

Rosa Cecilia  
Gómez May

Participación de la MAPKKK Ssk2 y los reguladores de respuesta  
Ssk1 y Skn7 en las respuestas al estrés regulado a través de la  
MAPK Tmk3 en *Trichoderma atroviride*

2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS  
NATURALES

**Participación de la MAPKKK Ssk2 y los reguladores de  
respuesta Ssk1 y Skn7 en las respuestas al estrés regulado  
a través de la MAPK Tmk3 en *Trichoderma atroviride***

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER  
EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA

ROSA CECILIA GÓMEZ MAY

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

NOVIEMBRE, 2018.



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Maestría en Ciencias Biológicas**

**Participación de la MAPKKK Ssk2 y los reguladores de respuesta Ssk1 y Skn7 en las respuestas al estrés regulado a través de la MAPK Tmk3 en *Trichoderma atroviride***

Opción de titulación

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Biológicas

**Presenta:**

Rosa Cecilia Gómez May

**Dirigido por:**

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

**SINODALES**

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo  
**Presidente**

Esquivel Naranjo Edgardo U.  
Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez  
**Secretario**

[Firma]  
Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime  
**Vocal**

[Firma]  
Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal  
**Suplente**

[Firma]  
Firma

Dr. Alfredo Herrera Estrella  
**Suplente**

[Firma]  
Firma

[Firma]  
Dra. Juana Elizabeth Elton Puente  
**Directora de la Facultad**

[Firma]  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
**Directora de Investigación y Posgrado**

## RESUMEN

La luz regula las respuestas de estrés y la reproducción asexual en *Trichoderma atroviride* a través de la vía de señalización de la MAPK Tmk3, ortólogo a la MAPK Hog1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Con la finalidad de conocer los componentes río arriba de la vía Pbs2-Tmk3, se generaron mutantes carentes de los genes *ssk2*, *ssk1* y *skn7* por los métodos de PCR doble unión y polientileglicol-CaCl<sup>2</sup>. Las cepas  $\Delta$ *ssk2*,  $\Delta$ *ssk1* y  $\Delta$ *skn7* fueron sometidas a estrés osmótico, oxidativo, a cadmio, al rojo Congo, choque térmico e irradiación con UV-C, donde se observó que la MAPKKK Ssk2 y el regulador de respuesta (RR) Ssk1 son indispensables para regular estas respuestas, así como la producción de conidios, mostrando fenotipos similares a la MAPK Tmk3 y MAPKK Pbs2. Sin embargo, el RR Skn7 actúa como un represor en respuesta a estrés osmótico, oxidativo, rojo Congo y cadmio, ya que las cepas mutantes resultaron ser más tolerantes bajo estas condiciones de estrés; no obstante, Skn7 es indispensable para regular la producción de conidios estimulada por un pulso de luz azul y daño mecánico; sin embargo, en condiciones de luz blanca constante la producción de conidios de las cepas  $\Delta$ *skn7* fue similar a la WT. Estos resultados sugieren que la MAPKKK Ssk2 y el RR Ssk1 participan en la misma vía para la activación de la MAPK Tmk3 y que los estímulos de luz y daño mecánico son percibidos por las HKs. Además, el RR Skn7 también es un regulador de las respuestas de daño mecánico y en pulso de luz azul, sugiriendo que puede estar interactuando con otras vías de señalización para regular la reproducción asexual en respuesta a estos estímulos.

**(Palabras clave:** *Trichoderma atroviride*, MAPKKK, RR, luz azul, estrés)

## SUMMARY

Light regulates stress responses and asexual reproduction in *Trichoderma atroviride* through of the MAPK Tmk3 signaling pathway, the ortholog MAPK Hog1 of *Saccharomyces cerevisiae*. In order to know components upstream of Pb2-Tmk3 pathway, mutants lacking the *ssk2*, *ssk1* and *skn7* genes were generated using the double-joint PCR and polyethylene glycol-CaCl<sup>2</sup> methods. The  $\Delta$ *ssk2*,  $\Delta$ *ssk1* and  $\Delta$ *skn7* strains were subject to osmotic stress, oxidative stress, cadmium, Congo red, heat shock and UV-C irradiation, where MAPKKK Ssk2 and response regulator (RR) Ssk1 were indispensable to regulate these responses, as well as the production of conidia, showing similar phenotypes to the MAPK Tmk3 and MAPKK Pbs2. However, RR Skn7 acts as a repressor in response to osmotic, oxidative stress, Congo red and cadmium, because mutant strains were more tolerant under these stress conditions; nevertheless, Skn7 is indispensable for regulating the production of conidia stimulated by a blue light pulse and mechanical injury; however, in conditions of constant white light, the production of conidia of  $\Delta$ *skn7* strains was similar to WT strain. These results suggest that MAPKKK Ssk2 and RR Ssk1, belong to the same pathway for activation of MAPK Tmk3, and that light and injury mechanical stimuli are perceived by HKs. Moreover, the RR Skn7 regulate responses to injury mechanical and blue light pulse, suggesting a possible interacting with other signaling pathways for asexual reproduction in response to these stimuli.

**(Key words:** *Trichoderma atroviride*, MAPKKK, RR, blue light, stress)

## DEDICATORIAS

A Dios, quien me permitió lograr una meta más y ha sido mi soporte durante toda mi vida, con todo mi amor y cariño.

A mi papá, mi linda mamá, a mis hermanas Blanca y Karlita, mi hermano Juanito y mi sobrino Emmanuel. Mi hermosa familia, quien me ha brindado en todo momento su apoyo incondicional, su confianza, paciencia y amor. Los he extrañado mucho y les agradezco todo lo que han hecho por mí.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo por la confianza brindada al permitirme ser parte de su grupo de investigación, por todas sus observaciones y enseñanzas, muchas gracias.

Asimismo, agradezco al Dr. Alfredo Herrera Estrella, Dr. José Antonio Cervantes Chávez, Dr. Fidel Landeros Jaime y Dr. Fausto Arellano Carbajal, quienes aceptaron ser parte de mi comité. Muchas gracias por todas sus observaciones, su tiempo y apoyo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por todo el apoyo brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de esta tesis de maestría, a lo largo de estos dos años.

A Gaby, por su amistad, apoyo y paciencia, quien fue un gran apoyo antes de iniciar este proyecto y durante el desarrollo fue mi guía, muchas gracias. A Eve, por su apoyo y ánimo cuando recién ingresé al mundo de la ciencia, muchas gracias por todo.

