



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Doctorado en Ciencias Biológicas

**Rol de las histidina cinasas en las respuestas reguladas por la
MAPK Tmk3 en *Trichoderma atroviride***

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

M. en C. Gabriela Calcáneo Hernández

Dirigida por:

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo
Presidente

Dr. Alfredo Herrera Estrella
Secretario

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Vocal

Dr. Fidel Landeros Jaime
Suplente

Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Enero, 2021
México

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

DEDICATORIAS

En memoria de Carolina Zárate García, por haberme señalado el camino a la ciencia.

Para mi abuela, la Sra. Ángela Pérez Jiménez, mi angelita.

Y para las personas que perdieron elementos valiosos en este año difícil
mientras yo escribía esta tesis.

No tengo ningún talento en especial, solo soy apasionadamente curioso.

— Einstein

Es nuestra luz, no nuestra oscuridad, lo que más nos asusta.

— Marianne Williamson

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Coordinación del Doctorado en Ciencias Biológicas por las facilidades prestadas.

Al Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo por haberme permitido realizar este proyecto en su laboratorio. Al Dr. José Antonio Cervantes Chávez, Dr. Fidel Landeros Jaime, Dr. Alfredo Herrera Estrella y Dra. Rosa Reyna Mouriño Pérez. Ha sido un honor para mí tenerlos en mi comité. Siempre estaré muy agradecida con ustedes.

A los compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular. A Eve, muchas gracias por tu ayuda. A Dani, eres una excelente persona y gran compañero de viaje. A Vic Javi, hold on and échale ganas. A Lupita, Jairito, Chava, Ceci y a los chicos del equipo Ustilago. Les deseo éxito a todos.

A los miembros del Departamento de Microbiología Experimental del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Disfruté mucho el mes de estancia en Ensenada. Gracias al Dr. Diego por su mucha, mucha paciencia. A la Dra. Olga y Marisela, estoy muy contenta de haberlas conocido.

A la Psic. Mariana y a los Doctores Olga, Fausto y Karina por el apoyo moral.

Acknowledgments to the anonymous reviewers of the Brazilian Journal of Microbiology where I published my first article, your comments were very constructive.

Agradezco a mi familia, a mis tres hermanos, a mi sobrina y amigos. A mi abuela por tanto, tanto amor y cariño. A mi madre, por su tiempo y las llamadas que hacían amenas mis momentos de soledad. A mi padre, por creer en mí.

A Lore, juntas por siempre.

A Alberto, por tu amable tiempo para mis dramas.

A los hermanos Caro y Pablo, si nos los hubiera conocido probablemente no hubiera llegado hasta aquí.

To Yuuki, for inspiring me to fly further.

ÍNDICE

PRÓLOGO.....	9
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	12
II. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Adaptación al estrés en hongos	13
2.2 <i>Trichoderma atroviride</i>	17
2.3 Una conexión entre las vías de MAPKs y la luz	19
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. HIPÓTESIS.....	21
V. OBJETIVOS	21
VI. CAPITULO 1: Validación de la cepa Ura ¹ como herramienta genética para el reemplazo de genes de respuesta a luz azul en <i>T. atroviride</i>	22
6.1 RESUMEN	23
6.2 INTRODUCCIÓN	25
6.3 MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.4 RESULTADOS.....	30
6.5 DISCUSIÓN	40
VII. CAPITULO 2: Localización celular de la MAPK Tmk3:mCherry en hifas de <i>Trichoderma atroviride</i>	43
7.1 RESUMEN	44
7.2 INTRODUCCIÓN	46
7.3 MATERIALES Y MÉTODOS	47
7.4 RESULTADOS.....	52
7.5 DISCUSIÓN	63

VIII. CAPITULO 3: Descifrando la participación de las histidina cinasas con dominios PAS y GAF en las respuestas al estrés celular y la luz azul de <i>Trichoderma atroviride</i>	69
8.1 RESUMEN	70
8.2 INTRODUCCIÓN	72
8.3 MATERIALES Y MÉTODOS	76
8.4 RESULTADOS	78
8.5 DISCUSIÓN	102
IX. CAPITULO 4: Papel de la HK Nik1 de <i>T. atroviride</i> en la regulación de genes quitina sintasa en respuesta a un estrés osmótico	110
9.1 RESUMEN	111
9.2 INTRODUCCIÓN	113
9.3 MATERIALES Y MÉTODOS	115
9.4 RESULTADOS	116
9.5 DISCUSIÓN	118
X. CONCLUSIONES GENERALES	121
XI. PERSPECTIVAS	121
XII. REFERENCIAS	122
XIII. ANEXOS	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de HK en hongos ascomicetos.	16
Figura 2. Amplificación de la región codificante del gen <i>pyr4</i> en las cepas Ura ⁻ de <i>T. atroviride</i>	31
Figura 3. Representación esquemática de las deleciones de <i>pyr4</i>	32
Figura 4. Deleción del gen <i>tmk3</i> e identificación de mutantes $\Delta tmk3$	34
Figura 5. Deleción del gen <i>pbs2</i> e identificación de mutantes $\Delta pbs2$	34
Figura 6. Validación del gen <i>pyr4</i> como marcador de selección para el reemplazo de genes de <i>T. atroviride</i>	35
Figura 7. Deleción del gen <i>blr1</i> e identificación de mutantes $\Delta blr1$	36
Figura 8. Deleción del gen <i>blr2</i> e identificación de mutantes $\Delta blr2$	37
Figura 9. Fenotipos de las cepas WT, $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$ de <i>T. atroviride</i>	38
Figura 10. Expresión de los genes de respuesta a luz azul en las cepas $\Delta pbs2$, $\Delta tmk3$, $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$	39
Figura 11. Construcción del casete knock-in para etiquetar la MAPK Tmk3 con el fluoróforo mCherry.	49
Figura 12. Respuesta de <i>T. atroviride</i> ante un estímulo de luz azul, verde, amarillo y rojo.	53
Figura 13. Expresión de genes regulados por luz ante un estímulo de luz azul, verde, amarillo y rojo.....	53
Figura 14. Construcción del casete para knock-in de Tmk3.	55
Figura 15. Análisis por PCR del reemplazo del gen <i>tmk3</i> por <i>tmk3</i> etiquetada con mCherry en cepas WT y Ura ⁻ 1.....	57
Figura 16. Análisis por RT-PCR del reemplazo de <i>tmk3</i> por <i>tmk3</i> etiquetada con mCherry en una cepa WT.....	57
Figura 17. Análisis por PCR del reemplazo del gen <i>tmk3</i> por un alelo etiquetado con mCherry en cepas $\Delta pbs2$ y $\Delta blr1$	59
Figura 18. Análisis por PCR de la deleción del gen <i>blr2</i> en la cepa Ura ⁻ 1:T3mCh..	60

Figura 19. Localización de la MAPK Tmk3 en hifas de la cepa Ura-1:T3mCh.....	61
Figura 20. La MAPK Tmk3 de <i>T. atroviride</i> se localiza en el citoplasma y en otros orgánulos.....	61
Figura 21. Localización de Tmk3 en respuesta al estímulo de luz blanca.	62
Figura 22. Localización de la MAPK Tmk3 en la cepa $\Delta blr2$:T3mCh.....	63
Figura 23. Ilustración esquemática de la construcción de un casete por PCR para reemplazar los genes HKs por el marcador <i>pyr4</i>	79
Figura 24. Casete para el reemplazo de los genes que codifican para histidina cinasas por el gen <i>pyr4</i>	80
Figura 25. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen <i>hk1a</i>	82
Figura 26. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen <i>hk2a</i>	83
Figura 27. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen <i>hk2b</i>	83
Figura 28. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen <i>hk4</i>	84
Figura 29. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen <i>hk5</i>	85
Figura 30. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen <i>hk9</i>	85
Figura 31. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen <i>hk10</i>	86
Figura 32. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen <i>hk11</i>	86
Figura 33. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen <i>sln1</i>	87
Figura 34. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk1a$	88
Figura 35. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk2b$	89
Figura 37. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk4$	90
Figura 37. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk5$	91
Figura 38. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk9$	92
Figura 39. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk10$	93

Figura 40. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas <i>Δhk11</i>	94
Figura 41. Tolerancia a estrés osmótico por NaCl y sorbitol en conidia de las mutantes carentes de HKs.....	95
Figura 42. Tolerancia a estrés osmótico por NaCl en micelio de las mutantes carentes de HKs.	96
Figura 43. Tolerancia a estrés osmótico por sorbitol en micelio de las mutantes carentes de HKs.	96
Figura 44. Tolerancia a estrés por rojo Congo en conidia de las mutantes carentes de HKs.	97
Figura 45. Tolerancia a estrés por rojo Congo en micelio de las mutantes carentes de HKs.	98
Figura 46. Tolerancia a estrés por cadmio en conidia de las mutantes carentes de HKs.	98
Figura 47. Tolerancia a estrés por cadmio en micelio de las mutantes carentes de HKs.....	99
Figura 48. Tolerancia a estrés oxidativo por H ₂ O ₂ en conidia de las mutantes carentes de HKs.	100
Figura 49. Tolerancia a estrés oxidativo por H ₂ O ₂ en micelio de las mutantes carentes de HKs.....	100
Figura 50. Análisis de expresión de genes dependientes de luz azul en mutantes carentes de HKs.	101
Figura 51. Análisis de la expresión de los genes que codifican para HKs en oscuridad y ante un estímulo de luz azul.	102
Figura 52. Análisis de expresión de genes en respuesta a un estrés osmótico...	116
Figura 53. Rol de la vía MAPK Tmk3 en la expresión de genes regulados por estrés osmótico.	117

PRÓLOGO

La presente tesis se encuentra dividida en cuatro capítulos que corresponden a los objetivos del proyecto. El primer capítulo consiste en los resultados de un sistema de transformación en *T. atroviride* sin el uso de antibióticos, publicado en la revista Brazilian Journal of Microbiology (PMID: 32627116). Este método de transformación nos permitió realizar más de 12 mutaciones de sitio dirigido en *T. atroviride* de forma eficiente y económica, además fue incluido en el artículo una metodología actualizada de los experimentos realizados en el laboratorio. En el segundo capítulo se presenta el diseño de un casete knock-in para etiquetar proteínas en *T. atroviride*. La herramienta nos permitió etiquetar la proteína MAPK Tmk3 con el fluoróforo mCherry y fue posible observar la proteína en vivo con los microscopios confocales en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, durante el mes de septiembre de 2019. En el tercer capítulo se muestran los resultados del análisis de la participación de las proteínas-histidina cinasas con dominios PAS/GAF en las respuestas a la luz azul y estrés celular de *T. atroviride*. Por último, el cuarto capítulo consiste en el análisis del rol de la histidina cinasa Nik1 en la regulación de los genes quitina sintasa y β -1,3-glucano sintasa en respuesta a un estrés osmótico regulada por la MAPK Tmk3 (por publicar).

RESUMEN

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso que actúa como agente de biocontrol contra hongos patógenos de plantas, sin embargo, es susceptible a estresores ambientales. Se publicó que la MAPK Tmk3, homóloga a Hog1 de levadura y p38 de mamíferos, regula la conidiación y diversas respuestas al estrés ambiental, y es la proteína central de una vía de señalización donde las histidina cinasas (HKs) forman parte de la transducción de señales. En este estudio, mediante la obtención de mutantes carentes de HKs usando la cepa auxótrofa a uracilo Ura⁻1 y el gen *pyr4* como marcador de selección, se evaluó la participación de Hk1a, Hk2b, Hk4, Hk5, Hk9, Hk10 y Hk11 en respuesta a la luz y estrés celular que son reguladas por la MAPK Tmk3. Los resultados mostraron que dependiendo del estímulo, las HKs actúan como represoras o activadoras. Hk9 y Hk11 regulan la fotoconidiación y Hk9 y Hk2b regulan el crecimiento micelial posiblemente a través de la MAPK Tmk3. Hk1a, Hk2b, Hk4 y Hk5 funcionan como represoras de la fotoconidiación, y Hk5 y Hk10 actúan como represoras del crecimiento filamentoso. Las cinasas Hk1a, Hk4, Hk5 y Hk10 también actúan como represoras para la tolerancia al estrés hiperosmótico. Se observó también que la MAPK Tmk3 regula la transcripción de las HKs. Por último, se evaluó la participación de la HK Nik1 en la regulación de genes que codifican para quitina sintasa (*chs*) en respuesta a un estrés osmótico y se observó que los genes *chs1*, *chs2* y *chs3* son regulados a través de Nik1, la MAPKK Pbs2 y la MAPK Tmk3. Para obtener más herramientas moleculares para el estudio de genes en *T. atroviride*, se diseñó un casete donde se etiquetó exitosamente a la MAPK Tmk3 con el fluoróforo mCherry y se observó en vivo que sin estrés, Tmk3 se encuentra presente en el citoplasma y en otros orgánulos. Con el colorante DAPI se corroboró que Tmk3 se localiza en el núcleo en respuesta a la luz. En general, las mutantes y las nuevas herramientas moleculares generadas aportaron más información sobre la biología de *T. atroviride*.

(Palabras clave: *Trichoderma atroviride*, histidina cinasa, estrés celular, conidiación, luz)

ABSTRACT

Trichoderma atroviride is a filamentous fungus, which acts as a biocontrol agent against plant pathogenic fungi. However, it is susceptible to environmental stressors. The MAPK Tmk3 of *T. atroviride*, homologous to yeast Hog1 and mammalian p38, regulates conidiation and environmental stressors, and is the central protein of a signaling pathway where histidine kinases (HK) participates in the signal transduction. In this study, by obtaining mutants lacking HKs using a uracil auxotrophic strain, Ura⁻1 and the *pyr4* gene as a selectable marker, the participation of Hk1a, Hk2b, Hk4, Hk5, Hk9, Hk10 y Hk11 in response to light and cellular stress was evaluated. Results showed that depending on the stimulus, the HKs act as repressors or activators. Hk9 and Hk11 regulate photoconidiation and Hk9 and Hk2b regulate mycelial growth, possibly through the MAPK Tmk3. Hk1a, Hk2b, Hk4 and Hk5 function as photoconidiation repressors, and Hk5 and Hk10 act as filamentous growth repressors. The kinases Hk1a, Hk4, Hk5, and Hk10 also act as repressors for hyperosmotic stress tolerance. It was also observed that the MAPK Tmk3 regulates the transcription of HKs. Finally, the participation of Nik1 HK in the regulation of genes that code for chitin synthase (*chs*) in response to osmotic stress was evaluated, and it was observed that *chs1*, *chs2* and *chs3* genes are regulated through Nik1, Pbs2 MAPKK and Tmk3 MAPK. To obtain more molecular tools for genetic analysis in *T. atroviride*, a cassette was designed where the MAPK Tmk3 was successfully tagged with mCherry, and it was observed *in vivo* that without stress, Tmk3 is present in the cytoplasm and in other organelles. With the DAPI dye, it was confirmed that Tmk3 is located in the nucleus in response to light. In general, the mutants and the new molecular tools provided more information of the biology of *T. atroviride*.

(Key words: *Trichoderma atroviride*, histidine kinase, cellular stress, light)

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En una célula eucariota, las vías de transducción de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) se activan en consecuencia a los cambios de las condiciones del medio ambiente. Las MAPKs son reguladores importantes de la tolerancia al estrés, el crecimiento celular y la diferenciación, sin embargo, también existe una conexión entre la vía de proteínas cinasas activadas por estrés y la luz (Esquivel-Naranjo et al., 2016; Yu et al., 2016; Lamb et al., 2011).

Trichoderma atroviride es un organismo que ha servido como un modelo de estudio de la reproducción asexual en hongos filamentosos por más de 60 años. Actualmente, en *T. atroviride* se estudia la relación entre la vía de la MAPK Tmk3, homóloga a Hog1 de *Saccharomyces cerevisiae*, y las respuestas a la luz. En hongos filamentosos, los homólogos a Hog1 son activados por el sistema regulador de dos componentes, el cual se compone de histidina cinasas, proteínas fosforelevos y reguladores de respuesta (Bahn, 2008). Por lo tanto, para tener un mejor conocimiento del mecanismo molecular de la conidiación inducida por luz regulado por la MAPK Tmk3, se explora el papel de las histidina cinasas en las respuestas a la luz y estrés celular reguladas por la MAPK Tmk3.

II. ANTECEDENTES

2.1 Adaptación al estrés en hongos

Los nichos ecológicos de los hongos son dinámicos, muestran fluctuaciones en parámetros locales como la temperatura, el equilibrio hídrico, el pH, los niveles de nutrientes y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Estas fluctuaciones a menudo son capaces de perturbar la homeostasis celular, imponiendo así estrés a la célula fúngica (Brown et al., 2017), y limitarlos en su crecimiento, reproducción y supervivencia. En respuesta, los hongos desarrollaron la capacidad de detectar y responder a diferentes estímulos ambientales para maximizar su estado físico (Francisco et al., 2019). Una de las estrategias que emplean los hongos para hacer frente a diversos estreses es cambiar su morfología. Por ejemplo, las hifas pueden ser la morfología más apropiada para cruzar las barreras físicas, colonizar el tejido del huésped y escapar de los ambientes dañinos generados por las defensas del huésped, mientras que los hongos levaduriformes pueden tener una mejor morfología para permitir la dispersión entre nichos o entre hospedadores y aumentar el tamaño de su población (Francisco et al., 2019).

Los hongos requieren respuestas robustas al estrés para sobrevivir en entornos cambiantes. Las respuestas celulares y moleculares al estrés involucran tanto fases críticas como adaptativas. Las respuestas críticas minimizan el daño causado por los efectos nocivos de un estrés. Las respuestas adaptativas generalmente promueven la restauración de la homeostasis celular con el fin de permitir el crecimiento del hongo en las nuevas condiciones (Nikolaou et al., 2009). La adaptación al estrés depende de tres principios fundamentales: la primera es la habilidad de detectar señales ambientales, la segunda es la habilidad de transducir esas señales para regular procesos celulares que intervienen en la adaptación al estrés, y la tercera representa las respuestas adaptativas que permiten a la célula sobrevivir al estrés (Brown et al., 2017).

En hongos se ha descubierto que varias cascadas de señalización están involucradas en las respuestas al estrés y la adaptación, incluida la vía de señalización de AMP cíclico (AMPC), la vía de señalización de Ca^{2+} /calcineurina, la proteína quinasa C (PKC)/Mpk1 (también conocida como Slt2), y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Bahn, 2008).

Las MAPKs son uno de los mecanismos más importantes para la percepción de la información extracelular. Cumplen importantes funciones en su fisiología y desarrollo como el control del ciclo celular, el apareamiento, la morfogénesis, la respuesta a diferentes tipos de estrés, la resistencia a la luz UV y a los cambios de temperatura, la formación e integridad de la pared celular, la degradación de los orgánulos, la virulencia, la señalización célula-célula, la interacción hongo-planta y la respuesta a patrones moleculares asociados con el daño (Martínez-Soto y Ruiz-Herrera, 2017).

2.1.1 Vías de señalización de las MAPK

Una vía de MAPK canónica se compone de tres proteínas cinasas activadas consecutivamente: MAPKKK (MAPK cinasa cinasa), MAPKK (MAPK cinasa) y MAPK. Los procesos de transducción de señales en los que se involucran las MAPKs comienzan con la detección de un estímulo ambiental por receptores o proteínas ancladas a la membrana celular, como el sistema regulador de dos componentes (TCS), receptores de tirosina cinasas (RTKs) o estructuras de múltiples proteínas como los eisosomas los cuales están unidos a los receptores heterotriméricos o monoméricos acoplados a proteínas G (Martínez-Soto y Ruiz-Herrera, 2017). Tras la activación, la MAPKKK fosforila dos residuos de serina o treonina en posiciones conservadas de la MAPKK. La MAPKK activada procede a fosforilar los residuos de treonina y tirosina de un motivo Thr-X-Tyr conservado en la MAPK (Chen y Thorner, 2007).

La levadura *S. cerevisiae* posee cinco vías de señalización MAPKs, los cuales son conocidos por regular el apareamiento (MAPKs Fus3 y Kss1), el

crecimiento invasivo (MAPK Kss1), la integridad de la pared celular (MAPK Slt2), la hiperosmorregulación (MAPK Hog1) y la formación de ascosporas (MAPK Smk1) (Hamel et al., 2012).

La vía de señalización de MAPK mejor estudiada es la que corresponde a la MAPK Hog1 de levadura que fue descubierta en 1993 por Brewster et al. A pesar de que Hog1 fue inicialmente estudiada en la levadura como un regulador al estrés osmótico, se ha encontrado que la MAPK Hog1 y sus homólogos en otros organismos regulan una amplia variedad de respuestas a diferentes estrés (Brewster y Gustin, 2014). La activación de la vía Hog1 de *S. cerevisiae* en respuesta al estrés osmótico comprenden dos vías funcionalmente redundantes pero diferentes entre sí: la vía de la MAPKKK Ste11 y la vía del sistema de dos componentes. Una señal recibida por cualquiera de las dos vías converge en una MAPKK en común, Pbs2, el cual es el activador específico de la MAPK Hog1. En una célula sin estrés, Hog1 se encuentra localizado en el citoplasma, sin embargo, al activarse, se transloca al núcleo donde modula la actividad del factor de transcripción por fosforilación, se localiza con el complejo de ARN polimerasa II en varios promotores y mejora la exportación nuclear de transcripciones de genes de respuesta al estrés (Ferrigno, 1998; Saito y Posas, 2012).

2.1.1.1 Vía del sistema regulador de dos componentes

La vía de MAPK Hog1 se comprende de dos módulos, una compuesta por los tres niveles de MAPKs y la otra por el TCS, integrado por histidina cinasas sensoras híbridas, proteínas de fosfotransferencia que contienen histidina (HPt) y reguladores de respuesta, los cuales detectan y transmiten señales ambientales para activar la vía MAPK Hog1 (Bahn, 2008). El sistema de señalización de histidina cinasas (HK) de dos componentes es un mecanismo importante por el cual algunos organismos detectan y se adaptan a su entorno. Las HKs están implicadas en la regulación de diversos procesos, incluida la diferenciación, la quimiotaxis, la

producción de metabolitos secundarios y la virulencia en patógenos de plantas y animales (Catlett et al., 2003).

La primera HK caracterizada fue Sln1 de *S. cerevisiae* (Maeda et al., 1994). La levadura *S. cerevisiae* posee solo una HK en su genoma, no obstante, otros hongos patógenos como *Cochliobolus heterostrophus* poseen en su genoma 21 genes que codifican para HKs (Catlett et al., 2003).

Usualmente las HKs de hongos tienen dominios HisKA y receptor (REC) que son sitios para la fosfotransferencia intraproteica entre residuos de histidina y aspartato conservados, respectivamente, y un dominio HATPasa_c requerido para la unión de ATP, lo que sugiere que las HKs pueden ser parte de múltiples eventos de fosfoaceptor y fosfodonador (Li et al., 2010). Además, se encuentran una variedad de otros dominios sensores, los cuales dependiendo de su dominio sensor, fueron clasificados en once grupos de HKs (Fig. 1) (Catlett et al., 2003).

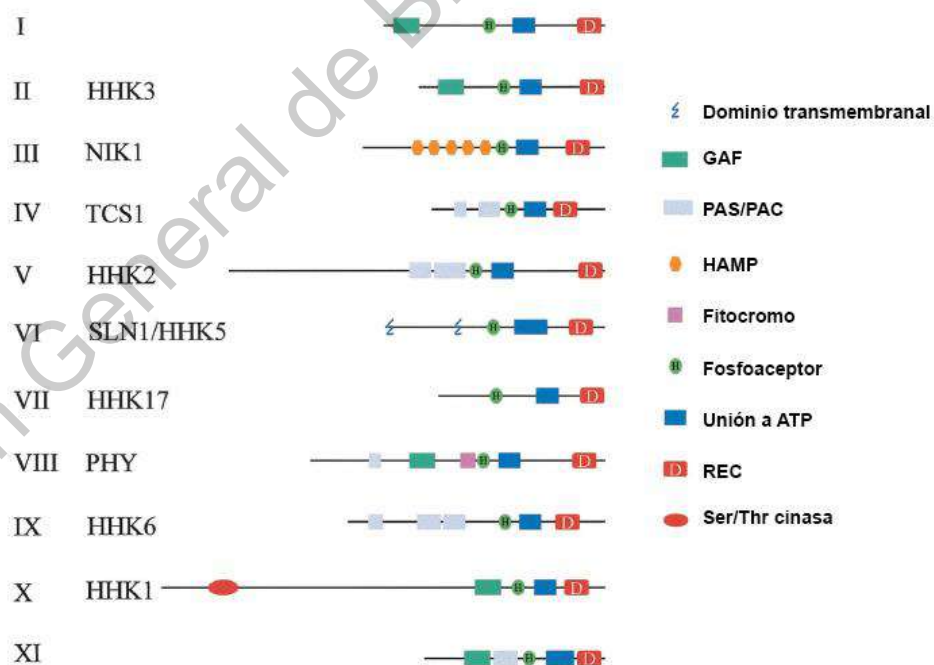


Figura 1. Clasificación de HK en hongos ascomicetos. Imagen a escala de la estructura del dominio para una proteína representativa de cada grupo de HK. Modificado de Catlett et al. (2003).

Los de la clase I y II son parecidos entre sí, ambas poseen un dominio GAF. Tanto los dominios GAF como PAS son dominios versátiles de unión a ligando. Los dominios GAF se unen a GMP cíclicos y cromóforos. Las HKs de la clase III poseen repetidos del dominio HAMP. Los dominios HAMP se encuentran en proteínas relacionadas con la señalización, incluidas las HKs, las adenilil ciclasas, las proteínas de quimiotaxis que aceptan metilo y las fosfatasas. Las HKs de la clase IV, V y IX poseen dominios PAS, solo difieren en tamaño. Las únicas HKs que poseen dominios transmembranales pertenecen a la clase VI. Las HKs que no poseen dominio sensor fueron agrupados en la clase VII. Las HKs de la clase VIII son los que poseen dominio fitocromo, además de un dominio GAF y PAS. Los de la clase X son HKs de tamaño grande que poseen un dominio GAF y un dominio de serina/treonina cinasa. Por último, las HKs de la clase XI poseen un dominio GAF y uno PAS (Catlett et al., 2003).

2.2 *Trichoderma atroviride*

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso común del suelo, ampliamente utilizado como un agente de control biológico, debido a su capacidad para parasitar hongos fitopatógenos de importancia agrícola. Se ha demostrado que su reproducción asexual (conidiación) está estrechamente regulada por la luz y la disponibilidad de nutrientes. Un pulso de luz azul/UV-A induce la producción de conidias, formando un anillo en el perímetro de la colonia donde se recibió el estímulo (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007).

2.2.1 Confrontación al estrés celular a través de la MAPK Tmk3 en *T. atroviride*

Los miembros del género *Trichoderma* tienen una distribución cosmopolita, se pueden encontrar en diversos hábitats ecológicos como el suelo, la madera en descomposición y la rizósfera (Wang y Zhuang, 2020). Además son usados en la agricultura para el biocontrol de enfermedades de las plantas (Steyaert et al., 2010). Por lo anterior, *T. atroviride* se ve expuesto a diferentes estreses abióticos, como la limitación de agua, salinidad y temperaturas extremas (Poveda, 2020). Para los

microorganismos, un medio ambiente desfavorable representa un estrés (Bahn, 2008). Sin embargo, *T. atroviride* posee la vía de señalización MAPK Tmk3 para regular las respuestas a insultos ambientales (Esquivel-Naranjo et al., 2016).

Las respuestas al estrés hiperosmótico y oxidativo, toxicidad por metales pesados, daño al ADN, mantenimiento de la integridad de la pared celular y reproducción asexual son regulados por Tmk3 en *T. atroviride* (Esquivel-Naranjo et al., 2016). También se relacionó a la MAPK Tmk3 como un regulador de genes de respuesta a luz en conjunto con los fotorreceptores de luz azul Blr1/Blr2 (Esquivel-Naranjo et al., 2016).

2.2.2 Percepción de la luz azul y la transducción de señales en *T. atroviride*

En *T. atroviride*, la luz regula la producción de conidias (fotoconidiación), crecimiento y metabolismo (Casas-Flores et al., 2004). Estas respuestas son reguladas por un fotorreceptor de luz azul/UV-A formado por las proteínas Blr1/Blr2, homólogos a las proteínas White-Collar de *Neurospora crassa*, las cuales actúan como un factor de transcripción regulable por la luz azul. La luz azul promueve tanto la inducción como la represión de genes regulados por al menos dos sistemas de percepción de luz: uno actuando a través del fotorreceptor Blr1/Blr2 y otro por un sistema de percepción aún no identificado (Rosales-Saavedra et al., 2006). El fotorreceptor Blr1 tiene un dominio de unión a ADN y tres dominios PAS. El primer dominio PAS es considerado un dominio sensorial LOV, que contiene todos los aminoácidos necesarios para interactuar con el cromóforo FAD, incluyendo la cisteína que forma un fotoaducto con la flavina. Ambas proteínas, Blr1 y Blr2, son esenciales para la fotoconidiación y la expresión de genes regulados por la luz azul (Rosales-Saavedra et al., 2006).

Se identificó en *Trichoderma reesei* un segundo fotorreceptor de luz azul, Envoy, el ortólogo a Vvd de *N. crassa*. Envoy es una proteína que contiene un solo dominio PAS/LOV, codificado también en el genoma de *T. atroviride*. En la oscuridad, el gen correspondiente (*env1*) es transcrito en niveles poco detectables,

pero en luz, los niveles de transcrito incrementan hasta 500 veces, y de forma dependiente del complejo fotorreceptor Blr1/Blr2 (Castellanos et al., 2010).

Se ha relacionado a la vía de señalización del AMP cíclico en fotoconidiación (Berrocal-Tito et al., 2000; Casas-Flores, 2004), y a la vía de señalización de MAPKs en las respuestas a la luz. Se ha observado que una mutante carente en la MAPK Tmk3 en *T. atroviride* muestra una reducción del 80 % en la producción de conidia estimulada por la luz blanca constante (Esquivel-Naranjo et al., 2016). Datos preliminares muestran que la vía de dos componentes activa a Tmk3 por luz, a través del regulador de respuesta Ssk1 y la MAPKKK Ssk2 (Gómez-May, 2018), sin embargo, aún se desconoce el receptor o los receptores de luz azul que activan a Tmk3.

2.3 Una conexión entre las vías de MAPKs y la luz

Conocer la relación entre la luz y la vía de MAPK responsiva a estrés, es de vital importancia para entender cómo los defectos en los ritmos circadianos, y los defectos en las vías de MAPKs, causan enfermedades similares en humanos, incluyendo disfunciones en el sistema inmune, enfermedades en el corazón, desórdenes degenerativos y cáncer (Lamb et al., 2011). En *T. atroviride*, la MAPK Tmk3, homóloga a la MAPK Hog1 de *S. cerevisiae*, se activa a los cinco minutos de recibir el estímulo de luz azul, y regula la inducción y represión de genes dependientes de luz azul, en colaboración con el fotorreceptor Blr1 (Esquivel-Naranjo et al., 2016). En *N. crassa*, el reloj circadiano controla los ritmos de la activación de la MAPK Os-2, homóloga a la MAPK Hog1 de *S. cerevisiae*, para preparar a la célula del estrés durante el día (Lamb et al., 2011). En *A. nidulans*, la MAPK SakA, homóloga a Hog1, se activa no solo ante una respuesta al estrés osmótico, sino también al estímulo de luz; en ausencia de la HK FphA, la MAPK SakA aún responde al estrés osmótico, pero no a la luz (Yu et al., 2016).

III. JUSTIFICACIÓN

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso, de importancia potencial para la biotecnología, y usado como un organismo modelo para entender las respuestas al estrés ambiental y la fotoconidiación. Su comercialización se basa en la producción de conidia, por lo tanto, entender los mecanismos moleculares implicados en la conidiación de *T. atroviride* podría proporcionar beneficios para su uso como agente de biocontrol. Previamente se determinó que la MAPK Tmk3 regula una amplia gama de respuestas al estrés ambiental y la conidiación estimulada por la luz azul, de modo que la vía de dos componentes podría participar en la transducción de las señales extracelulares a través de Tmk3. Se plantea esta investigación para comprender la participación de las histidina cinasas que forman parte de la vía de dos componentes, como posibles receptores y activadores de la vía de señalización MAPK Tmk3 en *T. atroviride*.

IV. HIPÓTESIS

Las histidina cinasas forman parte del sistema de dos componentes que regula la vía de señalización de la MAPK Tmk3 en *T. atroviride*, implicada en la activación de los genes de respuesta a la luz azul, conidiación y resistencia al estrés.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de las histidina cinasas en las respuestas a estímulos ambientales mediadas por la MAPK Tmk3 en *Trichoderma atroviride*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar el uso de la cepa Ura⁻1 como herramienta genética para el reemplazo de genes de respuesta a luz azul en *T. atroviride*
2. Determinar la localización celular de Tmk3 ante un estímulo de luz azul
3. Determinar la participación de las histidina cinasas con dominios PAS/GAF en las respuestas al estrés celular y la activación por luz azul de los genes dependientes de Tmk3 en *T. atroviride*
4. Analizar la participación de la histidina cinasa Nik1 en la regulación de genes de pared celular en respuesta a un estrés osmótico

VI. CAPITULO 1:

Validación de la cepa Ura⁻1 como herramienta genética para el reemplazo de genes de respuesta a luz azul en *T. atroviride*

Gabriela Calcáneo-Hernández, Erick Rojas-Espinosa, Fidel Landeros-Jaime, José Antonio Cervantes-Chávez, Edgardo Ulises Esquivel-Naranjo

Revista Brazilian Journal of Microbiology

doi.org/10.1007/s42770-020-00329-7

6.1 RESUMEN

El desarrollo de un sistema de transformación eficiente es esencial para enriquecer el conocimiento de la biología de *Trichoderma atroviride*. Para implementar un nuevo método de obtención de cepas mutantes de *T. atroviride*, la cepa auxótrofa a uracilo Ura⁻1, el cual posee una versión trunca de 351 aminoácidos del gen *pyr4*, fue utilizada como un fondo genético para eliminar la MAPK Tmk3, MAPKK Pbs2 y los receptores de luz azul Blr1/Blr2. Los genes *tmk3*, *pbs2*, *blr1* y *blr2* fueron reemplazados por una versión corta del gen *pyr4* como marcador homólogo. Las mutantes $\Delta tmk3$ y $\Delta pbs2$ seleccionadas con el marcador *pyr4* fueron comparadas por fenotipo con las mutantes $\Delta tmk3$ y $\Delta pbs2$ seleccionadas por su resistencia a higromicina B. Todas las mutantes fueron característicamente idénticas, muy sensibles a los diferentes factores estresantes y afectadas en la fotoconidiación. Las mutantes $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$ seleccionadas con *pyr4* no respondieron al estímulo de la luz, pero fueron capaces de conidiar en respuesta a un daño mecánico. La complementación de la biosíntesis de uracilo no interfirió en la expresión de los genes *blu1*, *grg2*, *phr1* y *env1* regulados por la luz azul. En general, el metabolismo del uracilo puede usarse como una herramienta para la manipulación genética en *T. atroviride*.

(Palabras clave: auxotrofía, marcador de selección, esporulación, estrés celular, respuesta a la luz)

ABSTRACT

The development of an efficient transformation system is essential to enrich the genetic understanding of *Trichoderma atroviride*. To implement a new method to generate *T. atroviride* mutant strains, the Ura⁻1 uracil auxotroph strain, which codes for a truncated *pyr4* gene of 351 amino acids, was used as a genetic background to knock out the MAPKK Pbs2, MAPK Tmk3, and the blue light receptors Blr1/Blr2. The *tmk3*, *pbs2*, *blr1*, and *blr2* genes were replaced by a short version of *pyr4* as a homologous marker. The $\Delta tmk3$ and $\Delta pbs2$ mutants selected with *pyr4* were phenotypically compared with $\Delta tmk3$ and $\Delta pbs2$ mutants selected by resistance to hygromycin B. All mutants were characteristically identical, highly sensitive to different stressors, and affected in photoconidiation. The $\Delta blr1$ and $\Delta blr2$ mutants selected with *pyr4* were not responsive to light, but they were able to conidiate in response to wound. The complementation of uracil biosynthesis did not interfere in the expression of *blu1*, *grg2*, *phr1*, and *env1* genes upregulated by blue light. Overall, uracil metabolism can be used as a tool for genetic manipulation in *T. atroviride*.

(Key words: auxotrophy, selectable marker, sporulation, cellular stress, light response)

6.2 INTRODUCCIÓN

Especies de hongos ascomicetos y basidiomicetos son agentes causantes de enfermedades en una amplia variedad de cultivos, y aunque el manejo moderno de cultivos puede controlarlos, existe un alto riesgo de desarrollar resistencia a los fungicidas (Braun et al., 2018; Heitman et al., 2017). Como alternativa, *Trichoderma* spp. se utilizan como biofungicidas y biofertilizantes para mejorar la calidad y la producción de los cultivos, reduciendo así el uso de agroquímicos (Guzmán-Guzmán et al., 2019; Lee et al., 2016). Sin embargo, los efectos de los hongos como control biológico pueden ser lentos en comparación con el control químico. Por esta razón, tener un mejor conocimiento de la biología de *Trichoderma* spp. podría mejorar su aplicación biotecnológica.

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso antagonista de hongos fitopatógenos. Su capacidad micoparásita se le atribuye por su competencia por los nutrientes, su producción de enzimas que degradan la pared celular y la antibiosis (Guzmán-Guzmán et al., 2019; Brunner et al., 2005). Además, es considerado como un modelo excelente para comprender la reproducción asexual, así como las respuestas a la luz y al daño (Esquivel-Naranjo et al., 2016; Medina-Castellanos et al., 2014; Steyaert et al., 2010). Por lo anterior, es necesario desarrollar nuevas estrategias efectivas para el estudio de genes en *T. atroviride*, con el fin de expandir su aplicación industrial y agrícola.

El uso de antibióticos para la selección de mutantes, incluidos los fungicidas, es costoso e interfiere con la función regular del gen objetivo (Narasipura et al., 2006; Pronk, 2002). Una forma de evitar el uso de antibióticos es generar mutantes auxótrofos como herramienta genética, en la que el mismo gen afectado se utiliza como un marcador de selección, y su manipulación es asequible (Pronk, 2002). Se ha publicado anteriormente sobre cepas auxótrofas de otras especies de *Trichoderma*. El gen *arg2*, que codifica la pequeña subunidad de la carbamoil-fosfato sintasa I, se aisló y se utilizó para complementar una cepa auxótrofa a

arginina en *Trichoderma virens* (Baek y Kenerley, 1998). En *T. reesei*, el gen *argB* de *Aspergillus nidulans* pudo restaurar la síntesis de arginina (Penttilä et al., 1987). Las auxótrofas a adenina de *T. reesei* que carecen del gen *ade2*, que codifica para una fosforribosil aminoimidazol carboxilasa necesaria para la producción de purinas, fueron fácilmente detectables mediante la selección de colonias rojas (Jørgensen et al., 2014). En *T. reesei* y *Trichoderma hypoxylon*, las auxótrofas a uracilo seleccionados por su resistencia al ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) se utilizaron con éxito como una herramienta genética para la alteración de un solo gen (Liu et al., 2018; Schuster et al., 2012; Gruber et al., 1990).

El análogo de pirimidina 5-FOA es usado comúnmente para la selección positiva de mutantes auxótrofas a uracilo, el cual es catalizado por una orotato fosforribosiltransferasa (OPRTasa) y orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa (OMP descarboxilasa) para obtener 5-fluorouridina monofosfato (5-FUMP) y 5-fluorouracilo (5-FU) (Atomi et al., 2012). El 5-FU inhibe la actividad de la timidilato sintasa, conduciendo a la disminución de timina en las células y repercutiendo en la síntesis de ADN (Atomi et al., 2012; Matuo et al., 2010; Wyatt y Wilson, 2009). Por lo tanto, las mutantes deficientes en OPRTasa o OMP descarboxilasa, esenciales para la síntesis de uracilo, pueden crecer en medios con 5-FOA suplementado con uridina/uracilo, mientras que 5-FOA produce un efecto tóxico en las cepas silvestres, facilitando así la selección de cepas auxótrofas (Razanamparany y Bégueret, 1986; Boeke et al., 1984).

Con el fin de obtener un sistema de transformación efectivo y económico en *T. atroviride*, se generaron cepas auxótrofas a uracilo incapaces de crecer en medios deficientes de uracilo. Los resultados fisiológicos y moleculares indican que el gen *pyr4* se puede usar como marcador de selección en un fondo auxótrofo a uracilo. En una cepa auxótrofa a uracilo Ura⁻¹, se reemplazaron de manera efectiva cuatro genes diferentes relacionados con el estrés y las respuestas a la luz, y las mutantes mostraron fenotipos similares en comparación con las mutantes seleccionadas con el marcador *hph* (higromicina-B-fosfotransferasa).

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizaron las cepas enlistadas en la tabla 1. Todas las cepas fueron propagadas en medios papa-dextrosa-agar (PDA), las cepas Ura⁻ se propagaron en medios PDA adicionadas con 5 mM uracilo, e incubadas a 27 °C. Los medios de cultivo que se utilizaron fueron previamente esterilizados en una autoclave a 15 psi durante 15 min y la manipulación de los hongos se realizó bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

Tabla 1. Cepas utilizadas

<i>T. atroviride</i>		
Cepa	Genotipo	Referencia
Silvestre (WT) IMI206040		
Ura ⁻ 1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10	Ura ⁻	Este estudio
$\Delta tmk3$ -2, -4, -6, -11, -12, -16, -18, -20	$\Delta tmk3::pyr4$	Este estudio
$\Delta pbs2$ -5, -15, -18	$\Delta bs2::pyr4$	Este estudio
$\Delta blr1$ -5, -7, -14, -16, -17, -18, -19, -20	$\Delta blr1::pyr4$	Este estudio
$\Delta blr2$ -2, -5, -9, -10, -13, -14, -15, -16, -17, -18	$\Delta blr2::pyr4$	Este estudio
$\Delta tmk3$ -13	$\Delta tmk3::hph$	Esquivel-Naranjo et al., 2016
$\Delta pbs2$ -7	$\Delta pbs2::hph$	Esquivel-Naranjo et al., 2016

Aislamiento de protoplastos

A partir de micelio de *T. atroviride* previamente incubado por 18 h a 27 °C en condiciones de agitación constante, se filtró el micelio, y los protoplastos se aislaron en base a la metodología descrita en Anexo 1.

Transformación de protoplastos por el método de polietilenglicol (PEG)-CaCl₂

La transformación de protoplastos y la selección de mutantes se llevaron a cabo en base al método descrito en Anexo 1. Los cultivos fueron incubados a 27 °C durante 4-6 días.

El gen *pyr4* como marcador de selección para el reemplazo de genes

Con el objetivo de probar la cepas auxótrofas a uracilo de *T. atroviride* como una herramienta genética, se generaron casetes knockouts para reemplazar los genes *tmk3*, *pbs2*, *blr1* y *blr2* por el gen *pyr4*, y la cepa Ura⁻1 se utilizó como cepa parental. En un primer PCR, se amplificaron las regiones flanqueantes 5' y 3' de *tmk3* usando los pares de oligonucleótidos Ptmk3-F — pPQtmk3-R y pTQtmk3-F — Ttmk3-R, oligonucleótidos Ppbs2-F — pPQpbs2-R y pTQpbs2-F — Tpbs2-R para *pbs2*, oligonucleótidos Pblr1-F — pPQblr1-R y pTQblr1-F — Tblr1-R para *blr1*, y oligonucleótidos Pblr2-F — pPQblr2-R y pTQblr2-F — Tblr2-R para *blr2*. Las secuencias de los oligonucleótidos se encuentran enlistadas en Anexo 2. Los oligonucleótidos smPyr4-F — smPyr4-R fueron usados para amplificar un fragmento de 1247 pb del gen *pyr4*. En un segundo PCR, las regiones 5' y 3' de cada gen fueron unidos al gen *pyr4* por complementariedad. En un tercer PCR, los casetes fueron amplificados usando los oligonucleótidos anidados N5tmk3-F — N3tmk3-R para *tmk3*, N5pbs2-F — N3pbs2-R para *pbs2*, N5blr1-F — N3blr1-R para *blr1*, y N5blr2-F — N3blr2-R para *blr2*, y la transformación se realizó siguiendo la metodología descrita en Anexo 1. Medios PDA con 1 M sorbitol fueron usados como medios de selección. El reemplazo de los genes se determinó por PCR. La extracción de ADN se realizó según el método de Raeder y Broda (1985) descrita en Anexo 1. La enzima polimerasa DreamTaq DNA Polymerase se usó en las reacciones de PCR y las condiciones fueron las siguientes: el primer paso a 95 °C por 3 min, después 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 1 min por kb, y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Ensayos de estrés celular

Gotas de 500 conidia de las cepas WT, $\Delta pbs2$ y $\Delta tmk3$ fueron colocadas en placas de PDA con 0.5 % Triton X-100 más KCl (0, 50 y 100 mM) para los ensayos de estrés osmótico; para los ensayos de tolerancia a metales pesados, cadmio (0, 400, y 800 mM CdCl₂); menadiona (0, 200 y 400 mM) para los ensayos de estrés

oxidativo; o rojo Congo (0, 50 y 100 mM) para evaluar la integridad de la pared celular. Para el análisis de la respuesta al estrés osmótico en micelio, se generaron precultivos en medios PDA inoculando 2 µl de una suspensión de conidia (1×10^8 conidia/ml) de las cepas WT, $\Delta pbs2$ y $\Delta tmk3$, e incubadas durante 40 h a 27 °C en condiciones de oscuridad. Después, discos de micelio de los precultivos se inocularon sobre placas de PDA con NaCl (0 y 0.2 M) para observar la tolerancia de las cepas al estrés osmótico. Las cepas fueron incubadas a 27°C durante 4 días. El experimento se realizó por triplicado.