A Mary, Alicia y Dulce, quienes me mostraron su apoyo, incluso antes de emprender este proyecto, gracias por su amistad.

A los compañeros(as) de LAMIMO, muchas gracias por su amistad, apoyo y paciencia.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	2
II.1 Hongos del género <i>Trichoderma</i> spp.....	2
II.2 Fotobiología en el Reino Fungi .....	3
II.2.1 Percepción de luz en hongos Ascomicetos .....	3
II.2.2 Percepción de luz en hongos Basidiomicetos .....	6
II.2.1 Percepción de luz en hongos Zigomicetos .....	8
II.3 La Vía del AMPc en las respuestas a la luz .....	9
II.4 La vía de la Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (MAPK) .....	10
II.4.1 La vía de las MAPK en las respuestas a la luz .....	12
II.5 Sistema de Transducción de Señales de dos Componentes .....	14
III. JUSTIFICACIÓN .....	19
IV. HIPÓTESIS .....	19
V. OBJETIVOS .....	20
V.1 Objetivo General .....	20
V.2 Objetivos Específicos .....	20
VI. METODOLOGÍA.....	21
VI.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo .....	21
VI.2 Extracción y manipulación de los ácidos nucleicos .....	21
VI. 3 Análisis <i>in silico</i> de la MAPKKK Ssk2 y los RR Ssk1 y Skn7 de <i>T. atroviride</i> .....	22
VI.4 Diseño de oligonucleótidos para la eliminación de los genes <i>ssk2</i> , <i>ssk1</i> y <i>skn7</i> .....	23
VI.5 Generación de cepas mutantes carente de los genes <i>ssk1</i> , <i>ssk2</i> y <i>skn7</i> . .	26
VI.5.1 Construcción de casetes para la eliminación de los genes <i>ssk1</i> , <i>ssk2</i> y <i>skn7</i> .....	26

VI.5.2 Transformación de <i>Trichoderma atroviride</i> mediante la técnica de Polietilenglicol- CaCl <sub>2</sub> .....	27
VI.5.3 Identificación de cepas mutantes carente de los genes <i>ssk2</i> , <i>ssk1</i> y <i>skn7</i> .....	29
VI.6 Caracterización fenotípica de las cepas $\Delta$ <i>ssk2</i> , $\Delta$ <i>ssk1</i> y $\Delta$ <i>skn7</i> en respuesta a estrés y a la luz azul .....	30
VI.6.1 Ensayo de estrés con conidios .....	31
VI.6.2 Ensayo de estrés con micelio .....	31
VI.6.3 Ensayo de sensibilidad a choque térmico .....	32
VI.6.4 Ensayo de reparación de ADN en células tratadas con UV .....	32
VI.6.5 Determinación de la producción de conidios estimulada por un pulso de luz azul .....	32
VI.6.6 Determinación de la producción de conidios estimulada por daño mecánico .....	33
VI.6.7 Determinación de la producción de conidios inducida por luz blanca constante .....	33
VI.7 Análisis de la expresión de genes por RT-PCR.....	34
VI.7.1 Análisis de la expresión de genes regulados por luz azul.....	34
VI.7.2 Análisis de la expresión de genes regulados en daño mecánico .....	36
VI.8 Análisis estadístico.....	37
VII. RESULTADOS .....	38
VII.1 Identificación <i>in silico</i> de la MAPKKK Ssk2 y los Reguladores de Respuesta Ssk1 y Skn7 en <i>Trichoderma atroviride</i> . .....	38
VII.2 Análisis <i>in silico</i> los Reguladores de Respuesta Ssk1 y Skn7 en <i>Trichoderma atroviride</i> .....	40
VII.3 Análisis funcional del RR Skn7 en <i>T. atroviride</i> .....	48
VII.3.1 Generación de cepas mutantes carentes del gen <i>skn7</i> .....	48
VII.3.2 El RR Skn7 regula negativamente la tolerancia a estrés osmótico de acuerdo con el estado de desarrollo del hongo.....	50
VII.3.3 Skn7 actúa como represor en la integridad de la pared celular .....	52
VII.3.4 Skn7 es un represor de respuesta a estrés oxidativo .....	54
VII.3.5 Skn7 modula negativamente la tolerancia a CdCl <sub>2</sub> .....	58



VII.3.6 Skn7 no regula respuesta a choque térmico y daño al ADN por UV 60	
VII.3.7 Skn7 es dispensable para la regulación de la producción de conidios por exposición a luz constante.....	62
VII.3.8 Skn7 regula la conidiación inducida por un pulso de luz azul .....	63
VII.3.9 Skn7 regula la conidiación inducida por daño mecánico.....	65
VII.3.10 El RR Skn7 regula la expresión de genes regulados por luz .....	66
VII.3.11 El RR Skn7 regula parcialmente la expresión de genes en daño mecánico .....	67
VII.4 Análisis funcional del RR Ssk1 en <i>T. atroviride</i> .....	69
VII.4.1 Generación de mutantes carentes del gen <i>ssk1</i> .....	69
VII.4.2 El RR Ssk1 regula respuesta a estrés osmótico .....	71
VII.4.3 Ssk1 es indispensable para regular la integridad de la pared celular .....	73
VII.4.4 Ssk1 es un regulador importante en la tolerancia al estrés oxidativo .....	75
VII.4.5 Ssk1 es indispensable para la tolerancia a CdCl <sub>2</sub> .....	78
VII.4.6 El RR Ssk1 participa en la reparación al ADN por daño UV y en choque térmico a través de la MAPK Tmk3.....	80
VII.4.7 Ssk1 participa en la reproducción asexual inducida por luz.....	81
VII.4.8 Ssk1 es indispensable para regular la conidiación inducida por un pulso de luz azul.....	83
VII.4.9 El RR Ssk1 participa en respuesta por daño mecánico .....	84
VII.4.10 El RR Ssk1 regula la expresión de genes regulados por luz azul .	85
VII.4.11 El RR Ssk1 regula parcialmente la expresión de genes de daño mecánico .....	86
VII.5 Análisis funcional de la MAPKKK Ssk2 en <i>T. atroviride</i> .....	88
VII.5.1 Generación de cepas mutantes carentes del gen <i>ssk2</i> .....	88
VII.5.2 La MAPKKK Ssk2 regula respuesta a estrés osmótico.....	90
VII.5.3 La MAPKKK Ssk2 regula la integridad de la pared celular a través de la MAPK Tmk3.....	92
VII.5.4 La MAPKKK Ssk2 participa en regular estrés oxidativo .....	94
VII.5.5 La MAPKKK Ssk2 regula la tolerancia a Cd en <i>T. atroviride</i> .....	97