Análisis de conidiación inducida por luz y daño

Los ensayos de respuesta a la luz de la cepa WT y cepas mutantes se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita en Anexo 1.

Análisis de la expresión de genes.

Se determinó la expresión de los genes *blu1*, *grg2*, *env1* y *phr1* en la cepa WT y las cepas mutantes $\Delta pbs2:pyr4$, $\Delta pbs2:hph$, $\Delta tmk3:pyr4$, $\Delta tmk3:hph$, $\Delta blr1:pyr4$ y $\Delta blr2:pyr4$. Las cepas fueron expuestas a luz azul durante 30 min ($914.4 \mu\text{mol m}^{-2}$), posteriormente se colectó el micelio y se extrajo el ARN. Como control se extrajo ARN total de cepas mantenidas en oscuridad. Para la extracción de ARN se usó TRIzol® Reagent (Invitrogen) siguiendo la metodología descrita en Anexo 1. El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado con la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se usó 1 µl de ADNc como templado para estimar los niveles de transcrito de los genes regulados por luz. Para las reacciones de PCR, se usaron los oligonucleótidos enlistados en Anexo 2, la enzima DreamTaq DNA Polymerase, y las condiciones para la reacción de PCR fueron las siguientes: el primer paso a 95 °C por 3 min, después 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 1 min por kb, y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y las gráficas fueron hechos con el programa GraphPad Prism (versión 5). Las gráficas muestran el promedio de tres experimentos diferentes, y la desviación estándar es indicada. Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de Tukey-Kramer.

6.4 RESULTADOS

Análisis funcional del gen *pyr4* de *T. atroviride* que codifica para una OMP descarboxilasa

En la base de datos de *T. atroviride* (mycocosm.jgi.doe.gov; Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute) se identificó el gen *pyr4* (Ta_297716) que codifica para una OMP descarboxilasa de 379 aminoácidos (1140 pb), con porcentaje de identidad del 91.6 %, 67.3 %, 56.0 % y 46.0 % en contraste con las OMP descarboxilasas de *T. reesei* (ETS06629.1), *N. crassa* (CAD21085.1), *A. nidulans* (AAB66359.1), y *S. cerevisiae* (AAB64498.1), respectivamente. Al igual que los homólogos de *pyr4* en *T. reesei* y *N. crassa*, el gen *pyr4* de *T. atroviride* no posee intrones, desemejante a *pyrG* de *A. nidulans* y *Aspergillus niger*, los cuales poseen dos intrones (Heidenreich y Kubicek, 1994), sugiriendo que *T. atroviride* está más estrechamente relacionado con *N. crassa* que con las dos especies de *Aspergillus*.

Análisis de las cepas auxótrofas a uracilo seleccionadas en medio 5-FOA

Diez cepas auxótrofas a uracilo Ura⁻ fueron generadas por Erick Rojas-Espinosa en base a una selección positiva con 0.5 mg/ml 5-FOA. El crecimiento de las auxótrofas en medios PDA más uracilo 5 mM fue estable y comparable con la cepa WT, sugiriendo que las cepas pueden usarse de forma segura como fondo genético. Posteriormente, se recogió micelio de las diez cepas Ura⁻ para la extracción de ADN y amplificación de la región codificante del gen *pyr4*.

Inesperadamente, cuando se amplificó *pyr4* para corroborar su delección, en seis cepas auxótrofas se amplificó un fragmento con tamaño similar al fragmento amplificado en el templado de la cepa WT (cepas Ura⁻2, -3, -5, -6, -7, -8, -9), mientras que en cuatro cepas (cepas Ura⁻1, Ura⁻4, Ura⁻9, y Ura⁻10) se amplificó un fragmento de menor peso en comparación a la cepa WT (Fig. 2).

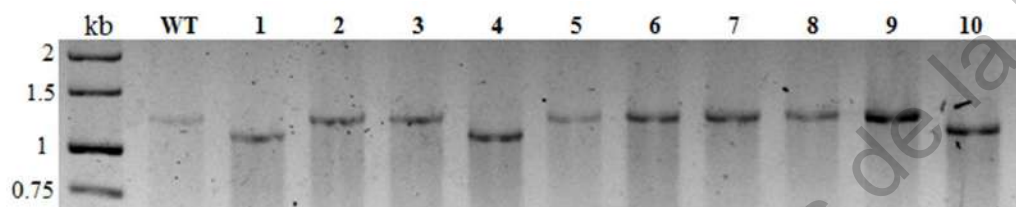


Figura 2. Amplificación de la región codificante del gen *pyr4* en las cepas Ura⁻ de *T. atroviride*. Se utilizaron los oligonucleótidos smPyr4-F — smpyr4-R para amplificar un fragmento de 1.2 kb que comprende el ORF (marco de lectura abierto) completo de *pyr4*. Se usó como templado el ADN total de las cepas WT y Ura⁻1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9 y -10. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: Primer paso a 95 °C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C por 30 s, a 60°C por 30s, a 72 °C por 1 min/kb, un paso final a 72 °C por 5 min.

Con el fin de identificar posibles mutaciones en la región codificante del gen *pyr4* en las cepas Ura⁻, se usaron los oligonucleótidos smPyr4-F — smpyr4-R para amplificar *pyr4*. El amplicón se purificó (QIAquick PCR Purification Kit; QIAGEN), y se secuenciaron (Área de servicios genómicos Langebio-Cinvestav). Como se esperaba, los amplicones de las cepas Ura⁻2, -3, -5, -6 y -7 no mostraron cambios en las secuencias de nucleótidos de *pyr4*, siendo idénticos a la cepa WT. Las cepas Ura⁻1, -4 y -10 tuvieron una delección de 139 pb, y la cepa Ura⁻9 una delección de 23 pb en las posiciones 928 pb y 997 pb, respectivamente, considerando el codón de inicio como la posición 1 pb (Fig. 3).

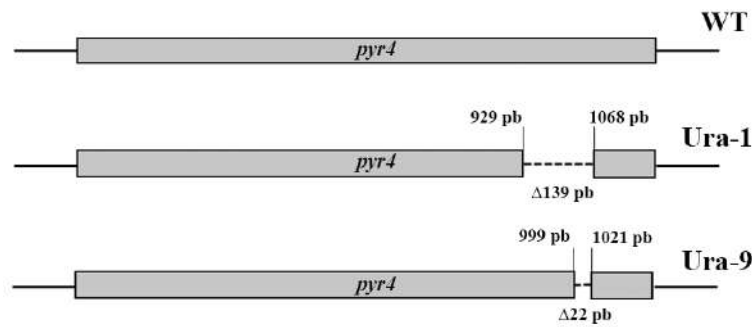


Figura 3. Representación esquemática de las delecciones de *pyr4*. Las delecciones de *pyr4* en las cepas Ura⁻¹ y Ura⁻⁹, y sus posiciones, fueron determinadas mediante un alineamiento de las secuencias de nucleótidos. Para el análisis se usó el programa MegAlign (DNASTAR; versión 7.1.0) por el método Clustal V.

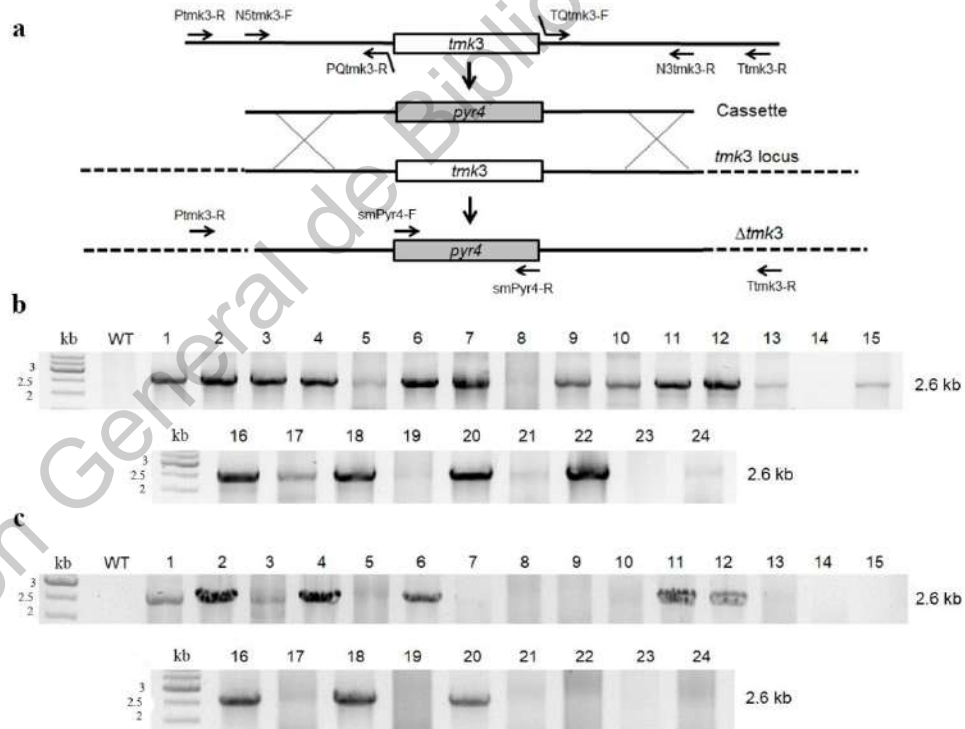
La delección causó un cambio en el marco de lectura, donde las cepas Ura⁻¹, -4 y -10 codificaron para un polipéptido de 351 amino ácidos, de los cuales 309 amino ácidos eran idénticos a *pyr4* de la cepa WT, y la cepa Ura⁻⁹ codificó para un polipéptido de 345 amino ácidos de los cuales 334 eran idénticos a la cepa WT (Anexo 4). Por lo tanto, las cepas Ura⁻¹, -4, -9 y -10 produjeron cepas auxotróficas que mostraron al menos dos mutaciones diferentes. Los resultados sugieren que 5-FOA podría ser un agente mutagénico que promueve la inestabilidad genómica. Además, los datos muestran que los últimos 45 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de Pyr4 son esenciales para la biosíntesis de uracilo.

Delección de los genes *tmk3* y *pbs2* usando *pyr4* como marcador de selección

Para evaluar si las auxótrofas a uracilo de *T. atroviride* se pueden utilizar como herramienta genética para el reemplazo de genes, se diseñaron casetes para sustituir los genes *tmk3* y *pbs2* por el gen *pyr4*. Los genes *tmk3* y *pbs2* codifican para la MAPK Tmk3 y la MAPKK Pbs2, respectivamente, cinasas relacionadas con la luz y las respuestas al estrés (Esquivel-Naranjo et al., 2016), los cuales fueron seleccionados para comparar nuestros resultados con los publicados anteriormente (mutantes $\Delta tmk3$ -13:*hph* y $\Delta pbs2$ -7:*hph*). Como fondo genético, se eligió la cepa Ura⁻¹ porque el truncamiento de *pyr4* es mayor en comparación a la cepa Ura⁻⁹,

pudiendo favorecer las mutaciones dirigidas y evitar el reemplazo de genes en el locus de *pyr4*.

Para construir los casetes de delección, se amplificó el ORF de *pyr4* con los oligonucleótidos smPyr4-F y smPyr4-R, generando un marcador seleccionable de 1247 pb. Posteriormente, el marcador *pyr4* se posicionó bajo el promotor y terminador de los genes a eliminar. La transformación se llevó a cabo. Se seleccionaron las cepas transformantes en medios PDA sin uracilo, luego se les aplicó tres pases monospóricos, y por PCR se determinó que ocho de 24 transformantes (33,3%) resultaron ser mutantes que carecían del gen *tmk3* (Fig. 4), y tres de 20 transformantes (15%) fueron mutantes Δ *pbs2:pyr4* (Fig. 5).



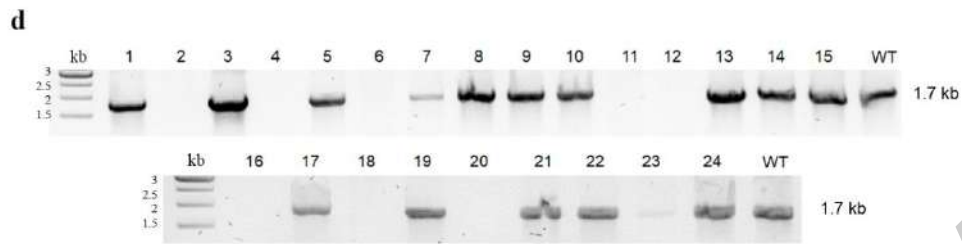


Figura 4. Delección del gen *tmk3* e identificación de mutantes $\Delta tmk3$. **a** Esquema del reemplazo de *tmk3* por el marcador de selección *pyr4*. Las regiones flanqueantes 5' y 3' se amplificaron utilizando los oligonucleótidos Ptmk3-F – PQtmk3-R y TQtmk3-F – Ttmk3-R, respectivamente. El gen *pyr4* se amplificó usando los oligonucleótidos smPyr4-F – smPyr4-R. En una segunda reacción de PCR, los tres fragmentos se unieron mediante secuencias quiméricas. En un tercer PCR, el casete de reemplazo se amplificó utilizando los oligonucleótidos N5tmk3-F – N3tmk3-R. Finalmente, el amplicón se utilizó directamente para la transformación de protoplastos. **b-c** PCR para confirmar el reemplazo de *tmk3*. Las mutantes se identificaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Ptmk3-F – smPyr4-R para amplificar la región 5'- gen *pyr4* (**b**) o *pyr4* - región 3' (oligonucleótidos smPyr4-F – Ttmk3-R) (**c**). En ambos casos se amplificó un fragmento de 2.6 kb. **d** PCR para amplificar la región codificante de *tmk3*. Los oligonucleótidos tmk3-F – tmk3-R amplificaron un fragmento de 1.7 kb del ORF de *tmk3* en cepas WT y cepas no mutantes. Las condiciones de PCR fueron como las descritas en la Fig. 2.

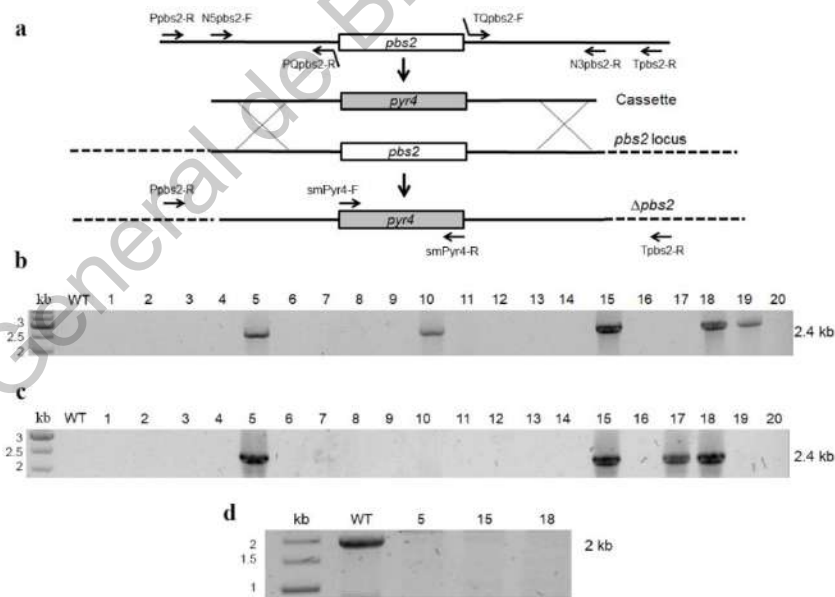


Figura 5. Delección del gen *pbs2* e identificación de mutantes $\Delta pbs2$. **a** Esquema del reemplazo de *pbs2* por el marcador de selección *pyr4*. Las regiones flanqueantes 5' y 3' se amplificaron utilizando los oligonucleótidos Ppbs2-F – PQpbs2-R y TQpbs2-F – Tpbs2-R, respectivamente. El gen *pyr4* se amplificó usando los oligonucleótidos smPyr4-F – smPyr4-R. En una segunda reacción de PCR, los tres fragmentos se unieron mediante secuencias quiméricas. En un tercer PCR, el casete de reemplazo se amplificó utilizando los oligonucleótidos N5pbs2-F – N3pbs2-R. Finalmente,

el amplicón se utilizó directamente para la transformación de protoplastos. **b-c** PCR para confirmar el reemplazo de **pbs2**. Las mutantes se identificaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Ppbs2-F — smPyr4-R para amplificar la región 5'- gen *pyr4* (**b**) o *pyr4* - región 3' (oligonucleótidos smPyr4-F — Tpbs2-R) (**c**). En ambos casos se amplificó un fragmento de 2.4 kb. **d** PCR para amplificar la región codificante de *pbs2*. Los oligonucleótidos pbs2-F — pbs2-R amplificaron un fragmento de 2 kb del ORF de *pbs2* solo en la cepa WT. Las condiciones de PCR fueron como las descritas en la Fig. 2.

Se analizó la conidiación estimulada por la luz en las cepas $\Delta tmk3:pyr4$ y $\Delta pbs2:pyr4$, y en todas las cepas mutantes la conidiación se redujo en un 80 % en comparación con la cepa WT, similar a los datos obtenidos con las cepas $\Delta tmk3:hph$ y $\Delta pbs2:hph$ (Fig. 6a-b). Como se publicó antes (Esquivel-Naranjo et al., 2016), todas las mutantes resultaron ser sensibles al estrés osmótico, rojo Congo, CdCl₂ y menadiona (Fig. 6c-d). No hubo diferencia en el fenotipo de las mutantes seleccionadas por los marcadores *hph* o *pyr4*, lo que indica que la cepa Ura^r1 no se vio afectada ni en la producción de conidia estimulada por la luz, ni por las respuestas al estrés celular.

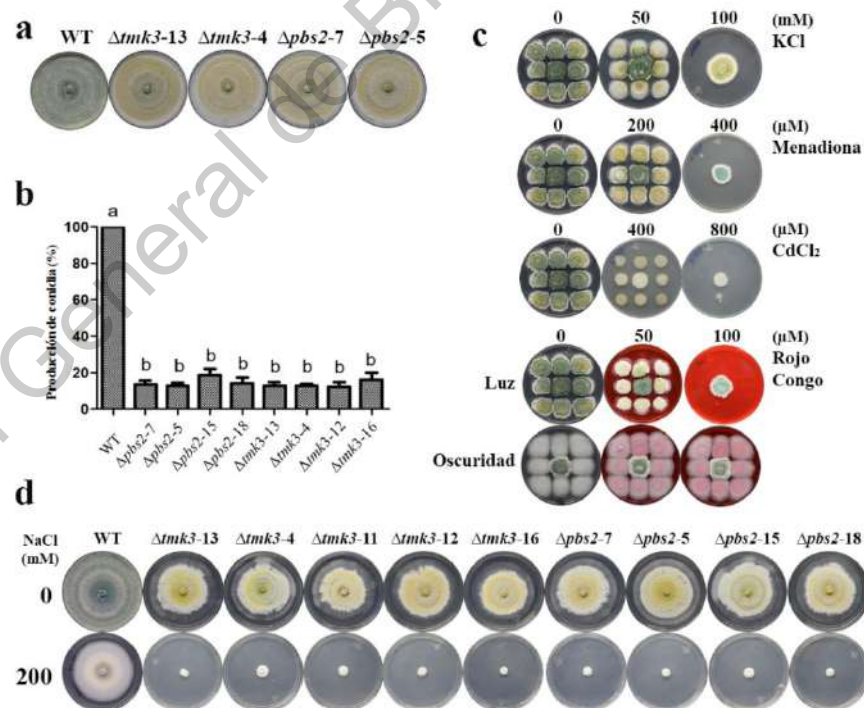


Figura 6. Validación del gen *pyr4* como marcador de selección para el reemplazo de genes de *T. atroviride*. **a** Comparación entre la cepa WT y las mutantes seleccionadas con el marcador *hph* ($\Delta tmk3-13$ y $\Delta pbs2-7$) y el marcador *pyr4* ($\Delta tmk3-4$ y $\Delta pbs2-5$), cultivados sobre placas de PDA en

condiciones de luz blanca constante ($0.586 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 7 días a 27°C . **b** Producción de conidia de la cepa WT y las mutantes seleccionadas con el marcador *hph* ($\Delta\text{tmk3-13}$ y $\Delta\text{pbs2-7}$) y el marcador *pyr4* ($\Delta\text{pbs2-5}$, -15, -18, $\Delta\text{tmk3-4}$, -12 y -16) crecidos en placas de PDA bajo luz blanca constante durante 7 días a 27°C . **c** Ensayo de respuesta al estrés en conidia de cepas Δtmk3 y Δpbs2 . Se inocularon gotas de 500 conidia de las cepas $\Delta\text{tmk3-4}$, -12, -16, -13, WT, $\Delta\text{pbs2-7}$, -5, -15 y -18 (desde la parte superior de la izquierda hasta la parte inferior de la derecha) en placas de PDA más diferentes concentraciones de los compuestos estresantes indicados. Luego se incubaron en condiciones de luz blanca constante u oscuridad, durante 4 días a 27°C . **d** Sensibilidad al estrés osmótico en micelio de cepas Δtmk3 y Δpbs2 . Se inocularon discos de micelio de las cepas indicadas sobre placas de PDA con o sin 200 mM NaCl, y se incubaron durante 4 días a 27°C .

Deleción de los genes que codifican para los receptores de luz azul *Blr1/Blr2* usando el marcador *pyr4*

Para demostrar nuevamente que la cepa Ura⁺1 de *T. atroviride* funciona como una herramienta genética, se diseñaron casetes para reemplazar las regiones codificantes de *blr1* y *blr2* por el gen *pyr4*, usando la cepa Ura⁺1 como fondo genético. Ocho de 20 transformantes (40%) fueron mutantes *blr1* (Fig. 7) y diez de las 18 transformantes (55,5%) fueron mutantes *blr2* (Fig. 8).

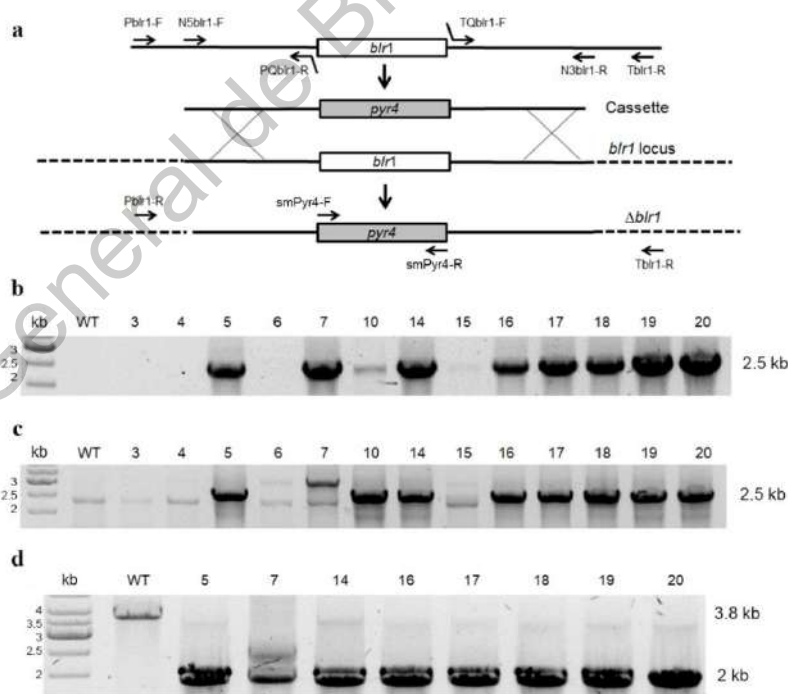


Figura 7. Deleción del gen *blr1* e identificación de mutantes Δblr1 . **a** Esquema del reemplazo de *blr1* por el marcador de selección *pyr4*. Las regiones flanqueantes 5' y 3' se amplificaron utilizando los oligonucleótidos Pblr1-F – PQblr1-R y TQblr1-F – Tblr1-R, respectivamente. El gen *pyr4* se

amplificó usando los oligonucleótidos smPyr4-F — smPyr4-R. En una segunda reacción de PCR, los tres fragmentos se unieron mediante secuencias quiméricas. En un tercer PCR, el casete de reemplazo se amplificó utilizando los oligonucleótidos N5blr1-F — N3blr1-R. Finalmente, el amplicón se utilizó directamente para la transformación de protoplastos. **b-c** PCR para confirmar el reemplazo de *blr1*. Las mutantes se identificaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Pblr1-F — smPyr4-R para amplificar la región 5'- gen *pyr4* (**b**) o *pyr4* - región 3' (oligonucleótidos smPyr4-F — Tblr1-R) (**c**). En ambos casos se amplificó un fragmento de 2.5 kb. **d** PCR para amplificar la región codificante de *blr1*. Los oligonucleótidos Pblr1-F — Tblr1-R se usaron para amplificar el casete de reemplazo, donde en las mutantes Δ *blr1* se amplificó un fragmento menor (2 kb) en comparación a la cepa silvestre (3.8 kb). Las condiciones de PCR fueron como las descritas en la Fig. 2.

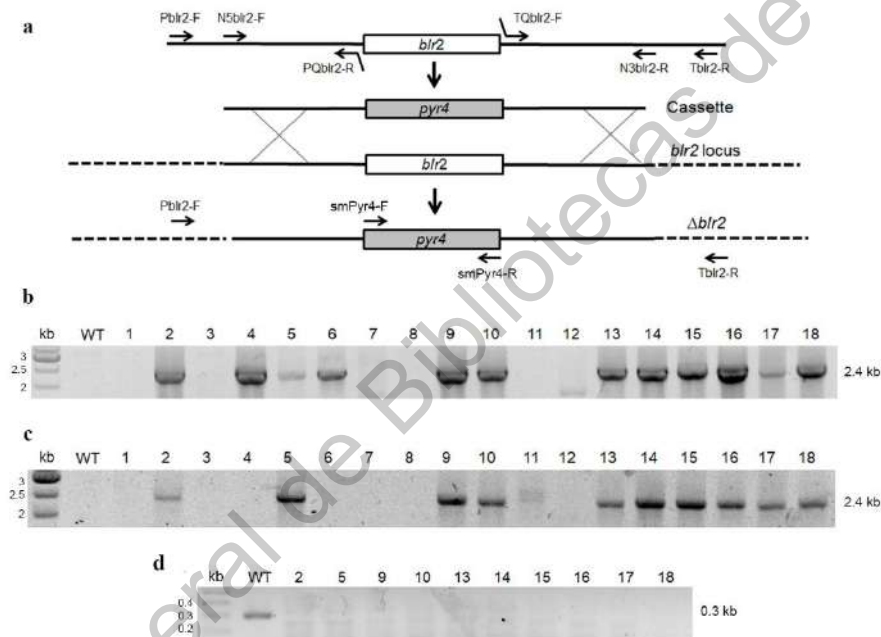


Figura 8. Delección del gen *blr2* e identificación de mutantes Δ *blr2*. **a** Esquema del reemplazo de *blr2* por el marcador de selección *pyr4*. Las regiones flanqueantes 5' y 3' se amplificaron utilizando los oligonucleótidos Pblr2-F — PQblr2-R y TQblr2-F — Tblr2-R, respectivamente. El gen *pyr4* se amplificó usando los oligonucleótidos smPyr4-F — smPyr4-R. En una segunda reacción de PCR, los tres fragmentos se unieron mediante secuencias quiméricas. En un tercer PCR, el casete de reemplazo se amplificó utilizando los oligonucleótidos N5blr2-F — N3blr2-R. Finalmente, el amplicón se utilizó directamente para la transformación de protoplastos. **b-c** PCR para confirmar el reemplazo de *blr2*. Las mutantes se identificaron mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Pblr2-F — smPyr4-R para amplificar la región 5'- gen *pyr4* (**b**) o *pyr4* - región 3' (oligonucleótidos smPyr4-F — Tblr2-R) (**c**). En ambos casos se amplificó un fragmento de 2.4 kb. **d** PCR para amplificar la región codificante de *blr2*. Los oligonucleótidos blr2-F — blr2-R amplificaron un fragmento de 0.3 kb del ORF de *blr2* solo en la cepa WT. Las condiciones de PCR fueron como las descritas en la Fig. 2.

Las mutantes $\Delta blr1:pyr4$ y $\Delta blr2:pyr4$ fueron expuestas a un pulso de luz azul (152.4 $\mu\text{mol m}^{-2}$), y como se esperaba, las cepas $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$ no conidieron en respuesta a la luz. Su fenotipo a la luz fue similar a la cepa control mantenida en la oscuridad (Fig. 9), sin embargo, sí conidieron en las zonas donde las hifas recibieron un daño ocasionado con un bisturí, al igual que los resultados publicados anteriormente sobre mutantes $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$ seleccionadas con *hph*, usando una cepa WT de *T. atroviride* (Casas-Flores et al., 2004). De nuevo, los resultados sugieren que es viable usar la cepa Ura¹ como un fondo genético para la obtención de mutantes en *T. atroviride*.

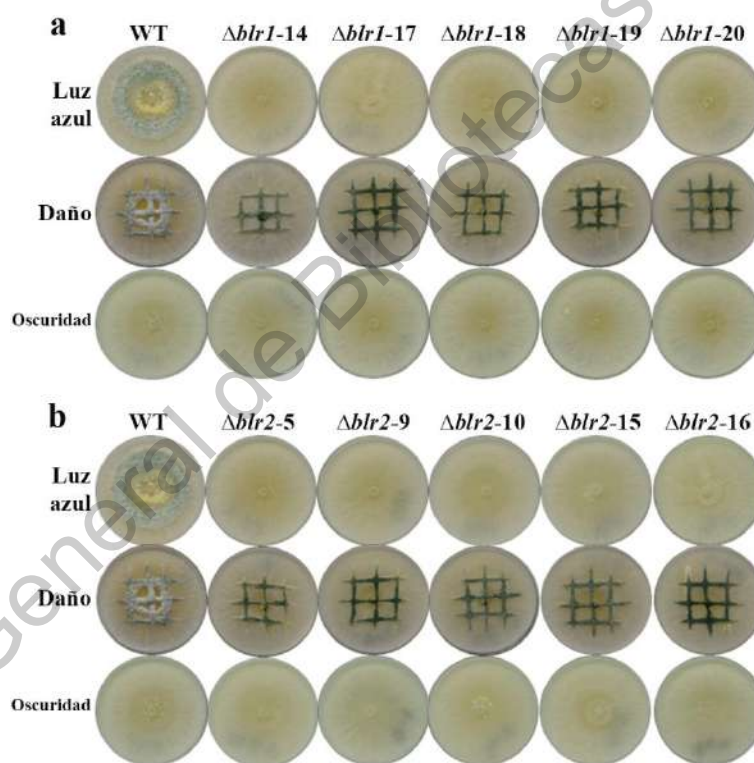


Figura 9. Fenotipos de las cepas WT, $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$ de *T. atroviride*. a Discos de micelio de las cepas WT, $\Delta blr1$ -14, -17, -18, -19, -20 o b cepas $\Delta blr2$ -5, -9, -10, -15 y -16 fueron inoculados sobre placas de PDA, e incubados durante 40 a 27 °C. Luego, las cepas fueron expuestas a la luz azul durante 5 min (152.4 $\mu\text{mol m}^{-2}$) para los ensayos de respuesta a la luz, o el micelio fue dañado con un bisturí. Después de 48 h se tomaron fotos. Las cepas mantenidas en la oscuridad se muestran como control.

La generación de mutantes usando la cepa Ura¹ como fondo genético no afectó la expresión de los genes regulados por luz

Todas las mutantes seleccionadas con el marcador *pyr4* mostraron las mismas características en la fotoconidiación y la tolerancia al estrés, como se describió anteriormente, en comparación con las mutantes seleccionadas con *hph* (Esquivel-Naranjo et al., 2016; Casas-Flores et al., 2004). Sin embargo, en *S. cerevisiae* se asoció un caso de epistasis en la expresión genética por el uso de cepas auxótrofas (Alam et al., 2016). Para descartar cambios en la expresión genética generados por el marcador de selección, se examinó la expresión de cuatro genes regulados por luz en las cepas $\Delta tmk3:pyr4$, $\Delta tmk3:hph$, $\Delta pbs2:pyr4$, $\Delta pbs2:hph$, $\Delta blr1:pyr4$ y $\Delta blr2:pyr4$ (Fig. 10).

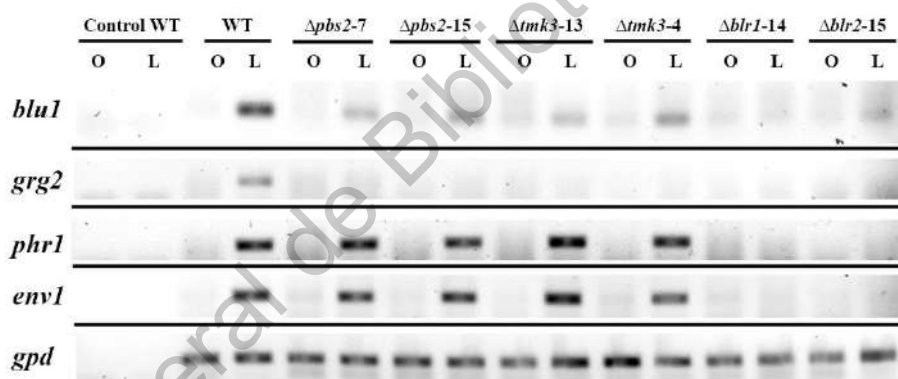


Figura 10. Expresión de los genes de respuesta a luz azul en las cepas $\Delta pbs2$, $\Delta tmk3$, $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$. Se llevó a cabo un análisis de RT-PCR para comparar la expresión de los genes *blu1*, *grg2*, *phr1* y *env1* en la cepa WT y mutantes seleccionadas con el marcador *hph* ($\Delta pbs2-7$ y $\Delta tmk3-13$) y el marcador *pyr4* ($\Delta pbs2-15$, $\Delta tmk3-4$, $\Delta blr1-14$ y $\Delta blr2-15$). Las cepas se mantuvieron en oscuridad durante 48 h. Luego, se expusieron a luz azul durante 30 min ($914,4 \mu\text{mol m}^{-2}$). Después de la inducción de luz azul, se extrajo el ARN total. El gen *gpd* se utilizó como control. El experimento se realizó por duplicado obteniendo los mismos resultados. **Control WT:** Cepa WT sin RT. **O:** oscuridad. **L:** luz.

Como se publicó anteriormente (Esquivel-Naranjo et al., 2016; Rosales-Saavedra et al., 2006), la expresión genética de *blu1*, *grg2*, *phr1* (CPD-fotoliasa) y *env1* (fotorreceptor de luz azul) no fue detectable en oscuridad; sin embargo,

después de un pulso de luz azul, se indujeron los niveles de transcrito de los cuatro genes en la cepa WT. En las mutantes $\Delta tmk3$ y $\Delta pbs2$, no se indujo la expresión de los genes *blu1* y *grg2*, mientras que los genes *phr1* y *env1* respondieron a la luz azul en un nivel similar a la cepa WT. En las mismas condiciones, los cuatro genes analizados presentaron patrones similares en las mutantes $\Delta tmk3$ y $\Delta pbs2$ obtenidas con *hph* y *pyr4*. En las cepas $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$, los genes *blu1*, *grg2*, *phr1* y *env1* no fueron inducidos por la luz azul, lo que indica una función preponderante de los receptores de luz azul Blr1/2 en las respuestas a la luz en *T. atroviride*. En conjunto, estos datos proporcionan evidencia de que la cepa Ura⁻1 de *T. atroviride* puede usarse como fondo genético para estudios genómicos funcionales.

6.5 DISCUSIÓN

El uso de hongos auxótrofos como herramienta genética es una alternativa económica para mejorar el estudio de las funciones de sus genes. En este capítulo se establece un sistema de transformación homóloga en *T. atroviride*, basado en el uso del gen *pyr4* para complementar la auxotrofia de una cepa Ura⁻ que fue capaz de crecer en 1 mg/ml 5-FOA. El gen *pyr4/pyrG* de *T. reesei*, *Trichoderma harzianum* y *T. hypoxylon* codifica para una orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa (Liu et al., 2018; Heidenreich y Kubicek, 1994; Gruber et al., 1990). La ausencia de *pyr4* en *T. reesei* puede ser restaurada por el gen *pyrG* de *A. niger* y el gen *pyr4* de *N. crassa* (Gruber et al., 1990), lo que indica que *pyr4* es altamente conservado en hongos.

Se realizó un análisis mediante PCR y secuenciación de las cepas Ura⁻, y los resultados revelaron que en cuatro auxótrofas a uracilo (Ura⁻1, -4, -9 y -10), el ORF de *pyr4* se encontraba truncado por al menos dos eventos independientes. Aunque el gen *pyr4* no se eliminó por completo, los alelos producidos codifican para una proteína Pyr4 no funcional, incapaz de producir uracilo, aunque fueron complementadas con éxito con el gen *pyr4* de la cepa silvestre. Por otro lado, seis cepas auxótrofas mostraron bandas con movilidad electroforética comparable a

pyr4 de la cepa parental, lo que sugiere que las mutaciones ocurrieron fuera de la región codificante de *pyr4*, confirmado mediante la secuenciación de las cepas Ura⁻2, -3, -5, -6 y -7. Las auxótrofas sin cambios en el ORF de *pyr4* podrían ser explicadas por una mutación en un elemento cis o trans necesario para la expresión de *pyr4*. Otra posibilidad es que se produjo una mutación en otro gen involucrado en la biosíntesis de pirimidina, como el gen *ura3/pyr2* que codifica para una OPRtasa. Los datos sugieren que 5-FOA puede ser mutagénico o, por el contrario, durante el proceso de transformación hubo una condición de estrés causando inestabilidad genómica. El 5-FU y FdUMP son moléculas tóxicas producidas por el metabolismo de 5-FOA, los cuales pueden ser incorporados al ARN o el ADN, uniéndose 5-FU con las adeninas y guaninas e induciendo inestabilidad genómica. (Matuo et al., 2010; Wyatt y Wilson, 2009). Una mutante de *S. cerevisiae* que carece de Apr1, la principal endonucleasa de sitio abásico, mostró sensibilidad ante el 5-FU, lo que sugiere que los sitios abásicos formados durante la reparación del ADN son más tóxicos, lo que puede provocar roturas de la cadena de ADN (Wellington et al., 2006). Sin embargo, no se ha documentado que el 5-FOA cause deleciones de ADN. Más datos que apoyan esta hipótesis provienen de experimentos en *Candida albicans*. Cuando *C. albicans* fue expuesta a 5-FOA, sus cromosomas sufrieron alteraciones (Wellington et al., 2006; Wellington y Rustchenko, 2005), presumiblemente como una mutación adaptativa bajo las condiciones de estrés por 5-FOA que causó cambios genéticos. Lo anterior puede explicar la mutación que ocurrió en *T. atroviride*, así como la pérdida parcial del ORF de *pyr4* por el 5-FOA añadido al medio de cultivo.

Se demostró que la cepa Ura⁻1 se puede utilizar como fondo genético para hacer mutaciones puntuales en *T. atroviride*. Los genes *blr1*, *blr2*, *pbs2* y *tmk3* anteriormente caracterizados (Esquivel-Naranjo et al., 2016; Casas-Flores et al., 2004) fueron reemplazados con éxito por *pyr4* en la cepa Ura⁻1. La eficiencia osciló entre el 15% y el 55% entre los genes incluidos en nuestro análisis. Por medio de un análisis Northern-blot, la expresión de los genes *blr1* y *blr2* se describió como

indetectable, lo que indica que esos genes se expresan poco, mientras que se detectaron niveles más altos en la transcripción de los genes *tmk3* y *pbs2* (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007; Rosales-Saavedra et al., 2006). A pesar de que el gen *pyr4* estaba bajo el control del promotor de estos genes reemplazados, en todos los casos la auxotrofía a uracilo se complementó con éxito. Se evaluó la producción de conida y la expresión de genes en mutantes obtenidos con la cepa auxótrofa, y los resultados son comparables a los de las mutantes obtenidas con el marcador *hph*. Aunque la eficiencia promedio del reemplazo de genes usando *pyr4* fue del 36 %, el porcentaje es similar a la eficacia usando el marcador *hph* (Esquivel-Naranjo et al., 2016), lo que sugiere que los casetes de reemplazo estaban dirigidos principalmente al locus correspondiente.

En *S. cerevisiae*, las auxotrofías alteran el fondo genético induciendo a diferentes respuestas transcripcionales (Seiple, 2006). Por lo anterior, se evaluó el nivel de expresión de cuatro genes regulados por luz en las mutantes obtenidas con una cepa auxótrofa a uracilo. Los genes analizados no mostraron alteraciones en los niveles de transcripción, sugiriendo que el comportamiento de *T. atroviride* es diferente al descrito en *S. cerevisiae*, aunque no se puede descartar una epistasis en otros genes no incluidos en esta evaluación. Nuestros resultados muestran que la cepa Ura⁻1 sirve como un trasfondo genético confiable, dado que no se detectaron perturbaciones transcripcionales en nuestras condiciones experimentales.

En conclusión, la cepa Ura⁻1 es una herramienta alternativa para reemplazar o complementar genes en *T. atroviride*. A pesar de que las cepas auxótrofas a uracilo no se obtuvieron mediante una delección puntual como se diseñó inicialmente, no se observaron diferencias en el fenotipo en comparación con las mutantes obtenidas con el marcador *hph*. Sería interesante saber si un gen *pyr4* heterólogo de otros hongos puede mejorar la eficiencia de reemplazo de genes en *T. atroviride*.

VII. CAPITULO 2:

Localización celular de la MAPK Tmk3:mCherry en hifas de *Trichoderma atroviride*

7.1 RESUMEN

Las respuestas al estrés celular y a la luz son reguladas a través de la MAPK Tmk3 en *Trichoderma atroviride*, sin embargo, su localización subcelular en respuesta a los estímulos extracelulares aún no ha sido determinada. En esta investigación, se construyó un casete para reemplazar el gen *tmk3* por un alelo que expresa la MAPK Tmk3 etiquetada con el fluoróforo mCherry (casete knock-in), incluyendo el marcador de selección *hph* y secuencias homólogas al marco de lectura y terminador de *tmk3* para insertar el gen Tmk3-mCherry bajo el promotor de *tmk3*. Después de seleccionar las transformantes resistentes a higromicina B, se obtuvo una mutante estable en la cepa Ura⁻1 al cual se llamó Ura⁻1:T3mCh. En vivo, se observó localización de la MAPK Tmk3 tanto en el citoplasma como en orgánulos de la cepa Ura⁻1:T3mCh, presuntamente en el retículo endoplasmático o en el sistema vacuolar. En respuesta al estímulo de luz, la fluorescencia se localizó en el núcleo, colocalizando con la fluorescencia emitida por DAPI intercalado en el ADN nuclear. Posteriormente, se usó la cepa Ura⁻1:T3mCh como fondo genético, y el gen *blr2* fue reemplazado por el gen *pyr4* para restaurar la auxotrofía y obtener una mutante carente del fotorreceptor Blr2 con Tmk3 etiquetado con mCherry. Se observó que sin estrés, Tmk3 también se localiza en el citoplasma y vacuolas cuando carece de *blr2*. Los resultados sugieren que Tmk3 se localiza en el citoplasma y posiblemente en otro orgánulo para regular el crecimiento vegetativo de *T. atroviride*, mientras que en respuesta a la luz, Tmk3 se transloca al núcleo para regular genes y conidiación.

(Palabras claves: *Trichoderma atroviride*, mCherry, microscopia, luz)

ABSTRACT

Responses to cellular stress and light are regulated through the MAPK Tmk3 in *Trichoderma atroviride*. However, its subcellular location in response to extracellular stimuli has not yet been determined. In this research, a cassette was constructed to replace the *tmk3* gene with an allele that expresses the MAPK Tmk3 tagged with mCherry (knock-in cassette), including the *hph* selection marker, and sequences homolog to the *tmk3* open reading frame and terminator, to insert the *tmk3* mCherry-tagged gene under the *tmk3* promoter. After selecting hygromycin resistant transformants, a stable mutant was obtained in a Ura-1 strain, named Ura-1:T3mCh. *In vivo*, localization of the MAPK Tmk3 was observed in the cytoplasm as well as in organelles of the Ura-1:T3mCh strain, presumably in the endoplasmic reticulum or in the vacuolar system. In response to light stimulus, the fluorescence was localized in the nucleus, colocalizing with the fluorescence emitted by DAPI embedded in the nuclear DNA. Subsequently, the Ura-1:T3mCh strain was used as the genetic background, and the *blr2* gene was replaced by the *pyr4* gene to restore auxotrophy and to obtain a mutant lacking the Blr2 photoreceptor with Tmk3 mCherry-tagged. It was observed that without stress, when it lacks *blr2*, Tmk3 is also localized in the cytoplasm and vacuoles. Results suggest that Tmk3 is localized in the cytoplasm and possibly, in another organelle to regulate the vegetative growth of *T. atroviride*, while in response to light, Tmk3 translocates to the nucleus to regulate genes and conidia.

(Key words: *Trichoderma atroviride*, mCherry, light)

7.2 INTRODUCCIÓN

Trichoderma atroviride es un micoparásito que antagoniza a hongos patógenos de plantas (Speckbacher et al., 2020), tiene gran relevancia como agente de biocontrol y productor de enzimas, y también es un modelo biológico atractivo, su genoma se encuentra secuenciado (Schmoll et al., 2016), y es usado para el estudio de la conidiación estimulada por luz azul (Casas-Flores et al., 2004) y la regeneración de hifas después de un daño mecánico (Hernandez-Onate et al., 2012). Debido a lo anterior, es crucial implementar más estrategias para el estudio de genes de *T. atroviride*.

Una herramienta ampliamente usada en la biología celular es el marcaje genético de proteínas usando fluoróforos para determinar la localización subcelular de las proteínas. La proteína verde fluorescente (GFP), originalmente aislada de la medusa *Aequorea victoria* (Shimomura, 2005), es la primera proteína conocida en la que la fluorescencia visible es genéticamente codificable, el fluoróforo se deriva de los residuos naturales presentes dentro de la estructura primaria de GFP, por lo que no requiere de un cofactor o sustrato para la fluorescencia (Brejc et al., 1997). GFP ha sido empleada como gen reportero para la observación de una variedad de eventos celulares (Leroch et al., 2011), se compone de 238 aminoácidos, absorbe la luz azul a 395 nm, con un pico más pequeño a 475 nm y emite luz verde a 508 nm (Cubitt et al., 1995). Posteriormente, se ha modificado a GFP para mejorar sus aplicaciones, cambiar las longitudes de onda de excitación y emisión, y crear diferentes colores para nuevas aplicaciones (Cormack et al., 1996; Heim et al., 1995).

Además de GFP, otro fluoróforo que se ha mejorado genéticamente es DsRed, la primera proteína roja fluorescente (RFP) aislada de un coral del género *Discosoma*, tiene una fluorescencia naranja-roja con una emisión máxima a 583 nm, y se excita de manera óptima a 558 nm, pero también se puede excitar con un láser estándar de 488 nm para ser usado con microscopios confocales (Bevis y Glick,

2002). Sin embargo, DsRed requiere de una incubación a 37°C por más de 30 h para que la fluorescencia roja alcanzara un nivel de estado estacionario, una fracción de la proteína retenía fluorescencia verde, y se tetramerizaba (Zhang et al., 2002), perturbando la función y localización de la proteína. Para solucionar los problemas que presentaba DsRed, se requirió de 33 mutaciones para obtener una proteína monomérica obteniendo como resultado mRFP, la cual madura más rápido, no presenta fluorescencia verde residual, y las longitudes de onda de excitación y emisión son 25 nm más largas que las variantes de DsRed (Campbell et al., 2002). Para mejorar la fotoestabilidad de mRFP, se realizaron más modificaciones donde se fusionaron los extremos amino y carboxilo de GFP a mRFP generando nuevas proteínas monoméricas fluorescentes, entre ellas mCherry, el cual ofrece una longitud de onda de excitación máxima de 587 nm, 610 nm de emisión, mejor fotoestabilidad, maduración más rápida y una excelente resistencia al pH, haciendo de mRFP un fluoróforo obsoleto (Shaner et al., 2004).

Para generar nuevas herramientas moleculares en *T. atroviride*, se diseñó un casete knock-in basado en el método para etiquetar proteínas con GFP en *Aspergillus nidulans* (Yang et al., 2004). En este trabajo se etiquetó con mCherry a la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) Tmk3, homóloga a Hog1 de *S. cerevisiae* y p38 de animales. Esta herramienta nos permitió observar la proteína Tmk3 *in vivo*, en respuesta a un estímulo de luz y en un fondo carente del gen *blr2*.

7.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizaron las cepas enlistadas en la tabla 2. La cepa WT y cepas mutantes se propagaron en medios PDA, la cepa Ura⁻1 en PDA más 5 mM uracilo, y se incubaron a 27 °C en luz blanca constante o en oscuridad. Para ensayos en microscopia confocal, las cepas se inocularon en medio mínimo Vogel (MMV), que contiene agar al 1.5 %, sales de Vogel 1X (Vogel, 1956), y sin sacarosa

para evitar la formación de una red densa de filamentos en el micelio y visualizar mejor las hifas independientes.

Tabla 2. Cepas utilizadas

<i>T. atroviride</i>		
Cepa	Genotipo	Referencia
Silvestre (WT)	IMI206040	
Ura ⁻ 1	Ura ⁻	(Calcáneo-Hernández et al., 2020)
Δ <i>pbs2</i> -15	<i>pbs2:pyr4</i>	(Calcáneo-Hernández et al., 2020)
Δ <i>blr1</i> -15	<i>blr1:pyr4</i>	(Calcáneo-Hernández et al., 2020)
Δ <i>blr2</i> -16	<i>blr2:pyr4</i>	(Calcáneo-Hernández et al., 2020)
Ura ⁻ 1:T3mCh	Ura ⁻ <i>hph:mCherry</i>	Este estudio
Δ <i>blr2</i> :T3mCh	Δ <i>blr2:hph:mCherry</i>	Este estudio

Ensayo de conidiación inducida por luz

Para realizar ensayos de esporulación en respuesta al estímulo de diferentes colores, discos de micelio de 5 mm de diámetro de la cepa WT se inocularon sobre papel filtro de 8 cm de diámetro humedecidos con 1.5 ml PDB, y se incubaron durante 48 h. Se emplearon lámparas con 18 leds (Geopower; Mexico) que emiten los colores azul, verde, amarillo y rojo para los pulsos de luz. Los inóculos fueron expuestos a la luz durante 5 min, con excepción del control que se mantuvo en oscuridad, y se incubaron nuevamente en oscuridad por 48 h. Finalmente, se tomaron fotos del ensayo.

Análisis de expresión de genes dependientes de luz azul

Discos de micelio (5 mm) de la cepa WT se inocularon sobre placas de PDA con celofán, y se incubaron en oscuridad durante 48 h. Después los inóculos fueron expuestos a la luz azul, verde, amarillo o rojo durante 30 min. Un inóculo que se mantuvo en oscuridad se usó como control. Finalmente se colectó el micelio y se congeló con N₂ líquido para la extracción de ARN. Se sintetizó ADNc y se analizó la expresión de los genes dependientes de luz azul enlistados en Anexo 3, siguiendo la metodología descrita en Anexo 1.

Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

Las extracciones del ADN se realizaron a partir de micelio crecido en oscuridad sobre placas de PDA cubiertas con celofán, siguiendo la metodología de Raeder y Broda (1985) descrita en Anexo 1.

Fusión de Tmk3 con mChFP

Como una aproximación para determinar los mecanismos moleculares implicados en la activación por luz azul de Tmk3, se diseñó un casete knock-in que expresa el gen *tmk3* etiquetado con el fluoróforo mCherry, en base al método de Yang et al. (2004) con modificaciones.

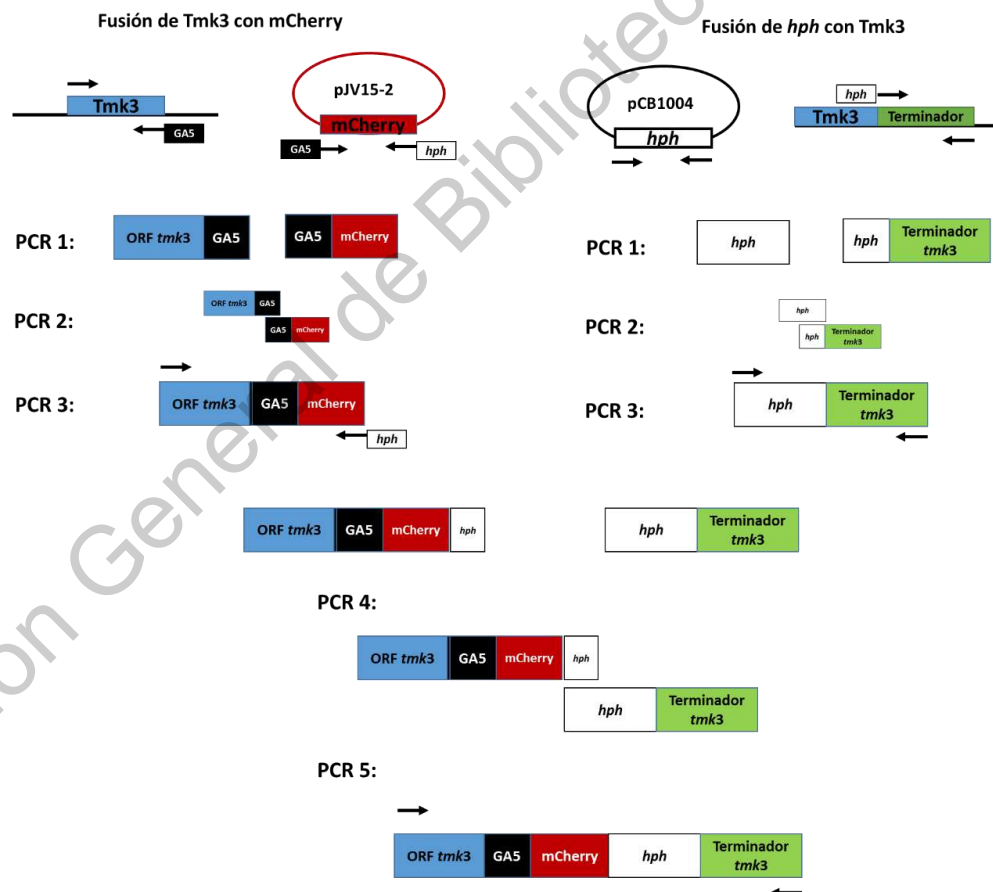


Figura 11. Construcción del casete knock-in para etiquetar la MAPK Tmk3 con el fluoróforo mCherry. La construcción del casete consistió en la unión de un fragmento del marco de lectura del gen *tmk3* (azul), el gen que codifica para mCherry (rojo), marcador *hph* (blanco) y un fragmento del

terminador de *tmk3* (verde). Se le añadió una bisagra de repetidos de glicina y alanina para dar estabilidad a la unión de mCherry en el extremo carboxilo de Tmk3 (negro). En total se realizaron 5 PCRs para la construcción del casete, de los cuales en los PCRs 2 y 4 no se requirieron de oligonucleótidos, los fragmentos se unieron por complementariedad.

El diseño consistió en realizar 5 rondas de PCRs para armar el casete (Fig. 11). Las secuencias de oligonucleótidos utilizados se enlistan en Anexo 2. En el primer PCR se amplificó la región codificante de *tmk3*, el gen que codifica para mCherry, el marcador *hph* y una región del terminador de *tmk3*. Para amplificar el marco de lectura de *tmk3* excluyendo el codón de paro, se utilizó un oligonucleótido quimérico reverso al cual se le añadieron bases que codifican para repetidos de glicina y alanina (5N5tmk3-F - Tmk3-GA5-R). Para amplificar el marco de lectura de mCherry, se utilizó el vector pJV15-2 (Verdín et al., 2009) y un oligonucleótido quimérico directo con bases que codifican para los repetidos de glicina y alanina (GA5-mcherry-F - 3'mcherry-R). Para amplificar el marco de lectura del marcador *hph*, se utilizó el plásmido pCB1004 (5hph-F - Hyg-R) (Carroll et al., 1994). Para amplificar un extremo del terminador de *tmk3*, se usó un oligonucleótido quimérico directo complementario a *hph* (TQtmk3-F - Ttmk3-R). En el segundo PCR se unieron por complementariedad los productos del PCR 1 en proporciones 1:1. En una reacción se fusionaron los fragmentos del ORF de *tmk3* con mCherry, en otra reacción se fusionaron los fragmentos de *hph* y el terminador de *tmk3*. En el tercer PCR se amplificaron las dos fusiones. Para amplificar la fusión *tmk3*-GA5-mCherry, se empleó el oligonucleótido anidado 6N5tmk3-F y el oligonucleótido quimérico mcherry-hph-R, que es complementario a *hph*. Para amplificar la fusión *hph*-Terminador, se emplearon los oligonucleótidos Hyg-F y 1N3tmk3-R. En el cuarto PCR se fusionaron por complementariedad los productos del PCR 3, ajustando los dos fragmentos a una proporción 1:1. En el PCR 5 se amplificó el casete completo con los oligonucleótidos kiTmk3-F y 2N3tmk3-R. Se utilizó directo sin purificar el producto del PCR 5 para transformar protoplastos de *T. atroviride*. Para todas las reacciones de PCR se utilizó la enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del manual. Las condiciones de PCR

fueron las siguientes: un primer paso a 94 °C por 2 min, 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 60 °C por 30 s, 68 °C por 1 min/kb, y una extensión final a 68 °C por 5 min. Las condiciones para el quinto PCR fueron las mismas con la excepción de que se programó la reacción a 40 ciclos.

Precipitación de ADN

Para obtener una mayor concentración de casetes para transformar protoplastos de *T. atroviride*, el producto de 7 reacciones de PCR 5 descrito anteriormente (350 µl), se colocó en un tubo de microcentrífuga, se añadió un décimo de 3 M CH₃COONa (pH 5.4, ajustado con ácido acético glacial) mantenido en refrigeración. Después se añadió dos volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló y se incubó a -20 °C por 5 min. Se centrifugó por 13,000 rpm durante 3 min. Se desechó el sobrenadante. Se añadió 500 µl etanol al 70 %. Se centrifugó nuevamente por 3 min a 13,000 rpm. Se desechó el sobrenadante, se secó la pastilla de ADN y se resuspendió con agua.

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

Para reemplazar el gen *tmk3* por un alelo quimérico de *tmk3* etiquetado con mCherry en *T. atroviride*, se transformaron protoplastos por el método de polietilenglicol-CaCl₂ usando el casete construido por PCR, siguiendo la metodología de transformación descrita en Anexo 1.

Identificación de mutantes

Las transformantes se seleccionaron en un medio PDA con higromicina B (100 mg/ml) realizando tres cultivos monospóricos. Posteriormente, se extrajo el ADN genómico de las transformantes (Anexo 1) para confirmar el reemplazo génico mediante cuatro reacciones de PCR. El PCR 1 consistió en amplificar un fragmento desde el promotor de *tmk3* más la región codificante de mCherry, incluyendo los repetidos de glicina y alanina (Ptmk3-F — mcherry-hph-R). El PCR 2 consistió en amplificar el marcador *hph* más una fracción del terminador de *tmk3* (Hyg-F —

Ttmk3-R). En la tercera reacción de PCR se amplificó el ORF de mCherry con los oligonucleótidos quiméricos (GA5-mcherry-F — mcherry-hph-R). En la cuarta reacción de PCR se amplificó el marcador *hph* (Hyg-F — Hyg-R). En las cuatro reacciones de PCR se utilizó la enzima ADN polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific) y las condiciones fueron las siguientes: el primer paso a 95 °C por 3 min, después 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 1 min por kb, y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Microscopia confocal

Las mutantes resistentes a higromicina B y que expresaban el gen mCherry fueron crecidas en medio mínimo Vogel sin sacarosa. Para observar la localización de Tmk3, se usó el método del bloque de agar invertido (Hickey et al., 2004). Las mutantes se observaron por microscopía confocal de barrido laser con el microscopio Olympus FluoView™ FV1000, y la fluorescencia fue detectada con el parámetro RFP (543 nm de excitación), bajo un objetivo de inmersión en aceite Planacromático, 60×/1.4 de apertura numérica. Las imágenes se capturaron usando el programa FV-10 ASW. Para visualizar la MAPK Tmk3 en tiempo real, se utilizó el microscopio invertido Nikon ECLIPSE Ti-E Spinning Disk, equipado con una cámara ANDOR iXon Ultra. Se usó un objetivo Apo TIRF 60x de inmersión en aceite.

7.4 RESULTADOS

Construcción del casete knock-in

Debido a que *T. atroviride* no conidia en respuesta a la luz roja (Casas-Flores, 2004), que la MAPK Tmk3 se activa ante el estímulo de la luz azul (Esquivel-Naranjo et al., 2016), y que la MAPK ThHog1 de *Trichoderma harzianum* se transloca al núcleo en respuesta al estrés celular (Delgado-Jarana, 2006), se decidió elegir un fluoróforo que se excitara en el espectro cercano al color rojo para observar la localización de Tmk3 en oscuridad y después de un estímulo de luz azul. Para confirmar que *T. atroviride* no esporulaba en respuesta a la luz roja, se realizó un

ensayo de fotoinducción en la cepa WT utilizando los colores azul, verde, amarillo y rojo. En luz amarilla y roja, la cepa WT no produjo el anillo de conidiación en el perímetro de la colonia, solo en respuesta a los colores azul y verde (Fig. 12).

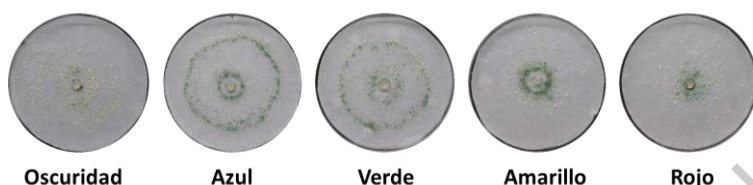


Figura 12. Respuesta de *T. atroviride* ante un estímulo de luz azul, verde, amarillo y rojo. Se inocularon discos de micelio de la cepa WT sobre papel filtro con PDB. Después de una incubación en oscuridad por 48 h, se les aplicó un pulso de luz de diferentes colores por 5 min, se incubaron nuevamente en oscuridad por 48 h y finalmente se tomaron fotos.

Posteriormente, se analizó la expresión de los genes dependientes de luz azul en respuesta al estímulo de las diferentes longitudes de ondas. Los genes *blu1*, *grg2* y *env1* se expresaron en respuesta a un pulso de luz azul y verde. No se observó expresión del gen *blu1* y *env1* en respuesta a la luz amarilla y roja, sin embargo, se observó una expresión baja en el gen *grg2* ante el estímulo de los colores amarillo y rojo (Fig. 13). Por lo anterior, se decidió utilizar el fluoróforo mCherry para el marcaje de Tmk3, ya que su longitud de onda de excitación es de 587 nm cercano al amarillo (Shaner et al., 2004), lo que lo hace un buen candidato para el estudio de la localización de Tmk3 en oscuridad.

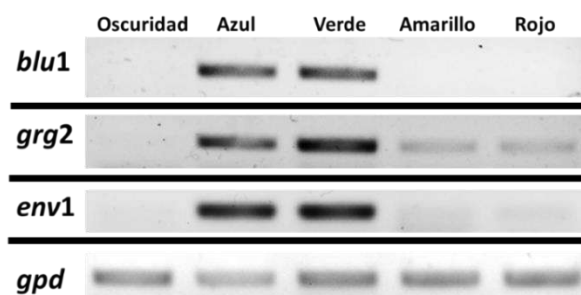
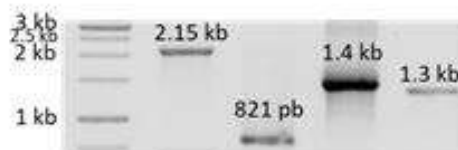


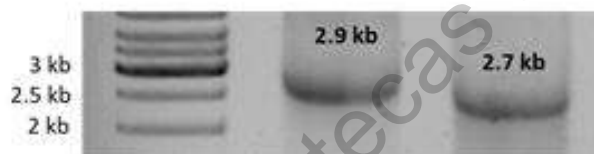
Figura 13. Expresión de genes regulados por luz ante un estímulo de luz azul, verde, amarillo y rojo. Discos de micelio de la cepa WT se inocularon en oscuridad sobre PDA con celofán. A las 48 h, las colonias fueron expuestas a diferentes longitudes de ondas por 30 min ($914.4 \mu\text{mol m}^{-2}$). Después el micelio fue colectado para la extracción de ARN para la síntesis de ADNc. Se utilizó 1 μl de ADNc como templado para las reacciones de PCR.

Se diseñaron oligonucleótidos para crear el casete knock-in y reemplazar el gen *tmk3* por el gen *tmk3* etiquetado con mCherry. El diseño del casete se basó en la estrategia de Yang et al. (2004) con modificaciones (Fig. 14). En el primer PCR, se amplificaron cuatro fragmentos: 2.15 kb del gen *tmk3*, que consistió en amplificar 0.41 kb del promotor de *tmk3*, 1.72 kb de la región codificante de *tmk3* sin el codón de paro, y 0.02 kb de bases que codifican para repetidos de glicina y alanina; 0.82 kb del gen mCherry; 1.4 kb del marcador de selección *hph*; 1.3 kb de un fragmento del terminador del gen *tmk3*. En un segundo PCR, la región codificante del gen *tmk3* se fusionó por complementariedad con la región codificante del gen que codifica para mCherry, y en otra reacción por separado, el gen *hph* se fusionó al terminador de *tmk3*. Para ambas reacciones los fragmentos se igualaron en relación 1:1. El tercer PCR consistió en amplificar los dos fragmentos con oligonucleótidos anidados, obteniéndose un fragmento de 2.9 kb de la unión del ORF de *tmk3* con mCherry, y otro fragmento de 2.7 kb de la unión del marcador *hph* con el terminador de *tmk3*. El cuarto PCR consistió en la unión de los dos fragmentos por complementariedad, ambos fragmentos fueron añadidos a la mezcla de PCR en proporciones iguales sin oligonucleótidos. Se obtuvo como resultado un fragmento de 5.6 kb. Finalmente, en el quinto PCR se amplificó el casete knock-in con oligonucleótidos anidados. El casete final, con tamaño de 4.3 kb, consistió en la fusión de 1.18 kb de la región codificante de *tmk3*, 0.03 kb de los repetidos de glicina y alanina, 0.68 kb de la región codificante de mCherry, 1.4 kb del marcador *hph*, y 1 kb de un fragmento del terminador de *tmk3*.

PCR 1



PCR 3



PCR 4



PCR 5



Figura 14. Construcción del casete para knock-in de Tmk3. **PCR 1.** Amplicones con sus correspondientes pesos del marco de lectura de *tmk3*, gen mCherry, marcador *hph* y un fragmento del terminador de *tmk3*. **PCR 3.** Se amplificó la unión de *tmk3* con mCherry y por separado, *hph* con el fragmento del terminador de *tmk3*. **PCR 4.** Una sola reacción de PCR para unir los productos del PCR 3. **PCR 5.** Con oligonucleótidos anidados se amplificó un fragmento más pequeño del casete knock-in construido en el PCR 4. El producto final se utilizó para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

Transformación

El producto del quinto PCR se utilizó directamente para transformar protoplastos de la cepa silvestre y la cepa auxótrofa Ura⁻1 de *T. atroviride*. Debido a que el producto de una sola reacción de PCR de 50 µl no fue suficiente para obtener transformantes resistentes a higromicina B, se amplificó siete veces el producto del PCR 4, los productos finales se juntaron en un solo tubo, el casete se precipitó, y el casete se resuspendió en 60 µl de H₂O HPLC. Finalmente se obtuvieron transformantes. Las transformantes obtenidas con la cepa silvestre se seleccionaron en medios PDA con higromicina B 100 µg/ml, y las transformantes obtenidas con la cepa Ura⁻1 se seleccionaron en PDA más uracilo 5 mM e higromicina B 100 µg/ml.

Después de tres pases monospóricos, se obtuvo solo una mutante estable como producto de la transformación con la cepa silvestre (cepa WT:T3mCh) y una mutante con la cepa Ura⁻1 (cepa Ura⁻1:T3mCh). Para comprobar el reemplazo del gen *tmk3* por el gen *tmk3* etiquetado con mCherry en las cepas WT:T3mCh y Ura⁻1:T3mCh, se extrajo el ADN genómico y se realizaron cuatro PCRs: se amplificó un fragmento de 3.9 kb con oligonucleótidos que flanquean el gen *tmk3* con mCherry (PTmk3-F — mCherry-hph-R), un fragmento de 2.7 kb que corresponde al gen *hph* con el terminador de *tmk3* (Hyg-F — Ttmk3-R), un fragmento de 0.8 kb del marco de lectura del gen que codifica para mCherry (GA5-mCherry-F — mCherry-hph-R), y un fragmento de 1.4 kb del gen *hph* (Hyg-F — Hyg-R). En ambas cepas se amplificaron los cuatro fragmentos esperados (Fig. 15).

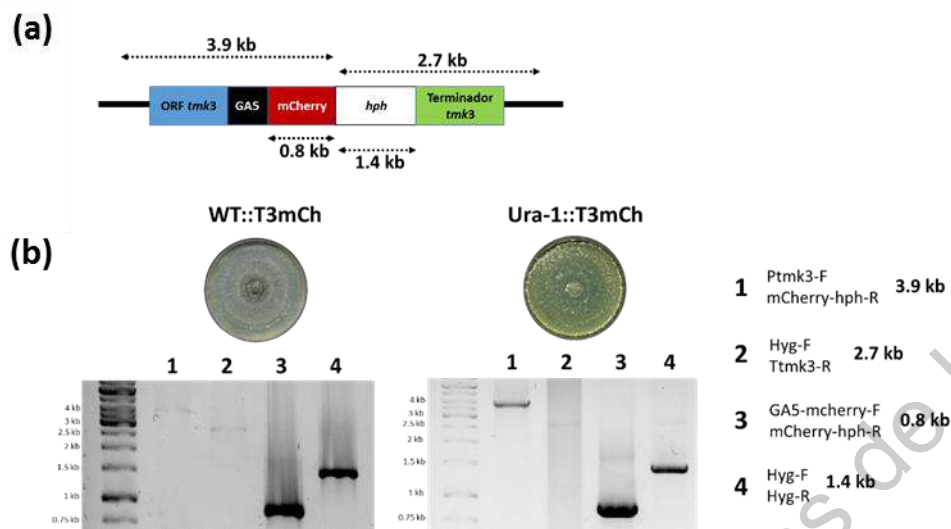


Figura 15. Análisis por PCR del reemplazo del gen *tmk3* por *tmk3* etiquetada con mCherry en cepas WT y Ura1. **a** Esquema del casete knock-in con los 4 PCRs que se llevaron a cabo para comprobar el reemplazo. **b** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los 4 fragmentos amplificados. Se usó como templado el ADN extraído de las cepas WT::T3mCh y Ura-1::T3mCh.

Posteriormente, se analizó por RT-PCR la expresión de mCherry en la cepa WT y la mutante WT:T3mCh usando los oligonucleótidos GA5-mcherry-F y 3mcherry-R (Anexo 1) para el gen que codifica para mCherry, y los oligonucleótidos tmk3-F y tmk3-R (Anexo 2) para el gen *tmk3*. Se observó que el gen *tmk3* se expresa en ambas cepas, sin embargo, solo mCherry se expresa en la cepa WT:T3mCh (Fig. 16). Los resultados sugieren que la inserción del gen *tmk3* etiquetado con mCherry fue exitosa.

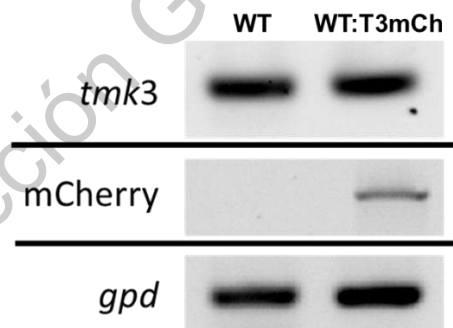


Figura 16. Análisis por RT-PCR del reemplazo de *tmk3* por *tmk3* etiquetada con mCherry en una cepa WT. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los genes amplificados. Se usó como templado el ADNc que se sintetizó a partir del ARN extraído de las cepas WT y WT:T3mCh.

Una vez que se determinó el reemplazo del gen *tmk3* por el alelo de *tmk3* etiquetado con mCherry, el mismo casete se utilizó para transformar las mutantes $\Delta pbs2:pyr4$, $\Delta blr1:pyr4$, y $\Delta blr2:pyr4$. No obstante, después de dos intentos de transformación con la metodología empleada para obtener las mutantes WT:T3mCh y Ura¹:T3mCh, no fue posible obtener transformantes.

Se modificaron algunos pasos para los siguientes intentos de transformación: los protoplastos de la cepa $\Delta pbs2:pyr4$ no resistieron el proceso de transformación, por consecuencia, no crecieron en el control positivo. El medio con sorbitol 1 M causó un estrés hiperosmótico a la mutante sensible a altas concentraciones de sorbitol, por lo que el nuevo medio de selección consistió en placas de PDA con higromicina B (100 mg/ml) sin sorbitol, solo el medio suave contenía sorbitol 1 M que cumple la función como estabilizador para proteger los protoplastos mientras regeneran su pared celular. Con la modificación, los protoplastos de $\Delta pbs2:pyr4$ sí sobrevivieron el proceso de transformación. Por difusión, la concentración de sorbitol disminuyó permitiendo la sobrevivencia y selección de mutantes carentes del gen *pbs2*. También se modificó la concentración del casete knock-in. Las cepas $\Delta blr1:pyr4$ y $\Delta blr2:pyr4$ sí resistían el proceso de transformación y el estrés hiperosmótico por sorbitol, sin embargo, no se obtenían transformantes, por lo que se concentró el producto de 7 PCRs en un solo tubo (350 μ l de volumen final), se precipitó el casete y se resuspendió el ADN en 60 μ l. Con estos cambios solo se pudo obtener una transformante estable de la cepa $\Delta pbs2:pyr4$ (cepa $\Delta pbs2$:T3mCh) y una de la cepa $\Delta blr1:pyr4$ ($\Delta blr1$:T3mCh).

Como alternativa, se optó por usar la cepa auxótrofa Ura¹:T3mCh para usarla como fondo genético, el gen *tmk3* ya se encuentra etiquetado en esa cepa, por lo que se puede utilizar el gen *pyr4* para complementar la auxotrofia y a la vez reemplazar genes. Se utilizó el casete anteriormente publicado (Calcáneo-Hernández et al., 2020) para obtener transformantes del gen *blr2* usando la cepa Ura¹:T3mCh como fondo genético. Finalmente se seleccionó una transformante del

gen *blr2*, nombrada $\Delta blr2$:T3mCh, a partir de medios PDA más higromicina B 100 $\mu\text{g/ml}$.

El reemplazo del gen *tmk3* por un alelo etiquetado con mCherry se comprobó por PCR en las cepas $\Delta blr1$:T3mCh y $\Delta pbs2$:T3mCh, amplificándose el gen *hph*, el gen que codifica para mCherry, un fragmento del gen *tmk3*, mCherry y *hph*, y otro fragmento de mCherry unido a *hph* (Fig. 17). En la cepa $\Delta blr2$:T3mCh se corroboró la delección del gen *blr2*. El gen *blr2* solo se amplificó en la cepa Ura⁻1:T3mCh (Fig. 18). Para las reacciones de PCR se usó la enzima DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific) y las condiciones fueron las siguientes: el primer paso a 95 °C por 3 min, después 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 1 min por kb, y una extensión final a 72 °C por 5 min.

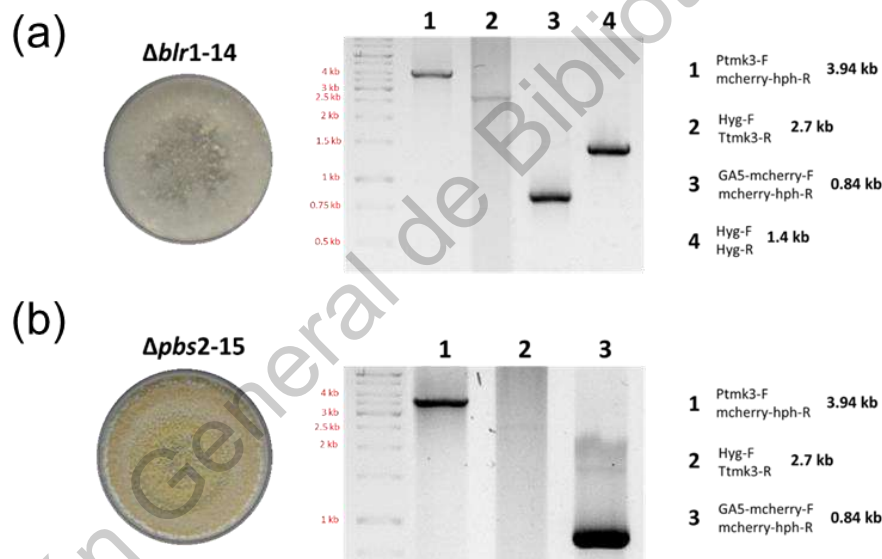


Figura 17. Análisis por PCR del reemplazo del gen *tmk3* por un alelo etiquetado con mCherry en cepas $\Delta pbs2$ y $\Delta blr1$. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los fragmentos amplificados por PCR para comprobar el reemplazo del gen *tmk3* por un alelo etiquetado con mCherry. Se usó como templado el ADN extraído de las cepas $\Delta blr1$:T3mCh (a) y $\Delta pbs2$:T3mCh (b). Los oligonucleótidos utilizados y el tamaño de los fragmentos amplificados se indican a la derecha. En Anexo 1 se enlistan las secuencias de oligonucleótidos utilizados.

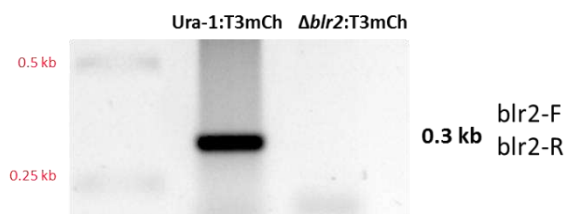


Figura 18. Análisis por PCR de la delección del gen *blr2* en la cepa Ura⁻1:T3mCh. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de un fragmento amplificado del gen *blr2* para comprobar el reemplazo del gen *blr2* por *pyr4* en un fondo auxótrofo a uracilo y que expresa el gen *tmk3* etiquetado con mCherry. Se usó como templado el ADN extraído de las cepas Ura⁻1:T3mCh y Δ *blr2*:T3mCh. En Anexo 1 se enlistan las secuencias de oligonucleótidos utilizados.

Localización de la MAPK Tmk3 de *T. atroviride*

Para observar con los microscopios confocales la fluorescencia producida por mCherry unida a Tmk3, se empleó la técnica de agar invertido descrito por Hickey et al. (2004). Las cepas se inocularon sobre placas de Vogel sin sacarosa, y se incubaron por 48 h en oscuridad. Posteriormente, se cortó un cuadro de aproximadamente 2 cm de ancho tomando el perímetro de la colonia, se colocaron de forma invertida sobre cubreobjetos, se incubaron por 2 h a temperatura ambiente en oscuridad dentro de cajas Petri cubiertos con aluminio, y después se observaron en el microscopio. A pesar de que se comprobó por PCR que el gen que codifica para mCherry se integró en el genoma de las cepas WT, Ura⁻1, Δ *pbs2* y Δ *blr1*, solo se observó fluorescencia en la cepa Ura⁻1 (Fig. 19). El resultado sugiere que el casete para etiquetar genes de *T. atroviride* con mCherry funciona porque se pudo observar fluorescencia en las hifas de la cepa Ura⁻1:T3mCh, pero a pesar de que es posible insertar a mCherry en el genoma de *T. atroviride*, determinar su expresión por RT-PCR no garantiza la estabilidad de la proteína.

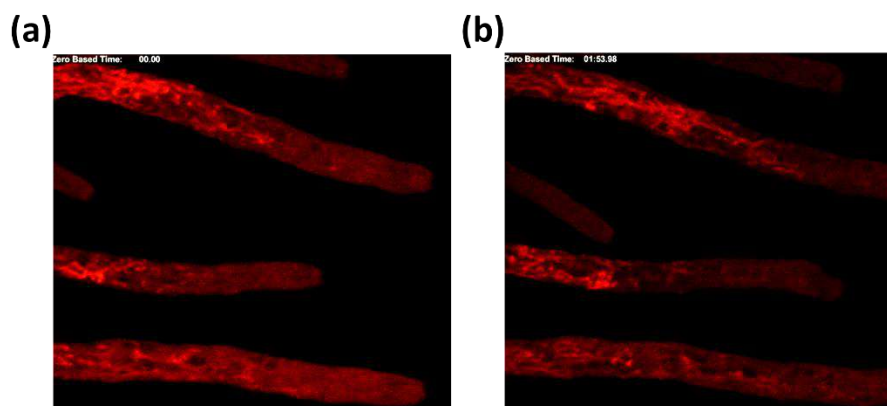


Figura 19. Localización de la MAPK Tmk3 en hifas de la cepa Ura-1:T3mCh. Se observó *in vivo* con el microscopio Nikon Eclipse Ti a la MAPK Tmk3 etiquetada con mCherry en la cepa Ura-1:T3mCh. A los tiempos 0:00 (a) y 1:54 min (b) se observaron vacuolas tubulares en las puntas de las hifas.

En vivo, se observó que la MAPK Tmk3 se localiza en el citoplasma pero también en otros orgánulos, posiblemente en el retículo endoplásmico o en el sistema vacuolar. Su localización se mostró similar a la proteína NADPH Oxidasa 1 (Nox1) de *N. crassa* (Cano-Domínguez et al., 2019) (Fig. 20).

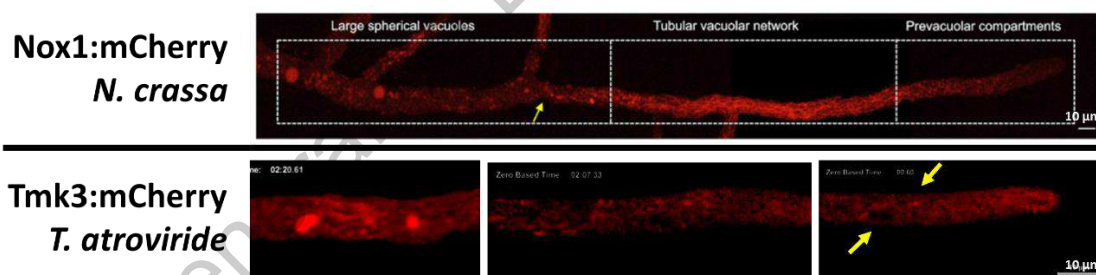


Figura 20. La MAPK Tmk3 de *T. atroviride* se localiza en el citoplasma y en otros orgánulos. Comparación de la localización de la MAPK Tmk3 con Nox1 de *N. crassa* (imagen tomada de Cano-Domínguez et al., 2019). En *T. atroviride* se señalan con flechas las posibles vacuolas tubulares.

Después de que las hifas de Ura-1:T3mCh fueron expuestas a la luz ambiental por 10 min, se observó que la MAPK Tmk3 se transloca al núcleo (Fig. 21). La localización de Tmk3 coincide con los núcleos teñidos con DAPI. Para observarlo en el microscopio, se removió el papel aluminio de las cajas Petri donde la cepa se encontraba incubándose en oscuridad. Después de 10 min, se cortó un cuadro de aproximadamente 2 cm de ancho tomando el perímetro de la colonia de Ura-1:T3mCh creciendo en medio Vogel, se colocó DAPI 0.5 $\mu\text{g/ml}$ sobre un

cubreobjetos, y el cuadro de medio Vogel con micelio de Ura⁺1:T3mCh se colocó de forma invertida sobre el cubreobjetos. El resultado preliminar sugiere que Tmk3 se transloca al núcleo en respuesta al estímulo de luz.

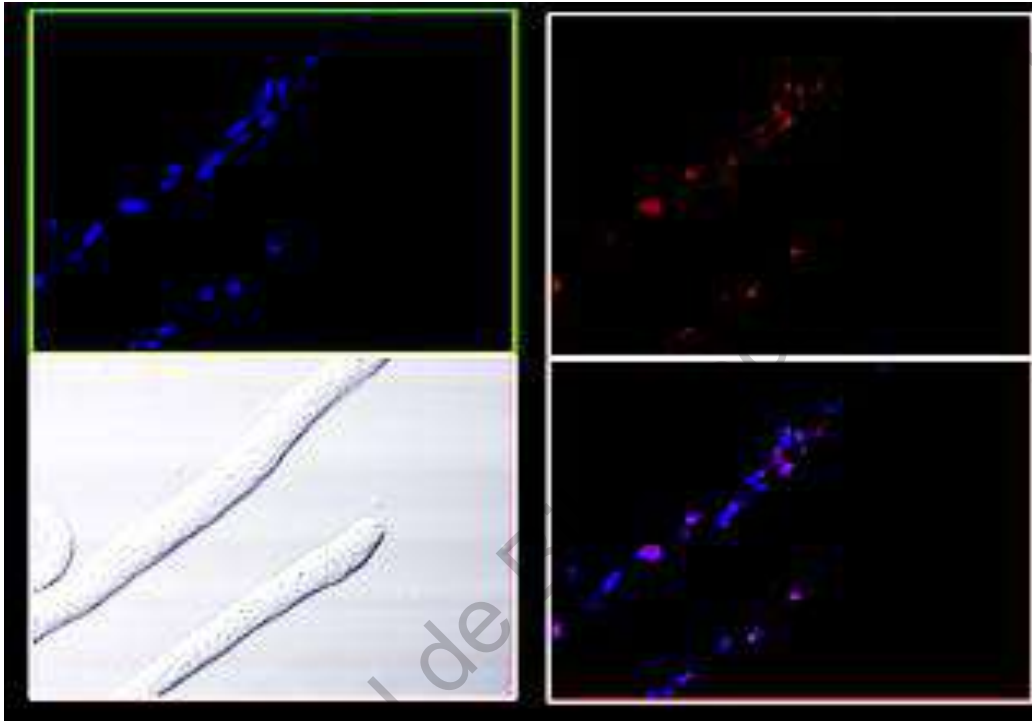


Figura 21. Localización de Tmk3 en respuesta al estímulo de luz blanca. La cepa Ura⁺1:T3mCh se expuso a la luz durante 10 minutos, posteriormente se utilizó 0.5 µg/ml DAPI para teñir los núcleos. La localización se observó con el microscopio confocal Olympus FV1000. Imagen inferior izquierda: hifas de Ura⁺1:T3mCh. Imagen superior izquierda: núcleos de la cepa Ura⁺1:T3mCh teñidos con DAPI. Imagen superior derecha: fluorescencia emitida por Tmk3 etiquetada con mCherry. Imagen inferior derecha: imagen superpuesta de núcleos teñidos con DAPI y Tmk3 etiquetada con mCherry.

También se observó fluorescencia en las hifas de la mutante $\Delta blr2$:T3mCh que se obtuvo con la cepa Ura⁺1:T3mCh (Fig. 22). Tmk3 se localizó en el citoplasma y en orgánulos tubulares y esféricos. Lo anterior sugiere que sin estrés, la carencia del gen *blr2* no afecta la estabilidad de Tmk3, y que la cepa Ura⁺1:T3mCh se puede utilizar como herramienta para observar la localización de Tmk3 en un fondo mutante.