VII.5.6 La MAPKKK Ssk2 regula respuesta a estrés térmico y daño al ADN por UV .....	99
VII.5.7 La MAPKKK Ssk2 regula la reproducción asexual en <i>T. atroviride</i>	100
VII.5.8 La MAPKKK Ssk2 regula la conidiación inducida por un pulso de luz .....	101
VII.5.9 La MAPKKK Ssk2 participa en respuestas por daño mecánico .....	102
VII.5.10 La MAPKKK Ssk2 regula la expresión de genes regulados por luz azul.....	103
VII.5.11 La MAPKKK Ssk2 regula parcialmente la expresión de genes de daño mecánico .....	104
VIII. DISCUSIÓN.....	106
VIII.1 El sistema de dos componentes en <i>T. atroviride</i> .....	106
VIII.2 Rol de la MAPKKK Ssk2 y los RR Ssk1 y Skn7 en respuestas a estrés.	107
VIII.3 Rol de Ssk2, Ssk1 y Skn7 en respuesta a daño mecánico .....	111
VIII.4 Participación de Skn7, Ssk1 y Ssk2 en respuestas a la luz .....	115
IX. CONCLUSIONES .....	118
X. PERSPECTIVAS .....	119
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
XII. APÉNDICE .....	130
XII.1 Simbología .....	130
XII.2 Alineamientos.....	131

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Lista de oligonucleótidos para eliminar el gen <i>skn7</i> .....	24
Tabla 2. Lista de oligonucleótidos para eliminar el gen <i>ssk1</i> .....	24
Tabla 3. Lista de oligonucleótidos para eliminar el gen <i>ssk2</i> .....	25
Tabla 4. Lista de oligonucleótidos para amplificar el gen <i>hph</i> .....	25
Tabla 5. Lista de oligonucleótidos para el análisis de expresión de los genes fotorregulados.....	35
Tabla 6. Lista de oligonucleótidos para el análisis de la expresión de los genes inducidos por daño mecánico.....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática de los dominios de las proteínas WCC en <i>N. crassa</i> .....	4
Figura 2. Fotorrespuestas en <i>A. nidulans</i> .....	5
Figura 3. Efecto de la luz en <i>C. neoformans</i> y <i>C. cinereus</i> .....	7
Figura 4. Fototropismo en hongos Zigomicetos .....	9
Figura 5. La vía de la MAPK Hog1 en levadura .....	11
Figura 6. Modelo de la regulación circadiana de la vía de la MAPK OS .....	13
Figura 7. Representación esquemática del sistema de dos componentes y el fosforrelevo .....	15
Figura 8. Representación esquemática de los dominios de los reguladores de respuesta en <i>S. cerevisiae</i> .....	17
Figura 9. Técnica de PCR de doble unión para eliminar las regiones codificantes de <i>ssk1</i> , <i>ssk2</i> y <i>skn7</i> .....	27
Figura 10. Reemplazo génico por doble recombinación homóloga en <i>Trichoderma atroviride</i> .....	29
Figura 11. Identificación molecular de mutantes carentes de <i>ssk2</i> , <i>ssk1</i> y <i>skn7</i> ..	30
Figura 12. Secuencia de aminoácidos y dominios presentes en el RR Skn7 de <i>T. atroviride</i> .....	38
Figura 13. Secuencia de aminoácidos y dominios presentes en el RR Ssk1 de <i>T. atroviride</i> .....	39
Figura 14. Secuencia de aminoácidos y dominios presentes en la MAPKKK Ssk2 de <i>T. atroviride</i> .....	39
Figura 15. Dominios presentes en los ortólogos al RR Skn7 .....	41

Figura 16. Alineamiento del dominio REC del RR Skn7 en sus ortólogos .....	42
Figura 17. Alineamiento del dominio HSF del RR Skn7 en sus ortólogos.....	43
Figura 18. Análisis filogenético de los diferentes ortólogos del RR Skn7.....	44
Figura 19. Dominios presentes en los ortólogos al RR Ssk1 .....	45
Figura 20. Alineamiento del dominio REC del RR Ssk1 en sus ortólogos .....	46
Figura 21. Análisis filogenético de los diferentes ortólogos del RR Ssk1.....	47
Figura 22. Construcción del casete para eliminar el gen <i>skn7</i> .....	48
Figura 23. Identificación del reemplazo del gen <i>skn7</i> por el marcador de selección .....	49
Figura 24. Tolerancia a estrés osmótico en conidios de las cepas $\Delta skn7$ .....	50
Figura 25. Tolerancia a estrés osmótico por KCl en micelio de las cepas $\Delta skn7$ ..	51
Figura 26. Tolerancia a estrés osmótico por sorbitol en micelio de las cepas $\Delta skn7$ .....	51
Figura 27. Análisis de la integridad de la pared celular en conidios de las cepas $\Delta skn7$ .....	53
Figura 28. Análisis de la integridad de la pared celular en las cepas $\Delta skn7$ en estado vegetativo .....	54
Figura 29. Tolerancia a estrés oxidativo por menadiona en conidios de las cepas $\Delta skn7$ .....	55
Figura 30. Tolerancia a estrés oxidativo por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en conidios de las cepas $\Delta skn7$ .....	56
Figura 31. Tolerancia a estrés oxidativo por menadiona en micelio de las cepas $\Delta skn7$ .....	57

Figura 32. Tolerancia a estrés oxidativo por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en micelio de las cepas $\Delta skn7$ .....	58
Figura 33. Tolerancia a cadmio en conidios de las cepas $\Delta skn7$ .....	59
Figura 34. Tolerancia a cadmio en micelio de las cepas $\Delta skn7$ .....	60
Figura 35. Tolerancia a choque térmico con conidios de las cepas $\Delta skn7$ .....	61
Figura 36. Sensibilidad a la luz UV en conidios de las cepas $\Delta skn7$ .....	62
Figura 37. Producción de conidios inducido por luz blanca constante en las cepas $\Delta skn7$ .....	63
Figura 38. Participación del RR Skn7 en la conidiación inducida con un pulso de luz azul .....	64
Figura 39. Participación de Skn7 en la conidiación inducida por daño mecánico .	66
Figura 40. Expresión de genes regulados por luz azul en las cepas $\Delta skn7$ .....	67
Figura 41. Expresión de genes regulados por daño mecánico en las cepas $\Delta skn7$ .....	68
Figura 42. Construcción del casete para eliminar el gen <i>ssk1</i> .....	69
Figura 43. Escrutinio fenotípico para identificar mutantes carentes del gen <i>ssk1</i> .....	70
Figura 44. Identificación de mutantes carente del gen <i>ssk1</i> .....	71
Figura 45. Participación del RR Ssk1 en la tolerancia a estrés osmótico en conidios .....	72
Figura 46. Sensibilidad a estrés osmótico por KCl en micelio de las cepas $\Delta ssk1$ .....	73
Figura 47. Sensibilidad a estrés osmótico por sorbitol en micelio de las cepas $\Delta ssk1$ .....	73