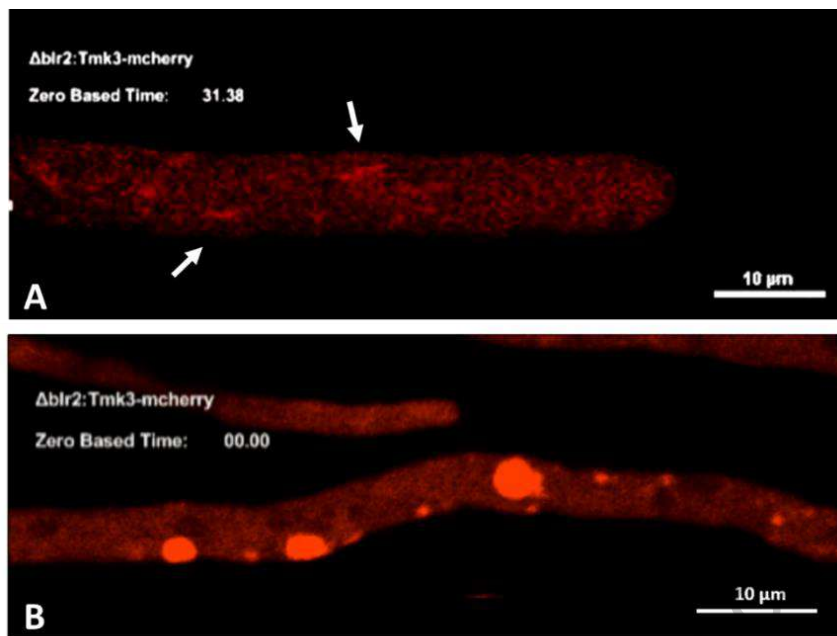


Figura 22. Localización de la MAPK Tmk3 en la cepa $\Delta blr2$:T3mCh. Sin estrés, Tmk3 se localiza en el citoplasma y en el sistema vacuolar en una mutante $\Delta blr2$. Las imágenes fueron tomadas en vivo con el microscopio Nikon Eclipse Ti.

7.5 DISCUSIÓN

Trichoderma atroviride es un excelente modelo de estudio debido a que su genoma puede incorporar secuencias con alta homología por recombinación homóloga (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2020), lo que facilita la inserción de casetes knock-in/knock-outs para la generación de transformantes estables.

En este experimento, se insertó el gen que codifica para la MAPK Tmk3 bajo su mismo promotor y etiquetado con el fluoróforo mCherry. La proteína fluorescente mCherry ha sido usada ampliamente en otros hongos para estudiar la localización de proteínas (Gonia et al., 2017; Khang et al., 2010; Doehlemann et al., 2009), y en esta ocasión se pudo utilizar con éxito en una cepa de *T. atroviride* auxótrofa a uracilo, lo cual sugiere que mCherry unido a Tmk3 en el extremo carboxilo terminal no interfiere con la función de la proteína. El diseño fue basado en el casete para etiquetar genes con GFP en *A. nidulans* (Yang et al., 2004), que

de igual forma se incluyeron secuencias que codifican para repetidos de glicina y alanina (rGA) entre Tmk3 y mCherry, y que actúa como una bisagra para dar estabilidad a la fusión. La idea de Yang et al. (2004) de añadir rGA surgió porque en sus experimentos iniciales no podían etiquetar proteínas con éxito, por lo que ellos tomaron la idea de usar rGA como en *S. cerevisiae* (Labib et al., 1999). Se ha publicado que la proteína EBNA1 del virus Epstein-Barr (virus del herpes humano 4), contiene rGA que le proporciona estabilidad, y bloquea la proteólisis dependiente de ubiquitina en células de humanos (Levitskaya et al., 1997), posteriormente este antecedente se usó como herramienta molecular. Añadir un mínimo de rGA a la proteína I κ B α de humano lo protege de ser degradado por el proteosoma (Sharipo et al., 1998), al igual que p53 (Heessen et al., 2002), lo que demuestra que los rGA da estabilidad a las proteínas quiméricas y lo previene de la degradación proteosomal. Heessen et al. (2003) sugieren que lo anterior es un mecanismo conservado, ya que fue posible generar una proteína GFP quimérica estable con rGA en *S. cerevisiae* (Heessen et al., 2003; Labib et al., 1999), y también proporcionó estabilidad en las fusiones de las proteínas con fluoróforos en *A. nidulans* (Yang et al., 2004), *N. crassa* (Hammond et al., 2011) y *T. atroviride*.

A pesar de que mCherry también se insertó en el genoma de una cepa WT, y se comprobó su expresión por RT-PCR, no fue posible observar fluorescencia. Yang et al. (2004) señalan que después de añadir los rGA fueron capaces de etiquetar varios genes en *A. nidulans*, sin embargo, no indican si de todas las transformantes obtenidas fueron funcionales. En este experimento la eficacia para obtener mutantes fue muy baja, al final solo se pudo obtener una transformante estable derivado de la WT, a pesar de que se concentró más ADN para el proceso de transformación. El tamaño del casete knock-in final fue de 4.3 kb, mientras que los casetes para knock-out son de aproximadamente 3 kb (Calcáneo-Hernández et al., 2020). Posiblemente el tamaño del fragmento de ADN que se desea insertar en el genoma de *T. atroviride* es un factor para que se den eventos de recombinación con éxito.

Los resultados del análisis en vivo de la MAPK Tmk3 sugieren que sin estrés, la MAPK Tmk3 en la cepa Ura¹ se localiza en el citoplasma al igual que homólogos de Tmk3 en *T. harzianum* (Delgado-Jarana, 2006), *S. cerevisiae* (Ferrigno et al., 1998) y *A. nidulans* (Yu et al., 2016). Sin embargo, sorpresivamente también se observó localización en otros orgánulos sin identificar. Las imágenes *in vivo* de la localización de Tmk3 en las hifas de *T. atroviride* es similar a la localización de Nox1 en *N. crassa* (Cano-Domínguez et al., 2019). Nox1 de *N. crassa* mostró una extensa co-localización con el marcador ATPasa vacuolar VMA-1 y solo una asociación menor con los marcadores del retículo endoplásmico (RE) Ca²⁺-ATPasa NCA-1 y un GFP dirigido al lumen del RE (Cano-Domínguez et al., 2019). Si la localización de la MAPK Tmk3 se observó parecida a Nox1 de *N. crassa*, es posible que también Tmk3, además de localizarse en el citoplasma, se encuentre en el RE o en el sistema vacuolar.

En las células eucariotas, las proteínas de la membrana plasmática, las proteínas que se secretan y las proteínas de la vía secretora comienzan su maduración dentro del RE. El RE contiene chaperonas, enzimas de glicosilación y otras enzimas de plegamiento para proporcionar un entorno ideal para el plegamiento de proteínas nacientes (Bicknell et al., 2010). En *S. cerevisiae*, la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE desencadena la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), una vía de señalización conservada que impulsa la transcripción de genes como las chaperonas, aunque en condiciones de estrés del RE, la vía MAPK Hog1 también regula la viabilidad celular (García-Marqués et al., 2015). Durante la etapa tardía de estrés en el RE, la MAPK Hog1 se fosforila y ayuda al RE a recuperar la homeostasis. Se demostró que el mecanismo de activación de Hog1 durante el estrés del RE es regulado por la vía de dos componentes, y tras la fosforilación, Hog1 se transloca al núcleo para regular la expresión génica. Posteriormente, Hog1 regresa al citoplasma, donde sus niveles de fosforilación permanecen altos. Desde su ubicación citoplasmática, Hog1 contribuye a mejorar la estabilidad de Atg8, una proteína de autofagia (Bicknell et al., 2010). Asimismo,

se demostró que la entrada al núcleo de Hog1 no es crítica para la osmoadaptación, aunque la actividad nuclear de Hog1 es prescindible para la adaptación al estrés del RE (García-Marqués et al., 2015). Lo anterior sugiere que la MAPK Tmk3 de *T. atroviride* también podría cumplir una función en el citoplasma relacionada con el RE.

Las vacuolas fúngicas son orgánulos móviles y complejos, análogos de los lisosomas de mamíferos, que no solo participan en la degradación de macromoléculas y proteólisis, sino también están involucradas en otros procesos celulares como almacenamiento y transporte de metabolitos, homeostasis de iones citosólicos y pH, y osmoregulación (Rico-Ramírez et al., 2018; Klionsky et al., 1990). Cuando se analizó Tmk3 en vivo en hifas en crecimiento, se observaron vacuolas tubulares parecidas a la llamada red de cisternas alargadas (Network of elongated cisternae; NEC) en *N. crassa* (Rico-Ramírez et al., 2018). Aunque no hay una publicación directamente relacionada con la MAPK Hog1 y el sistema vacuolar, por otros antecedentes podría ser que su relación sea por osmoregulación, respuestas a la luz azul, y/o crecimiento vegetativo.

En un estrés osmótico no solo se activan MAPKs, también se libera calcio de las vacuolas, aumentando las concentraciones de Ca^{2+} citosólico que activa la vía de señalización de Ca^{2+} /calmodulina (Cyert, 2003; Denis y Cyert, 2002). En *S. cerevisiae* se publicó que la actividad de la H^{+} -ATPasa vacuolar (V-ATPasa) actúa en paralelo con Hog1. Las mutantes *vmaΔ* son deficientes de la actividad V-ATPasa, y son sensibles ante un estrés osmótico. Cuando la célula carece de la actividad V-ATPasa, aumentan los niveles de iones de sodio y por consiguiente, aumentan los niveles de fosforilación de Hog1, a la vez que se eleva la expresión de PTP2, un regulador negativo, posiblemente para moderar la activación de Hog1 (Li et al., 2012). Aunque los resultados sugieren que la ATPasa vacuolar de *S. cerevisiae* ayuda a proveer osmotolerancia en conjunto con Hog1, es posible que Tmk3 de *T. atroviride* también actúe en conjunto con la V-ATPasa para enfrentarse al estrés osmótico.

Se sabe que la luz azul genera especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células (Kumar Rajendran et al., 2019), y el estrés oxidativo provoca la entrada de Ca^{2+} extracelular, y la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático y vacuolas (Ermak y Davies, 2002). Por lo anterior, es probable que también se libere Ca^{2+} en respuesta al estímulo de luz azul en *T. atroviride*, y que Ca^{2+} funcione como una molécula de señalización. El musgo *Physcomitrella patens* cuando crece en oscuridad, sus caulonemas crecen más rápido pero son altamente vacuolados, y cuando es expuesto a la luz, su crecimiento es lento y se libera Ca^{2+} (Russell et al., 1998). En *T. atroviride*, sin estrés se observaron *in vivo* vacuolas esféricas donde se localizó Tmk3, y su crecimiento vegetativo es más rápido en oscuridad (Esquivel-Naranjo et al., 2016). Cuando la cepa Ura⁻¹:T3mCh de *T. atroviride* fue expuesta a la luz, se observó localización de Tmk3 en el núcleo, y su localización coincidió con los núcleos teñidos con DAPI. La MAPK Tmk3 se translocó al núcleo en respuesta a la luz al igual que SakA, el homólogo a Tmk3 en *A. nidulans* (Yu et al., 2016). Tanto la MAPK Tmk3, como las vacuolas fúngicas, desempeñan papeles cruciales en la fisiología del crecimiento vegetativo (Esquivel-Naranjo et al., 2016; Weber, 2002). La cepa silvestre de *T. atroviride* crece más lento en luz, y cuando carece de *tmk3* su crecimiento también se ve comprometido (Esquivel-Naranjo et al., 2016), lo anterior sugiere que Tmk3 podría cumplir funciones en su forma no fosforilada en las vacuolas para regular el crecimiento vegetativo, y cuando se activa por fosforilación, se transloca al núcleo para activar genes de respuesta a estrés y luz azul. Las mutantes carentes de los fotorreceptores Blr1 y Blr2 en *T. atroviride* no esporulan en respuesta a la luz, pero su crecimiento vegetativo no se ve comprometido y conidian en respuesta a daño (Casas-Flores et al., 2004). Si la MAPK Tmk3 además de regular conidiación inducida por luz también regula el crecimiento micelial, es razonable pensar que Tmk3 también se pudiera localizar en otros orgánulos además del citoplasma y el núcleo.

En conclusión, los resultados preliminares sugieren que cuando *T. atroviride* se encuentra en un ambiente sin estrés, la MAPK Tmk3 en su forma no fosforilada

cumple la función de regular el crecimiento vegetativo localizándose en el citoplasma y en otro orgánulo, mientras que en respuesta a un estrés, se concentra en el núcleo para regular genes de respuesta a estrés.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

VIII. CAPITULO 3:

Descifrando la participación de las histidina
quinasas con dominios PAS y GAF en las
respuestas al estrés celular y la luz azul de
Trichoderma atrovoride

8.1 RESUMEN

Entender los factores que controlan el cambio morfogénico de micelio a conidia en *Trichoderma atroviride* es esencial para su uso como agente de biocontrol. Datos previos han mostrado que la MAPK Tmk3 regula la fotoconidiación a través del sistema de dos componentes, sin embargo, se desconoce el receptor o los receptores que podrían participar en la activación de Tmk3 por luz. En este estudio se evaluó la participación de siete histidina cinasas (HK) con dominio sensor PAS o GAF en respuesta a la luz y estrés celular que son regulados por la MAPK Tmk3. La caracterización fenotípica de las mutantes sugiere que Hk9 y Hk11 regulan la conidiación inducida por luz, mientras que Hk9 y Hk2b regulan el crecimiento micelial posiblemente a través de la MAPK Tmk3, no obstante, los resultados mostraron que Hk1a, Hk2b, Hk4 y Hk5 funcionan como represoras de la fotoconidiación, y Hk5 y Hk10 actúan como represoras del crecimiento filamentoso. Todas las HKs analizadas fueron tolerantes al estrés osmótico en conidia, y en micelio, Hk1a, Hk4, Hk5 y Hk10 actúan como represoras de la osmotolerancia. En micelio, Hk2b, Hk4, Hk5 y Hk9 regulan la integridad de la pared celular; Hk2b, Hk4, Hk5, Hk9 y Hk10 las altas dosis de cadmio, y Hk2b, Hk5, Hk9 y Hk11 las respuestas a estrés por H₂O₂. Posteriormente la expresión de genes de respuesta a luz dependientes de Tmk3 fue evaluada en las mutantes carentes de HKs. Los genes *blu1*, *grg2*, *freq* y *cry* se sobreexpresaron en las mutantes $\Delta h k 1 a$, $\Delta h k 2 b$, $\Delta h k 4$, $\Delta h k 5$ y $\Delta h k 10$, aunque se observó que Hk9 regula positivamente a *env1*. Finalmente la expresión de las doce HKs presentes en el genoma de *T. atroviride* fue evaluada en oscuridad y luz, y la tendencia fue que las HKs se expresaron menos en luz que en oscuridad. En ausencia del gen *tmk3*, los transcritos de los genes que codifican para HKs aumentaron. En conclusión, cada HK cumple un rol para mantener la homeostasis celular en *T. atroviride*, actuando como activadores o represoras, y los resultados sugieren que a la vez la MAPK Tmk3 regula la transcripción de las HKs.

(Palabras claves: histidina cinasa, *Trichoderma atroviride*, luz, osmotolerancia)

ABSTRACT

Understanding the factors that control the morphogenic change from mycelia to conidia in *Trichoderma atroviride* is essential for its use as biocontrol. Previous data have shown that the MAPK Tmk3 regulates light-induced conidiation through the two-component system. However, the receptor/receptors that could participate in the activation of Tmk3 by light is unknown. In this study, the participation of seven histidine kinases (HK) with PAS or GAF sensor domain in response to light and cellular stress regulated through Tmk3 was evaluated. The phenotypic characterization of the mutants suggests that Hk9 and Hk11 regulate light-induced conidiation, and Hk9 and Hk2b regulate mycelial growth, possibly through Tmk3. However, results showed that Hk1a, Hk2b, Hk4 and Hk5 function as repressors of photoconidiation, and Hk5 and Hk10 act as filamentous growth repressors. All of the HKs analyzed were tolerant to osmotic stress in conidia, while in mycelia stage, Hk1a, Hk4, Hk5 and Hk10 act as osmotolerance repressors. In mycelium, Hk2b, Hk4, Hk5 and Hk9 regulate the integrity of the cell wall; Hk2b, Hk4, Hk5, Hk9 and Hk10 the high doses of cadmium, and Hk2b, Hk5, Hk9 and Hk11 the responses to stress by H₂O₂. Subsequently, the expression of Tmk3-dependent light response genes were evaluated in mutants lacking HKs. The genes *blu1*, *grg2*, *freq* and *cry* were overexpressed in $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, and $\Delta hk10$ strains, although it was observed that Hk9 positively regulates *env1*. Finally, the expression of the twelve HKs present in the *T. atroviride* genome was evaluated in darkness and light. The HKs were less expressed in light than darkness, but in the absence of the *tmk3* gene, the transcripts increased. In conclusion, each HK plays a role in maintaining cell homeostasis in *T. atroviride*, acting as activators or repressors, and results suggest that at the same time, the MAPK Tmk3 regulates the transcription of the HKs.

(Key words: histidine kinase, *Trichoderma atroviride*, light, osmotolerance)

8.2 INTRODUCCIÓN

La habilidad de los organismos vivos para percibir el ambiente que lo rodea está relacionada con la evolución de las proteínas de señalización, los cuales reconocen señales específicas y ejecutan respuestas predeterminadas (Eyers, 2020). La información de una señal fluye a través de un sistema vivo, y a nivel molecular, este flujo de información va acompañado por el movimiento de moléculas dentro de una célula (Krysan y Colcombet, 2018). Dichas moléculas pueden ser algo tan simple como una proteína única, capaz de reconocer un ligando y ejercer un cambio fenotípico, o una vía extremadamente compleja, donde participan docenas de proteínas diferentes que actúan en coordinación (Eyers, 2020).

El primer estudio sobre fosforilación de proteínas fue hace más de cien años, y desde entonces se ha demostrado que este tipo de modificación regula aspectos de la función de las proteínas, y controla redes de señalización que moderan el crecimiento celular, la diferenciación, y las respuestas fisiológicas a estímulos externos (Eyers, 2020). No obstante, hasta la década de 1950 se dio a conocer a las proteínas cinasas como una nueva clase de enzimas (Adam y Hunter, 2018). En 1962 se descubrió la primera fosfohistidina en extractos de proteína mitocondrial de bovino (Boyer et al., 1962), sin embargo, el progreso del estudio de fosfohistidinas ha sido lento, principalmente por las dificultades técnicas que se han presentado (Eyers, 2020). Las fosfohistidinas contienen un enlace fosforamidato (P-N) el cual los hace termodinámicamente inestable, y esa propensión termodinámica para transferir su grupo fosforilo a otras moléculas, incluyendo a aminoácidos, sustenta el mecanismo de acción de una gran clase de histidina cinasas (HK), llamadas histidina cinasas de dos componentes (Attwood, 2013; Besant y Attwood, 2009).

Los sistemas de dos componentes (Two-component systems, TCS) constituyen el medio predominante por el cual los procariotas perciben y se adaptan a su entorno (Möglich, 2019). Los procariotas transducen las señales en función de la organización y complejidad del dominio por medio de sistemas de un

componente, sistemas de dos componentes por HKs de clase I y sistemas multicomponentes por HKs de clase II, o conocidos como sistemas de quimiotaxis (Wuichet et al., 2007). Se creía que las HKs eran componentes exclusivos del genoma de procariotes, hasta que en 1993 se publicó que el gen de respuesta a etileno de *Arabidopsis thaliana*, *ETR1*, es parecido a las proteínas del sistema de dos componentes de bacterias (Chang et al., 1993). Posteriormente, se descubrió a la única HK de *S. cerevisiae*, Sln1, identificándola como el receptor de la vía de señalización que regula las respuestas a estrés osmótico, la vía de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) Hog1 (Maeda et al., 1994).

El sistema de dos componentes es usado por procariotes y eucariotes para detectar y responder a las señales ambientales. En procariotes, el TCS usualmente se compone de la comunicación entre dos módulos funcionales: HKs y reguladores de respuestas (RR). La percepción de un estímulo induce a la autofosforilación de la HK, y el fosfato es transferido al RR, el cual actúa como factor de transcripción para regular directamente a genes requeridos para una respuesta adaptativa. Sin embargo, existen otras vías más complejas en bacterias que incluyen a las proteínas híbridas, la cual una sola proteína posee el dominio cinasa y el dominio receptor, ocurriendo más de un evento de fosfotransferencia, o también vías donde participan más de dos proteínas. En eucariotes, el TCS incluye un módulo adicional, el dominio fosfotransferasa que contiene histidina (Hpt), y la ruta de señalización para la percepción de un estímulo se integra de un fosforelevo de varios pasos entre tres tipos de proteínas: HK → Hpt → RR. En la mayoría de los TCS de eucariotes, el RR actúa como un factor de transcripción, o regula elementos río abajo como vías de MAPKs, o sistemas de señalización de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) (Kabbara et al., 2019; Fassler y West, 2013; Wurgler-Murphy, 1997). En plantas, algunas HKs son conocidas por regular directamente otros tipos de proteínas como cinasas tipo Raf (Clark et al., 1998). Actualmente se sabe que el genoma de virus, bacteriófagos, bacterias, arqueas, mohos mucilaginosos, hongos y plantas poseen genes que codifican para HKs (Kabbara et al., 2019; Defosse et al., 2015).

El TCS de *S. cerevisiae* se compone de la HK Sln1, el Hpt Ypd1, y el RR Skk1. Ssk1 no actúa como factor de transcripción, sino como activador de la cascada de señalización para las respuestas ante un estrés osmótico, conformada por las MAPKKKs Ssk2/Ssk22, la MAPKK Pbs2, y la MAPK Hog1 (Brewster y Gustin, 2014; Wurgler-Murphy, 1997). Mientras que *S. cerevisiae* y *Batrachochytrium dendrobatidis* tienen solo una HK en su genoma, otros hongos poseen más (Defosse et al., 2015; Catlett et al., 2003), y se ha revelado que son partícipes en las respuestas al estrés oxidativo, virulencia, sensibilidad a fungicidas, dimorfismo, producción de metabolitos secundarios, integridad de la pared celular, morfogénesis de hifas, esporulación, desarrollo sexual y asexual y percepción de luz (Hérivaux et al., 2016; Li et al., 2010).

Dado que el número de HKs varía según la especie de hongo, y que sus dominios receptores son diferentes entre sí, Catlett y colaboradores (2003) clasificaron a las HKs de hongos ascomicetos en once grupos. Las HKs más estudiadas son la HK clase III, conocida como Nik-1/Os-1, el cual contiene repetidos del dominio HAMP (Histidine kinases, Adenylyl cyclases, Methyl-accepting chemotaxis Proteins) en la región amino terminal (Catlett et al., 2003), y fue identificada inicialmente en *N. crassa* (Alex et al., 1996). Nik-1/Os-1 forma parte de la vía osmosensora de *N. crassa* (Schumacher et al., 1997), y homólogos de Nik-1 en otros hongos regulan además de las respuestas a estrés osmótico, conidiación, la morfología de la hifa, la estructura de la pared celular, y respuestas a fungicidas (Hagiwara et al., 2013; Meena et al., 2010). Otra HK muy caracterizada en hongos filamentosos es la HK del grupo VIII, el cual posee un dominio PHY conservado en fitocromos (Catlett et al., 2003). El fitocromo mejor caracterizado en hongos es FphA de *A. nidulans*, el cual actúa como un receptor de luz roja para activar la vía de MAPK SakA, homóloga a la MAPK Hog1, y además reprimir el desarrollo sexual en condiciones de luz roja (Yu et al., 2016; Blumenstein et al., 2005).

El hongo ascomiceto *T. atroviride* es altamente interactivo en raíces y suelos, produce una amplia gama de sustancias antibióticas y parasita otros hongos

(Harman et al., 2004). Es considerado como un agente excelente de biocontrol. Su capacidad para detectar, invadir y destruir otros hongos ha sido la principal razón de su éxito comercial como bioplaguicida (Kappel et al., 2020; Mukherjee et al., 2013). Un hongo como agente de biocontrol ideal es aquel que produce conidia de manera rentable y mantiene largos periodos de crecimiento vegetativo (Steyaert et al., 2010), por lo tanto, comprender el mecanismo del cambio morfogénico de micelio a conidia en *T. atroviride* es integral para su mejora comercial.

En *T. atroviride*, la transición de micelio a espora es determinado por distintas señales ambientales, una de ellas es la luz, un componente importante para la producción comercial de conidia (Steyaert et al., 2010). Las cepas silvestres de *T. atroviride* producen conidia en las longitudes de onda cercanas a la luz azul (Kumagai y Oda, 1969), y las respuestas a la luz azul son reguladas principalmente por las proteínas fotorreceptoras Blr-1 y Blr-2, similares a las fototropinas de plantas (Casas-Flores et al., 2004). Otra proteína que participa en las respuestas a la luz en *T. atroviride* es la MAPK Tmk3, homóloga a Hog1 de *S. cerevisiae* (Esquivel-Naranjo et al., 2016). También se identificaron a los elementos que participan en la vía de activación de Tmk3 por luz: la MAPKK Pbs2 (Esquivel-Naranjo et al., 2016), la MAPKKK Ssk2 y el RR Ssk1 (Gómez-May, 2018). Además, *T. atroviride* posee 12 HKs en su genoma (Schmoll et al., 2016), los RR son activados por HKs, por lo cual al menos uno de ellos podría estar implicado en la activación de Tmk3 por luz. Dado que, en análisis previos descartaron la participación de las HK Nik1 y Phy1 en la activación de genes de respuesta a luz azul (Calcáneo-Hernández et al., en proceso), en el presente trabajo se exploró la función de las HKs con dominios PAS y GAF, los cuales podrían estar implicados en la señalización o regulación de la transcripción de genes de respuesta a luz azul en *T. atroviride*.

8.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas enlistadas en la tabla 3. Las cepas se propagaron en medios PDA y se incubaron a 27 °C en luz blanca constante o en oscuridad, cubiertos con papel aluminio. Los medios de cultivo que se utilizaron fueron previamente esterilizados en una autoclave a 15 psi durante 15 min y la manipulación de los hongos se realizó bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

Tabla 3. Cepas utilizadas

<i>T. atroviride</i>		
Cepa	Genotipo	Referencia
Silvestre (WT)	IMI206040	
Ura ⁻ 1	Ura ⁻	(Calcáneo-Hernández et al., 2020)
$\Delta tmk3$ -6	$\Delta tmk3; pyr4$	(Calcáneo-Hernández et al., 2020)
Hk1a-3,9,11	ΔTa_32890	Este estudio
Hk2b-4,9	ΔTa_133533	Este estudio
Hk4-2,5,7,8,9	ΔTa_88129	Este estudio
Hk5-8,12	ΔTa_32149	Este estudio
Hk9-3	ΔTa_152868	Este estudio
Hk10-1,2,3	ΔTa_286374	Este estudio
Hk11-5	ΔTa_296396	Este estudio

Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo la metodología de Raeder y Broda (1985) descrita en Anexo 1.

Generación de mutantes

Se crearon casetes para reemplazar los genes Hk1a, Hk2b, Hk4, Hk5, Hk9, Hk10 y Hk11 de *T. atroviride* por el gen *pyr4* siguiendo la técnica de PCR de doble unión (Yu et al., 2004), utilizando los oligonucleótidos enlistados en Anexo 2.

Posteriormente, se transformaron protoplastos de la cepa Ura⁻1 por el método de polietilenglicol-CaCl₂ usando los casetes contruidos por PCR, siguiendo la metodología de transformación descrita en Anexo 1. Como medio selectivo se utilizó una placa de PDA con 1 M sorbitol.

Identificación de mutantes

Las transformantes se seleccionaron en medios PDA realizando tres cultivos monospóricos. Posteriormente, se extrajo el ADN genómico (Anexo 1) para confirmar el reemplazo génico mediante tres reacciones de PCR. En las tres reacciones de PCR se utilizó la enzima ADN polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific) y los oligonucleótidos enlistados en Anexo 1. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: el primer paso a 95 °C por 3 min, después 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s, 72 °C por 1 min por kb, y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Evaluación del crecimiento micelial de mutantes

A partir de preinóculos crecidos en oscuridad de la cepa WT y cepas mutantes, se cortaron seis discos de micelio de 5 mm de diámetro, tres discos se inocularon sobre placas de PDA y se incubaron en oscuridad cubiertas con papel aluminio, mientras que tres discos fueron inoculados sobre PDA y se incubaron en condiciones de luz blanca constante (0.586 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Después de 48 h, se tomaron fotos para medir el crecimiento radial usando el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). El ensayo se realizó por triplicado.

Determinación de la producción de conidia estimuladas por luz

A partir de preinóculos crecidos en oscuridad, se cortaron discos de micelio (5 mm) de la cepa WT y cepas mutantes, se inocularon sobre placas de PDA, y se incubaron en luz blanca constante (0.586 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 27 °C durante 7 días. Después la conidia fue colectada con 16 ml de agua estéril, y cuantificada usando una cámara de Neubauer. El experimento se realizó por triplicado.

Análisis de expresión de genes fotorregulados

Las colonias crecidas en oscuridad de la cepa WT y mutantes fueron expuestas a la luz azul durante 30 min (914,4 $\mu\text{mol m}^{-2}$). Las colonias que se mantuvieron en oscuridad se usaron como control. Se extrajo el ARN, se sintetizó ADNc y se analizó la expresión de los genes dependientes de luz azul enlistados en Anexo 2, siguiendo la metodología descrita en Anexo 1.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5 (<http://www.graphpad.com>) para las construcciones de las gráficas. Las gráficas muestran el promedio de tres experimentos independientes más la desviación estándar. Se realizaron pruebas de ANOVA de una vía utilizando los Post-Test de Tukey-Kramer con valores de 0.05.

8.4 RESULTADOS

Generación de mutantes carentes de genes que codifican para HKs

Schmoll et al. (2016) identificaron las doce HKs en el genoma de *T. atroviride* y los clasificaron en base a Catlett et al. (2003). Se encuentran presentes dos genes parálogos que codifican para HKs de la clase I (genes Ta_ 32890 y Ta_ 49350) y clase II (Ta_ 128614 y Ta_ 133533), mientras que las HKs restantes por analizar pertenecen a las clases IV (Ta_88129), V (Ta_32149), VI (Ta_158454), IX (Ta_152868), X (Ta_286374) y XI (Ta_296396). Cada secuencia fue tomada de la base de datos del genoma de *T. atroviride* (*T. atroviride* genome database v2.0 of the Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute) para el diseño de oligonucleótidos (Anexo 1). Las HKs fueron nombradas según el número de la clase a la que pertenecen, con excepción del gen Ta_158454 clase VI, el cual se nombró *sln1* por ser homóloga al gen que codifica para la HK Sln1 de *S. cerevisiae*. Se construyeron casetes como se ilustra en la Fig. 23 para reemplazar

los genes que codifican para HKs por el gen *pyr4* en base a la técnica de PCR doble unión (Yu et al., 2004).

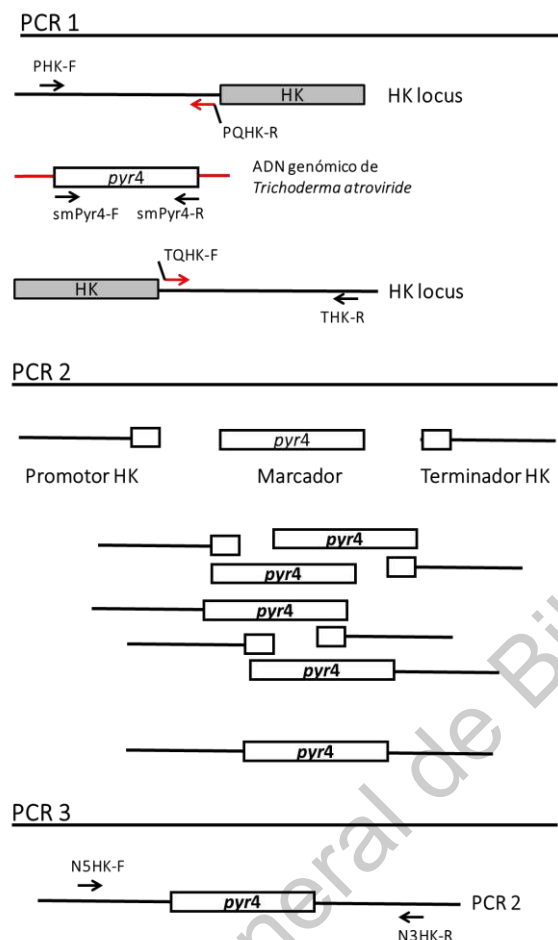


Figura 23. Ilustración esquemática de la construcción de un casete por PCR para reemplazar los genes HKs por el marcador *pyr4*. PCR1. En las reacciones correspondientes al PCR 1, se amplifican los extremos 5' y 3' del gen diana usando oligonucleótidos quimérico al gen diana y el gen *pyr4*. **PCR2.** Por complementariedad se unen los fragmentos amplificados en PCR1. **PCR3.** Amplificación del casete de reemplazo usando oligonucleótidos anidados.

Se llevó a cabo la construcción de los casetes. Con oligonucleótidos específicos se amplificaron 1.1 kb de la región 5' (Phk1a-F y pPQhk1a-R) y 1.2 kb de la región 3' (pTQhk1a-F y Thk1a-R) del gen *hk1a* (EHK43602.1); 1 kb de la región 5' (Phk1b-F y pPQhk1b-R) y 1.1 kb de la región 3' (pTQhk1b-F y Thk1b-R) del gen *hk1b* (EHK49368.1); 1.2 kb de la región 5' (Phk2a-F y pPQhk2a-R) y 1.3 kb de la región 3' (pTQhk2a-F y Thk2a-R) del gen *hk2a* (EHK46538.1); 1.1 kb de la región 5' (Phk2b-F y pPQhk2b-R) y 1.3 kb de la región 3' (pTQhk2b-F y Thk2b-R) del gen *hk2b* (EHK46538.1); 1.1 kb de la región 5' (Phk4-F y pPQhk4-R) y 1.1 kb de la región

3' (pTQhk4-F y Thk4-R) del gen *hk4* (EHK44956.1); 1 kb de la región 5' (Phk5-F y pPQhk5-R) y 1.2 kb de la región 3' (pTQhk5-F y Thk5-R) del gen *hk5* (EHK42346.1); 1.1 kb de la región 5' (Phk9-F y pPQhk9-R) y 1.4 kb de la región 3' (pTQhk9-F y Thk9-R) del gen *hk9* (EHK39964.1); 1.2 kb de la región 5' (Phk10-F y pPQhk10-R) y 1.2 kb de la región 3' (pTQhk10-F y Thk10-R) del gen *hk10* (EHK40776.1); 1 kb de la región 5' (Phk11-F y pPQhk11-R) y 1.1 kb de la región 3' (pTQhk11-F y Thk11-R) del gen *hk11* (EHK40433.1); 1.1 kb de la región 5' (Psln1-F y pPQsln1-R) y 1.1 kb de la región 3' (pTQsln1-F y Tsln1-R) del gen *sln1* (EHK50841.1). Adicionalmente, se amplificó 1.2 kb del marcador de selección *pyr4* (smpyr4-F y smpyr4-R) (Fig. 24a). En un segundo PCR, se fusionaron los tres fragmentos para construir el casete que comprende el gen *pyr4* flanqueado por los extremos 5' y 3' de los genes que codifican para HKs. El tercer PCR consiste en re-amplificar los casetes para aumentar la concentración y especificidad (Fig. 24b). Se usaron oligonucleótidos anidados para amplificar 3.4 kb del casete para reemplazar el gen *hk1a* (N5hhk1-F y N3hhk1-R); 3.3 kb para el gen *hk1b* (N5hhk8-F y N3hhk8-R); 3.5 kb para el gen *hk2a* (N5hhk2-F y N3hhk2-R); 3.4 kb para el gen *hk2b* (N5hhk7-F y N3hhk7-R); 3.3 kb para el gen *hk4* (N5hhk9-F y N3hhk9-R); 3.2 kb para el gen *hk5* (N5hhk4-F y N3hhk4-R); 3.5 kb para el gen *hk9* (N5hhk3-F y N3hhk3-R); 3.5 kb para el gen *hk10* (N5hhk6-F y N3hhk6-R); 3.2 kb para el gen *hk11* (N5hhk5-F y N3hhk5-R); 3.3 kb para el gen *sln1* (N5sln1-F y N3sln1-R).

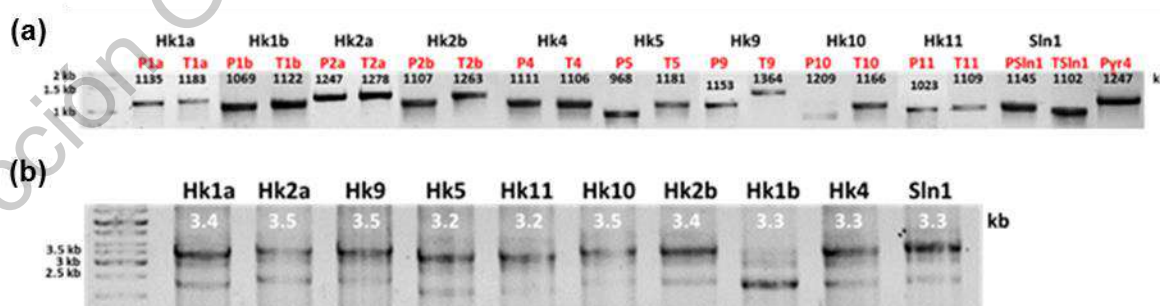


Figura 24. Casete para el reemplazo de los genes que codifican para histidina cinasas por el gen *pyr4*. (a) Se amplificaron los extremos 5' y 3' de los genes que codifican para HKs de *T. atroviride* además del marcador de selección *pyr4*. (b) Casetes para reemplazar los genes de HKs. En ambas electroforesis se usó agarosa al 1 %.

Para eliminar los genes que codifican para HKs en *T. atroviride*, se transformaron protoplastos de la cepa Ura⁻1 con los casetes contruidos por PCR. El casete para la deleción del gen *hk1b* (Ta_49350) resultó ser de un tamaño menor al esperado por lo que no se utilizó para la transformación, los casetes para los otros genes resultaron ser del tamaño esperado, sin embargo, también se amplificaron otras bandas de menor tamaño.

Se llevó a cabo la transformación de protoplastos. Las transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecer en medios sin uracilo. En el control negativo donde en lugar de usar el casete se usó solución osmótica no hubo crecimiento, validando que las colonias seleccionadas eran cepas transformantes. Después de seis cultivos monospóricos, se extrajo el ADN total de las transformantes y se analizó el reemplazo de los genes por PCR con oligonucleótidos que amplificaron un fragmento de la región codificante.

Se obtuvieron 18 transformantes del gen *hk1a*, 17 transformantes del gen *hk2a*, 9 transformantes del gen *hk2b*, 9 transformantes del gen *hk4*, 20 transformantes del gen *hk5*, 13 transformantes del gen *hk9*, 3 transformantes del gen *hk10*, 6 transformantes del gen *hk11* y 14 transformantes del gen *sln1*. Finalmente, se comprobaron por PCR la obtención de 3 mutantes del gen *hk1a* (Fig. 25), 2 mutantes del gen *hk2b* (Fig. 27), 5 mutantes del gen *hk4* (Fig. 28), 2 mutantes del gen *hk5* (Fig. 29), 1 mutante del gen *hk9* (Fig. 30), 3 mutantes del gen *hk10* (Fig. 31) y 1 mutante del gen *hk11* (Fig. 32). No se pudo comprobar el reemplazo génico de *hk2a* (Fig. 26) y *sln1* (Fig. 33), en el análisis por PCR de la doble recombinación homóloga se amplificó una banda del tamaño esperado en la cepa WT en ambos casos.

Histidina cinasa Hk1a

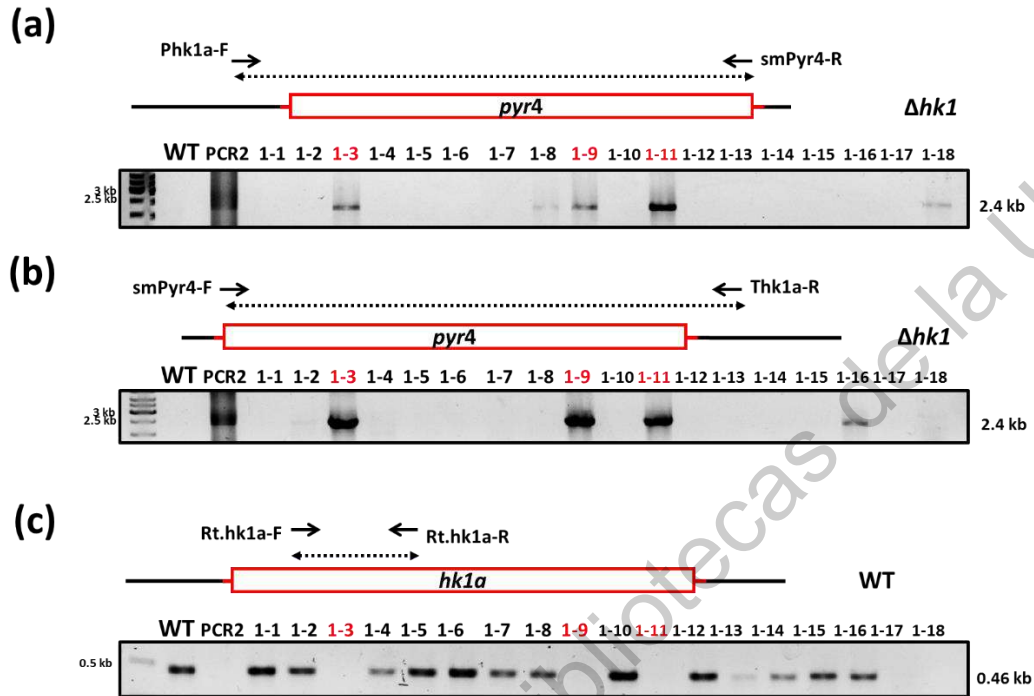
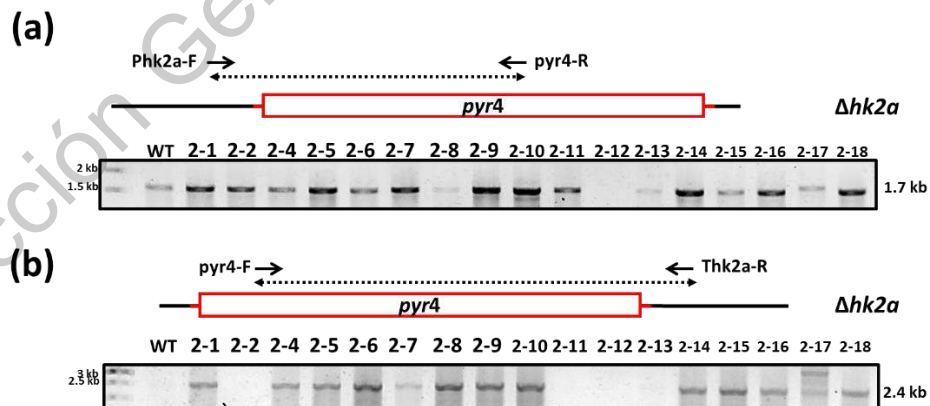


Figura 25. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen *hk1a*. Usando ADN genómico de las cepas indicadas se amplificaron los extremo 5' (a) y extremo 3' (b). Se amplificó una banda de 2.4 kb en el extremo 5' y una banda de 2.4 kb en el extremo 3' solo en cepas $\Delta hk1$ (cepas $\Delta hk1$ -3, -9 y -11). (c) Amplificación de un fragmento del ORF del gen *hk1*. Se amplificó un fragmento de 0.46 kb solo en la cepa WT y cepas no mutantes.

Histidina cinasa Hk2a



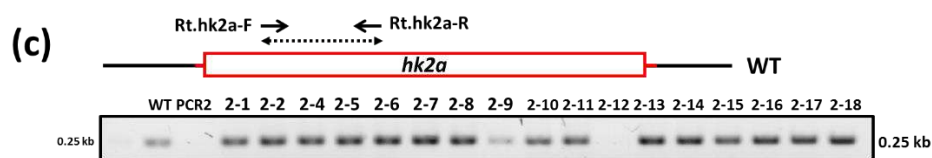


Figura 26. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen *hk2a*. (a) Amplificación del extremo 5' y extremo 3' (b) en la cepa WT y mutantes $\Delta hk2a$. Se esperaba amplificar una banda de 1.7 kb en el extremo 5' y una banda de 2.4 kb en el extremo 3' solo en cepas $\Delta hk2a$, sin embargo, en el extremo 5' se obtuvo una banda de menor peso tanto en la cepa WT como en las transformantes obtenidas con el casete para reemplazar el gen *hk2a*. (c) Amplificación de un fragmento del ORF del gen *hk2a*. Se amplificó un fragmento de 0.25 kb en la cepa WT y cepas no mutantes.

Histidina cinasa Hk2b

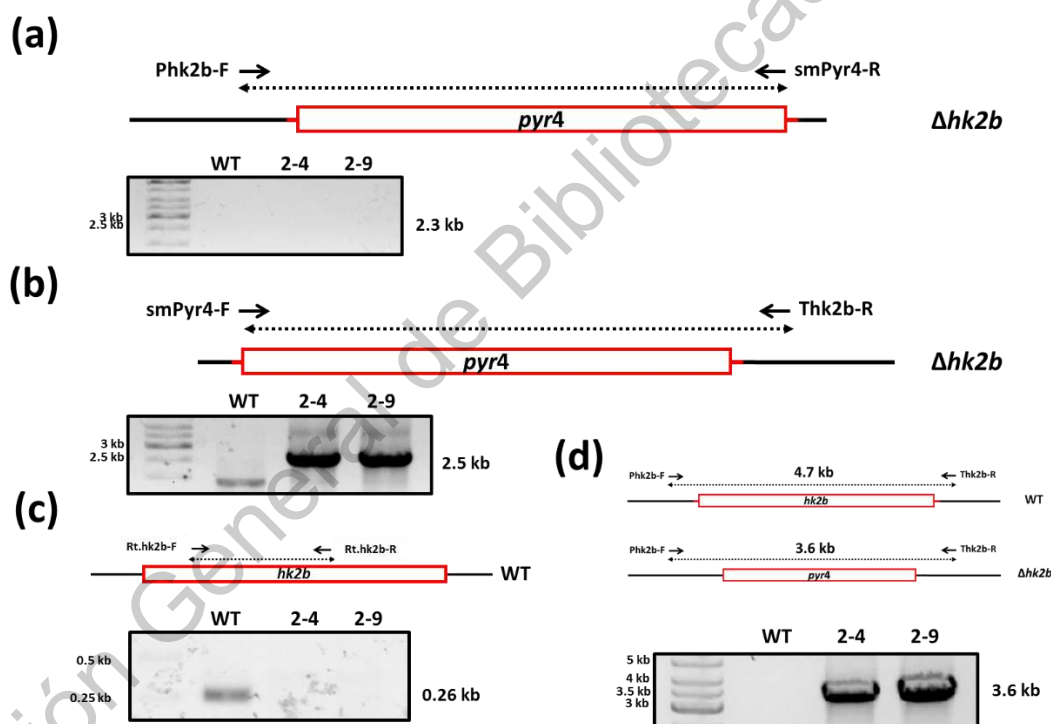


Figura 27. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen *hk2b*. (a) Amplificación del extremo 5' y extremo 3' (b) en la cepa WT y mutantes $\Delta hk2$. Se esperaba amplificar una banda de 2.3 kb en el extremo 5' en cepas mutantes, no obstante, no fue posible amplificarlo. En el extremo 3' se amplificó la banda esperada de 2.5 kb solo en cepas $\Delta hk2$ (cepas $\Delta hk2$ -4, -9). (c) Amplificación de un fragmento del ORF del gen *hk2*. Se obtuvo un fragmento de 0.26 kb solo en la cepa WT. (d) Amplificación del casete de reemplazo en cepas $\Delta hk2$. Para corroborar el reemplazo génico, se amplificó todo el casete de reemplazo usando los oligonucleótidos PHhk7-F y THhk7-R. Solo se obtuvo una banda de 3.6 kb en cepas mutantes.

Histidina cinasa Hk4

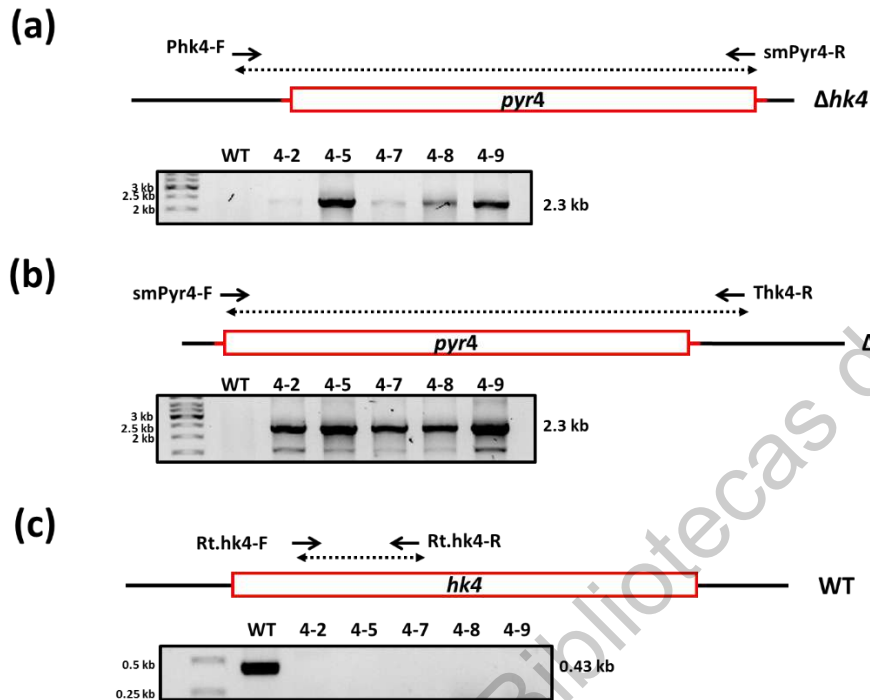
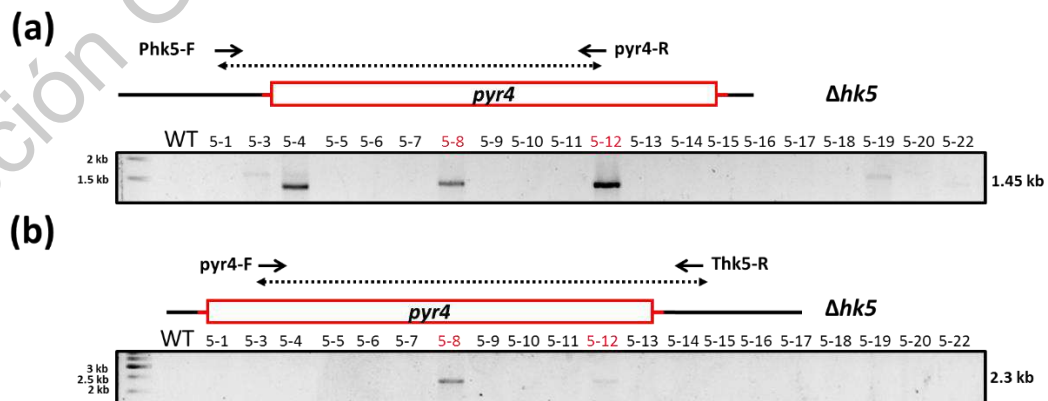


Figura 28. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen *hk4*. (a) Amplificación del extremo 5' y extremo 3' (b) en la cepa WT y mutantes $\Delta hk4$. Se obtuvo una banda de 2.3 kb en el extremo 5' y una banda de 2.3 kb en el extremo 3' solo en cepas $\Delta hk4$ (cepas $\Delta hk4$ -2, -5, -7, -8 y -9). (c) Amplificación de un fragmento del ORF del gen *hk4*. Se amplificó un fragmento de 0.43 kb solo en la cepa WT.

Histidina cinasa Hk5



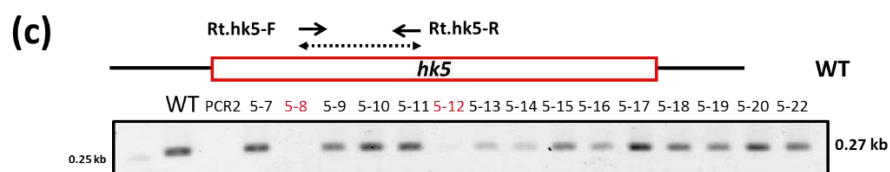


Figura 29. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen *hk5*. (a) Amplificación del extremo 5' y extremo 3' (b) en la cepa WT y mutantes $\Delta hk5$. Se obtuvo una banda de 1.45 kb en el extremo 5' y una banda de 2.3 kb en el extremo 3' solo en cepas $\Delta hk5$ (cepas $\Delta hk5$ -8 y -12). (c) Amplificación de un fragmento del ORF del gen *hk5*. Se amplificó un fragmento de 0.27 kb solo en la cepa WT y cepas no mutantes.

Histidina cinasa Hk9

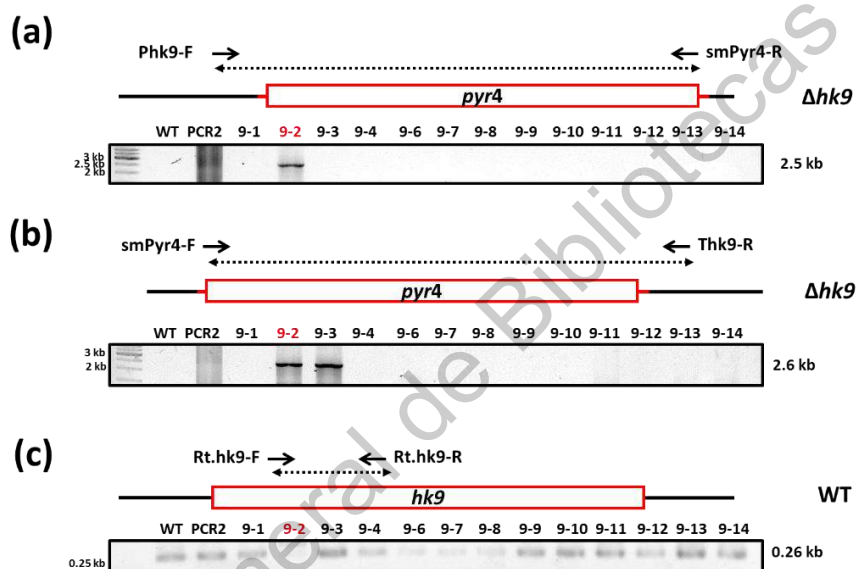
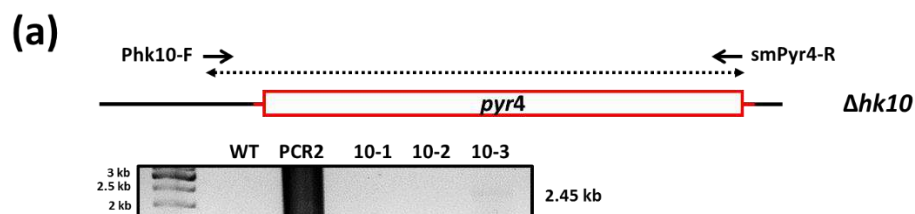


Figura 30. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen *hk9*. (a) Amplificación del extremo 5' y extremo 3' (b) en la cepa WT y mutantes $\Delta hk9$. Se obtuvo una banda de 2.5 kb en el extremo 5' y una banda de 2.6 kb en el extremo 3' solo en cepas $\Delta hk9$ (cepa $\Delta hk9$ -2). (c) Amplificación de un fragmento del ORF del gen *hk9*. Se amplificó un fragmento de 0.26 kb solo en la cepa WT y cepas no mutantes.

Histidina cinasa Hk10



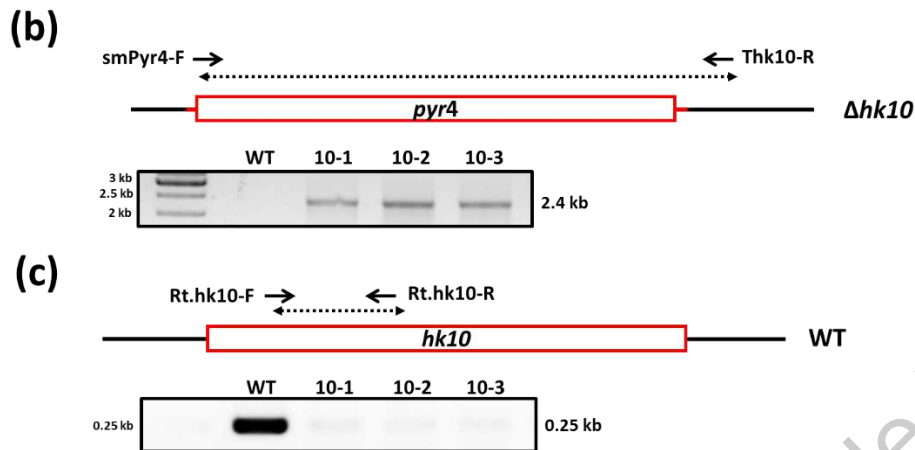


Figura 31. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen *hk10*. (a) Amplificación del extremo 5' y extremo 3' (b) en la cepa WT y mutantes $\Delta hk10$. Se obtuvo una banda de 2.45 kb en el extremo 5' y una banda de 2.4 kb en el extremo 3' solo en cepas $\Delta hk10$ (cepas $\Delta hk10$ -1, -2 y -3). (c) Amplificación de un fragmento del ORF del gen *hk10*. Se amplificó un fragmento de 0.25 kb solo en la cepa WT.

Histidina cinasa Hk11

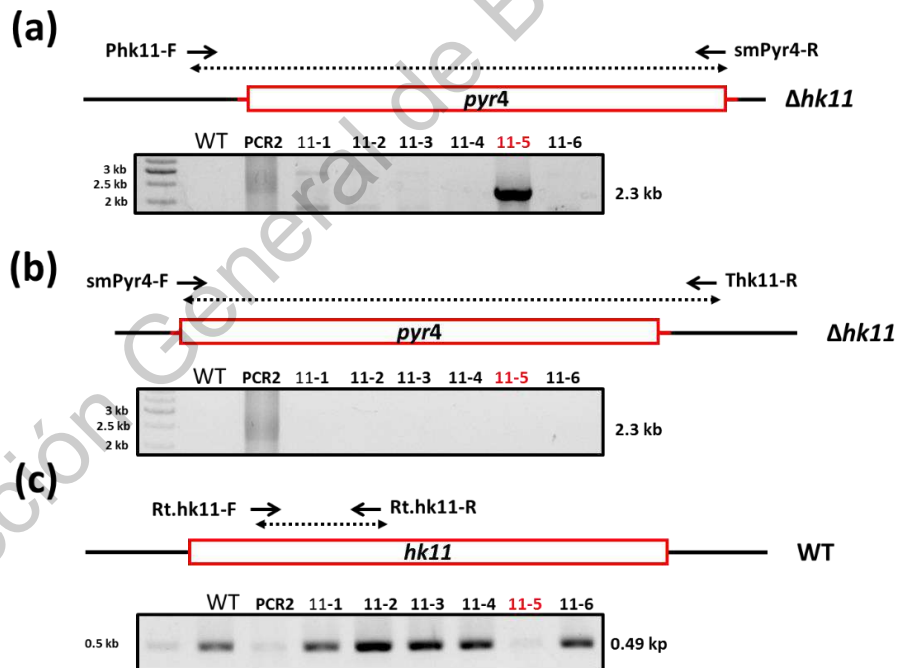


Figura 32. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen *hk11*. (a) Amplificación del extremo 5' y extremo 3' (b) en la cepa WT y mutantes $\Delta hk11$. Se obtuvo una banda de 2.3 kb en el extremo 5' y una banda de 2.3 kb en el extremo 3' solo en cepas $\Delta hk11$ (cepa $\Delta hk11$ -5). (c) Amplificación de un fragmento del ORF del gen *hk11*. Se amplificó un fragmento de 0.49 kb solo en la cepa WT y cepas no mutantes.

Histidina cinasa Sln1

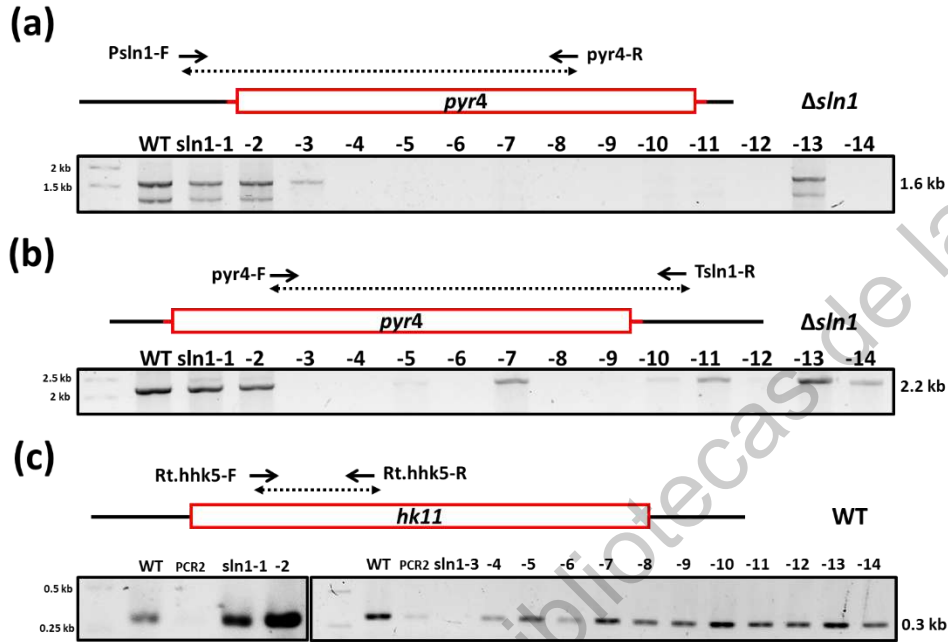


Figura 33. Identificación por PCR de las mutantes carentes del gen *sln1*. (a) Amplificación del extremo 5' y extremo 3' (b) en la cepa WT y mutantes $\Delta sln1$. Se esperaba amplificar una banda de 1.6 kb en el extremo 5' y una banda de 2.2 kb en el extremo 3' solo en cepas mutantes, sin embargo, en ambos casos la banda esperada se amplificó en el control. (c) Amplificación de un fragmento del ORF del gen *hk2a*. Se amplificó un fragmento de 0.3 kb en la cepa WT y cepas no mutantes.

Participación de las HKs en el crecimiento radial y producción de conidia regulados por la MAPK Tmk3

Se analizó el crecimiento micelial y la conidiación inducida por luz de las cepas carentes de HKs para comparar el fenotipo entre ellas y observar si presentan el mismo comportamiento. Aunque solo se obtuvo una mutante de las cepas $\Delta hk9$ y $\Delta hk11$ también se evaluó su crecimiento radial y conidiación. Dado que la MAPK Tmk3 participa en el crecimiento filamentoso y conidiación en *T. atroviride* (Esquivel-Naranjo et al., 2016), se incluyó la cepa mutante $\Delta tmk3:pyr4$ para compararla con las mutantes carentes de HKs identificadas por PCR.

Histidina cinasa Hk1a

Se analizó el crecimiento micelial de las mutantes $\Delta hk1a$ y se comparó con la cepa WT y la mutante $\Delta tmk3$. El análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre las mutantes $\Delta hk1a$ y la cepa WT, mientras que la reducción del crecimiento micelial de la cepa $\Delta tmk3$ fue de 60 % menos que la cepa WT (Fig. 34a).

Las mutantes $\Delta hk1a$ produjeron 50 % más conidia que la cepa WT, mientras que la cepa $\Delta tmk3$ produjo 90 % menos conidia que la cepa WT (Fig. 34b). Los resultados sugieren que Hk1a no participa en el crecimiento micelial de *T. atroviride*, pero actúa como un represor de la conidiación inducida por luz la cual es regulada por la MAPK Tmk3.

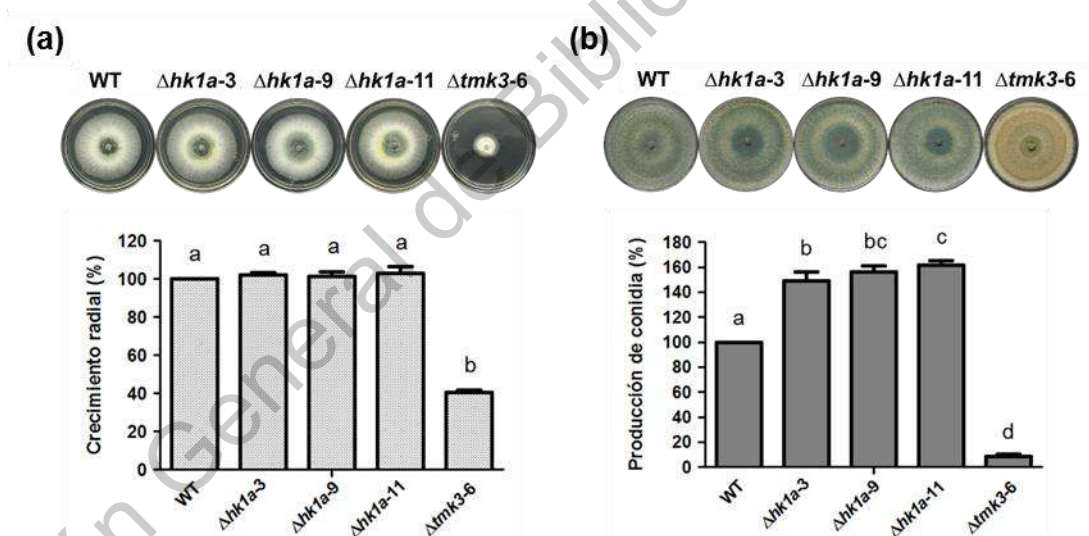


Figura 34. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk1a$. (a) Crecimiento radial. Las cepas WT, $\Delta hk1a-3$, -9, -12 y $\Delta tmk3-6$ fueron incubadas en medios PDA a 27°C durante 48 horas en presencia de luz constante (0.586 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El crecimiento se determinó por triplicado usando el programa Image J. (b) Producción de conidia. Las cepas indicadas fueron incubadas por triplicado en medios PDA a 27 °C durante 7 días en luz blanca constante, posteriormente se colectó la conidia y se cuantificaron en el microscopio. Las gráficas muestran los promedios de los valores $\pm$ la desviación estándar analizados con el método Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

Histidina cinasa Hk2

Se analizó el crecimiento micelial de las mutantes $\Delta hk2b$ y se comparó con la cepa WT y la mutante $\Delta tmk3$. Los resultados muestran que la reducción del crecimiento micelial en luz constante de las cepas $\Delta hk2b$ fue de 5 % en comparación con la cepa WT, y el análisis estadístico corrobora que hay diferencias significativas entre las mutantes $\Delta hk2b$ y la cepa WT y $\Delta tmk3$ (Fig. 35a).

En conidiación, las mutantes $\Delta hk2b$ produjeron 40 % más conidia que la cepa WT (Fig. 35b). Los resultados sugieren que Hk2b participa en el crecimiento micelial de *T. atroviride*, posiblemente a través de Tmk3, pero actúa como un represor de la conidiación inducida por luz al igual que Hk1a.

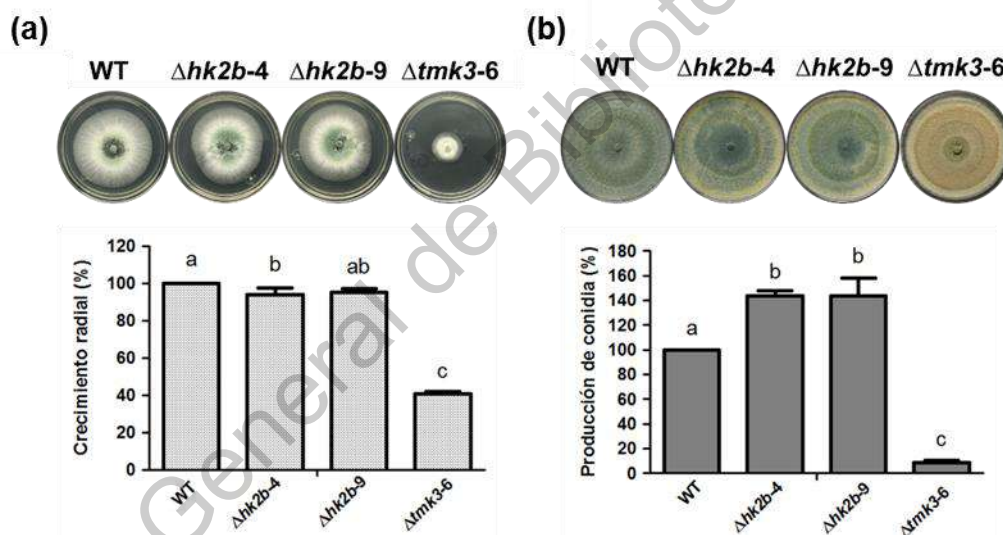


Figura 35. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk2b$. (a) Crecimiento radial. Las cepas WT, $\Delta hk2b-4$, -9 y $\Delta tmk3-6$ fueron incubadas en medios PDA a 27 °C durante 48 horas en presencia de luz constante (0.586 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El crecimiento se determinó por triplicado usando el programa Image J. (b) Producción de conidia. Las cepas indicadas fueron incubadas por triplicado en medios PDA a 27 °C durante 7 días en luz blanca constante, posteriormente se colectó la conidia y se cuantificaron en el microscopio. Las gráficas muestran los promedios de los valores $\pm$ la desviación estándar analizados con el método Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

Histidina cinasa Hk4

Se analizó el crecimiento micelial de las mutantes $\Delta hk4$ y se comparó con la cepa WT y la mutante $\Delta tmk3$. En promedio, el crecimiento radial de las mutantes $\Delta hk4$ fue de 3 % más que la cepa WT, aunque el análisis estadístico indicó que no hay diferencias significativas entre el crecimiento micelial de las mutantes $\Delta hk4$ y la cepa WT, pero sí hay diferencias significativas en comparación con la mutante $\Delta tmk3$ (Fig. 36a).

Los resultados de la cuantificación de la conidia mostraron que las mutantes $\Delta hk4$ produjeron 50 % más conidia que la cepa WT (Fig. 36b), y no hubo diferencias significativas entre las mutantes $\Delta hk4$ en conidiación. Según los resultados, aunque no haya una participación aparente de Hk4 en la regulación del crecimiento micelial de *T. atroviride*, posiblemente Hk4 también participa como un represor de la conidiación inducida por luz al igual que Hk1a y Hk2b.

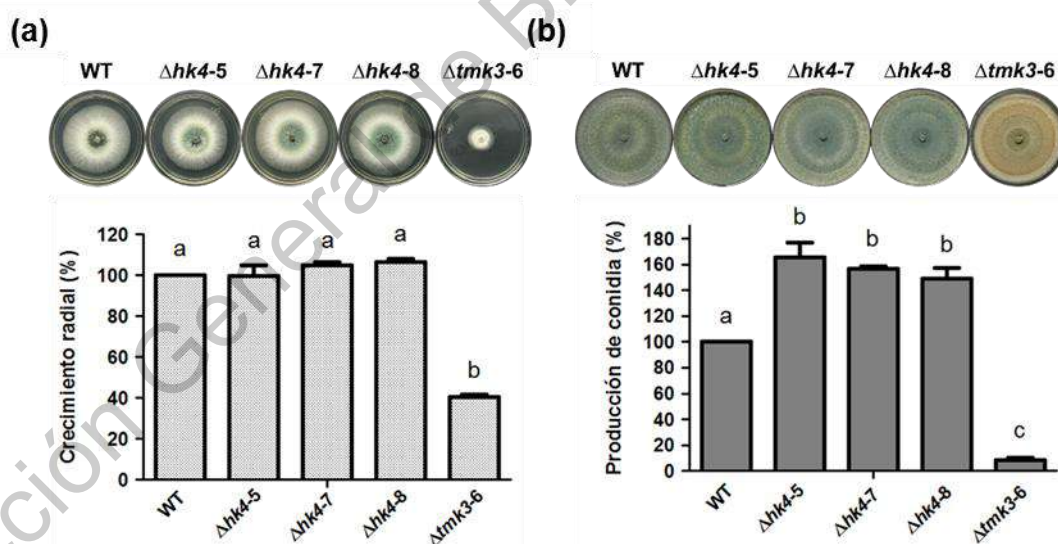


Figura 36. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk4$. (a) Crecimiento radial. Las cepas WT, $\Delta hk4-5$, -7, -8 y $\Delta tmk3-6$ fueron incubadas en medios PDA a 27 °C durante 48 horas en presencia de luz constante (0.586 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El crecimiento se determinó por triplicado usando el programa Image J. (b) Producción de conidia. Las cepas indicadas fueron incubadas por triplicado en medios PDA a 27 °C durante 7 días en luz blanca constante, posteriormente se colectó la conidia y se cuantificaron en el microscopio. Las gráficas muestran los promedios de los valores $\pm$ la desviación estándar analizados con el método Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

Histidina cinasa Hk5

Se analizó el crecimiento micelial de las mutantes $\Delta hk5$ y se comparó con la cepa WT y la mutante $\Delta tmk3$. Los resultados muestran que el crecimiento micelial en luz constante de las cepas $\Delta hk5$ fue en promedio 12 % mayor que la cepa WT, y se corroboró estadísticamente que existen diferencias significativas entre las mutantes $\Delta hk5$ y la cepa WT y $\Delta tmk3$ (Fig. 37a).

En conidiación, las mutantes $\Delta hk2b$ produjeron en promedio 25 % más conidia que la cepa WT (Fig. 37b). Los resultados sugieren que Hk5 participa como un represor del crecimiento micelial y de la conidiación inducida por luz en *T. atroviride*, procesos que son regulados por la MAPK Tmk3.

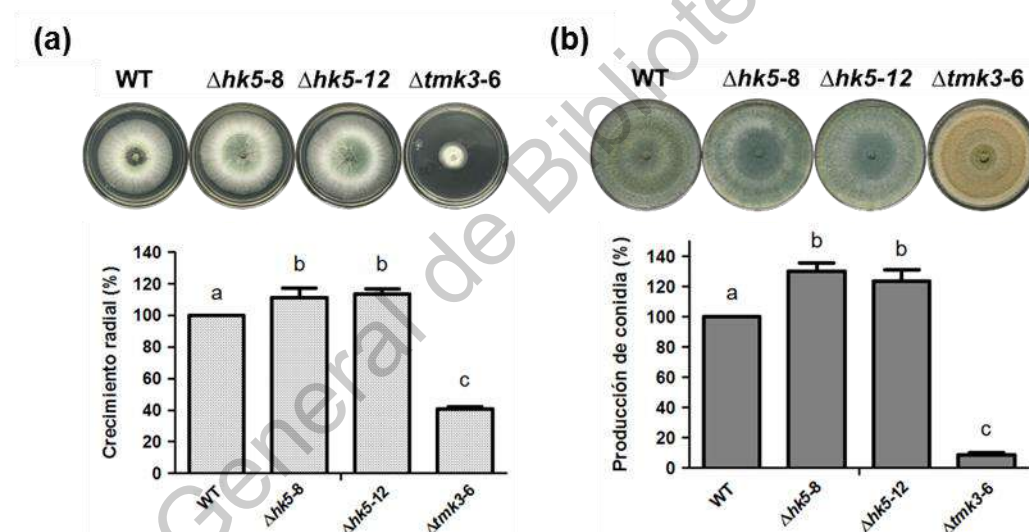


Figura 37. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk5$. (a) Crecimiento radial. Las cepas WT, $\Delta hk5-8$, -12 y $\Delta tmk3-6$ fueron incubadas en medios PDA a 27 °C durante 48 horas en presencia de luz constante (0.586 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El crecimiento se determinó por triplicado usando el programa Image J. (b) Producción de conidia. Las cepas indicadas fueron incubadas por triplicado en medios PDA a 27 °C durante 7 días en luz blanca constante, posteriormente se colectó la conidia y se cuantificaron en el microscopio. Las gráficas muestran los promedios de los valores $\pm$ la desviación estándar analizados con el método Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

Histidina cinasa Hk9

Se analizó el crecimiento micelial de la mutante $\Delta hk9$ y se comparó con la cepa WT y la mutante $\Delta tmk3$. El crecimiento radial en luz constante de la cepa $\Delta hk9$ fue en promedio 20 % menor que la cepa WT. Se comprobó estadísticamente que hay diferencias significativas entre la cepa WT y las mutantes $\Delta hk9$ y $\Delta tmk3$ (Fig. 38a).

Se cuantificó la producción de conidia de la mutante $\Delta hk9$ crecida en luz blanca constante. La cepa $\Delta hk9$ produjo 15 % menos conidia que la cepa WT (Fig. 38b). Los resultados sugieren que Hk9 participa en la regulación del crecimiento micelial y la conidiación inducida por luz, posiblemente a través de la MAPK Tmk3.

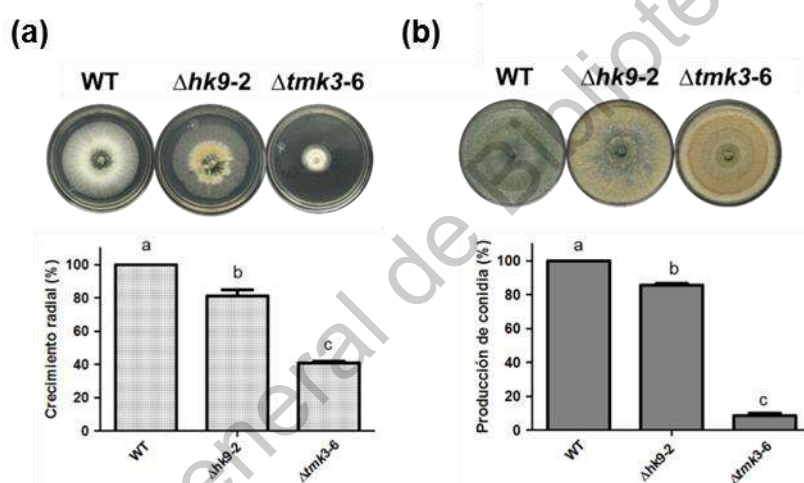


Figura 38. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk9$. (a) Crecimiento radial. Las cepas WT, $\Delta hk9-2$ y $\Delta tmk3-6$ fueron incubadas en medios PDA a 27 °C durante 48 horas en presencia de luz constante (0.586 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El crecimiento se determinó por triplicado usando el programa Image J. (b) Producción de conidia. Las cepas indicadas fueron incubadas por triplicado en medios PDA a 27 °C durante 7 días en luz blanca constante, posteriormente se colectó la conidia y se cuantificaron en el microscopio. Las gráficas muestran los promedios de los valores $\pm$ la desviación estándar analizados con el método Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

Histidina cinasa Hk10

Se analizó el crecimiento micelial de las mutantes $\Delta hk10$ y se comparó con la cepa WT y la mutante $\Delta tmk3$. El crecimiento radial de las cepas $\Delta hk10$ fue en

promedio 8 % mayor en comparación a la cepa WT (Fig. 39a). En conidiación, el análisis estadístico indicó que no hay diferencias significativas entre la WT y las cepas $\Delta hk10$ (Fig.39b). Los resultados sugieren que Hk10 participa como un represor del crecimiento micelial regulado por la MAPK Tmk3 en *T. atroviride*, pero no hay una participación aparente de la Hk10 en la regulación de la producción de conidia inducida por luz.

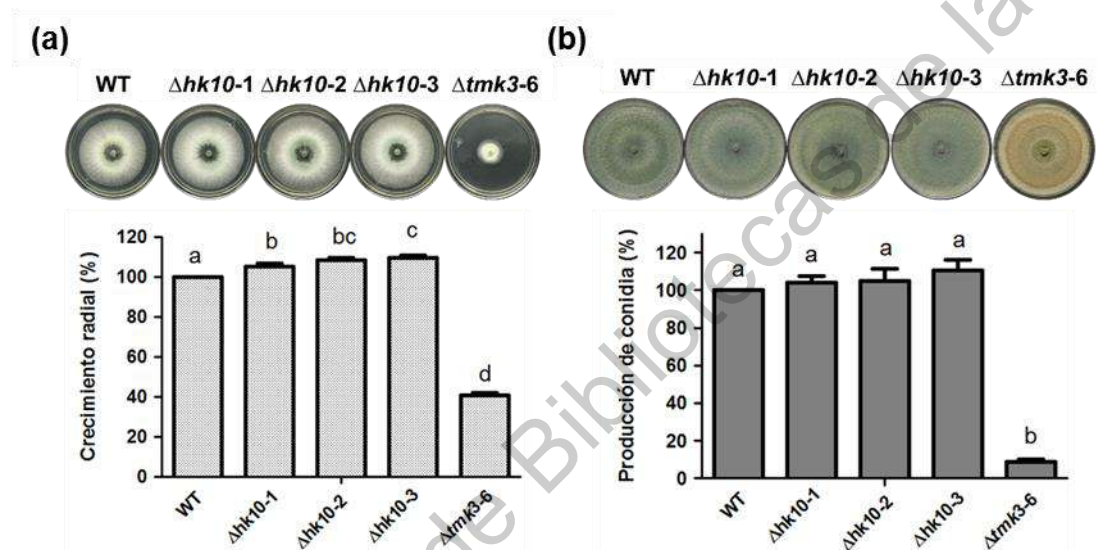


Figura 39. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk10$. **A.** Crecimiento radial. Las cepas WT, $\Delta hk10-1$, -2, -3 y $\Delta tmk3-6$ fueron incubadas en medios PDA a 27 °C durante 48 horas en presencia de luz constante (0.586 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El crecimiento se determinó por triplicado usando el programa Image J. **B.** Producción de conidia. Las cepas indicadas fueron incubadas por triplicado en medios PDA a 27 °C durante 7 días en luz blanca constante, posteriormente se colectó la conidia y se cuantificaron en el microscopio. Las gráficas muestran los promedios de los valores $\pm$ la desviación estándar analizados con el método Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

Histidina cinasa Hk11

Se analizó el crecimiento micelial de la mutante $\Delta hk11$ y se comparó con la cepa WT y la mutante $\Delta tmk3$. Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas entre la cepa WT y la mutante $\Delta hk11$, por lo que se sugiere que la HK11 no participa en la regulación del crecimiento filamentoso de *T. atroviride* (Fig. 40a).

En conidiación, la mutante $\Delta hk11$ produjo 8 % menos conidia que la cepa WT (Fig. 40b). Los resultados sugieren que la Hk11 participa en la regulación de la conidiación inducida por luz en *T. atroviride*, posiblemente en conjunto con Hk9 y Nik1 y a través de la MAPK Tmk3.

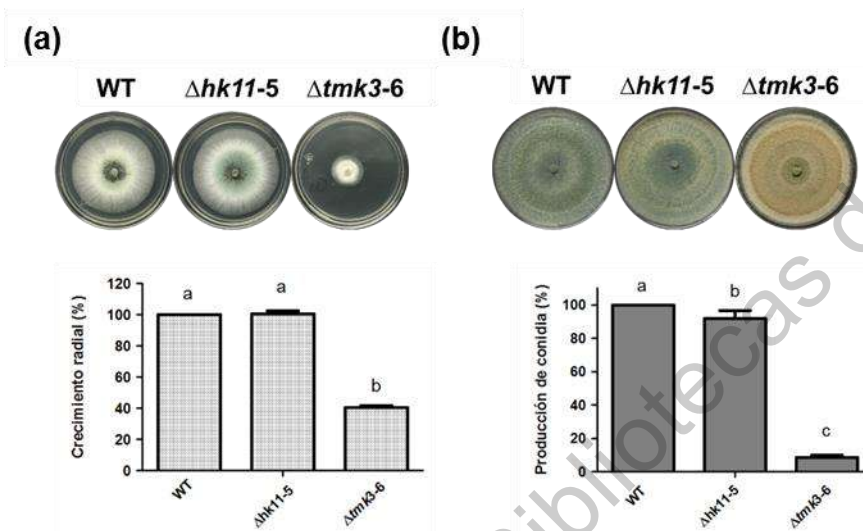


Figura 40. Crecimiento radial y producción de conidia inducida por luz de las cepas $\Delta hk11$. (a) Crecimiento radial. Las cepas WT, $\Delta hk11-5$ y $\Delta tmk3-6$ fueron incubadas en medios PDA a 27 °C durante 48 horas en presencia de luz constante (0.586 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El crecimiento se determinó por triplicado usando el programa Image J. (b) Producción de conidia. Las cepas indicadas fueron incubadas por triplicado en medios PDA a 27 °C durante 7 días en luz blanca constante, posteriormente se colectó la conidia y se cuantificaron en el microscopio. Las gráficas muestran los promedios de los valores $\pm$ la desviación estándar analizados con el método Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

Respuesta al estrés celular en mutantes carentes de HKs

La cepa WT y las mutantes $\Delta hk1a-3$, $\Delta hk2b-3$, $\Delta hk4-5$, $\Delta hk5-8$, $\Delta hk9-2$, $\Delta hk10-1$, $\Delta hk11-3$ y $\Delta tmk3-6:pyr4$ fueron seleccionadas para realizar un análisis de respuesta a estrés celular. Debido a que las mutantes obtenidas de los genes *hk1a*, *hk2b*, *hk4*, *hk5* y *hk10* se comportaron igual en la caracterización del crecimiento radial y conidiación inducida por luz constante, solo se analizó una mutante por gen.

Las mutantes fueron evaluadas en respuesta a un estrés osmótico por altas concentraciones de NaCl y sorbitol en los estadios de conidia y micelio. En conidia,

todas las cepas, con excepción de la mutante $\Delta tmk3$, fueron capaces de tolerar las concentraciones de 50 mM NaCl y 200 mM sorbitol, sin embargo, las mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$ y $\Delta hk11$ fueron capaces de crecer en las concentraciones de 100 mM NaCl y 400 mM sorbitol mientras que esas concentraciones fueron letales para la cepa WT. La cepa $\Delta hk5$ fue la única capaz de tolerar las cantidades de 300 mM NaCl. Las cepas $\Delta hk1a$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$ y $\Delta hk11$ pudieron crecer en un medio PDA adicionado con 600 mM sorbitol (Fig. 41).

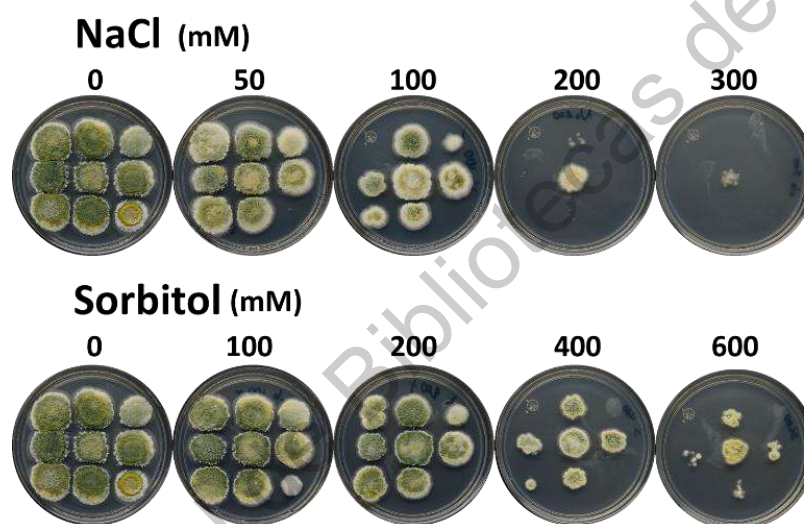


Figura 41. Tolerancia a estrés osmótico por NaCl y sorbitol en conidia de las mutantes carentes de HKs. 500 conidia de la cepa WT y cepas mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$, $\Delta hk11$ y $\Delta tmk3$ (desde la parte superior izquierda hasta la parte inferior derecha) fueron inoculadas en medio PDA adicionado con Triton X-100 al 0.5 % y NaCl o sorbitol a las concentraciones indicadas, e incubadas a 27 °C por seis días en condiciones de luz blanca constante.

En micelio, las cantidades de 200 mM NaCl y 400 mM sorbitol inhibieron el crecimiento de la mutante $\Delta tmk3$, en cambio, la mutante $\Delta hk5$ toleró de forma eminente las concentraciones de 600 mM NaCl y 1 M sorbitol en comparación con la cepa WT y las mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk4$, $\Delta hk10$ fueron más tolerantes a las altas concentraciones de NaCl y sorbitol en comparación con la cepa WT. Los resultados sugieren que las HKs Hk1a, Hk4, Hk5 y Hk10 cumplen el rol de regular de forma negativa las respuestas al estrés osmótico, en especial la Hk4 y Hk5, mientras que Hk2b, Hk9 y Hk11 son dispensables para la osmotolerancia (Fig. 42-43).