Figura 48. Participación del RR Ssk1 en la integridad de la pared celular en conidios .....	74
Figura 49. Análisis de la integridad de la pared celular en micelio de las cepas $\Delta ssk1$ .....	75
Figura 50. Participación del RR Ssk1 en la tolerancia al estrés oxidativo por menadiona en conidios .....	76
Figura 51. Participación del RR Ssk1 en la tolerancia al estrés oxidativo por $H_2O_2$ en conidios.....	76
Figura 52. Tolerancia a estrés oxidativo por menadiona en micelio de las cepas $\Delta ssk1$ .....	77
Figura 53. Efecto de la luz en la tolerancia a estrés por $H_2O_2$ en micelio de las cepas $\Delta ssk1$ .....	78
Figura 54. Participación del RR Ssk1 en la tolerancia a cadmio en conidios .....	79
Figura 55. Participación del RR Ssk1 en la tolerancia a cadmio en micelio.....	79
Figura 56. Sensibilidad a la irradiación con UV en conidios de las cepas $\Delta ssk1$ ..	80
Figura 57. Tolerancia en conidios de las cepas WT, $\Delta ssk1$ y $\Delta tmk3$ a choque térmico .....	81
Figura 58. Participación del RR Ssk1 en la producción de conidios inducida por luz blanca constante.....	82
Figura 59. Participación del RR Ssk1 en la conidiación inducida por un pulso de luz azul .....	83
Figura 60. Participación del RR Ssk1 en la conidiación inducida por daño mecánico .....	85
Figura 61. Participación del RR Ssk1 en regular la expresión de genes dependientes de la MAPK Tmk3.....	86

Figura 62. Expresión de genes regulados por daño mecánico en la cepa $\Delta ssk1$ .....	87
Figura 63. Construcción del casete para eliminar el gen <i>ssk2</i> .....	88
Figura 64. Escrutinio fenotípico para identificar mutantes carentes del gen <i>ssk2</i> .....	89
Figura 65. Identificación por PCR de la cepa mutante carente del gen <i>ssk2</i> .....	90
Figura 66. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la tolerancia a estrés osmótico en conidios.....	91
Figura 67. Sensibilidad a estrés osmótico por KCl en micelio de la cepa $\Delta ssk2$ ...	92
Figura 68. Sensibilidad a estrés osmótico por sorbitol en micelio de la cepa $\Delta ssk2$ .....	92
Figura 69. Análisis de la integridad de la pared celular en conidios de la cepa $\Delta ssk2$ .....	93
Figura 70. Análisis de la integridad de la pared celular en micelio de la cepa $\Delta ssk2$ .....	94
Figura 71. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la tolerancia a estrés oxidativo por menadiona en conidios .....	95
Figura 72. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la tolerancia a estrés oxidativo por $H_2O_2$ en conidios.....	95
Figura 73. Tolerancia a estrés oxidativo por menadiona en micelio de la cepa $\Delta ssk2$ .....	96
Figura 74. Efecto de la luz en la tolerancia a estrés oxidativo provocado por $H_2O_2$ en micelio de la cepa $\Delta ssk2$ .....	97
Figura 75. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la tolerancia a cadmio en conidios .....	98



Figura 76. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la tolerancia a cadmio en micelio .....	98
Figura 77. Sensibilidad a la luz UV en conidios de la cepa $\Delta ssk2$ .....	99
Figura 78. Tolerancia en conidios de las cepas WT, $\Delta ssk2$ , $\Delta tmk3$ y $\Delta pbs2$ a choque térmico .....	100
Figura 79. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la producción de conidios inducida por luz blanca constante .....	101
Figura 80. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la producción de conidios inducidos por un pulso de luz azul .....	102
Figura 81. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la producción de conidios inducido por daño mecánico.....	103
Figura 82. Participación de la MAPKKK Ssk2 en regular la expresión de genes dependientes de la MAPK Tmk3.....	104
Figura 83. Expresión de genes regulados por daño mecánico en la cepa $\Delta ssk2$ .....	105
Figura 84. Modelo de activación de la MAPKK Pbs2 por la MAPKKK Ssk2 .....	108
Figura 85. Modelo hipotético de la participación de Ssk2, Ssk1 y Skn7 en <i>T. atroviride</i> en respuestas a estrés .....	112
Figura 86. Respuestas en <i>T. atroviride</i> en daño mecánico.....	113
Figura 87. Modelo hipotético de la participación de Ssk2, Ssk1 y Skn7 en respuesta a daño mecánico en <i>T. atroviride</i> .....	114
Figura 88. Modelo hipotético de la participación de Ssk1, Ssk2 y Skn7 en respuesta a la luz en <i>T. atroviride</i> .....	116
Figura 89. Alineamiento de los reguladores de respuesta ortólogos a Skn7 .....	133
Figura 90. Alineamiento de los reguladores de respuesta ortólogos a Ssk1.....	137

## ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

HK: Histidina cinasa

HPT: Histidina fosfotransferasa

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos

MMV: Medio Mínimo Vogels

ORF: Marco de lectura abierto

PAS: Per-ARNT-Sim

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDA: Papa-Dextrosa-Agar

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RR: Regulador de respuesta

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa

TCST: Sistema de transducción de señales de dos componentes

SAPK: Proteína cinasa activada por estrés

WT: cepa silvestre

aa: aminoácido

pb: pares de bases

UV: ultravioleta

$\mu$ l: microlitro

ml: mililitro

$\mu$ M: micromolar

mM: milimolar

seg: segundos

min: minutos

h: horas

nm: nanómetro

rpm: revoluciones por minuto

$^{\circ}$ C: grados centígrados

## I. INTRODUCCIÓN

*Trichoderma atroviride* es un hongo micoparásito usado ampliamente como agente de control biológico para combatir hongos fitopatógenos y nematodos, siendo una alternativa al control químico de plagas y enfermedades (García-Esquivel *et al.*, 2016). Su aplicación es a base de formulaciones de esporas asexuales (conidios) por lo cual es importante entender el mecanismo de desarrollo del hongo y su reproducción para incrementar sus beneficios (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2012). La luz juega un rol importante para los organismos, y en hongos se ha estimado que la mayoría responde a ella (Dasgupta *et al.*, 2016). Los procesos regulados por luz en hongos incluyen su crecimiento, reproducción, ritmos circadianos, expresión de genes, entre otros (Herrera-Estrella *et al.*, 2007). En *T. atroviride*, los fotorreceptores Blr1 y Blr2 son esenciales para la fotoconidación y expresión de genes regulados por la luz azul, entre ellos genes relacionados con estrés celular o daño al DNA (Schmoll *et al.*, 2010).