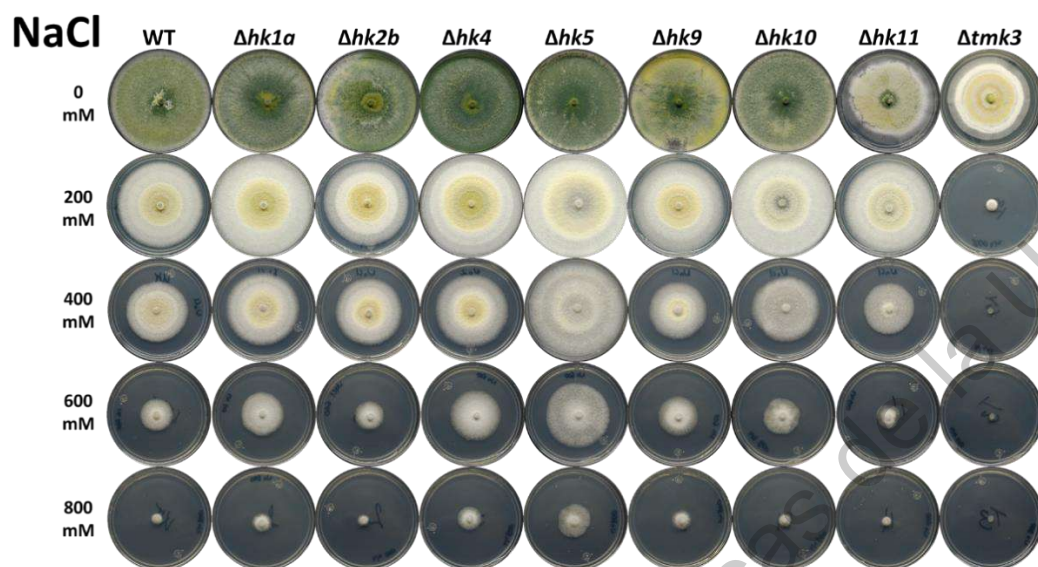


Figura 42. Tolerancia a estrés osmótico por NaCl en micelio de las mutantes carentes de HKs. Discos de micelio de la cepa WT y cepas mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$, $\Delta hk11$ y $\Delta tmk3$ fueron inoculados en PDA más NaCl a las concentraciones indicadas e incubados a 27 °C por cuatro días en condiciones de luz blanca constante.

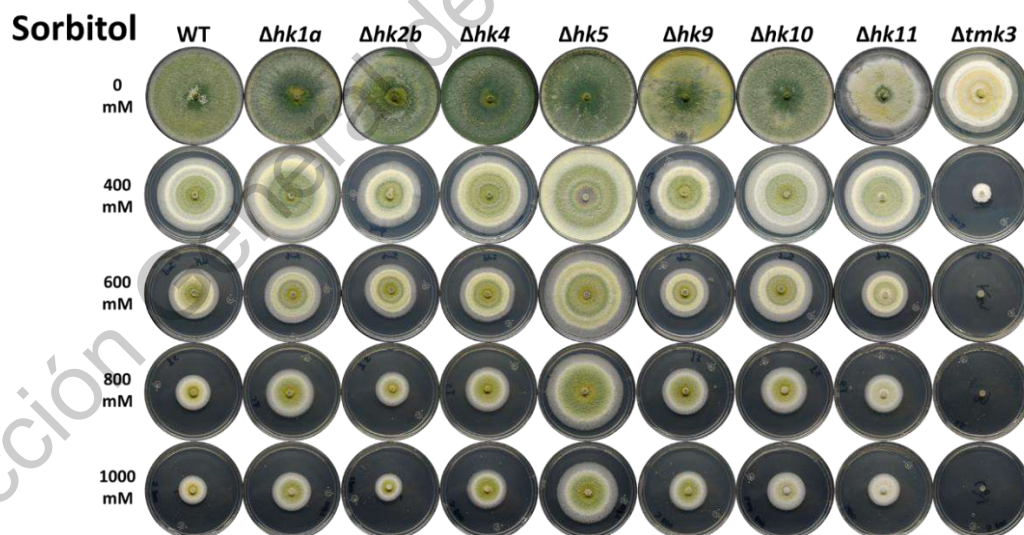


Figura 43. Tolerancia a estrés osmótico por sorbitol en micelio de las mutantes carentes de HKs. Discos de micelio de la cepa WT y cepas mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$, $\Delta hk11$ y $\Delta tmk3$ fueron inoculados en PDA más sorbitol a las concentraciones indicadas e incubados a 27 °C por cuatro días en condiciones de luz blanca constante.

La integridad de la pared celular de la cepa WT y las mutantes carentes de los genes *hk1a*, *hk2b*, *hk4*, *hk5*, *hk9*, *hk10*, *hk11* y *tmk3* fue analizada en base a su resistencia a concentraciones altas del colorante rojo Congo. En conidia, la cantidad de 100 μ M rojo Congo inhibió el crecimiento de la mutante $\Delta tmk3$ mientras que el resto de las cepas pudieron crecer a esa concentración incubadas bajo luz constante. En medios PDA adicionados con 200 μ M rojo Congo, solo las cepas $\Delta hk5$ y $\Delta hk9$ fueron capaces de crecer en condiciones de luz constante, mientras que la cantidad de 400 μ M rojo Congo inhibió el crecimiento de todas las cepas analizadas (Fig. 44).

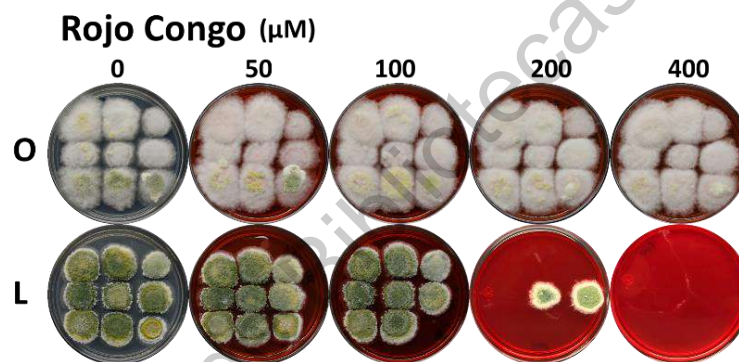


Figura 44. Tolerancia a estrés por rojo Congo en conidia de las mutantes carentes de HKs. 500 conidia de la cepa WT y cepas mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$, $\Delta hk11$ y $\Delta tmk3$ (desde la parte superior izquierda hasta la parte inferior derecha) fueron inoculadas desde la parte superior izquierda hasta la parte inferior izquierda en medio PDA adicionado con Triton X-100 al 0.5 % y rojo Congo a las concentraciones indicadas, e incubadas a 27 °C por seis días en condiciones de luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

En micelio, las mutantes $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$ y $\Delta tmk3$ presentaron defectos en su crecimiento en la concentración de 400 μ M rojo Congo e incubadas en condiciones de luz blanca constante (Fig. 45). Los resultados sugieren que las HKs Hk2b, Hk4, Hk5, y Hk9 juegan un rol en regular la pared celular de *T. atroviride* durante el desarrollo del micelio, sin embargo, es posible que Hk5 y Hk9 regulen de forma negativa la arquitectura de la pared de *T. atroviride* durante el estadio de conidia, ya que cuando carece de los genes *hk5* y *hk9*, en conidia son más tolerantes al rojo Congo en comparación con la cepa WT.

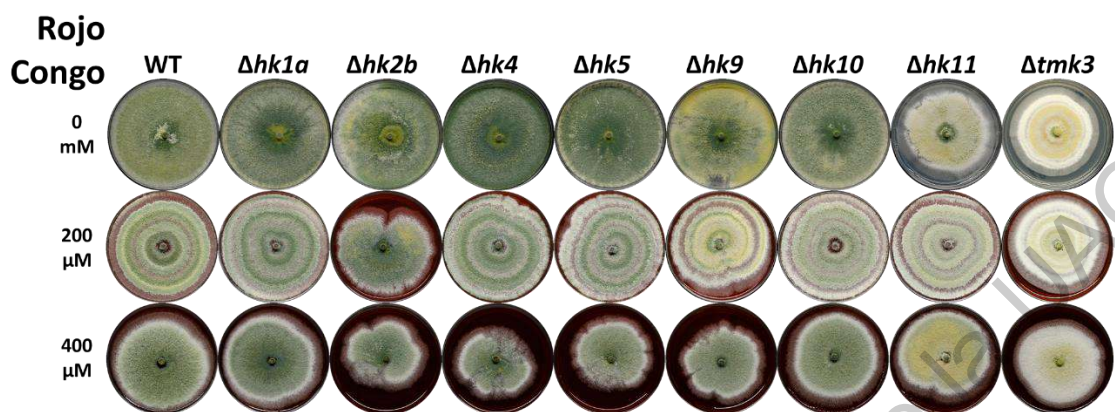


Figura 45. Tolerancia a estrés por rojo Congo en micelio de las mutantes carentes de HKs. Discos de micelio de la cepa WT y cepas mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$, $\Delta hk11$ y $\Delta tmk3$ fueron inoculados en PDA más rojo Congo a las concentraciones indicadas e incubados a 27 °C por cuatro días en condiciones de luz blanca constante.

Se probó la participación de las HKs Hk1a, Hk2b, Hk4, Hk5, Hk9, Hk10 y Hk11 en la tolerancia de *T. atroviride* a altas concentraciones de cadmio. En conidia, todas las cepas analizadas, con excepción de la mutante $\Delta tmk3$, fueron capaces de crecer en 800 μM $CdCl_2$, no obstante, las mutantes $\Delta hk5$ y $\Delta hk10$ crecieron en medios adicionados con 1200 μM $CdCl_2$, mientras que esa cantidad fue letal para la cepa WT y las mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk9$, $\Delta hk11$ y $\Delta tmk3$ (Fig. 46).

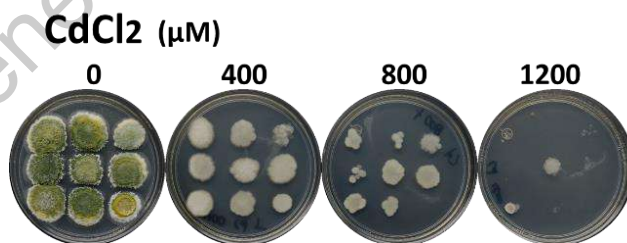


Figura 46. Tolerancia a estrés por cadmio en conidia de las mutantes carentes de HKs. 500 conidia de la cepa WT y cepas mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$, $\Delta hk11$ y $\Delta tmk3$ (desde la parte superior izquierda hasta la parte inferior derecha) fueron inoculadas desde la parte superior izquierda hasta la parte inferior izquierda en medio PDA adicionado con Triton X-100 al 0.5 % y $CdCl_2$ a las concentraciones indicadas, e incubadas a 27 °C por seis días en condiciones de luz blanca constante.

En micelio, las mutantes $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$ y $\Delta tmk3$ presentaron defectos en su crecimiento radial en comparación con la cepa WT,

siendo las mutantes $\Delta hk2b$, $\Delta hk9$ y $\Delta tmk3$ las más afectadas bajo concentraciones de 600 μM CdCl_2 (Fig. 47). Los resultados sugieren que las Hk2b, Hk4, Hk5, Hk9 y Hk10 participan en la tolerancia a estrés por cadmio posiblemente a través de la MAPK Tmk3, mientras que Hk1 y Hk11 son dispensables para la tolerancia de *T. atroviride* a altas concentraciones de CdCl_2 .

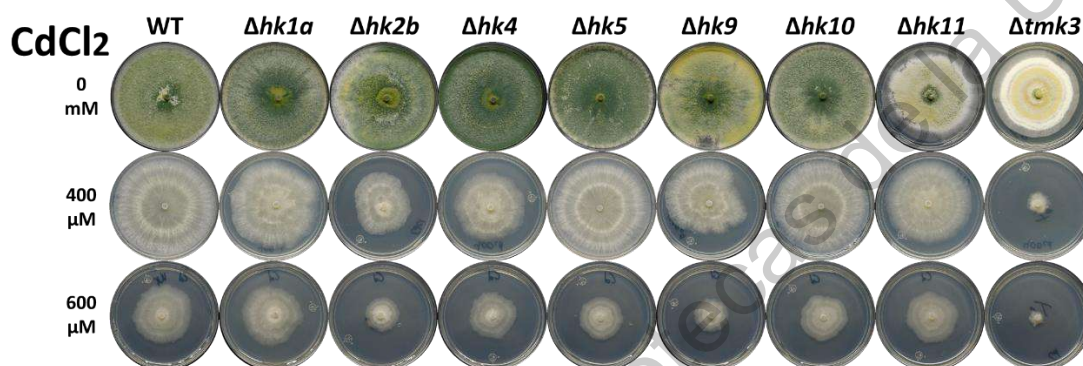


Figura 47. Tolerancia a estrés por cadmio en micelio de las mutantes carentes de HKs. Discos de micelio de la cepa WT y cepas mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$, $\Delta hk11$ y $\Delta tmk3$ fueron inoculados en PDA más CdCl_2 a las concentraciones indicadas e incubados a 27 °C por cuatro días en condiciones de luz blanca constante.

Se analizó la participación de las HKs Hk1a, Hk2b, Hk4, Hk5, Hk9, Hk10 y Hk11 de *T. atroviride* en respuesta a un estrés oxidativo por peróxido. En conidia, la cepa WT y las mutantes analizadas crecieron en 2 mM H_2O_2 , pero la cantidad de 3 mM H_2O_2 en el medio inhibió el crecimiento de todas las cepas analizadas (Fig. 48). En micelio, se observó que la cantidad de 40 mM H_2O_2 en el medio afectó el crecimiento radial de las mutantes carentes de los genes *hk2b*, *hk5*, *hk9*, *hk11* y *tmk3* (Fig. 49). Los resultados sugieren que las HKs Hk2b, Hk5, Hk9 y Hk11 podrían estar participando en las respuestas a estrés oxidativo ocasionado por H_2O_2 en *T. atroviride* y posiblemente a través de la MAPK Tmk3.

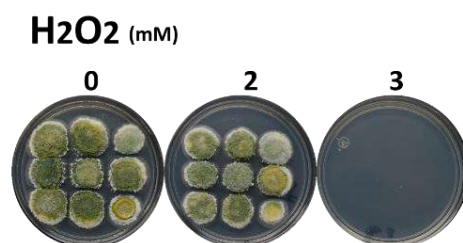


Figura 48. Tolerancia a estrés oxidativo por H₂O₂ en conidia de las mutantes carentes de HKs. 500 conidia de la cepa WT y cepas mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$, $\Delta hk11$ y $\Delta tmk3$ (desde la parte superior izquierda hasta la parte inferior derecha) fueron inoculadas desde la parte superior izquierda hasta la parte inferior izquierda en medio PDA adicionado con Triton X-100 al 0.5 % y H₂O₂ a las concentraciones indicadas, e incubadas a 27 °C por seis días en condiciones de luz blanca constante.

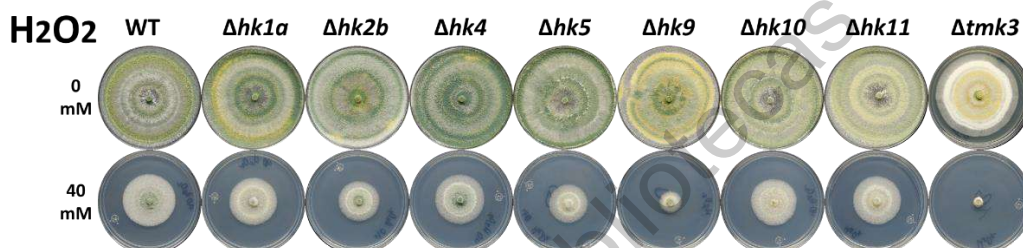


Figura 49. Tolerancia a estrés oxidativo por H₂O₂ en micelio de las mutantes carentes de HKs. Discos de micelio de la cepa WT y cepas mutantes $\Delta hk1a$, $\Delta hk2b$, $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$, $\Delta hk11$ y $\Delta tmk3$ fueron inoculados en PDA más H₂O₂ a las concentraciones indicadas e incubados a 27 °C por cuatro días en condiciones de luz blanca constante.

Expresión de genes dependientes de luz azul en cepas carentes de HKs

Se realizó un análisis de la expresión de los genes *blu1*, *grg2*, *env1*, *frq* y *cry* en oscuridad y ante un pulso de luz azul en la cepa WT y las mutantes carentes de los genes *hk1a*, *hk2b*, *hk4*, *hk5*, *hk9*, *hk10*, *hk11* y *tmk3*. Se observó que en respuesta a un pulso de luz azul, el gen *blu1* se expresó más en las mutantes $\Delta hk4$, $\Delta hk9$ y $\Delta hk10$, y el gen *grg2* se expresó más en las mutantes $\Delta hk5$, $\Delta hk9$ y $\Delta hk10$, mientras que en la mutante $\Delta tmk3$ no se detectó transcritos. El gen *env1* se expresó en la mutante $\Delta tmk3$, sin embargo, se observó un mayor nivel de transcrito en la mutante $\Delta hk5$, mientras que *env1* se expresa a niveles bajos en la mutante $\Delta hk9$. Se analizaron los genes *frq* y *cry* que son dependientes de la MAPK Tmk3 para su transcripción. El gen *frq* se expresó más en las mutantes $\Delta hk4$, $\Delta hk5$, $\Delta hk9$, $\Delta hk10$ y $\Delta hk11$, y *cry* se expresó más en las mutantes $\Delta hk2b$ y $\Delta hk10$ (Fig. 50).

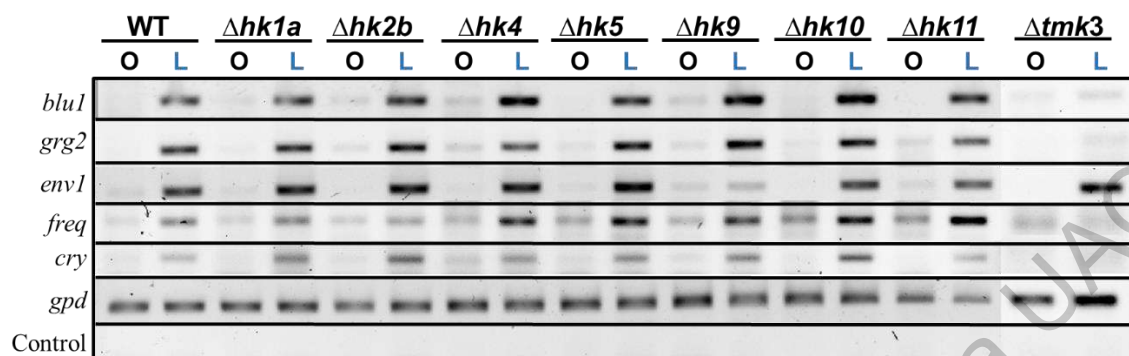


Figura 50. Análisis de expresión de genes dependientes de luz azul en mutantes carentes de HKs. ADNc se sintetizó a partir de ARN total extraído de micelio crecido en oscuridad (O) o expuesto a luz azul por 30 min (L) en las cepas indicadas. Se amplificó el ADNc resultante de la transcripción reversa mediante una reacción de PCR y el producto se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Como control de síntesis de ADNc, se usó como templado el ARN total de las muestras y agua DEPC en vez de la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific), posteriormente se amplificó *gpd*.

Análisis de la expresión de genes que codifican para HKs en una cepa carente de *tmk3*

Se evaluó la expresión de los doce genes que codifican para HKs en el genoma de *T. atroviride* en oscuridad, ante un pulso de luz, y cuando carece del gen *tmk3*. Se observó que en la cepa WT, los genes *hk1a*, *hk2a*, *hk2b*, *hk5*, *hk9*, *hk10* y *phy1* se expresaron más en oscuridad que en luz, pero cuando *T. atroviride* carece del gen *tmk3*, los niveles de transcrito aumentaron en los genes mencionados, con excepción del gen *hk5*, que se expresó más en luz que en oscuridad en la mutante $\Delta tmk3$. El gen *sln1* se expresó más en luz que en oscuridad en la cepa WT, mientras que en la mutante $\Delta tmk3$ se observó lo contrario, *sln1* se expresó más en oscuridad que en luz. No se detectó transcrito del gen *hk4* en la cepa WT y la mutante $\Delta tmk3$, mientras que el gen *hk11* solo fue detectable en la mutante *tmk3*. Los genes *hk1b* y *nik1* se expresaron de forma constitutiva (Fig. 51). Los resultados de los análisis de expresión de los genes sugieren que las HKs participan en regular negativamente los genes que se activan por luz azul y que son dependientes de la MAPK Tmk3, a la vez que la MAPK Tmk3 regula la transcripción de las HKs.

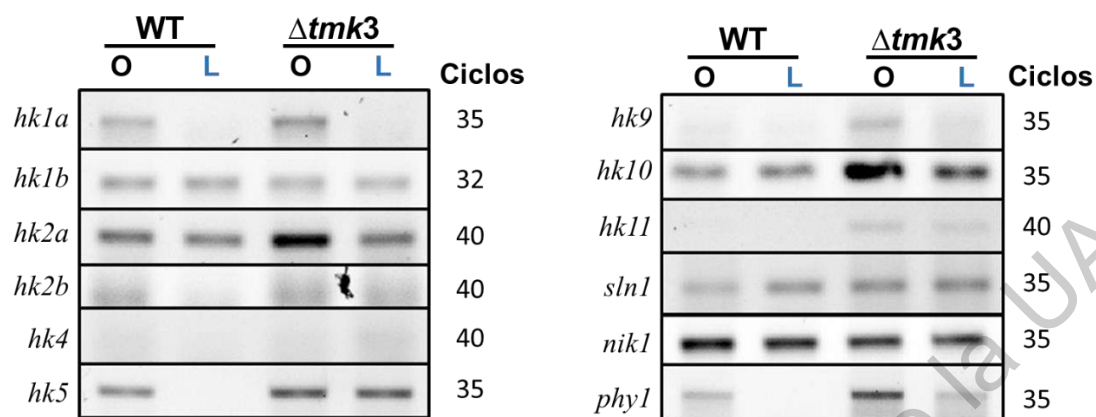


Figura 51. Análisis de la expresión de los genes que codifican para HKs en oscuridad y ante un estímulo de luz azul. ADN complementario se sintetizó a partir de ARN total extraído de micelio crecido en oscuridad (O) o expuesto a luz azul por 30 min (L) en la cepa WT y la mutante $\Delta tmk3; pyr4$. Se amplificó el ADNc resultante de la transcripción reversa mediante una reacción de PCR y el producto se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

8.5 DISCUSIÓN

Trichoderma atroviride es sin duda un modelo de estudio ideal para entender las respuestas a la luz y el estrés ambiental en hongos filamentosos. Una de sus bondades es la facilidad para generar mutaciones puntuales. Añadir a un vector secuencias presentes en el genoma de *T. atroviride* facilita la recombinación homóloga (Esquivel-Naranjo and Herrera-Estrella, 2020), y este evento también se lleva a cabo en un fondo auxótrofo a uracilo (Calcáneo-Hernández et al., 2020). Con la ventaja de que la obtención de mutantes en la cepa Ura⁻¹ es más económica, se utilizó la cepa Ura⁻¹ como cepa parental para generar siete mutantes carentes de HKs en *T. atroviride*.

En este experimento se presentaron dificultades en la construcción de casetes knockout. En todos los casos se amplificaron bandas de menor tamaño a lo esperado, para el gen *hk1b* no fue posible amplificar el fragmento con el tamaño deseado por lo que no se utilizó para el reemplazo de *hk1b*. La eficiencia de la recombinación fue menor a lo publicado (Calcáneo-Hernández et al., 2020), posiblemente las bandas menores al tamaño esperado que se amplificaron en el

PCR 3 desfavorecieron la recombinación homóloga. En el reemplazo de los genes *tmk3*, *pbs2*, *blr1* y *blr2* en la cepa Ura⁻¹ no se observaron bandas de diferentes tamaños. Las secuencias de las HKs son ricas en A y T por su origen bacteriano (Papon and Stock, 2019; Rajewska et al., 2012), por lo que probablemente la presencia de muchas adeninas y timinas en los extremos 5' y 3' de los genes que codifican para HKs tuvieron que ver en la falla de la obtención de un solo casete.

La vía de transducción de señales basadas en HKs se estudió inicialmente en bacterias, y posteriormente se identificaron y caracterizaron en levaduras, hongos filamentosos, mohos mucilaginosos y plantas (Fassler y West, 2013). En hongos filamentosos son pocas las publicaciones donde se ha realizado un estudio completo de las funciones de sus HKs, siendo solo las proteínas Nik1, Phy1 y Sln1 las más estudiadas. Dado que el número de HKs varía según la especie, en ascomicetos se clasificaron en 11 grupos (Catlett et al., 2003). Nik1 pertenece a la clase III, y es la única en poseer repetidos del dominio HAMP que actúan como osmosensores (Catlett et al., 2003). Sln1 pertenece a la clase VI, siendo la única HK con dominios transmembranales (Catlett et al., 2003). La HK Phy clase VIII posee un dominio fitocromo esencial para la detección de luz roja, y algunos hongos como *N. crassa* y *Botryotinia fuckeliana* poseen más de un Phy (Catlett et al., 2003). El resto de las histidinas cinasas poseen en común dominios GAF o PAS relacionados con las respuestas a la luz y estrés oxidativo (Catlett et al., 2003), a excepción de la HK clase VII que carece de un dominio sensor.

El genoma de *T. atroviride* posee dos genes que codifican para una histidina cinasa grupo I, dos del grupo II, y un gen para el resto de los otros grupos, excepto el grupo VII. En este estudio se obtuvieron siete mutantes carentes de genes que codifican para HK grupo I, II, IV, V, IX, X y XI, y se evaluó su crecimiento radial, la producción de conidia inducida por luz, y las respuestas al estrés osmótico, estrés oxidativo y su resistencia a altas concentraciones de rojo Congo y CdCl₂, procesos regulados por la MAPK Tmk3 (Esquivel-Naranjo et al., 2016). En general se observó

que las HKs analizadas cumplen una participación en el crecimiento vegetativo, conidiación y respuestas al estrés celular en *T. atroviride*.

Los miembros de HKs grupo I contienen un dominio GAF como sensor y son muy divergentes. Estas proteínas están presentes no solo en hongos ascomicetos sino también en basidiomicetos pero parecen haberse expandido en ascomicetos fitopatógenos. El hongo *N. crassa* posee solo una histidina cinasa del grupo I, mientras que *B. fuckeliana* y *Gibberella moniliformis* poseen cinco (Catlett et al., 2003). En *M. oryzae*, la mutante de la HK grupo I, MoHik3, mostró una ligera disminución en la conidiación y una virulencia atenuada (Jacob et al., 2014), aunque la mutante de la Hk grupo I de *Cryptococcus neoformans* no presentó alteración fenotípica (Bahn et al., 2006). En *T. atroviride* se analizaron mutantes del gen *hk1a* que codifica para una HK clase I, y se sugiere que Hk1a aunque aparentemente no tiene un rol en el crecimiento vegetativo de *T. atroviride*, regula de forma negativa la conidiación, produce 50 % más conidia en comparación con la cepa silvestre, fue más tolerante al estrés osmótico que la cepa silvestre, pero los resultados sugieren que Hk1a es dispensable para contrarrestar el estrés oxidativo y a las altas cantidades de cadmio y rojo Congo.

Las HKs del grupo II también poseen un dominio GAF. Aunque *C. heterostrophus* y *G. moniliformis* poseen una HK clase II, se desconoce su función (Catlett et al., 2003). En *Beauveria bassiana* se analizó una mutante de HK clase II y solo aparenta tener un rol menor en virulencia (Liu et al., 2017). El análisis de las mutantes carentes de *hk2b* sugieren que la histidina cinasa Hk2b cumple un rol en la regulación del crecimiento radial de *T. atroviride*, sin embargo, Hk2b regula de forma negativa la conidiación, las mutantes $\Delta hk2b$ produjeron 50 % más conidia en comparación que la cepa silvestre. La mutante $\Delta hk2b$ resistió ligeramente más el estrés osmótico que la cepa silvestre en conidia, pero los resultados sugieren que Hk2b es dispensable en respuesta al estrés osmótico en micelio. La pared celular de la mutante $\Delta hk2b$ en conidia no se observó afectada, no obstante, el micelio de la mutante analizada presentó defectos en su crecimiento en altas concentraciones

de rojo Congo, CdCl_2 y H_2O_2 . Los resultados sugieren que en *T. atroviride*, Hk2b aunque regula el crecimiento micelial, la arquitectura de la pared celular y las altas dosis de H_2O_2 y cadmio en micelio, actúa como represor de la conidiación. Las proteínas que poseen dominios GAF están involucradas en las respuestas al estrés oxidativo (Cho et al., 2009; Lin et al., 2007), y si el cadmio en las células produce estrés oxidativo (Stohs et al., 2000) es posible que Hk2b regule el estrés oxidativo ocasionado por H_2O_2 y cadmio en *T. atroviride* a través de la MAPK Tmk3.

En la clase IV se agrupan las HKs con dos dominios PAS (Catlett et al., 2003), donde se demostró que participan en la virulencia de *A. fumigatus* (Clemons et al., 2002), y en *A. nidulans* es esencial para la producción de conidia pero no para el crecimiento vegetativo (Appleyard et al., 2000). Los resultados del análisis de las mutantes carentes del gen *hk4* en *T. atroviride* sugieren que la Hk4 regula de forma negativa la conidiación inducida por luz. La mutante $\Delta hk4$ es más resistente al estrés osmótico que la cepa silvestre, aunque la arquitectura de su pared celular en micelio es defectuosa. Hk4 regula en micelio el estrés por altas concentraciones de cadmio pero los resultados sugieren que no cumple un rol en regular el estrés oxidativo.

Las HKs pertenecientes al grupo V son cinasas de gran tamaño que poseen repetidos de dominios PAS (Catlett et al., 2003) y se encuentran implicados en el crecimiento vegetativo, conidiación, regulación de la arquitectura de la pared celular, adaptación al estrés oxidativo y virulencia en *M. oryzae* (Jacob et al., 2014). Las proteínas con dominio PAS, al igual que las proteínas con dominio GAF, regulan las respuestas al estrés oxidativo (Zhulin, 1997) e incluso se publicó que los dominios GAF y PAS son similares en su estructura (Aravind y Ponting, 1997). Los resultados de los análisis de la mutante $\Delta hk5$ en *T. atroviride* sugieren que Hk5 es un regulador negativo del crecimiento micelial, esporulación inducida por luz y resistencia al estrés osmótico. En conidia, Hk5 regula negativamente la arquitectura de la pared celular y las altas concentraciones de cadmio, sin embargo, en micelio regula la integridad de la pared celular y altas dosis de cadmio y H_2O_2 . El dominio PAS de la HK Mak2 de *Schizosaccharomyces pombe* es esencial en respuesta al peróxido

(Rickman et al., 2004), por lo que es posible que la Hk5 también actúe como activador de la MAPK Tmk3 en respuesta al estrés oxidativo.

En la clase IX se agrupan otras HKs con dominios PAS. Se analizó una mutante de HK clase IX en *B. bassiana* y los datos indican que HK9 regula la producción de conidia y virulencia pero actúa como represor de las respuestas al estrés osmótico por sorbitol, la integridad de la pared celular y el estrés oxidativo por menadiona (Liu et al., 2017). En *T. atroviride* se observó que Hk9 regula el crecimiento vegetativo y conidiación. En micelio regula las respuestas a altas dosis de H₂O₂, cadmio y rojo Congo, sin embargo, en conidia regula de forma negativa el estrés osmótico y la integridad de la pared celular.

Las HKs del grupo X son las cinasas de mayor tamaño en hongos, los cuales poseen un dominio de serina/treonina (S/TKr) y un dominio GAF (Catlett et al., 2003), y se les ha atribuido un rol en la virulencia de hongos patógenos y las respuestas al estrés oxidativo. Una mutante de HK clase X en *Candida albicans* es incapaz de llevar a cabo el cambio morfológico de conidia a hifa (Hérivaux et al., 2016), la mutante $\Delta hk10$ de *B. bassiana* es sensible a altas dosis de H₂O₂ en comparación a una cepa silvestre (Liu et al., 2017), aunque la mutante de la HK clase X de *M. oryzae* regula de forma negativa la integridad de la pared celular (Jacob et al., 2014). En *T. atroviride*, los resultados sugieren que aunque Hk10 no cumple un rol en la producción de conidia por luz constante, regula de forma negativa el crecimiento filamentoso. En micelio y conidia la mutante $\Delta hk10$ es ligeramente más resistente al estrés osmótico por sorbitol, aunque en conidia también Hk10 podría estar actuando como un represor de las respuestas al estrés osmótico por NaCl y altas dosis de cadmio.

Se han encontrado HKs de la clase XI en hongos ascomicetos y basidiomicetos, los cuales tienen como sensores un dominio PAS y un dominio GAF (Catlett et al., 2003). En *N. crassa* se analizó el fenotipo de una mutante carente de un gen que codifica para una HK clase XI, y se observó que el crecimiento hifal de

la mutante es menor en comparación a la cepa silvestre, pero produjo más conidia y caroteno (Barba-Ostria et al., 2011). El hongo *M. oryzae* posee tres HKs del grupo XI los cuales están implicados en virulencia, arquitectura de la pared celular, conidiación, crecimiento vegetativo y respuestas al estrés oxidativo. En *T. atroviride*, los resultados sugieren que Hk11 regula la conidiación y resistencia a altas dosis de cadmio en micelio, pero en conidia regula negativamente la osmotolerancia.

Todas las HKs analizadas actúan como represoras de las respuestas a estrés en conidia, Hk1a, Hk4, Hk5 y Hk10 son represoras de las respuestas al estrés osmótico en micelio y Hk1a, Hk2b, Hk4, Hk5 controlan de forma negativa la conidiación. En un análisis previo de la Hk Nik1 se observó que los genes de respuesta a luz azul, *blu1* y *grg2*, también se activan ante un estrés osmótico (Calcáneo-Hernández, en proceso). Dado que proteínas con dominios PAS y GAF también están involucradas en las respuestas a la luz (Montgomery, 2007), se evaluó la expresión de genes que son activados por luz azul y dependientes de la MAPK Tmk3 para su activación en mutantes carentes de HKs. En el análisis se observó que en ausencia de *hk1a* y *hk2b* hubo más transcrito del gen *cry*. En carencia de *hk4* se elevaron los transcritos de los genes *blu1* y *frq*. En la mutante carente de *hk5* se detectaron más transcritos de *grg2*, *env1* y *frq*. Los genes *blu1*, *grg2* y *frq* se expresaron más en la mutante $\Delta hk9$, aunque sorpresivamente se detectó menos transcrito del gen *env1* en comparación con la cepa silvestre y la mutante $\Delta tmk3$. En ausencia de *hk10*, se detectó mayor transcrito de los genes *blu1* y *frq*. En la mutante $\Delta hk11$ se expresó más el gen *frq*. La sobreexpresión de los genes que son dependientes de la MAPK Tmk3 en las mutantes carentes de HKs podría explicar su tolerancia a la hiperosmolaridad y la sobreproducción de conidia.

El gen *frq* codifica para una proteína homóloga a FRQ de *N. crassa* relacionada con respuestas a la luz y ritmo circadiano. La acumulación rítmica de OS-2 fosforilado es dependiente de FRQ, pero OS-2 no depende de FRQ para activarse en respuesta a un estrés osmótico (Vitalini et al., 2007). También se sugirió en *N. crassa* que el fotorreceptor CRY-1 modula la actividad del complejo White

Collar (Olmedo et al., 2010), y en *T. atroviride* el cryptocromo controla la expresión de genes de respuesta a luz azul y roja (García-Esquivel et al., 2016). Los resultados de este experimento sugieren que la MAPK Tmk3 controla la transcripción de *frq* y *cry1* en respuesta a la luz azul, al igual que *blu1* y *grg2*, y que las HKs también cumplen un rol en la regulación de su transcripción aunque de forma negativa. Sorpresivamente el gen *env1* se expresó menos en la mutante $\Delta hk9$, la cual presentó defectos en conidiación y crecimiento radial. Si la expresión de *env1* no depende de la MAPK Tmk3, pudiera ser que también las HKs también cumplan otras funciones además de regular la vía de señalización MAPK Tmk3. En *M. oryzae*, la proteína Ypd1 se activa por luz y regula la transcripción del gen *ENVOY* (Mohanalan et al., 2017). Dado que no hay muchos estudios sobre el rol de HKs con dominios PAS y GAF en hongos, es difícil explicar la razón por la cual controlan de forma negativa los genes dependientes de Tmk3. En *S. cerevisiae* en ausencia de su única HK, la MAPK Hog1 se mantiene fosforilada ocasionando la muerte celular (Posas et al., 1996). Pudiera ser que en *T. atroviride* en ausencia de una de sus HKs con dominio PAS o GAF, se incrementan los niveles de Tmk3 fosforilado, ocasionando una sobretranscripción de genes dependientes de Tmk3, aunque no de forma letal ya que también otras HKs se encuentran presentes en la célula para su sobrevivencia y esta sugerencia se sustenta al observar como solo ciertos genes se sobreexpresan en ausencia de una HK pero no todos.

Finalmente se evaluó la expresión de las doce HKs presentes en el genoma de *T. atroviride* en condiciones de oscuridad y luz y en ausencia del gen *tmk3*. La tendencia fue que las HKs se expresan más en oscuridad que en luz y que la MAPK Tmk3 controla la transcripción de las HKs con la excepción de *hk2b* y *nik1*. En *M. oryzae* se analizó la expresión de HKs con dominios PAS y en respuesta a la luz se elevó la expresión, mientras que en una mutante donde el gen *YPD1* fue silenciado, la expresión de las HKs fue abatida en respuesta a la luz, concluyendo que la luz induce la expresión de las HKs y que Ypd1 controla la expresión de HKs y la activación de MAPKs para regular diversas funciones en respuesta a la luz. En *T.*

atroviride, solo la expresión del gen *sln1* se eleva en respuesta a la luz, mientras que se detectó menos transcrito ante el estímulo de la luz en Phy1 y los genes que codifican para HK con dominio PAS o GAF, a la vez que posiblemente se dé un evento de autoregulación donde la MAPK Tmk3 actúa como represor de las HKs.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

IX. CAPITULO 4:

Papel de la HK Nik1 de *T. atroviride* en la regulación de genes quitina sintasa en respuesta a un estrés osmótico

9.1 RESUMEN

La pared celular confiere a los hongos la protección necesaria para enfrentarse al estrés ambiental, el cual se constituye principalmente de quitina y β -glucano, sintetizados por las enzimas quitina sintasas (*chs*) y β -glucano sintasa (*fks1*) respectivamente, sin embargo, también las MAPKs participan en las respuestas adaptativas al estrés y regulan la integridad de la pared celular de los hongos. En esta investigación, se mostró que en *T. atroviride* la expresión de los genes *chs1*, *chs2*, *chs3* y *chs6* disminuyó a los 15 min de un choque osmótico por 500 mM NaCl como una respuesta temprana, mientras que los genes *chs4*, *chs5*, *chs7* y *fks1* se mantuvieron constitutivos. Posteriormente, se evaluó la expresión de los genes *chs1*, *chs2*, *chs3* y *chs6* en mutantes $\Delta tmk3$, $\Delta pbs2$ y $\Delta nik1$, y se determinó que la vía MAPK Tmk3 reprime la expresión de los genes *chs1*, *chs2*, *chs3* y *chs6*, participando la HK Nik1 en la regulación de *chs1*, *chs2* y *chs3*. En el mismo experimento también se evaluó la expresión de los genes dependientes de luz azul, *blu1* y *grg2*, y se observó que también se activan en respuesta a un estrés osmótico, siendo el pico máximo a los 15 min, de forma dependiente de Tmk3, pero independientemente de Nik1. En general, la vía MAPK Tmk3 participa en la arquitectura de la pared celular regulando la transcripción de los genes *chs* a través de la HK Nik1.

(Palabras clave: pared celular, quitina sintasa, estrés osmótico, MAPK)

ABSTRACT

The cell wall provides to fungi the necessary protection to face environmental stress, which is mainly buildup of chitin and β -glucan, synthesized by chitin synthase (*chs*) and β -glucan synthase (*fks1*) respectively. However, MAPKs also participate in adaptive responses to stress and regulate the integrity of the fungal cell wall. In this research, it was shown that the expression of *T. atroviride chs1*, *chs2*, *chs3*, and *chs6* genes decreases 15 min after an osmotic shock by 500 mM NaCl as an early response, while the *chs4*, *chs5*, *chs7*, and *fks1* genes remained unchanged. Subsequently, the expression of *chs1*, *chs2*, *chs3*, and *chs6* was evaluated in $\Delta tmk3$, $\Delta pbs2$ and $\Delta nik1$ mutant strains, and it was determined that the MAPK Tmk3 pathway represses the expression of the *chs1*, *chs2*, *chs3*, and *chs6* genes, participating HK Nik1 in the regulation of *chs1*, *chs2*, and *chs3*. In the same experiment, the expression of the blue light-dependent genes, *blu1* and *grg2*, was also evaluated, and it was observed that they are also activated in response to osmotic stress, being the maximum expression at 15 min, in a Tmk3-dependent manner, but independently of Nik1. In general, the MAPK Tmk3 pathway participates in the architecture of the cell wall by regulating the transcription of *chs* genes through the HK Nik1.

(Key words: cell wall, chitin synthase, osmotic stress, MAPK)

9.2 INTRODUCCIÓN

Los hongos deben enfrentarse a los desafíos que surgen constantemente en su entorno natural, como son los cambios osmóticos, estrés oxidativo, choque térmico, fluctuaciones de pH, limitaciones de nutrientes y cambios químicos (Fuchs y Mylonakis, 2009), sin embargo, su pared celular los protege contra las condiciones ambientales adversas. La pared celular de los hongos no solo funciona como una barrera, también desempeña funciones esenciales en la morfología y el desarrollo celular (Malavazi et al., 2014), y se compone principalmente de manoproteínas, 1,3- β -glucano y quitina (Ram et al., 2004).

Si bien la MAPK Slt2 es específica para regular la integridad de la pared celular de los hongos, se ha publicado que otras vías de señalización también participan en su mantenimiento. En *S. cerevisiae* la MAPK Slt2 modula la biosíntesis de la pared celular y la organización de la actina (Levin, 2005), aunque se ha sugerido que dependiendo del tipo de daño que recibe la pared celular, la vía MAPK Hog1 que regula las respuestas al estrés ambiental podría desempeñar funciones de co-regulación con la vía de la MAPK Slt2 (Rodríguez-Peña et al., 2010; Fuchs and Mylonakis, 2009). En *C. albicans* se ha estudiado extensivamente la organización de su pared celular ya que juega un papel importante en la patogenicidad (Ruiz-Herrera et al., 2006) y se ha publicado que varias vías regulan su arquitectura, incluidas las vías Mkc1 (homóloga a Slt2), Hog1, Cek1 (homóloga a Kss1) y calcineurina, así como la chaperona Hsp90, las cuales han demostrado estar involucradas en la regulación de la expresión de quitina sintasas (Heilmann et al., 2013).

El proteoma de la pared celular es altamente dinámico y adaptable en respuesta a condiciones externas y a cambios morfológicos. Cuando una célula fúngica se estresa, sus niveles de quitina aumentan. La quitina es solo un componente menor de la pared celular, pero un pequeño aumento en el porcentaje de quitina conduce a una pared más robusta (Heilmann et al., 2013). Para ejecutar

los cambios transcripcionales necesarios debido al estrés extracelular, los hongos poseen sensores transmembranales que detectan los cambios e inician señales que se transducen desde la superficie celular al núcleo (Fuchs y Mylonakis, 2009).

En el hongo micoparásito *T. atroviride* se publicó que su genoma posee ocho genes que codifican para quitina sintasas, los cuales se observó una expresión diferencial de tres genes en respuesta al estrés osmótico. También se demostró que la MAPK Tmk3, homóloga a la MAPK Hog1 de levadura, regula no solo respuestas al estrés osmótico sino también la integridad de la pared celular (Esquivel-Naranjo et al., 2016), por lo que la MAPK Tmk3 podría estar participando en la regulación de genes que participan en la biosíntesis de la pared celular.

Se ha publicado que los homólogos a la MAPK Hog1 en hongos son activados por el sistema de dos componentes (Bahn, 2008), y sus receptores, las histidina cinasas, también podrían participar en la coordinación del remodelamiento de la pared celular. En este estudio se analizó la expresión de los genes que codifican para quitina sintasa y β -1,3-glucano sintasa en la respuesta temprana a un choque osmótico, posteriormente también se evaluaron la expresión de los genes cuando carece de los componentes de la vía de señalización activada por estrés, la MAPK Tmk3 y la MAPKK Pbs2. En el análisis se incluyó la HK Nik1, el cual también participa en la regulación de la pared celular. Los resultados indican que Nik1 actúa como un receptor para regular genes que codifican para quitina sintasa a través de la vía MAPK Tmk3.

9.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas enlistadas en la tabla 4. Para obtener conidia fresca, las cepas se propagaron en medios PDA y se incubaron a 27 °C en luz blanca constante durante 5 días, posteriormente se colectó la conidia con 16 ml de agua estéril.

Tabla 4. Cepas utilizadas

Cepa	Genotipo	Referencia
Silvestre (WT) IMI206040		
$\Delta nik1$ -3	$\Delta nik1$	(Calcáneo-Hernández et al., en proceso)
$\Delta tmk3$ -13	$\Delta tmk3$	(Esquivel-Naranjo et al., 2016)
$\Delta pbs2$ -7	$\Delta pbs2$	(Esquivel-Naranjo et al., 2016)

Análisis de expresión de genes inducidos por estrés osmótico

Una suspensión de conidia (1×10^6 conidia/ml) de la cepa WT fue inoculada en 45 ml de medio PDB (caldo papa dextrosa), en un matraz Erlenmeyer de 250 ml cubierto con papel aluminio, e incubada en agitación constante (160 rpm) a 27°C por 48 h. Posteriormente, para probar el efecto de un estrés osmótico en genes de pared celular, bajo condiciones de oscuridad se añadió al medio líquido 5 ml de 5 M NaCl, y las muestras se incubaron por un tiempo extra de 5, 15, 30 y 60 min. Después, se filtró el micelio de las muestras, se congeló en nitrógeno líquido y se maceró. El micelio de la muestra que se tomó como control (tiempo 0), se colectó justo después de añadir NaCl. Se extrajo ARN total de las muestras usando TRIzol® Reagent (Invitrogen) siguiendo la metodología descrita en Anexo 1, luego se sintetizó ADNc (RevertAid Reverse Transcriptase; Thermo Scientific), y las reacciones de PCR se llevaron a cabo para analizar la expresión de genes regulados por la vía MAPK Tmk3 (*blu1* y *grg2*), y los genes involucrados en la síntesis de polisacáridos de pared celular como quitina (genes *chs1*-8) y β -1,3-glucano (*fks1*). Los oligonucleótidos que se utilizaron se enlistan en Anexo 3.

9.4 RESULTADOS

En *Trichoderma harzianum*, los genes de respuesta a luz azul dependiente de la MAPK Tmk3, *blu1* y *grg2*, se expresa ante un estrés osmótico por sorbitol (Delgado-Jarana, 2006). Por lo anterior, se evaluó la expresión de los genes *blu1* y *grg2* en respuesta a un estrés por 500 mM NaCl. Ya que el experimento se realizó en condiciones de oscuridad, se incluyó el gen *env1* como control. Se observó que a los 15 min posterior al tratamiento, los niveles de transcrito de *blr1* y *grg2* aumentan, y luego *blu1* tiende a disminuir, mientras que *grg2* se mantiene elevado (Fig. 52). No se observó expresión de *env1* en respuesta a un choque osmótico. Lo anterior sugiere que *blu1* y *grg2* regulan también respuestas al estrés osmótico, siendo los 15 min el pico máximo de expresión. Debido a que los hongos remodelan su pared celular ante un estrés ambiental (Ene et al., 2015), se evaluó la actividad de genes que codifican para quitina sintasa (*chs1-8*) y β -1,3-glucano sintasa (*fks1*), y se determinó que los genes *chs1*, *chs2*, *chs3* y *chs6* su expresión disminuye a los 15 min de un tratamiento con 500 mM NaCl, mientras que los genes *chs4*, *chs5*, *chs7* y *fks1* se mantienen constitutivos, y no se detectó transcrito del gen *chs8*.

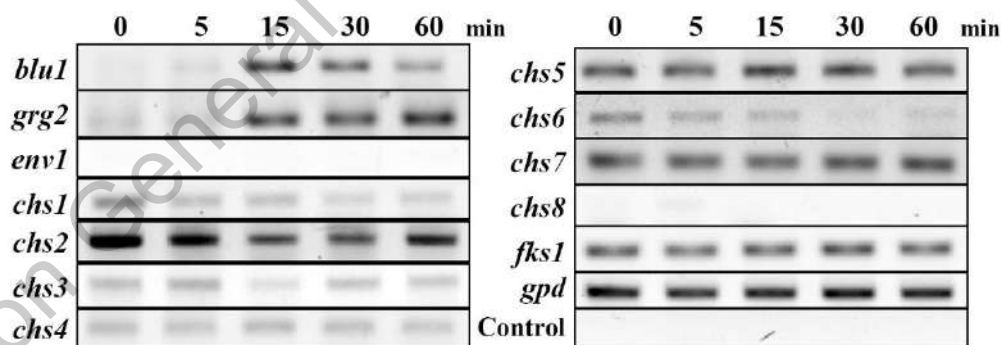


Figura 52. Análisis de expresión de genes en respuesta a un estrés osmótico. Micelio de la cepa WT crecido en medio líquido fue expuesto a 500 mM NaCl, después el micelio se colectó a los tiempos indicados. Se extrajo ARN total de las muestras para sintetizar ADNc. Como control de carga, se amplificó el gen *gpd*. Como control de síntesis de ADNc, en la misma reacción se usaron las muestras de ARN como templado y sin transcriptasa, y posteriormente se amplificó *gpd*.

Para analizar la participación de la vía MAPK Tmk3 en la regulación de los genes *chs1*, *chs2*, *chs3* y *chs6*, se realizó un ensayo de estrés salino en las cepas $\Delta tmk3$, $\Delta pbs2$ y $\Delta nik1$ a los 15 min posterior a un estrés salino. El resultado sugiere que la vía MAPK Tmk3 también regula los genes *blu1* y *grg2* en respuesta a un estrés salino e independientemente de la HK Nik1, pero a través de Nik1 reprime los genes *chs1*, *chs2* y *chs3* (Fig. 53). Por lo anterior, es posible que en *T. atroviride* la HK Nik1 participe en regular un cierto número de genes a través de la vía MAPK Tmk3.

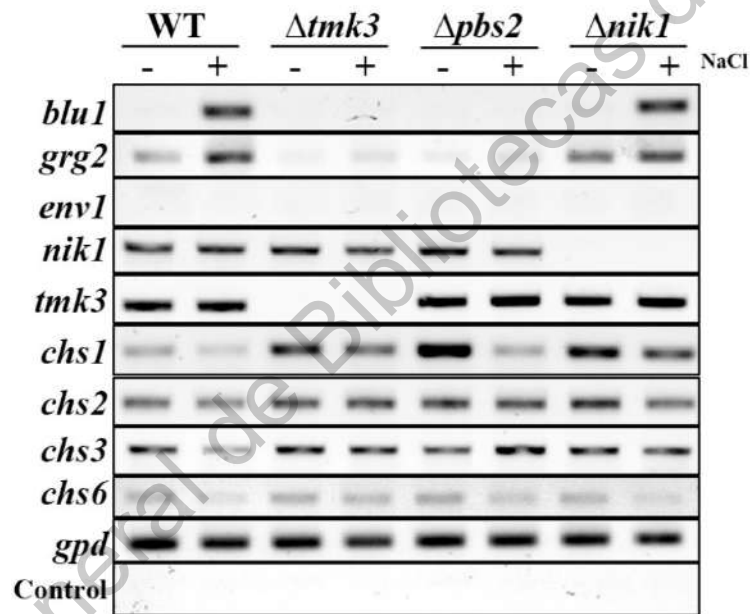


Figura 53. Rol de la vía MAPK Tmk3 en la expresión de genes regulados por estrés osmótico. Se sintetizó ADNc a partir del ARN total extraído del micelio de la cepa WT y mutantes sin estrés o después de 15 min de haber sido sometido a un estrés salino. Como control de síntesis de ADNc, en la misma reacción se utilizó el ARN de las muestras como templado y sin transcriptasa, posteriormente se amplificó *gpd*.

9.5 DISCUSIÓN

Los análisis que anteriormente se habían realizado en mutantes carentes de los genes *nik1*, *pbs2* y *tmk3* sugieren que la vía MAPK Tmk3 regula la arquitectura de la pared celular en *Trichoderma atroviride*, y que la HK Nik1 participa en el mantenimiento (Esquivel-Naranjo et al., 2016; Calcáneo-Hernández et al., en proceso). Usualmente la pared celular de los hongos se compone de quitina y β -1,3-glucano (Gow et al., 2017), y en *T. atroviride* se publicó un estudio detallado de los genes que codifican para quitina sintasa (*chs*) (Kappel et al., 2020). Los datos son interesantes porque se demostró que dependiendo de la etapa de su desarrollo, la expresión de los genes varía. Desde que una espora empieza a germinar, los niveles de expresión de genes *chs* aumenta, pero a medida que el hongo ha crecido y ha formado conidia, la expresión de los genes disminuye (Kappel et al., 2020). Otro resultado importante a considerar es la regulación de genes *chs* ante un estrés osmótico (Kappel et al., 2020), y esto va en correlación con la remodelación de la pared celular de los organismos ante un cambio ambiental (Ene et al., 2015; Tenhaken, 2015; Piuri et al., 2005).

En esta investigación se realizó una evaluación de la expresión de los genes *chs* en *T. atroviride* en la respuesta temprana a un estrés osmótico. Algunos resultados son comparables con los de Kappel et al. (2020), sin embargo, también se presentaron algunas diferencias. Nuestro análisis fue hecho a los 5, 15, 30 y 60 min posterior a un tratamiento con 500 NaCl, mientras que ellos su análisis se realizó una hora después de un estrés con 700 mM NaCl. En ambos resultados no hubo una diferencia significativa de la expresión de los genes *chs4*, *chs5* y *chs7*, sin embargo, nosotros observamos que la expresión de los genes *chs1*, *chs2*, *chs3* y *chs6* disminuye a los 15 min posterior a un estrés, pero después aumenta, mientras que Kappel et al. publicaron que no hay cambios en los niveles de transcrito de *chs1* y *chs3*. Nosotros no pudimos detectar transcrito del gen *chs8*, sin embargo, ellos publicaron que *chs8* se expresa muy poco en *T. atroviride*, y solo aumenta en respuesta a estrés osmótico y en condiciones micoparasitarias (Kappel et al., 2020).

Posiblemente las variaciones en algunos resultados sean por la diferencia en el método. Su tiempo de incubación fue de 24 h mientras que nosotros incubamos *T. atroviride* durante 48 h. Dado que la expresión de los genes *chs* también varía dependiendo de la etapa del desarrollo hongo, es probable que el tiempo de incubación también haya sido otro factor en las diferencias de los resultados.

En nuestra evaluación se observó una disminución de la expresión de los genes *chs1*, *chs2*, *chs3* y *chs6* como una respuesta adaptativa temprana. En *Ustilago maydis* se analizó la regulación de los genes que codifican para quitina sintasa, y la expresión de cuatro genes *chs* disminuyó en respuesta a un estrés salino (Robledo-Briones y Ruiz-Herrera, 2012), al igual que cinco genes *chs* de *Penicillium digitatum* (Gandía et al., 2012). También se analizó la expresión del gen *fks1*, pero se mantuvo constitutivo al igual que en *U. maydis* (Robledo-Briones y Ruiz-Herrera, 2012). El gen *fks1* codifica para la β -1,3-glucano sintasa, otra enzima esencial para la arquitectura de la pared celular de hongos. En *Saccharomyces cerevisiae*, el gen *fks1* es regulado en el ciclo celular (Mazur et al., 1995), por lo que se sugiere que no participa en la regulación de las respuestas al estrés osmótico.

Si las MAPKs regulan la arquitectura de la pared celular, crecimiento vegetativo y esporulación (Esquivel-Naranjo et al., 2016; Ene et al., 2015), es razonable pensar que la MAPK Tmk3 tiene un control en la expresión de genes para la biosíntesis de la pared celular. En base a lo anterior, se evaluó la expresión de los genes *chs* en mutantes carentes de los genes *nik1*, *pbs2* y *tmk3*. Los resultados sugieren que la HK Nik1 reprime los genes *chs1*, *chs2* y *chs3* a través de la vía MAPK Tmk3. También se publicó que en *C. albicans* la vía MAPK Hog1 regula la expresión de genes *chs*, la actividad de la quitina sintasa se eleva en una cepa *hog1* Δ en contraste con la cepa WT (Munro et al., 2007), al igual que los genes *chs1*, *chs2*, *chs3* y *chs6* en cepas Δ *tmk3*. Lo anterior sugiere que la vía Tmk3 regula de forma negativa los genes *chs* en *T. atroviride*.

Por último, se analizó la expresión de genes de respuesta a luz azul en *T. atroviride* ante un estrés salino en condiciones de oscuridad. Se observó que el pico máximo de expresión de los genes *blu1* y *grg2* fue a los 15 min, mientras que no se detectó transcrito del gen *env1*. Tampoco se detectó expresión de los genes *blu1* y *grg2* en respuesta a un estrés osmótico en cepas $\Delta pbs2$ y $\Delta tmk3$. Los resultados sugieren que en *T. atroviride*, los genes *blr1* y *grg2*, que codifican para una proteína glucosa represible (Delgado-Jarana, 2006), regulan tanto el estrés osmótico como respuestas a la luz, y dependen de la vía MAPK Tmk3 para su activación, pero independientemente de la HK Nik1.

X. CONCLUSIONES GENERALES

- El uso de la cepa Ura⁻1 como fondo genético y el gen *pyr4* como marcador de selección es una alternativa segura para el estudio funcional de los genes de *T. atroviride*.
- El diseño de un casete knock-in para etiquetar la MAPK Tmk3 fue exitosa aunque poco eficiente. Se logró etiquetar a Tmk3 en un fondo auxótrofo a uracilo, cepa Ura⁻1:T3mCh, donde se observó *in vivo* a Tmk3. La cepa Ura⁻1:T3mCh funcionó como herramienta molecular para obtener una mutante *blr2* con Tmk3 etiquetada.
- Se obtuvieron mutantes de los genes *hk1a*, *hk2b*, *hk4*, *hk5*, *hk9*, *hk10* y *hk11* que codifican para HKs con dominios PAS y/o GAF. Dependiendo del gen y del estímulo extracelular, las HKs cumplen una función como activadoras o represoras.
- Los resultados sugieren que la MAPK Tmk3 regula la transcripción de genes que codifican para HK.
- La HK Nik1 regula los genes *chs1*, *chs2*, *chs3* importantes para la arquitectura de la pared celular de *T. atroviride* a través de la vía de la MAPK Tmk3.

XI. PERSPECTIVAS

- Generar mutantes de los genes *sln1*, *hk1b* y *hk2a*.
- Generar complementantes de las mutantes carentes de HKs.
- Realizar más estudios de la localización de la MAPK Tmk3.
- Determinar si usar un gen *pyr4* de otro organismo aumentaría la eficiencia en la transformación utilizando la cepa Ura⁻1 como fondo genético.

XII. REFERENCIAS

- Adam, K., Hunter, T., 2018. Histidine kinases and the missing phosphoproteome from prokaryotes to eukaryotes. *Lab Invest* 98, 233–247. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.118>
- Alam, M.T., Zelezniak, A., Mülleder, M., Shliha, P., Schwarz, R., Capuano, F., Vowinckel, J., Radmaneshfar, E., Krüger, A., Calvani, E., Michel, S., Börno, S., Christen, S., Patil, K.R., Timmermann, B., Lilley, K.S., Ralser, M., 2016. The metabolic background is a global player in *Saccharomyces* gene expression epistasis. *Nat Microbiol* 1, 15030. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.30>
- Alex, L.A., Borkovich, K.A., Simon, M.I., 1996. Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 3416–3421. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3416>
- Appleyard, M.V.C.L., McPheat, W.L., Stark, M.J.R., 2000. A novel 'two-component' protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics* 37, 364–372. <https://doi.org/10.1007/s002940000123>
- Aravind, L., Ponting, C.P., 1997. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 458–459. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01148-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01148-1)
- Atom, H., Imanaka, T., Fukui, T., 2012. Overview of the genetic tools in the Archaea. *Front. Microbio.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00337>
- Attwood, P.V., 2013. Histidine kinases from bacteria to humans. *Biochemical Society Transactions* 41, 1023–1028. <https://doi.org/10.1042/BST20130019>
- Baek, J.-M., Kenerley, C.M., 1998. The *arg2* Gene of *Trichoderma virens*: Cloning and Development of a Homologous Transformation System. *Fungal Genetics and Biology* 23, 34–44. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.1025>
- Bahn, Y.-S., 2008. Master and Commander in Fungal Pathogens: the Two-Component System and the HOG Signaling Pathway. *Eukaryotic Cell* 7, 2017–2036. <https://doi.org/10.1128/EC.00323-08>
- Bahn, Y.-S., Kojima, K., Cox, G.M., Heitman, J., 2006. A Unique Fungal Two-Component System Regulates Stress Responses, Drug Sensitivity, Sexual Development, and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *MBoc* 17, 3122–3135. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-02-0113>
- Barba-Ostria, C., Lledías, F., Georgellis, D., 2011. The *Neurospora crassa* DCC-1 Protein, a Putative Histidine Kinase, Is Required for Normal Sexual and Asexual Development and Carotenogenesis. *Eukaryotic Cell* 10, 1733–1739. <https://doi.org/10.1128/EC.05223-11>
- Berrocal-Tito, G.M., Rosales-Saavedra, T., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., 2000. Characterization of blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochem. Photobiol.* 71, 662–668.
- Besant, P.G., Attwood, P.V., 2009. Detection and analysis of protein histidine phosphorylation. *Mol Cell Biochem* 329, 93–106. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0117-2>
- Bevis, B.J., Glick, B.S., 2002. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* 20, 83–87. <https://doi.org/10.1038/nbt0102-83>
- Bicknell, A.A., Tourtellotte, J., Niwa, M., 2010. Late Phase of the Endoplasmic Reticulum Stress Response Pathway Is Regulated by Hog1 MAP Kinase. *J. Biol. Chem.* 285, 17545–17555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.084681>
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., Fischer, R., 2005. The *Aspergillus nidulans* Phytochrome FphA Represses Sexual Development in Red Light. *Current Biology* 15, 1833–1838. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.061>
- Boeke, J.D., La Croute, F., Fink, G.R., 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* 197, 345–346. <https://doi.org/10.1007/BF00330984>
- Boyer, P.D., Deluca, M., Ebner, K.E., Hultquist, D.E., Peter, J.B., 1962. Identification of phosphohistidine in digests from a probable intermediate of oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 237, PC3306–PC3308.

- Braun, H., Woitsch, L., Hetzer, B., Geisen, R., Zange, B., Schmidt-Heydt, M., 2018. *Trichoderma harzianum*: Inhibition of mycotoxin producing fungi and toxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 280, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.021>
- Brejč, K., Sixma, T.K., Kitts, P.A., Kain, S.R., Tsien, R.Y., Ormo, M., Remington, S.J., 1997. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 2306–2311. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2306>
- Brewster, J.L., Gustin, M.C., 2014. Hog1: 20 years of discovery and impact. *Science Signaling* 7, re7–re7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005458>
- Brown, A., Cowen, L., di Pietro, A., Quinn, J., 2017. Stress Adaptation, in: *The Fungal Kingdom*. American Society of Microbiology, pp. 463–485. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0048-2016>
- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S.L., Lorito, M., Kubicek, C.P., Mach, R.L., 2005. Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* To Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3959–3965. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3959-3965.2005>
- Calcáneo-Hernández, G., Rojas-Espinosa, E., Landeros-Jaime, F., Cervantes-Chávez, J.A., Esquivel-Naranjo, E.U., 2020. An efficient transformation system for *Trichoderma atroviride* using the *pyr4* gene as a selectable marker. *Braz J Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00329-7>
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y., 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 7877–7882. <https://doi.org/10.1073/pnas.082243699>
- Cano-Domínguez, N., Bowman, B., Peraza-Reyes, L., Aguirre, J., 2019. *Neurospora crassa* NADPH Oxidase NOX-1 Is Localized in the Vacuolar System and the Plasma Membrane. *Front. Microbiol.* 10, 1825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01825>
- Carroll, A.M., Sweigard, J.A., Valent, B., 1994. Improved Vectors for Selecting Resistance to Hygromycin. *Fungal Genetics Reports* 41, 22. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1367>
- Casas-Flores, S., 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 150, 3561–3569. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27346-0>
- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P., Herrera-Estrella, A., 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 150, 3561–3569. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27346-0>
- Castellanos, F., Schmoll, M., Martínez, P., Tisch, D., Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Esquivel-Naranjo, E.U., 2010. Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology* 47, 468–476. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.02.001>
- Catlett, N.L., Yoder, O.C., Turgeon, B.G., 2003. Whole-Genome Analysis of Two-Component Signal Transduction Genes in Fungal Pathogens. *Eukaryotic Cell* 2, 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1151-1161.2003>
- Chang, C., Kwok, S., Bleecker, A., Meyerowitz, E., 1993. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262, 539–544. <https://doi.org/10.1126/science.8211181>
- Chen, R.E., Thorner, J., 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773, 1311–1340. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.05.003>
- Cho, H.Y., Cho, H.J., Kim, Y.M., Oh, J.I., Kang, B.S., 2009. Structural Insight into the Heme-based Redox Sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 284, 13057–13067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808905200>
- Clark, K.L., Larsen, P.B., Wang, X., Chang, C., 1998. Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 5401–5406. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5401>

- Clemons, K.V., Miller, T.K., Selitrennikoff, C.P., Stevens, D.A., 2002. *fos-1*, a putative histidine kinase as a virulence factor for systemic aspergillosis. *Med Mycol* 40, 259–262. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.3.259.262>
- Coninck, E., Scauflaire, J., Gollier, M., Liénard, C., Foucart, G., Manssens, G., Munaut, F., Legrève, A., 2020. *Trichoderma atroviride* as a promising biocontrol agent in seed coating for reducing *Fusarium* damping-off on maize. *J Appl Microbiol* jam.14641. <https://doi.org/10.1111/jam.14641>
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S., 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33–38. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00685-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00685-0)
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y., 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 20, 448–455. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89099-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89099-4)
- Cyert, M.S., 2003. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311, 1143–1150. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01552-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01552-3)
- Defosse, T.A., Sharma, A., Mondal, A.K., Dugé de Bernonville, T., Latgé, J.-P., Calderone, R., Giglioli-Guivarc'h, N., Courdavault, V., Clastre, M., Papon, N., 2015. Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi: Fungal hybrid histidine kinases. *Molecular Microbiology* 95, 914–924. <https://doi.org/10.1111/mmi.12911>
- Delgado-Jarana, J., 2006. ThHog1 controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 152, 1687–1700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28729-0>
- Denis, V., Cyert, M.S., 2002. Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *Journal of Cell Biology* 156, 29–34. <https://doi.org/10.1083/jcb.200111004>
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Aßmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., Kahmann, R., 2009. Pep1, a Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis*, Is Required for Successful Invasion of Plant Cells. *PLoS Pathog* 5, e1000290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000290>
- Ene, I.V., Walker, L.A., Schiavone, M., Lee, K.K., Martin-Yken, H., Dague, E., Gow, N.A.R., Munro, C.A., Brown, A.J.P., 2015. Cell Wall Remodeling Enzymes Modulate Fungal Cell Wall Elasticity and Osmotic Stress Resistance. *mBio* 6, e00986-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00986-15>
- Ermak, G., Davies, K.J.A., 2002. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Molecular Immunology* 38, 713–721. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00108-0](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00108-0)
- Esquivel-Naranjo, E.U., García-Esquivel, M., Medina-Castellanos, E., Correa-Pérez, V.A., Parra-Arriaga, J.L., Landeros-Jaime, F., Cervantes-Chávez, J.A., Herrera-Estrella, A., 2016. A *Trichoderma atroviride* stress-activated MAPK pathway integrates stress and light signals: *Trichoderma* integrated stress and light signalling. *Molecular Microbiology* 100, 860–876. <https://doi.org/10.1111/mmi.13355>
- Esquivel-Naranjo, E.U., Herrera-Estrella, A., 2020. Strong preference for the integration of transforming DNA via homologous recombination in *Trichoderma atroviride*. *Fungal Biology* S1878614620300969. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.07.001>
- Esquivel-Naranjo, E.U., Herrera-Estrella, A., 2007. Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by *blr-2* overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 153, 3909–3922. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007302-0>
- Eyers, C.E. (Ed.), 2020. Histidine Phosphorylation: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*. Springer US, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9884-5>
- Fassler, J.S., West, A.H., 2013. Histidine Phosphotransfer Proteins in Fungal Two-Component Signal Transduction Pathways. *Eukaryotic Cell* 12, 1052–1060. <https://doi.org/10.1128/EC.00083-13>
- Ferrigno, P., 1998. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *The EMBO Journal* 17, 5606–5614. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5606>

- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H., Silver, P.A., 1998. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *The EMBO Journal* 17, 5606–5614. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5606>
- Francisco, C.S., Ma, X., Zwysig, M.M., McDonald, B.A., Palma-Guerrero, J., 2019. Morphological changes in response to environmental stresses in the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Sci Rep* 9, 9642. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45994-3>
- Fuchs, B.B., Mylonakis, E., 2009. Our Paths Might Cross: the Role of the Fungal Cell Wall Integrity Pathway in Stress Response and Cross Talk with Other Stress Response Pathways. *Eukaryotic Cell* 8, 1616–1625. <https://doi.org/10.1128/EC.00193-09>
- Gandía, M., Harries, E., Marcos, J.F., 2012. Identification and characterization of chitin synthase genes in the postharvest citrus fruit pathogen *Penicillium digitatum*. *Fungal Biology* 116, 654–664. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.03.005>
- García-Esquivel, M., Esquivel-Naranjo, E.U., Hernández-Oñate, M.A., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, A., 2016. The *Trichoderma atroviride* cryptochrome/photolyase genes regulate the expression of blr1-independent genes both in red and blue light. *Fungal Biology* 120, 500–512. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.007>
- García-Marqués, S., Randez-Gil, F., Prieto, J.A., 2015. Nuclear versus cytosolic activity of the yeast Hog1 MAP kinase in response to osmotic and tunicamycin-induced ER stress. *FEBS Letters* 589, 2163–2168. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.021>
- Gonia, S., Berman, J., Gale, C.A., 2017. Generation of Fluorescent Protein Fusions in *Candida* Species. *JoVE* 55333. <https://doi.org/10.3791/55333>
- Gow, N.A.R., Latge, J.-P., Munro, C.A., 2017. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
- Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C.P., de Graaff, L.H., 1990. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a pyrG-negative mutant strain. *Curr Genet* 18, 71–76. <https://doi.org/10.1007/BF00321118>
- Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M.D., Olmedo-Monfil, V., Herrera-Estrella, A., 2019. *Trichoderma* Species: Versatile Plant Symbionts. *Phytopathology* 109, 6–16. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>
- Hagiwara, D., Takahashi-Nakaguchi, A., Toyotome, T., Yoshimi, A., Abe, K., Kamei, K., Gono, T., Kawamoto, S., 2013. Nika/TcsC Histidine Kinase Is Involved in Conidiation, Hyphal Morphology, and Responses to Osmotic Stress and Antifungal Chemicals in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* 8, e80881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080881>
- Hamel, L.-P., Nicole, M.-C., Duplessis, S., Ellis, B.E., 2012. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell* 24, 1327–1351. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096156>
- Hammond, T.M., Xiao, H., Rehard, D.G., Boone, E.C., Perdue, T.D., Pukkila, P.J., Shiu, P.K.T., 2011. Fluorescent and bimolecular-fluorescent protein tagging of genes at their native loci in *Neurospora crassa* using specialized double-joint PCR plasmids. *Fungal Genetics and Biology* 48, 866–873. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.05.002>
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2, 43–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro797>
- Heessen, S., Dantuma, N.P., Tessarz, P., Jellne, M., Masucci, M.G., 2003. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae* by a Gly-Ala repeat. *FEBS Letters* 555, 397–404. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01296-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01296-1)
- Heessen, S., Leonchiks, A., Issaeva, N., Sharipo, A., Selivanova, G., Masucci, M.G., Dantuma, N.P., 2002. Functional p53 chimeras containing the Epstein-Barr virus Gly-Ala repeat are protected from Mdm2- and HPV-E6-induced proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 1532–1537. <https://doi.org/10.1073/pnas.022306499>
- Heidenreich, E.J., Kubicek, C.P., 1994. Sequence of the pyr4 gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Gene* 147, 151–152. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90057-4)

- Heilmann, C.J., Sorgo, A.G., Mohammadi, S., Sosinska, G.J., de Koster, C.G., Brul, S., de Koning, L.J., Klis, F.M., 2013. Surface Stress Induces a Conserved Cell Wall Stress Response in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 12, 254–264. <https://doi.org/10.1128/EC.00278-12>
- Heim, R., Cubitt, A.B., Tsien, R.Y., 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663–664. <https://doi.org/10.1038/373663b0>
- Heitman, Howlett, Crous, Stukenbrock, James, Gow (Eds.), 2017. Plant Pathogenic Fungi, in: *The Fungal Kingdom*. American Society of Microbiology, pp. 703–726. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016>
- Hérivaux, A., So, Y.-S., Gastebois, A., Latgé, J.-P., Bouchara, J.-P., Bahn, Y.-S., Papon, N., 2016. Major Sensing Proteins in Pathogenic Fungi: The Hybrid Histidine Kinase Family. *PLoS Pathog* 12, e1005683. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005683>
- Hernandez-Onate, M.A., Esquivel-Naranjo, E.U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A., Herrera-Estrella, A.H., 2012. An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 14918–14923. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209396109>
- Hickey, P.C., Read, N.D., 2009. Imaging living cells of *Aspergillus in vitro*. *Med Mycol* 47, S110–S119. <https://doi.org/10.1080/13693780802546541>
- Hickey, P.C., Swift, S.R., Roca, M.G., Read, N.D., 2004. Live-cell Imaging of Filamentous Fungi Using Vital Fluorescent Dyes and Confocal Microscopy, in: *Methods in Microbiology*. Elsevier, pp. 63–87. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(04\)34003-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(04)34003-1)
- Jacob, S., Foster, A.J., Yemelin, A., Thines, E., 2014. Histidine kinases mediate differentiation, stress response, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *MicrobiologyOpen* 3, 668–687. <https://doi.org/10.1002/mbo3.197>
- Jørgensen, M., Skovlund, D., Johannesen, P., Mortensen, U.H., 2014. A novel platform for heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* (Teleomorph *Hypocrea jecorina*). *Microb Cell Fact* 13, 33. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-33>
- Kabbara, S., Hérivaux, A., Dugé de Bernonville, T., Courdavault, V., Clastre, M., Gastebois, A., Osman, M., Hamze, M., Cock, J.M., Schaap, P., Papon, N., 2019. Diversity and Evolution of Sensor Histidine Kinases in Eukaryotes. *Genome Biology and Evolution* 11, 86–108. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy213>
- Kappel, L., Münsterkötter, M., Sipos, G., Escobar Rodriguez, C., Gruber, S., 2020. Chitin and chitosan remodeling defines vegetative development and *Trichoderma* biocontrol. *PLoS Pathog* 16, e1008320. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008320>
- Khang, C.H., Berruyer, R., Giraldo, M.C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymmek, K., Kang, S., Valent, B., 2010. Translocation of *Magnaporthe oryzae* Effectors into Rice Cells and Their Subsequent Cell-to-Cell Movement. *Plant Cell* 22, 1388–1403. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069666>
- Klionsky, D.J., Herman, P.K., Emr, S.D., 1990. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54, 266–292.
- Krysan, P.J., Colcombet, J., 2018. Cellular Complexity in MAPK Signaling in Plants: Questions and Emerging Tools to Answer Them. *Front. Plant Sci.* 9, 1674. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01674>
- Kumagai, T., Oda, Y., 1969. An action spectrum for photoinduced sporulation in the fungus *Trichoderma viride*. *Plant and Cell Physiology* 10, 387–392. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a074417>
- Kumar Rajendran, N., George, B.P., Chandran, R., Tynga, I.M., Hourelid, N., Abrahamse, H., 2019. The Influence of Light on Reactive Oxygen Species and NF- κ B in Disease Progression. *Antioxidants* 8, 640. <https://doi.org/10.3390/antiox8120640>
- Labib, K., Diffley, J.F.X., Kearsey, S.E., 1999. G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat Cell Biol* 1, 415–422. <https://doi.org/10.1038/15649>

- Lamb, T.M., Goldsmith, C.S., Bennett, L., Finch, K.E., Bell-Pedersen, D., 2011. Direct Transcriptional Control of a p38 MAPK Pathway by the Circadian Clock in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE* 6, e27149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027149>
- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., Bennett, J.W., 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biol Biotechnol* 3, 7. <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0025-7>
- Leroch, M., Mernke, D., Koppenhoefer, D., Schneider, P., Mosbach, A., Doehlemann, G., Hahn, M., 2011. Living Colors in the Gray Mold Pathogen *Botrytis cinerea*: Codon-Optimized Genes Encoding Green Fluorescent Protein and mCherry, Which Exhibit Bright Fluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2887–2897. <https://doi.org/10.1128/AEM.02644-10>
- Levin, D.E., 2005. Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *MMBR* 69, 262–291. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005>
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., Masucci, M.G., 1997. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 12616–12621. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12616>
- Li, D., Agrellos, O.A., Calderone, R., 2010. Histidine kinases keep fungi safe and vigorous. *Current Opinion in Microbiology* 13, 424–430. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.04.007>
- Li, S.C., Diakov, T.T., Rizzo, J.M., Kane, P.M., 2012. Vacuolar H⁺-ATPase Works in Parallel with the HOG Pathway To Adapt *Saccharomyces cerevisiae* Cells to Osmotic Stress. *Eukaryotic Cell* 11, 282–291. <https://doi.org/10.1128/EC.05198-11>
- Lin, Z., Johnson, L.C., Weissbach, H., Brot, N., Lively, M.O., Lowther, W.T., 2007. Free methionine-(R)-sulfoxide reductase from *Escherichia coli* reveals a new GAF domain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 9597–9602. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703774104>
- Liu, H., Wang, G., Li, W., Liu, X., Li, E., Yin, W.-B., 2018. A highly efficient genetic system for the identification of a harzianum B biosynthetic gene cluster in *Trichoderma hypoxylon*. *Microbiology* 164, 769–778. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000649>
- Liu, J., Tong, S.-M., Qiu, L., Ying, S.-H., Feng, M.-G., 2017. Two histidine kinases can sense different stress cues for activation of the MAPK Hog1 in a fungal insect pathogen: Two sensors of fungal Hog1 cascade. *Environmental Microbiology* 19, 4091–4102. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13851>
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., Saito, H., 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242–245. <https://doi.org/10.1038/369242a0>
- Malavazi, I., Goldman, G.H., Brown, N.A., 2014. The importance of connections between the cell wall integrity pathway and the unfolded protein response in filamentous fungi. *Briefings in Functional Genomics* 13, 456–470. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elu027>
- Martínez-Soto, D., Ruiz-Herrera, J., 2017. Functional analysis of the MAPK pathways in fungi. *Revista Iberoamericana de Micología* 34, 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.02.006>
- Matuo, R., Sousa, F.G., Escargueil, A.E., Soares, D.G., Grivicich, I., Saffi, J., Larsen, A.K., Henriques, J.A.P., 2010. DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP. *Biochemical Pharmacology* 79, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.08.016>
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B., Foor, F., 1995. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5671–5681. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.10.5671>
- Medina-Castellanos, E., Esquivel-Naranjo, E.U., Heil, M., Herrera-Estrella, A., 2014. Extracellular ATP activates MAPK and ROS signaling during injury response in the fungus *Trichoderma atroviride*. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00659>
- Meena, N., Kaur, H., Mondal, A.K., 2010. Interactions among HAMP Domain Repeats Act as an Osmosensing Molecular Switch in Group III Hybrid Histidine Kinases from Fungi. *J. Biol. Chem.* 285, 12121–12132. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.075721>

- Möglich, A., 2019. Signal transduction in photoreceptor histidine kinases. *Protein Science* 28, 1923–1946. <https://doi.org/10.1002/pro.3705>
- Mohan, V.C., Chandarana, P.M., Chattoo, Bharat.B., Patkar, R.N., Manjrekar, J., 2017. Fungal Histidine Phosphotransferase Plays a Crucial Role in Photomorphogenesis and Pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*. *Front. Chem.* 5, 31. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00031>
- Montgomery, B.L., 2007. Sensing the light: photoreceptive systems and signal transduction in cyanobacteria: Sensing light. *Molecular Microbiology* 64, 16–27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05622.x>
- Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., Kenerley, C.M., 2013. *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 105–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102353>
- Mukherjee, S., Creamer, R., 2013. Transformation Methods for Slow-Growing Fungi, in: Gupta, V.K., Tuohy, M.G., Ayyachamy, M., Turner, K.M., O'Donovan, A. (Eds.), *Laboratory Protocols in Fungal Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 467–473. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_43
- Munro, C.A., Selvaggini, S., de Bruijn, I., Walker, L., Lenardon, M.D., Gerssen, B., Milne, S., Brown, A.J.P., Gow, N.A.R., 2007. The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 63, 1399–1413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05588.x>
- Narasipura, S.D., Ren, P., Dyavaiah, M., Auger, I., Chaturvedi, V., Chaturvedi, S., 2006. An efficient method for homologous gene reconstitution in *Cryptococcus gattii* using URA5 auxotrophic marker. *Mycopathologia* 162, 401–409. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0076-z>
- Nikolaou, E., Agriafioti, I., Stumpf, M., Quinn, J., Stansfield, I., Brown, A.J., 2009. Phylogenetic diversity of stress signaling pathways in fungi. *BMC Evol Biol* 9, 44. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-44>
- Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., Luque, E.M., Corrochano, L.M., 2010. A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes con-10 and con-6 in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 47, 352–363. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.11.004>
- Papon, N., Stock, A.M., 2019. What do archaeal and eukaryotic histidine kinases sense? *F1000Res* 8, 2145. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20094.1>
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E., Knowles, J., 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 61, 155–164. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90110-7)
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., Ruzal, S.M., 2005. Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *J Appl Microbiol* 98, 84–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02428.x>
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., Saito, H., 1996. Yeast HOG1 MAP Kinase Cascade Is Regulated by a Multistep Phosphorelay Mechanism in the SLN1–YPD1–SSK1 “Two-Component” Osmosensor. *Cell* 86, 865–875. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80162-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80162-2)
- Poveda, J., 2020. *Trichoderma parareesei* Favors the Tolerance of Rapeseed (*Brassica napus* L.) to Salinity and Drought Due to a Chorismate Mutase. *Agronomy* 10, 118. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010118>
- Pronk, J.T., 2002. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2095–2100. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2095-2100.2002>
- Raeder, U., Broda, P., 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1, 17–20. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01479.x>
- Rajewska, M., Wegrzyn, K., Konieczny, I., 2012. AT-rich region and repeated sequences – the essential elements of replication origins of bacterial replicons. *FEMS Microbiol Rev* 36, 408–434. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00300.x>

- Ram, A.F.J., Arentshorst, M., Damveld, R.A., vanKuyk, P.A., van den Hondel, C., 2004. The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall. *Microbiology* 150, 3315–3326. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27249-0>
- Razanamparany, V., Bégueret, J., 1986. Positive screening and transformation of *ura5* mutants in the fungus *Podospora anserina*: characterization of the transformants. *Curr Genet* 10, 811–817. <https://doi.org/10.1007/BF00418527>
- Rickman, L., Saldanha, J.W., Hunt, D.M., Hoar, D.N., Colston, M.J., Millar, J.B.A., Buxton, R.S., 2004. A two-component signal transduction system with a PAS domain-containing sensor is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.082>
- Rico-Ramírez, A.M., Roberson, R.W., Riquelme, M., 2018. Imaging the secretory compartments involved in the intracellular traffic of CHS-4, a class IV chitin synthase, in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 117, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.03.006>
- Robledo-Briones, M., Ruiz-Herrera, J., 2012. Transcriptional Regulation of the Genes Encoding Chitin and β -1,3-Glucan Synthases from *Ustilago maydis*. *Curr Microbiol* 65, 85–90. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0129-0>
- Rodríguez-Peña, J.M., García, R., Nombela, C., Arroyo, J., 2010. The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* 27, 495–502. <https://doi.org/10.1002/yea.1792>
- Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E.U., Casas-Flores, S., Martínez-Hernández, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C., Herrera-Estrella, A., 2006. Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* 152, 3305–3317. <https://doi.org/10.1099/mic.0.29000-0>
- Ruiz-Herrera, J., Victoria Elorza, M., Valentín, E., Sentandreu, R., 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Research* 6, 14–29. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x>
- Russell, A.J., Cove, D.J., Trewavas, A.J., Wang, T.L., 1998. Blue light but not red light induces a calcium transient in the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B., S. & G. *Planta* 206, 278–283. <https://doi.org/10.1007/s004250050401>
- Saito, H., Posas, F., 2012. Response to Hyperosmotic Stress. *Genetics* 192, 289–318. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140863>
- Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M.I., Baker, S.E., Brown, C., Cervantes-Badillo, M.G., Cetz-Chel, J., Cristobal-Mondragon, G.R., Delaye, L., Esquivel-Naranjo, E.U., Frischmann, A., Gallardo-Negrete, J. de J., García-Esquivel, M., Gomez-Rodriguez, E.Y., Greenwood, D.R., Hernández-Oñate, M., Kruszkowska, J.S., Lawry, R., Mora-Montes, H.M., Muñoz-Centeno, T., Nieto-Jacobo, M.F., Nogueira Lopez, G., Olmedo-Monfil, V., Osorio-Concepcion, M., Pilsyk, S., Pomraning, K.R., Rodriguez-Iglesias, A., Rosales-Saavedra, M.T., Sánchez-Arreguín, J.A., Seidl-Seiboth, V., Stewart, A., Uresti-Rivera, E.E., Wang, C.-L., Wang, T.-F., Zeilinger, S., Casas-Flores, S., Herrera-Estrella, A., 2016. The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 205–327. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-15>
- Schumacher, M.M., Enderlin, C.S., Selitrennikoff, C.P., 1997. The Osmotic-1 Locus of *Neurospora crassa* Encodes a Putative Histidine Kinase Similar to Osmosensors of Bacteria and Yeast. *Current Microbiology* 34, 340–347. <https://doi.org/10.1007/s002849900193>
- Schuster, A., Bruno, K.S., Collett, J.R., Baker, S.E., Seiboth, B., Kubicek, C.P., Schmoll, M., 2012. A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Biofuels* 5, 1. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-1>
- Seiple, L., 2006. Linking uracil base excision repair and 5-fluorouracil toxicity in yeast. *Nucleic Acids Research* 34, 140–151. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj430>
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., Tsien, R.Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22, 1567–1572. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>

- Sharipo, A., Imreh, M., Leonchiks, A., Imreh, S., Masucci, M.G., 1998. A minimal glycine-alanine repeat prevents the interaction of ubiquitinated I κ B α with the proteasome: a new mechanism for selective inhibition of proteolysis. *Nat Med* 4, 939–944. <https://doi.org/10.1038/nm0898-939>
- Shimomura, O., 2005. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 217, 3–15. <https://doi.org/10.1111/j.0022-2720.2005.01441.x>
- Speckbacher, V., Ruzsanyi, V., Wigger, M., Zeilinger, S., 2020. The *Trichoderma atroviride* Strains P1 and IMI 206040 Differ in Their Light-Response and VOC Production. *Molecules* 25, 208. <https://doi.org/10.3390/molecules25010208>
- Steyaert, J.M., Weld, R.J., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A., 2010. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology* 156, 2887–2900. <https://doi.org/10.1099/mic.0.041715-0>
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2000. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19, 201–213.
- Tenhaken, R., 2015. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00771>
- Verd $\acute{a}$ n, J., Bartnicki-Garcia, S., Riquelme, M., 2009. Functional stratification of the Spitzenk $\ddot{a}$ mpfer of *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* 74, 1044–1053. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06917.x>
- Vitalini, M.W., de Paula, R.M., Goldsmith, C.S., Jones, C.A., Borkovich, K.A., Bell-Pedersen, D., 2007. Circadian rhythmicity mediated by temporal regulation of the activity of p38 MAPK. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 18223–18228. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704900104>
- Wang, C., Zhuang, W.-Y., 2020. Carbon metabolic profiling of *Trichoderma* strains provides insight into potential ecological niches. *Mycologia* 112, 213–223. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1698246>
- Weber, R.W.S., 2002. Vacuoles and the fungal lifestyle. *MYT* 16. <https://doi.org/10.1017/S0269915X02006110>
- Wellington, M., Anaul, M., Rustchenko, K.E., 2006. 5-fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in genetically manipulated strains of *Candida albicans*. *Mycologia* 98, 393–398. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.3.393>
- Wellington, M., Rustchenko, E., 2005. 5-Fluoro-orotic acid induces chromosome alterations in *Candida albicans*. *Yeast* 22, 57–70. <https://doi.org/10.1002/yea.1191>
- Wuichet, K., Alexander, R.P., Zhulin, I.B., 2007. Comparative Genomic and Protein Sequence Analyses of a Complex System Controlling Bacterial Chemotaxis, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 3–31. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)22001-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)22001-9)
- Wurgler-Murphy, S., 1997. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 172–176. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01036-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01036-0)
- Wyatt, M.D., Wilson, D.M., 2009. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 788–799. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8557-5>
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P.C., Dou, X., Perez-Balaguer, A., Osmani, S.A., 2004. Rapid Production of Gene Replacement Constructs and Generation of a Green Fluorescent Protein-Tagged Centromeric Marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* 3, 1359–1362. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1359-1362.2004>
- Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y., Scazzocchio, C., 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41, 973–981. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.08.001>
- Yu, Z., Armant, O., Fischer, R., 2016. Fungi use the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signalling. *Nature Microbiology* 1. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.19>
- Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., Tsien, R.Y., 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 906–918. <https://doi.org/10.1038/nrm976>
- Zhulin, I., 1997. PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 331–333. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01110-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01110-9)

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Metodologías

Aislamiento y transformación de protoplastos por el método de polietilenglicol (PEG)-CaCl₂

Para obtener protoplastos de *T. atroviride*, se inocularon 1×10^8 conidios de la cepa WT o cepas mutantes en 100 ml de medio estéril GEYEC (1.5% glucosa, 0.3% extracto de levadura y 0.5% hidrolizado de caseína), incubado a 27°C por 16 horas en agitación orbital constante. Posteriormente el micelio fue filtrado con ayuda de un embudo y tela Magitel estéril, se recuperó con una espátula metálica estéril y 0.2 g de micelio fue colocado en un tubo cónico estéril de 50 ml con 7 ml de solución osmótica (50 mM CaCl₂, 0.5 M Manitol y 50 mM MES, con pH 5.5 ajustado con KOH) y 0.1 g de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich). El tubo cónico se agitó vigorosamente en vórtex y se incubó a temperatura ambiente en agitación orbital constante a 120 rpm por 2 h. Los protoplastos obtenidos fueron filtrados con tela Magitel estéril, se lavaron con 2 ml de solución osmótica y se centrifugaron a 8,000 rpm por 10 minutos para su recolección. La fase acuosa se desechó, la pastilla se resuspendió en un volumen mínimo de solución osmótica y se distribuyó en tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 ml (300 µl en cada tubo). Un tubo con protoplastos fue usado como control y otro para transformar. Al tubo para transformar se le añadió una mezcla del producto del PCR 3 (50 µl), donde se amplificó el casete para el reemplazo del gen a analizar por un marcado de selección, más un volumen de solución osmótica (50 µl). Al tubo con protoplastos usados como control se le añadió 100 µl de solución osmótica. Los dos tubos de microcentrífuga se incubaron por 20 min en hielo y posteriormente se les añadió 400 µl de PEG-8000 (Thermo Scientific™ – USB) al 40% estéril y precalentado a 42°C. Se mezclaron suavemente por inversión y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Se tomó la mezcla de cada uno de los tubos de microcentrífuga con una pipeta y se vertió en tubos Falcón de 15 ml estéril con 10 ml de top agar (1 M sorbitol, PDB y 0.7 % agarosa), y se mezclaron por inversión suavemente. Luego, el top agar con los protoplastos a los cuales se les añadió el casete construido por PCR se vertió en cajas Petri con medio selectivo. El top agar con los protoplastos control se vertió en dos diferentes cajas Petri: en una primera caja sin higromicina B como control positivo (para visualizar la viabilidad de los protoplastos, y en una segunda caja con medio selectivo, como control negativo. Finalmente, las cajas Petri se dejaron incubando a 27°C de 4 a 6 días hasta observar el crecimiento de transformantes.