Las especies de *Trichoderma* tienen tres vías de MAPK denotadas como Tmk1, Tmk2 y Tmk3. En *T. atroviride*, la expresión del gen *tmk3* es regulado por luz azul a través de los fotorreceptores Blr1/Blr2 y esta MAPK integra respuestas a la luz azul y al estrés (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). En este trabajo de investigación se planteó descifrar la importancia del sistema de dos componentes, analizando la participación de Ssk1, Ssk2 y Skn7 río arriba en la vía de señalización de la proteína cinasa activada por estrés (SAPK) Tmk3, la cual regula respuestas a estrés celular, fotoconidación y expresión de genes en respuesta a estos estímulos en *T. atroviride*.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Hongos del género *Trichoderma* spp.

La primera descripción del hongo llamado *Trichoderma* fue en 1794 por Persson, y en 1865 se le vinculó con el estado sexual *Hypocrea* (Schuster y Schmoll, 2010). Los hongos del género *Trichoderma* (División-Ascomycota, Sudivisión-Pezizomycotina, Clase-Sordariomycetes, Orden-Hypocreales, Familia-Hycreaceae) son saprofitos del suelo y la madera, de crecimiento muy rápido (Martínez *et al.*, 2013; Waghunde *et al.*, 2016), donde son capaces de competir por nutrientes y espacio con otros microorganismos (Argumedo-Delira *et al.*, 2009)

Desde de 1930 se reconoce como agente de biocontrol en enfermedades de plantas, y los mecanismos que *Trichoderma* usa para antagonizar los hongos fitopatógenos incluyen la competencia, colonización, antibiosis y micoparasitismo. (Waghunde *et al.*, 2016). Además de la actividad de biocontrol de algunas especies de *Trichoderma*, también induce la resistencia sistémica a enfermedades en la planta a estrés bióticos y abióticos, tales como el déficit de agua, sal y temperatura (Harman, 2011).

El hongo *Trichoderma* se reproduce asexualmente por conidios, donde la luz influye en su desarrollo además de la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, la conidiación también puede ser estimulada por estrés nutricional, cambios en el pH del medio, daño micelial, calcio extracelular y componentes orgánicos volátiles derivados de hongos (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2013; Osorio-Concepción *et al.*, 2013).

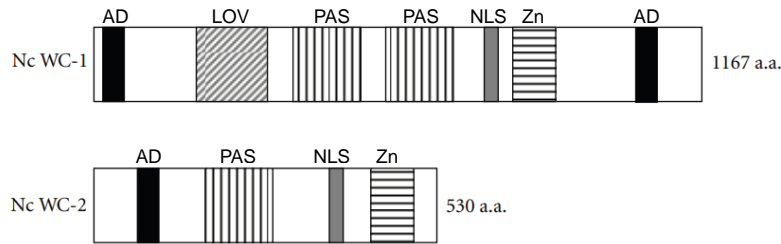
*Trichoderma atroviride* es un hongo filamentoso cosmopolita usado comercialmente en la agricultura como agente de control biológico contra una gran variedad de hongos fitopatógenos, por lo que proporciona una alternativa al uso de pesticidas (Dubey *et al.*, 2012). La aplicación de *T. atroviride* en el campo es a base de conidios (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006), el cual es regulado por el daño mecánico, la luz, la ausencia de carbono y de nitrógeno en el medio (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2012).

## II.2 Fotobiología en el Reino Fungi

La luz es un factor abiótico vital para los seres vivos ya que regula el crecimiento, la pigmentación, el metabolismo, la reproducción y los ritmos circadianos en una gran variedad de organismos, desde bacterias hasta humanos (Schmoll *et al.*, 2010; Ambra *et al.*, 2004). La luz provoca una respuesta biológica a través de proteínas asociadas a moléculas orgánicas pequeñas que son sensibles a longitudes de onda específicas (cromóforos) que en adelante llamaremos fotorreceptores. En algunos hongos se ha identificado varias clases de fotorreceptores, tales como opsinas, fitocromos, criptocromos y proteínas White collar (WC) tipo fototropinas (García-Esquivel *et al.*, 2016).