Extracción de ADN

Se inoculó 2 µl de una suspensión de conidia (1×10^8 conidia/ml) sobre una placa PDA cubierta con celofán, y se incubó durante 48 h en oscuridad. Posteriormente el micelio se recolectó con una

espátula metálica estéril y se colocó en un mortero con nitrógeno líquido (N_2). El micelio congelado se molió con el pistilo hasta obtener un polvo fino blanco. Se colocó 500 μ l de micelio pulverizado en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml previamente congelado con N_2 , y se adicionó 600 μ l de una solución amortiguadora de urea (7 M Urea, 0.35 M NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA y 1 % de N-Lauril Sarcosina). El tubo se mezcló por 2 min en vórtex y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 600 μ l de una mezcla de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (50:48:2). El tubo se agitó en vórtex por 2 min. En seguida el tubo se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. La fase acuosa fue recuperada y colocada en un nuevo tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml. Nuevamente se agregó 600 μ l de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y se siguieron los pasos subsecuentes hasta la recuperación de la fase acuosa en un nuevo tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml. En seguida, se adicionó 1 volumen de isopropanol para precipitar el ADN y se mezcló suavemente por inversión hasta observar la formación de hebras blancas. Se centrifugó el tubo a 12,000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante. Posteriormente se adicionó 500 μ l de etanol 70% y el tubo se mezcló en vórtex durante 1 min. Se centrifugó el tubo a 12,000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante. El tubo se dejó secando bocabajo bajo una toalla de papel. Después la pastilla de ADN fue resuspendida en 50 μ l de H_2O HPLC estéril. Por último, se adicionó 1 μ l de RNasa (10 mg/ml) (Invitrogen) al tubo y se incubó a 37°C por 20 min. Cuando era requerido, el ADN se cuantificó con un Nanodrop, usando el agua HPLC como blanco.

Extracción de ARN

El micelio de la cepa WT o cepas mutantes cuando fue crecido en placas de PDA, fue recolectado con una espátula estéril; cuando fue crecido en medio líquido, fue filtrado con ayuda de un embudo de plástico cubierto con tela Magitel previamente esterilizado. El micelio se colocó sobre un papel aluminio y se congeló con nitrógeno líquido (N_2). El micelio congelado fue molido con ayuda de un matraz y pistilo previamente enfriado con N_2 . Se colectó 200 μ l de micelio pulverizado y se colectó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml previamente enfriado con N_2 . Al tubo se añadió 1 ml de TRIzol® Reagent (Invitrogen) y se mezcló con ayuda de un vórtex durante 1 min, posteriormente el tubo se incubó a temperatura ambiente durante 4 min. El tubo fue centrifugado a 12,000 rpm por 1 min a 4 °C. La fase acuosa fue recuperada y se colocó en un tubo nuevo. Se añadió 200 μ l de cloroformo a 4 °C. El tubo fue mezclado en vórtex durante 1 min y se incubó a temperatura ambiente por 4 min. El tubo fue centrifugado a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y colocado en un tubo nuevo. Nuevamente se añadió 200 μ l de cloroformo a 4 °C. Se centrifugó el tubo a 12,000 por 5 min. El sobrenadante fue recuperado sin tomar el residuo del fondo y se colocó en un tubo nuevo. Se añadió 500 μ l isopropanol 100 % a 4 °C al tubo. El tubo se incubó por 10 min a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se desechó el líquido. Se añadió 1 ml de una mezcla de etanol 70 % y H_2O DEPC 30 %. El tubo se mezcló en vórtex por

1 min. El tubo se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min a 4 °C. Se desechó el líquido y el tubo se dejó secando abierto de forma invertida sobre una toalla de papel. La pastilla de ARN fue resuspendida con 20 µl de H₂O DEPC estéril y con ayuda de un vórtex. Finalmente se utilizó 2 µl de ARN para su cuantificación con el Nanodrop.

Como nota, el dietil pirocarbonato (DEPC) se utiliza para inactivar enzimas RNasas. Se prepara al menos un día antes. Se utiliza 1 ml de DEPC por 1 l de H₂O, se deja reposar por al menos 2 h y se esteriliza.

Análisis de conidiación inducida por luz y daño

Discos de micelio de la cepa WT y cepas mutantes se inocularon sobre placas de PDA, y se incubaron en oscuridad por 40 h a 27 °C en condiciones de oscuridad. Para analizar conidiación estimulada por luz, los cultivos fueron expuestos a la luz azul por 5 min (152.4 µmol m⁻²) y se incubaron nuevamente por 48 h a 27 °C en oscuridad. Para analizar conidiación estimulada por un daño mecánico, en un cuarto oscuro con la ayuda de un foco rojo de seguridad, las colonias crecidas en oscuridad por 40 h fueron cortadas con un bisturí esterilizado para inducir a la conidiación, y se incubaron nuevamente por 48 h a 27 °C en oscuridad.

Anexo 2. Lista de oligonucleótidos utilizados para la construcción de casetes

Proteína	Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos 5' -> 3'	Fragmento amplificado
Pyr4 (EHK48963.1)	smPyr4-F	CTC CCT ACG CTC TCC GCC ACC ACC AAT CGA TCT TTA TCC G	Marco de lectura del gen <i>pyr4</i>
	smPyr4-R	CTC CAG CCT CTT CCA GCT CCG CAA CTT CTT TTT TTC TTA TCG CAG C	
	pyr4-F	GAC GAC GCA TCC TCT AAC CTC	
	pyr4-R	GAC GCC TTG CCC GGT ACC	
Tmk3 (EHK43400.1)	Ptmk3-F	GCT GGT GCC CTC TTG TTC TC	Región 5' del gen <i>tmk3</i>
	PQtmk3-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG ATT CGC GGG GAA ATA ACG ACG	
	TQtmk3-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAG AGA GTA GAG GTG CAG AAT TCG	Región 3' del gen <i>tmk3</i>
	Ttmk3-R	CTA CAG GTC GTC TCC ACA GC	
	N5tmk3-F	CTC TTG TGC TCC GAC GAA ACC	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>tmk3</i>
	N3tmk3-R	CGT CCA CCT CCA AAT CAT GGC	
	tmk3-F	GTT TGG TCT TGT CTG CTC TGC G	Marco de lectura del gen <i>tmk3</i>
	tmk3-R	GCA GGT CGG TTC CGA GAA GC	
Pbs2 (EHK47459.1)	Ppbs2-F	CAG TGC GCT GGC TCC AGC	Región 5' del gen <i>pbs2</i>
	PQpbs2-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG AGG TGG GGT TTT CGG ATG CTT C	
	TQpbs2-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GCA GAA GAA AAG CAT AGA GCG G	Región 3' del gen <i>pbs2</i>
	Tpbs2-R	CGC GAA CCT ACC GGA AGC C	
	N5pbs2-F	TCA CGA CAG ACG AGT CTT GCC	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>pbs2</i>
	N3pbs2-R	TGA AAG AGG TAA TGG CAG TAT TCG G	
	pbs2-F	GTC ACG ATG AGC GGC ACC G	Marco de lectura del gen <i>pbs2</i>
	pbs2-R	AAG CTT GGT GCC CCT CAC TGG CTG	
Blr1 (EHK39879.1)	Pblr1-F	GTT AGT TAG AGG ACG AAA GGC AG	Región 5' del gen <i>blr1</i>
	PQblr1-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG AGT CGG AGA GGG AGA GGG C	
	TQblr1-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAC GAG AAG AGC GAG AAA GTA GC	Región 3' del gen <i>blr1</i>
	Tblr1-R	CCG AGA CGC TGC GAT GGC	
	N5blr1-F	GTA GGC CTT CAA GAC CGT GC	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>blr1</i>
	N3blr1-R	TCG GTC CAT TCA CAA AAG CTC C	
Blr2 (EHK40294.1)	Pblr2-F	GAA ACG CCG GTC AGC AGG C	Región 5' del gen <i>blr2</i>
	PQblr2-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG AGC AGA CGA TGG CAC TGG AG GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAC AAG GAA AGA GAG GAA GAA CGG	
	TQblr2-F	GGA TTA TGC AGC TGA GGT TAT GG	Región 3' del gen <i>blr2</i>
	Tblr2-R		
	N5blr2-F	GTA CCT GTT TGG CGA TGC TAC G	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>blr2</i>
	N3blr2-R	GCA TCC GAG GCA AAT TGA GCG	
	blr2-F	ACC GCA GCC CTA CCC TCA TC	

	blr2-R	CAC CGC AAC CCG CAG GC	Marco de lectura del gen <i>blr2</i>
Hk1a Ta_32890 Clase I (EHK43602.1)	Phk1a-F	GTA CTA TGG CTC GTG GTG GC	Región 5' del gen <i>hk1a</i>
	pPQhk1a-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG ATG CGG TGA TGG TGT TGT GTG G	
	pTQhk1a-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAC CAA GAA TGG CAC ACA CCT TGC	
	Thk1a-R	AGA GCA AGC AAT GAA CCA TGC C	Región 3' del gen <i>hk1a</i>
	N5hk1a-F	GGT CTT ACC AGC ACC GGT GG	
	N3hk1a-R	GAA AGA CCT GCC ATG CGC TC	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>hk1a</i>
	Rt.hk1a-F	TCC GTG CGT TGT CCT GTG C	Marco de lectura del gen <i>hk1a</i>
	Rt.hk1a-R	GAA ACT CAG GCT CAG GCG TG	
Hk1b Ta_49350 Clase I (EHK49368.1)	Phk1b-F	GCG ACG ATG CCC GAA GGC	Región 5' del gen <i>hk1b</i>
	pPQhk1b-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG AGA CTC GGA CAC CAG CCT G	
	pTQhk1b-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAG CAG GAG GCG TTT GGT AGC	
	Thk1b-R	CCC AAG AGT AGC GCT GGA G	Región 3' del gen <i>hk1b</i>
	N5hk1b-F	GAG CTT TGG AGA AGG CTG AGC	
	N3hk1b-R	GTG ACA GAG GGC GGA GGG	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>hk1b</i>
	Rt.hk1b-F	CAT CTC GAG GCG CAG AGG C	Marco de lectura del gen <i>hk1b</i>
	Rt.hk1b-R	GAC GGA GAA TGT ACG CTG ATC G	
Hk2a Ta_128614 Clase II (EHK46538.1)	Phk2a-F	GCG CGT ATG TTG CTA GCT CC	Región 5' del gen <i>hk2a</i>
	pPQhk2a-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG AGT GGA GAA GAG CTG GTG TGG	
	pTQhk2a-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAT GCG GCA GAT GCA CAC CAA C	
	Thk2a-R	GAT ACC TTG AGT GCC GCA GC	Región 3' del gen <i>hk2a</i>
	N5hk2a-F	GCT CCT CTG TTG GCT TTG GC	
	N3hk2a-R	CGA TTG GTT TCC ACG GCT GC	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>hk2a</i>
	Rt.hk2a-F	GTC ATC ATT GGC ATT CAA GAC CTC	Marco de lectura del gen <i>hk2a</i>
	Rt.hk2a-R	CAG CAT ATG CAA GGA GTC CAG C	
Hk2b Ta_133533 Clase II (EHK46538.1)	Phk2b-F	CAG AGC GGA AAC TGT GAC TGC	Región 5' del gen <i>hk2b</i>
	pPQhk2b-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG AGT AGA AAA CTG GAG CCT GTG TG	
	pTQhk2b-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAC AAG TCG ATC GCG GCT CTC	
	Thk2b-R	GCT GGC GGG CTT CCC TTG	Región 3' del gen <i>hk2b</i>
	N5hk2b-F	CAT GCA GTG ATC AGA GCG AAG	
	N3hk2b-R	GCT AGC ATA GAG CCG AAT CAG	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>hk2b</i>
	Rt.hk2b-F	TGC GCC CAT ACG GTG ACA C	Marco de lectura del gen <i>hk2b</i>
	Rt.hk2b-R	GTG GTT GAC TGG TTG CTG AGG	
Hk4 Ta_88129 Clase IV (EHK44956.1)	Phk4-F	GAG GGG TTG CAG ATG GTC TCT C	Región 5' del gen <i>hk4</i>
	pPQhk4-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG ATT AGC GGC CCT GCT GGC ATC	
	pTQhk4-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAG AGG AGA CAG TGA AAC CTG CC	
	Thk4-R	CAC CCA ATC ACA CCC GCA GAC	Región 3' del gen <i>hk4</i>
	N5hk4-F	CGA AGG ATT GTA CGA CAC GTA GG	
	N3hk4-R	CAC CTC GTA GCC ACC CAC C	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>hk4</i>
	Rt.hk4-F	CGC TGC GGT GTC CCT TAC G	

	Rt.hk4-R	CGA CGC CCT GCG ACA CTC	Marco de lectura del gen <i>hk4</i>
Hk5 Ta_32149 Clase V (EHK42346.1)	Phk5-F	CTG CTC TCA CTC ACT CGC TG	Región 5' del gen <i>hk5</i>
	pPQhk5-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG AAG AGA CCG AGT CCT CAG GG	
	pTQhk5-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAG GCT GGA TGG AAC CCG AAG	Región 3' del gen <i>hk5</i>
	Thk5-R	CGT TGG GCT GCA CTG AGT TTG	
	N5hk5-F	GTG TGA GGA GGC CCT ACG G	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>hk5</i>
	N3hk5-R	GGA CTG GAT GAC GCC GGT TAC	
	Rt.hk5-F	CTA CCG AAT TCT CCT GGT GGA AG	Marco de lectura del gen <i>hk5</i>
	Rt.hk5-R	GGC AGG CCT GGT AGC CAT C	
Sln1 Ta_158454 Clase VI (EHK50841.1)	Psln1-F	GTC AAC GGT GAG GCC GTC TG	Región 5' del gen <i>sln1</i>
	pPQsln1-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG AGG CGT GGC ATA CTG CGA G	
	pTQsln1-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAG CCA TTT GTG CAA GGC GAC C	Región 3' del gen <i>sln1</i>
	Tsln1-R	CGT TAC GGT CAG GCC AAG GG	
	N5sln1-F	CGA GAT CTC ATC CAA GTG GCT C	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>sln1</i>
	N3sln1-R	GTC TGC GGT ACA CAG TTA TAC AAG	
	Rt.sln1-F	GAG GCT GCC AAC GAG AGC	Marco de lectura del gen <i>sln1</i>
	Rt.sln1-R	CTT CAA GGC TGA CAT GCT GGC	
Hk9 Ta_152868 Clase IX	Phhk3-F	CCA GCC GGT ACG AGT ACG AG	Región 5' del gen <i>hk9</i>
	pPQhk9-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG ACC GGT GGG AGG GCA GC	
	pTQhk9-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAG TCT GGA GCA GGA GAG GC	Región 3' del gen <i>hk9</i>
	Thk9-R	ACG TCC GAA CTT GCT CCA GG	
	N5hk9-F	GTC GCC TCA CTC CCA TCT CC	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>hk9</i>
	N3hk9-R	GGC AGT GGC TGT CCT GTG G	
	Rt.hk9-F	GCA GTT GAC GAG CGC TTC AC	Marco de lectura del gen <i>hk9</i>
	Rt.hk9-R	TGC CAT TCC AAG TCG CTG AGA C	
Hk10 Ta_286374 Clase X (EHK40776.1)	Phk10-F	GAT TGA CGT GGT GTG GGC TCG	Región 5' del gen <i>hk10</i>
	pPQhk10-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG AGG AGG AGT TGC GGT AGG GG	
	pTQhk10-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAG CTT GGT GAT TAG GGG ACT CG	Región 3' del gen <i>hk10</i>
	Thk10-R	GAA GGG GAA ACA CTA ATG CAG AGC	
	N5hk10-F	TCA GGC GAG GAG GCG TCA TAC	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>hk10</i>
	N3hk10-R	GCG TAC TCT AGC GTC CAT CAC	
	Rt.hk10-F	CAC TTC ATC ATA TCG CAG ACG C	Marco de lectura del gen <i>hk10</i>
	Rt.hk10-R	CTC GAC TTC ATC AGA CCA CGG	
Hk11 Ta_296396 Clase XI (EHK40433.1)	Phk11-F	CCG AGG CAT CCA CAT CCA TCC	Región 5' del gen <i>hk11</i>
	pPQhk11-R	GGT GGT GGC GGA GAG CGT AGG GAG AGT GGC GGA CGG GTC TAG G	
	pTQhk11-F	GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAG CGA CAC GTG AAG GCG ATG	Región 3' del gen <i>hk11</i>
	Thk11-R	GAC CGC AGA TTG CTG AAT ACA AG	
	N5hk11-F	TGT GGT TCC TCC TTC AGC TGC	Oligonucleótidos anidados para el gen <i>hk11</i>
	N3hk11-R	CAA CGC ACA GCT CGC AAT CC	
	Rt.hk11-F	CCG TCT TCC GTG TCG TCC TC	Marco de lectura del gen <i>hk11</i>
	Rt.hk11-R	CAT CGC TTA GCA TTT CCA GTC TC	

PCR	Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos 5' -> 3'	Fragmento amplificado
1	5N5tmk3-F	CTG AAT TTT TGC GCT CGA CCG	Tmk3-GA5
	Tmk3-GA5-R	ACC AGC ACC AGC ACC AGC ACC GAA TTG TTG GTC TTC CAT TTG GGG	
	GA5-mcherry-F	GGT GCT GGT GCT GGT GCT GGT GCT GGT GCC ATC ATC AAG GAG TTC ATG C	
	3mcherry-R	GAA GGG CGT ACT AGG GTT GC	GA5-mCherry
	5hph-F	CAT CGA ACT GGA TCT CAA CAG C	
	Hyg-R	CTA TTC CTT TGC CCT CGG ACG GCG GAG CTG GAA GAG GCT GGA GAG AGA GTA GAG GTG CAG AAT TCG	hph
	TQtmk3-F		
	Ttmk3-R	CTA CAG GTC GTC TCC ACA GC	Terminador de Tmk3
3	6N5tmk3-F	GCA TCA GCA CAA CAT CAA CCT TG	Tmk3-Ga5-mCherry-hph
	mCherry-hph-R	TGC TCC TTC AAT ATC AGT TAA CGT CGA TCA GGG CGT ACT AGG GTT GCG	
	Hyg-F	GAT CGA CGT TAA CTG ATA TTG AAG GAG	
	1N3tmk3-R	CGT CCA CCT CCA AAT CAT GGC	hph-Terminador de Tmk3
5	kiTmk3-F	CTT GAT GCT AAC GGC TCT CGC	Casete knock-in
	2N3tmk3-R	CCA TCA TTT GGA ATA CTC CAT CAG C	
	Ptmk3-F	GCT GGT GCC CTC TTG TTC TC	Gen <i>tmk3</i>
	Ttmk3-R	CTA CAG GTC GTC TCC ACA GC	

Anexo 3. Lista de oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión de genes

Gen	Oligonucleótido	Secuencia de nucleótidos 5' → 3'	Número de ciclos
<i>gpd</i> (EHK49005.1)	gpd-F	GCC GAT GGT GAG CTC AAG GG	26
	gpd-R	GGT CGA GGA CAC GGC GGG A	
<i>os1</i> (EHK40885.1)	1os1-F	CGA ATG TCG AGG GCA AGT GG	35
	3os1-R	GTG AAG TCG CCG TCT GTA GC	
<i>tmk3</i> (EHK43400.1)	tmk3-F	GTT TGG TCT TGT CTG CTC TGC G	35
	tmk3-R	GCA GGT CGG TTC CGA GAA GC	
Genes de respuesta a luz azul			
<i>blu1</i> (EHK44319.1)	qblu1-F	CGT TGG CTC TCG CCT GAC C	27
	blu1-R	GAA CGC CAT TGA AGG CCT CG	
<i>grg2</i> (EHK50625.1)	grg2-F	GAT TCC ATC AAG CAG GGT GCC	27
	grg2-R	GTT TAG ATA GCC TGC TTG TGG G	
<i>env1</i> (EHK44161.1)	env1-F	GCC AAA ATG GTT CCT TCA GGG TC	27
	env1-R	GTT TGG TCG AGA CAC AAG TCG G	
<i>frq</i> (EHK43939.1)	frq-F	GAA ACC GGC CAG AGC GAC	31
	frq-R	CGT TGG AGG CAC GGC TG	
<i>cry</i> (EHK43749.1)	cry-F	GAG CCG GAG GTT CTC TGG C	31
	cry-R	GCT TGG GGA AGA GAG TCT GC	
Genes implicados en el remodelado de la pared celular			
<i>chs1</i> (EHK39721.1)	chs1-F	CCT CAG GCA GTA GCT ACC AC	40
	chs1-R	CGT GGA CAG TGG AGG CAG G	
<i>chs2</i> (EHK46279.1)	chs2-F	CTG ACG TTC CCG ACA CTG TTC C	40
	chs2-R	TGC CAG TCC ACC AGC GAC G	
<i>chs3</i> (EHK39554.1)	chs3-F	GAT TCG CGC CAA CCA TGT CG	35
	chs3-R	GTA GGA TAA AGC ATC AAC CGA GG	
<i>chs4</i> (EHK40657.1)	chs4-F	GTC CGC GAT CTC TGT GGC AC	38
	chs4-R	ACC AAG AGT GTG CGG TGA CG	
<i>chs5</i> (EHK48324.1)	chs5-F	CCG TGC ATG GCT AAG ACT TGG	31
	chs5-R	GAG TCG GGT GTG TAG ATG CAG	
<i>chs6</i> (EHK48325.1)	chs6-F	TCA TCA CAG CCG CAC CAG C	31
	chs6-R	GAG TCG ATT GAT GCA GAG AAC C	
<i>chs7</i> (EHK48360.1)	chs7-F	GTT CGA CTG GGT CAG AAT GGC	40
	chs7-R	CCA TTG GAG AAC TGA GAC GAC G	
<i>chs8</i> (EHK41601.1)	chs8-F	TCT TCG GAA ATG TCT CGC ACC	40
	chs8-R	CGG AGC CTT GCC TCT TCC	
<i>fks1</i> (EHK39881.1)	fks1-F	CTC TTC TGG TTA TTG CCC AGT C	31
	fks1-R	GTT GCT TGG TTG TAA CAG TCG G	

Anexo 4. Secuenciación de la región codificante de *pyr4* de la cepa WT y mutantes Ura⁻.

Los oligonucleótidos smPyr4-F y smPyr4-R fueron usados para amplificar un fragmento de 1.6 kb del ORF de *pyr4*. Los amplicones fueron purificados y secuenciados. Las secuencias fueron alineadas usando el programa MegAlign (version 7.1.0) por el método Clustal V.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
WT	ATGGCATCACCCGACCTTCAAGACGACCTTCGCCGCGAGGAGCGAGGCGACGACGATCCTCTAACTCTTATCTGCTCAGGCTCATGGACCTCAAGGCATCCAACTCTGCTTGAGC											
Ura-1	ATGGCATCACCCGACCTTCAAGACGACCTTCGCCGCGAGGAGCGAGGCGACGACGATCCTCTAACTCTTATCTGCTCAGGCTCATGGACCTCAAGGCATCCAACTCTGCTTGAGC											
Ura-2	ATGGCATCACCCGACCTTCAAGACGACCTTCGCCGCGAGGAGCGAGGCGACGACGATCCTCTAACTCTTATCTGCTCAGGCTCATGGACCTCAAGGCATCCAACTCTGCTTGAGC											
Ura-3	ATGGCATCACCCGACCTTCAAGACGACCTTCGCCGCGAGGAGCGAGGCGACGACGATCCTCTAACTCTTATCTGCTCAGGCTCATGGACCTCAAGGCATCCAACTCTGCTTGAGC											
Ura-4	ATGGCATCACCCGACCTTCAAGACGACCTTCGCCGCGAGGAGCGAGGCGACGACGATCCTCTAACTCTTATCTGCTCAGGCTCATGGACCTCAAGGCATCCAACTCTGCTTGAGC											
Ura-5	ATGGCATCACCCGACCTTCAAGACGACCTTCGCCGCGAGGAGCGAGGCGACGACGATCCTCTAACTCTTATCTGCTCAGGCTCATGGACCTCAAGGCATCCAACTCTGCTTGAGC											
Ura-6	ATGGCATCACCCGACCTTCAAGACGACCTTCGCCGCGAGGAGCGAGGCGACGACGATCCTCTAACTCTTATCTGCTCAGGCTCATGGACCTCAAGGCATCCAACTCTGCTTGAGC											
Ura-7	ATGGCATCACCCGACCTTCAAGACGACCTTCGCCGCGAGGAGCGAGGCGACGACGATCCTCTAACTCTTATCTGCTCAGGCTCATGGACCTCAAGGCATCCAACTCTGCTTGAGC											
Ura-9	ATGGCATCACCCGACCTTCAAGACGACCTTCGCCGCGAGGAGCGAGGCGACGACGATCCTCTAACTCTTATCTGCTCAGGCTCATGGACCTCAAGGCATCCAACTCTGCTTGAGC											
Ura-10	ATGGCATCACCCGACCTTCAAGACGACCTTCGCCGCGAGGAGCGAGGCGACGACGATCCTCTAACTCTTATCTGCTCAGGCTCATGGACCTCAAGGCATCCAACTCTGCTTGAGC											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
WT	GCCGACGTGCCACGCGCGAGAGCTCTTTACCTTGTCTGACAAATCGGCCCTCCATCGTTGTGCTCAAGACACACTACGACATGGTTTCTGGGTGGGATTTCCACCGCGACACTGGC											
Ura-1	GCCGACGTGCCACGCGCGCGAGAGCTCTTTACCTTGTCTGACAAATCGGCCCTCCATCGTTGTGCTCAAGACACACTACGACATGGTTTCTGGGTGGGATTTCCACCGCGACACTGGC											
Ura-2	GCCGACGTGCCACGCGCGCGAGAGCTCTTTACCTTGTCTGACAAATCGGCCCTCCATCGTTGTGCTCAAGACACACTACGACATGGTTTCTGGGTGGGATTTCCACCGCGACACTGGC											
Ura-3	GCCGACGTGCCACGCGCGCGAGAGCTCTTTACCTTGTCTGACAAATCGGCCCTCCATCGTTGTGCTCAAGACACACTACGACATGGTTTCTGGGTGGGATTTCCACCGCGACACTGGC											
Ura-4	GCCGACGTGCCACGCGCGCGAGAGCTCTTTACCTTGTCTGACAAATCGGCCCTCCATCGTTGTGCTCAAGACACACTACGACATGGTTTCTGGGTGGGATTTCCACCGCGACACTGGC											
Ura-5	GCCGACGTGCCACGCGCGCGAGAGCTCTTTACCTTGTCTGACAAATCGGCCCTCCATCGTTGTGCTCAAGACACACTACGACATGGTTTCTGGGTGGGATTTCCACCGCGACACTGGC											
Ura-6	GCCGACGTGCCACGCGCGCGAGAGCTCTTTACCTTGTCTGACAAATCGGCCCTCCATCGTTGTGCTCAAGACACACTACGACATGGTTTCTGGGTGGGATTTCCACCGCGACACTGGC											
Ura-7	GCCGACGTGCCACGCGCGCGAGAGCTCTTTACCTTGTCTGACAAATCGGCCCTCCATCGTTGTGCTCAAGACACACTACGACATGGTTTCTGGGTGGGATTTCCACCGCGACACTGGC											
Ura-9	GCCGACGTGCCACGCGCGCGAGAGCTCTTTACCTTGTCTGACAAATCGGCCCTCCATCGTTGTGCTCAAGACACACTACGACATGGTTTCTGGGTGGGATTTCCACCGCGACACTGGC											
Ura-10	GCCGACGTGCCACGCGCGCGAGAGCTCTTTACCTTGTCTGACAAATCGGCCCTCCATCGTTGTGCTCAAGACACACTACGACATGGTTTCTGGGTGGGATTTCCACCGCGACACTGGC											
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
WT	ACTGGCGCCAAAGCTGGCTCGCTGGCCGGAAGACAGGCTTCTCATTTTGAAGACCGCAAGTTTCGGGGACATTTGGCCACACAGTTGAGCTGCAGTACACAGCGGCTCGCGCGCATC											
Ura-1	ACTGGCGCCAAAGCTGGCTCGCTGGCCGGAAGACAGGCTTCTCATTTTGAAGACCGCAAGTTTCGGGGACATTTGGCCACACAGTTGAGCTGCAGTACACAGCGGCTCGCGCGCATC											
Ura-2	ACTGGCGCCAAAGCTGGCTCGCTGGCCGGAAGACAGGCTTCTCATTTTGAAGACCGCAAGTTTCGGGGACATTTGGCCACACAGTTGAGCTGCAGTACACAGCGGCTCGCGCGCATC											
Ura-3	ACTGGCGCCAAAGCTGGCTCGCTGGCCGGAAGACAGGCTTCTCATTTTGAAGACCGCAAGTTTCGGGGACATTTGGCCACACAGTTGAGCTGCAGTACACAGCGGCTCGCGCGCATC											
Ura-4	ACTGGCGCCAAAGCTGGCTCGCTGGCCGGAAGACAGGCTTCTCATTTTGAAGACCGCAAGTTTCGGGGACATTTGGCCACACAGTTGAGCTGCAGTACACAGCGGCTCGCGCGCATC											
Ura-5	ACTGGCGCCAAAGCTGGCTCGCTGGCCGGAAGACAGGCTTCTCATTTTGAAGACCGCAAGTTTCGGGGACATTTGGCCACACAGTTGAGCTGCAGTACACAGCGGCTCGCGCGCATC											
Ura-6	ACTGGCGCCAAAGCTGGCTCGCTGGCCGGAAGACAGGCTTCTCATTTTGAAGACCGCAAGTTTCGGGGACATTTGGCCACACAGTTGAGCTGCAGTACACAGCGGCTCGCGCGCATC											
Ura-7	ACTGGCGCCAAAGCTGGCTCGCTGGCCGGAAGACAGGCTTCTCATTTTGAAGACCGCAAGTTTCGGGGACATTTGGCCACACAGTTGAGCTGCAGTACACAGCGGCTCGCGCGCATC											
Ura-9	ACTGGCGCCAAAGCTGGCTCGCTGGCCGGAAGACAGGCTTCTCATTTTGAAGACCGCAAGTTTCGGGGACATTTGGCCACACAGTTGAGCTGCAGTACACAGCGGCTCGCGCGCATC											
Ura-10	ACTGGCGCCAAAGCTGGCTCGCTGGCCGGAAGACAGGCTTCTCATTTTGAAGACCGCAAGTTTCGGGGACATTTGGCCACACAGTTGAGCTGCAGTACACAGCGGCTCGCGCGCATC											
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
WT	ATCGACTGGGCGCAGATTGTCAACGTCAACATGGTACCGGGCAAGCGCTGTGTGGCTCTCTGGCCCAAGGTTGCCAGGCGATGGCTGGAGCGTTATCCGTGCGAGGTCGAAGACATCCGTC											
Ura-1	ATCGACTGGGCGCAGATTGTCAACGTCAACATGGTACCGGGCAAGCGCTGTGTGGCTCTCTGGCCCAAGGTTGCCAGGCGATGGCTGGAGCGTTATCCGTGCGAGGTCGAAGACATCCGTC											
Ura-2	ATCGACTGGGCGCAGATTGTCAACGTCAACATGGTACCGGGCAAGCGCTGTGTGGCTCTCTGGCCCAAGGTTGCCAGGCGATGGCTGGAGCGTTATCCGTGCGAGGTCGAAGACATCCGTC											
Ura-3	ATCGACTGGGCGCAGATTGTCAACGTCAACATGGTACCGGGCAAGCGCTGTGTGGCTCTCTGGCCCAAGGTTGCCAGGCGATGGCTGGAGCGTTATCCGTGCGAGGTCGAAGACATCCGTC											
Ura-4	ATCGACTGGGCGCAGATTGTCAACGTCAACATGGTACCGGGCAAGCGCTGTGTGGCTCTCTGGCCCAAGGTTGCCAGGCGATGGCTGGAGCGTTATCCGTGCGAGGTCGAAGACATCCGTC											
Ura-5	ATCGACTGGGCGCAGATTGTCAACGTCAACATGGTACCGGGCAAGCGCTGTGTGGCTCTCTGGCCCAAGGTTGCCAGGCGATGGCTGGAGCGTTATCCGTGCGAGGTCGAAGACATCCGTC											
Ura-6	ATCGACTGGGCGCAGATTGTCAACGTCAACATGGTACCGGGCAAGCGCTGTGTGGCTCTCTGGCCCAAGGTTGCCAGGCGATGGCTGGAGCGTTATCCGTGCGAGGTCGAAGACATCCGTC											
Ura-7	ATCGACTGGGCGCAGATTGTCAACGTCAACATGGTACCGGGCAAGCGCTGTGTGGCTCTCTGGCCCAAGGTTGCCAGGCGATGGCTGGAGCGTTATCCGTGCGAGGTCGAAGACATCCGTC											
Ura-9	ATCGACTGGGCGCAGATTGTCAACGTCAACATGGTACCGGGCAAGCGCTGTGTGGCTCTCTGGCCCAAGGTTGCCAGGCGATGGCTGGAGCGTTATCCGTGCGAGGTCGAAGACATCCGTC											
Ura-10	ATCGACTGGGCGCAGATTGTCAACGTCAACATGGTACCGGGCAAGCGCTGTGTGGCTCTCTGGCCCAAGGTTGCCAGGCGATGGCTGGAGCGTTATCCGTGCGAGGTCGAAGACATCCGTC											
	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
WT	ACTGTTGGAAACCCCTACCATGGACAGTTTGGACGATGCGGAAGATGCCAAGATGATGAGCGCTGTTACGGTCAACGGCAATGGATCCACATGATGGAGAGGCTATATACGCCGGCCGC											
Ura-1	ACTGTTGGAAACCCCTACCATGGACAGTTTGGACGATGCGGAAGATGCCAAGATGATGAGCGCTGTTACGGTCAACGGCAATGGATCCACATGATGGAGAGGCTATATACGCCGGCCGC											
Ura-2	ACTGTTGGAAACCCCTACCATGGACAGTTTGGACGATGCGGAAGATGCCAAGATGATGAGCGCTGTTACGGTCAACGGCAATGGATCCACATGATGGAGAGGCTATATACGCCGGCCGC											
Ura-3	ACTGTTGGAAACCCCTACCATGGACAGTTTGGACGATGCGGAAGATGCCAAGATGATGAGCGCTGTTACGGTCAACGGCAATGGATCCACATGATGGAGAGGCTATATACGCCGGCCGC											
Ura-4	ACTGTTGGAAACCCCTACCATGGACAGTTTGGACGATGCGGAAGATGCCAAGATGATGAGCGCTGTTACGGTCAACGGCAATGGATCCACATGATGGAGAGGCTATATACGCCGGCCGC											
Ura-5	ACTGTTGGAAACCCCTACCATGGACAGTTTGGACGATGCGGAAGATGCCAAGATGATGAGCGCTGTTACGGTCAACGGCAATGGATCCACATGATGGAGAGGCTATATACGCCGGCCGC											
Ura-6	ACTGTTGGAAACCCCTACCATGGACAGTTTGGACGATGCGGAAGATGCCAAGATGATGAGCGCTGTTACGGTCAACGGCAATGGATCCACATGATGGAGAGGCTATATACGCCGGCCGC											
Ura-7	ACTGTTGGAAACCCCTACCATGGACAGTTTGGACGATGCGGAAGATGCCAAGATGATGAGCGCTGTTACGGTCAACGGCAATGGATCCACATGATGGAGAGGCTATATACGCCGGCCGC											
Ura-9	ACTGTTGGAAACCCCTACCATGGACAGTTTGGACGATGCGGAAGATGCCAAGATGATGAGCGCTGTTACGGTCAACGGCAATGGATCCACATGATGGAGAGGCTATATACGCCGGCCGC											
Ura-10	ACTGTTGGAAACCCCTACCATGGACAGTTTGGACGATGCGGAAGATGCCAAGATGATGAGCGCTGTTACGGTCAACGGCAATGGATCCACATGATGGAGAGGCTATATACGCCGGCCGC											
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720
WT	AATGGCGACGCGCGCAAGGGAAGCATCGTTTCCATCACTACTGTTACTCAGCAGTACGAATCCCGCGCTCGCCGCGACTAGGAAAGACAATCGCAGAGGAGATGAGTCACTATTTC											
Ura-1	AATGGCGACGCGCGCAAGGGAAGCATCGTTTCCATCACTACTGTTACTCAGCAGTACGAATCCCGCGCTCGCCGCGACTAGGAAAGACAATCGCAGAGGAGATGAGTCACTATTTC											
Ura-2	AATGGCGACGCGCGCAAGGGAAGCATCGTTTCCATCACTACTGTTACTCAGCAGTACGAATCCCGCGCTCGCCGCGACTAGGAAAGACAATCGCAGAGGAGATGAGTCACTATTTC											
Ura-3	AATGGCGACGCGCGCAAGGGAAGCATCGTTTCCATCACTACTGTTACTCAGCAGTACGAATCCCGCGCTCGCCGCGACTAGGAAAGACAATCGCAGAGGAGATGAGTCACTATTTC											
Ura-4	AATGGCGACGCGCGCAAGGGAAGCATCGTTTCCATCACTACTGTTACTCAGCAGTACGAATCCCGCGCTCGCCGCGACTAGGAAAGACAATCGCAGAGGAGATGAGTCACTATTTC											
Ura-5	AATGGCGACGCGCGCAAGGGAAGCATCGTTTCCATCACTACTGTTACTCAGCAGTACGAATCCCGCGCTCGCCGCGACTAGGAAAGACAATCGCAGAGGAGATGAGTCACTATTTC											
Ura-6	AATGGCGACGCGCGCAAGGGAAGCATCGTTTCCATCACTACTGTTACTCAGCAGTACGAATCCCGCGCTCGCCGCGACTAGGAAAGACAATCGCAGAGGAGATGAGTCACTATTTC											
Ura-7	AATGGCGACGCGCGCAAGGGAAGCATCGTTTCCATCACTACTGTTACTCAGCAGTACGAATCCCGCGCTCGCCGCGACTAGGAAAGACAATCGCAGAGGAGATGAGTCACTATTTC											
Ura-9	AATGGCGACGCGCGCAAGGGAAGCATCGTTTCCATCACTACTGTTACTCAGCAGTACGAATCCCGCGCTCGCCGCGACTAGGAAAGACAATCGCAGAGGAGATGAGTCACTATTTC											
Ura-10	AATGGCGACGCGCGCAAGGGAAGCATCGTTTCCATCACTACTGTTACTCAGCAGTACGAATCCCGCGCTCGCCGCGACTAGGAAAGACAATCGCAGAGGAGATGAGTCACTATTTC											
	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840
WT	GGAAATCGAAGAGGCGCGCTGAACCGTGGTCTCTCATCTCGCCAGATGTCACGGAAGGCAACTTTATGACTGGGGAATACACCAAGCTTTCGCTGAGGCGAGCTCGGGAACACAAG											
Ura-1	GGAAATCGAAGAGGCGCGCTGAACCGTGGTCTCTCATCTCGCCAGATGTCACGGAAGGCAACTTTATGACTGGGGAATACACCAAGCTTTCGCTGAGGCGAGCTCGGGAACACAAG											
Ura-2	GGAAATCGAAGAGGCGCGCTGAACCGTGGTCTCTCATCTCGCCAGATGTCACGGAAGGCAACTTTATGACTGGGGAATACACCAAGCTTTCGCTGAGGCGAGCTCGGGAACACAAG											
Ura-3	GGAAATCGAAGAGGCGCGCTGAACCGTGGTCTCTCATCTCGCCAGATGTCACGGAAGGCAACTTTATGACTGGGGAATACACCAAGCTTTCGCTGAGGCGAGCTCGGGAACACAAG											
Ura-4	GGAAATCGAAGAGGCGCGCTGAACCGTGGTCTCTCATCTCGCCAGATGTCACGGAAGGCAACTTTATGACTGGGGAATACACCAAGCTTTCGCTGAGGCGAGCTCGGGAACACAAG											
Ura-5	GGAAATCGAAGAGGCGCGCTGAACCGTGGTCTCTCATCTCGCCAGATGTCACGGAAGGCAACTTTATGACTGGGGAATACACCAAGCTTTCGCTGAGGCGAGCTCGGGAACACAAG											
Ura-6	GGAAATCGAAGAGGCGCGCTGAACCGTGGTCTCTCATCTCGCCAGATGTCACGGAAGGCAACTTTATGACTGGGGAATACACCAAGCTTTCGCTGAGGCGAGCTCGGGAACACAAG											
Ura-7	GGAAATCGAAGAGGCGCGCTGAACCGTGGTCTCTCATCTCGCCAGATGTCACGGAAGGCAACTTTATGACTGGGGAATACACCAAGCTTTCGCTGAGGCGAGCTCGGGAACACAAG											
Ura-9	GGAAATCGAAGAGGCGCGCTGAACCGTGGTCTCTCATCTCGCCAGATGTCACGGAAGGCAACTTTATGACTGGGGAATACACCAAGCTTTCGCTGAGGCGAGCTCGGGAACACAAG											
Ura-10	GGAAATCGAAGAGGCGCGCTGAACCGTGGTCTCTCATCTCGCCAGATGTCACGGAAGGCAACTTTATGACTGGGGAATACACCAAGCTTTCGCTGAGGCGAGCTCGGGAACACAAG											

[illegible]