### II.2.1 Percepción de luz en hongos Ascomicetos

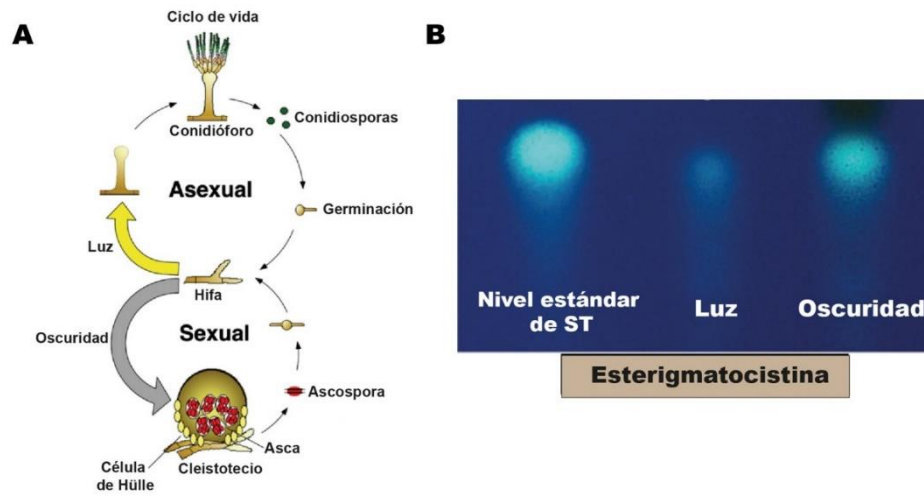
El hongo filamentoso *Neurospora crassa* fue descrito por primera vez por un microbiólogo francés en 1843. Actualmente es considerado un importante modelo de estudio de transducción de señales de luz azul, mediante dos componentes centrales denominados, *white collar-1 (wc-1)* y *white collar-2 (wc-2)*. En ambas proteínas se han identificado dominio PAS, mediante el cual interactúan para formar el heterodímero WCC (White Collar Complex) (Figura 1). La inducción de la biosíntesis de carotenoides en el micelio, la fotoconidación, así como el desarrollo sexual y la regulación del ritmo circadiano, son respuestas reguladas a través de la luz azul (Ballario y Macino, 1997; Corrochano, 2007). Además, en *N. crassa* se ha identificado otro receptor de luz azul: Vivid (VVD), esencial para la adaptación y la regulación de los cambios de intensidad de luz (Kazuhisa y col., 2005). Las proteínas WC-1 y VIVID contienen un dominio LOV, una subfamilia del dominio PAS, especializado para percibir señales de luz, oxígeno y voltaje. El dominio LOV de la proteína VIVID es un regulador negativo del factor de transcripción circadiano WCC (Lee *et al.*, 2014). Además, se han identificado dos fitocromos y un criptocromo, con funciones biológicas o moleculares aún no determinadas, al no encontrarse diferencias entre las cepas mutantes y la silvestre (Chen *et al.*, 2010).



**Figura 1. Representación esquemática de los dominios de las proteínas WCC en *N. crassa*.** WC-1 y WC-2 interactúan a través del dominio PAS. El dominio LOV en el fotoreceptor WC-1 se une a un cromóforo de FAD. Ambas proteínas contienen dominios de activación (AD), dedos de zinc que se unen al ADN tipo GATA y señal de localización nuclear (NLS) (Imagen modificada de [Belozerskaya et al., 2012](#)).

Asimismo, en *Aspergillus nidulans* se han identificado receptores de luz, los cuales comprenden un fitocromo para percibir luz roja, proteínas de señalización de luz azul ortólogas a White Collar, una opsina que percibe luz verde, y criptocromo/fotoliasa. En *A. nidulans*, el desarrollo del hongo es controlado por la luz, ya que se reproduce de manera asexual en presencia de luz y sexual en oscuridad, el cual está coordinado con el control de metabolismos secundarios (Bayram *et al.*, 2010) (Figura 2). Además, se ha descrito que mediante el fitocromo FphA, se reprime la formación de cuerpos fructíferos e induce la formación de esporas asexuales. Originalmente se pensaba que los fitocromos eran exclusivos de organismos fotosintéticos incluyendo las cianobacterias, pero posteriormente fue descubierto en bacterias heterótrofas y hongos, donde los ortólogos en hongos son más similares a los de bacterias. En *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Candida albicans* no se han identificado fitocromos (Blumenstein *et al.*, 2005). Las proteínas LreA y LreB, similares a las proteínas White Collar de *N. crassa* (Purschwitz *et al.*, 2008), y la fotoliasa/criptocromo CryA (Bayram *et al.*, 2008) son los receptores de luz azul en *A. nidulans*. CryA, como criptocromo reprime el desarrollo sexual en luz UVA (350-370 nm), mientras que en la función fotoliasa, repara dímeros de pirimidinas ciclobutano (CPD) inducidos por UV (Bayram *et al.*, 2008). Las proteínas LreA y LreB, estimulan el desarrollo sexual del hongo y la biosíntesis de micotoxinas (Purschwitz *et al.*, 2008). De hecho, se ha

descubierto que FphA forma un complejo regulador de la luz junto con LreA/LreB y con VeA (Purschwitz et al., 2008).



**Figura 2. Fotorrespuestas en *A. nidulans*.** (A) Ciclo de vida de *A. nidulans*. La luz controla el desarrollo del hongo, en oscuridad produce cuerpos fructíferos, mientras que en la luz las conidiosporas son dominantes. (B) La biosíntesis de esterigmatocistina (un precursor de la aflatoxina) es reprimida por la luz (Imagen modificada de Bayram *et al.*, 2010).

En hongos del género *Fusarium*, también se ha observado que la luz estimula la producción de metabolitos, tales como carotenoides, y en muchas especies influye en la producción de esporas asexuales y cuerpos fructíferos sexuales. En el genoma de *Fusarium* también se han identificado varios genes fotorreceptores, entre ellos proteínas White Collar, un criptocromo, una fotoliasa, un fitocromo y dos opsinas. En mutantes del ortólogo a WC-1, se ve afectada la expresión de la fotoliasa y opsinas, así como alteración en conidiación, patogenicidad en animales y la producción de metabolitos secundarios (Avalos y Estrada, 2010).

En el hongo fitopatógeno *Alternaria alternata*, se ha descrito que las micotoxinas, AOH y ATX, y la formación de esporas son reguladas por luz azul en formas opuestas, mediante el receptor LreA, ortóloga a WC-1 de *N. crassa*. Asimismo, se ha identificado en el genoma un criptocromo, un fitocromo y opsinas (Pruss *et al.*, 2014). El hongo patógeno de plantas *Botrytis cinerea*, se ha descrito que tiene un amplio espectro de acción, respondiendo a diferentes longitudes de onda, desde luz cercana a la UV, azul, verde, rojo y rojo lejano con cambios morfológicos. En este hongo, se han identificado once fotorreceptores, entre ellos



dos criptocromos/fotoliasas, dos opsinas, tres fitocromos y cuatro fotoreceptores de luz azul (Schumacher, 2017). El efecto de la luz sobre *B. cinerea*, abarca desde cambios en el modo de reproducción (formación de conidias o esclerocios), la biosíntesis de metabolitos secundarios y la virulencia (Schumacher, 2015).

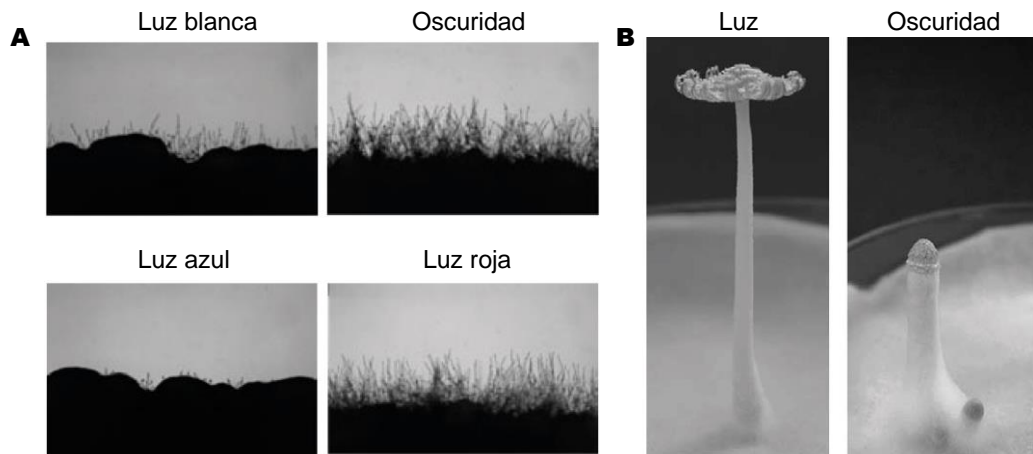
En *T. atroviride*, la luz azul regula la producción de conidios (fotoconidiación), crecimiento y metabolismo (Casas-Flores y col., 2004). Las respuestas a la luz azul/UV-A son reguladas por un fotorreceptor heterodimérico formado por las proteínas Blr-1/Blr-2 (Blue Light Regulator), homólogos a WC-1 y WC-2 en *N. crassa*, las cuales actúan como un factor de transcripción regulable por la luz (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006). El complejo BLR interactúa con el ADN a través de sus dominios de dedo de zinc tipo GATA, regulando así la expresión génica (Osorio-Concepción *et al.*, 2013). En estudios recientes, durante el análisis del transcriptoma regulado por la luz blanca en WT y en la mutante carente del gen *blr1* en *T. atroviride*, se determinaron 77 genes independientes de Blr-1 (García-Esquivel *et al.*, 2016), lo que sugiere que hay más sistemas adicionales de percepción de luz, funcionales en *T. atroviride*.

Sin embargo, la luz también participa como regulador negativo, como en el hongo *B. cinerea* donde la esporulación es inhibida por la luz azul, pero revertido por la luz roja (Tan, 1974). Así como en el hongo *Tuber borchii*, donde se ha demostrado que el crecimiento apical en el hongo ascomiceto es inhibido por la luz azul, así como una reducción en el tamaño de las colonias de micelio *in vitro*, pero este efecto inhibitorio no fue observado en luz roja, y se postula que es a través de la proteína Tbwc-1, homólogo al fotorreceptor de luz azul WC-1 de *N. crassa* (Ambra *et al.*, 2004).

## II.2.2 Percepción de luz en hongos Basidiomicetos

En el hongo patógeno de humanos *Cryptococcus neoformans* se han identificados dos genes homólogos a *wc-1* y *wc-2* de *N. crassa*, *CWC-1* y *CWC-2*. En este hongo, la luz azul inhibe la producción de filamentos de apareamiento dicarióticos, el cual no es afectado en presencia de luz roja o rojo lejano (Figura 3-

A). La carencia de *CWC-1* resulta en la pérdida de inhibición de filamentos, en condiciones de luz y oscuridad, así como resistencia a luz UV (Lu *et al.*, 2005). Además, la luz inhibe el apareamiento y la fructificación haploide del hongo patógeno. Asimismo, se han identificado un fitocromo y opsina, donde las eliminaciones de los respectivos genes no exhiben ningún fenotipo, ni efectos en el apareamiento (Idnurm y Hietman, 2005).



**Figura 3. Efecto de la luz en *C. neoformans* y *C. cinereus*.** (A) Efecto de diferentes condiciones de iluminación en la producción de filamentos de apareamiento dicariótico en *C. neoformans*. La luz azul participa como inhibidor. (B) Desarrollo del cuerpo fructífero maduro en una cepa WT en *C. cinereus*, bajo condiciones de fotoperiodos de 12 h. En condiciones de oscuridad constante se observa la elongación del primordio y no procede la fase de maduración (Imagen modificada de Lu *et al.*, 2005 y Kazuhisa *et al.*, 2005).

El hongo basidiomiceto *Coprinus cinereus*, también exhibe una remarcada morfogénesis durante el desarrollo del cuerpo fructífero, el cual es regulado por la luz (Figura 3-B). Bajo condiciones apropiadas de luz, el primordio del cuerpo fructífero procede a la fase de maduración, pero en oscuridad, el primordio no procede a la fase de maduración, donde los tejidos del píleo y estípites en la parte superior permanecen sin desarrollarse y la parte del primordio se elonga. Se identificó la proteína Dst1 la cual tiene alta similitud con WC-1. En *C. cinereus*, la luz tiene dos efectos, inhibe la etiolación del primordio y otra es que provoca el desarrollo del primordio en el cuerpo fructífero maduro (Kazuhisa *et al.*, 2005). Cabe mencionar, que las proteínas ortólogas a WC-1 en hongos basidiomicetos, no

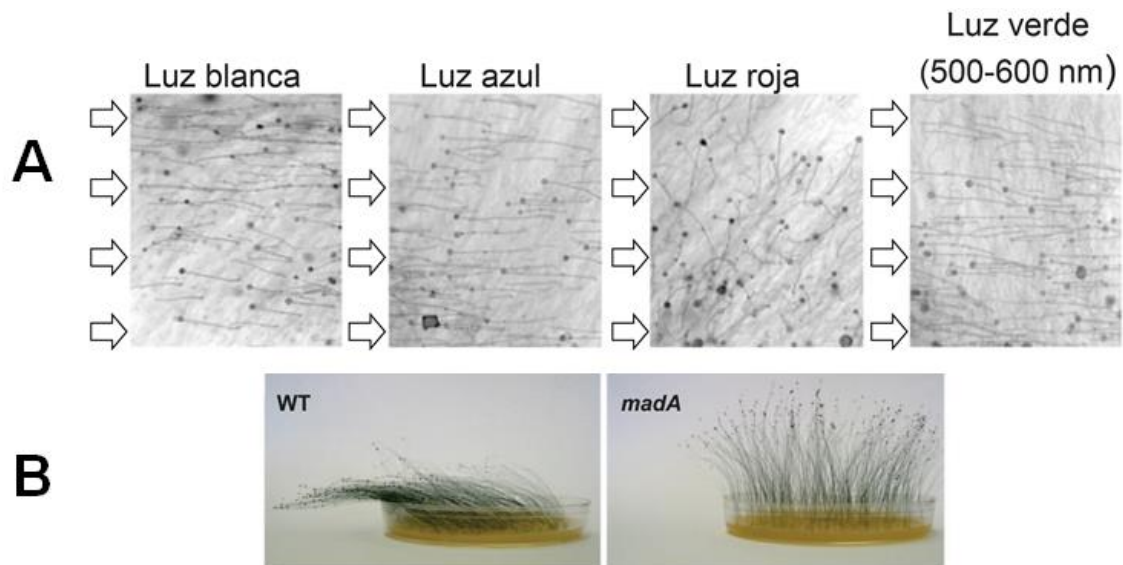
poseen un dominio de dedos de zinc o algún otro arreglo de unión a ADN, lo cual sugiere que CWC-1 interactúa con otras proteínas de unión a ADN (Idnurm y Hietman, 2005).

### II.2.1 Percepción de luz en hongos Zigomicetos

La regulación de la luz ha sido investigada en los hongos zigomicetos *Phycomyces blakesleeanus*, *Mucor circinelloides* y *Pilobolus crystallinus*, en los cuales la luz regula el fototropismo de los cuerpos fructíferos, la regulación del desarrollo de estructuras reproductivas y la activación de la biosíntesis de  $\beta$ -carotenos. A diferencia de los ascomicetos y basidiomicetos, en el genoma de varios zigomicetos se han revelado múltiples genes similares a *wc-1* y *wc-2* de *N. crassa* (Corrochano y Garre, 2010).

En el hongo *Mucor*, la luz regula la biosíntesis de  $\beta$ -carotenos. Sin embargo, los esporangiósforos en *Mucor circinelloides* también responde a la luz, exhibiendo fototropismo (Figura 4-A), el cual es inducido por la luz verde y azul, mientras que la carotenogénesis es solo inducido por luz azul. En *M. circinelloides* se han identificado tres genes (*mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*) que codifican proteínas homologas a WC-1 de *N. crassa*. Las mutantes del gen *mcwc-1c*, mostraron defectos en la biosíntesis de carotenos inducido por luz, mientras que *mcwc-1a* es un regulador positivo del fototropismo (Silva *et al.*, 2006).

El fototropismo en hongos, ha sido estudiado con detalle en los cuerpos fructíferos del hongo modelo *Phycomyces*, el cual es muy sensible a la luz (Figura 4-B). En el análisis del fototropismo en *Phycomyces* se aislaron 10 mutantes de *mad*. Las mutaciones en dos genes, *madA* y *madB*, no solo interrumpen el fototropismo sino perjudican severamente todas las fotorespuestas, lo cual sugiere que tienen un rol esencial en la percepción de luz. Asimismo, se ha identificado que la mutación de *madC*, no altera la respuesta a la luz en micelio (Cerdá-Olmedo, 2001).



**Figura 4. Fototropismo en hongos Zigomicetos. (A)** Micelio de *M. circinelloides* de la cepa silvestre fueron crecidos por tres días en PDA con diferente iluminación unilateral (indicado por las flechas) (Imagen modificado de Silva *et al.*, 2006). **(B)** La flexión fototrópica de los esporangióforos de *P. blakesleeanus* hacia la luz blanca (iluminada desde la izquierda) se produce en la cepa WT y esta respuesta se pierde en la cepa mutante *madA* (Imagen modificada Idnum *et al.*, 2006).

### II.3 La Vía del AMPc en las respuestas a la luz

Los hongos del género *Trichoderma* tienen la capacidad para colonizar diferentes ambientes, además de responder a los cambios del ambiente. En respuesta a una señal extracelular, se inicia una cascada de señalización, y esta señal se transmite por segundos mensajeros tales como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Vieira-Nogueira *et al.*, 2015). La biosíntesis del AMPc ocurre en las células eucariotas en respuesta a una variedad de estímulos extracelulares tales como nutrientes, luz, temperatura y hormonas, donde regula una variedad de procesos fisiológicos (Lee *et al.*, 2003). En plantas inferiores se ha descrito que el AMPc desempeña un rol en la fotosíntesis en el gametofito de la macroalga roja *Porphyra leucosticta*, ya que los niveles de AMPc permanecen bajos en la oscuridad, luz roja o rojo lejano, mientras que la luz blanca causa un aumento en sus niveles (Segovia *et al.*, 2001). En *Arabidopsis thaliana*, se sugiere que el AMPc tiene un papel en la programación celular de la germinación, donde la luz y la

temperatura participan en este proceso, por lo cual proponen que esta vía puede jugar un papel clave en la detección de luz y temperatura, así como en la transducción de señales (Thomas *et al.*, 2013).

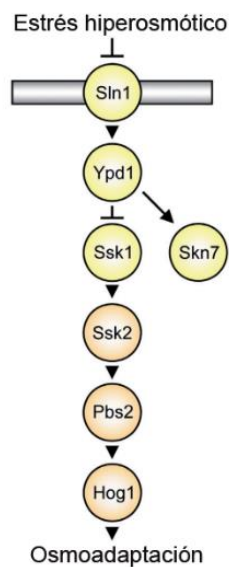
En hongos, la vía del AMPc es altamente conservada, en donde se ha descrito que regula conidiación, dimorfismo, proceso sexual, ciclo celular, fototropismo (Nemčovič y Farkaš, 1998). En *T. atroviride*, uno de los primeros eventos inducidos por la luz, es el incremento en los niveles de AMPc intracelular, la activación de la enzima adenilato ciclasa, la fosforilación de proteínas, cambios en el potencial de la membrana, variaciones en los niveles de ATP y la transcripción diferencial de genes (Osorio-Concepción *et al.*, 2013). Además, se ha determinado que la adición de db-AMPc promueve la conidiación en oscuridad, mientras que la atropina lo previene, después de un pulso de luz. Además, el AMPc provoca la conidiación en mutantes de *blr*, creciendo en condiciones limitadas de carbono; sin embargo, en un medio enriquecido la adición de dB-cAMP no provoca la conidiación en las mutantes. Por lo tanto, el complejo BLR es necesario para la conidiación en ausencia de carbón, mas no de nitrógeno, por medio de la ruta del AMPc (Casas-Flores *et al.*, 2006). Sin embargo, en *T. virens* la conidiación es independiente del AMPc (Mukherjee *et al.*, 2007). No obstante, aún se desconocen los fotorreceptores y los mecanismos moleculares implicados en la activación de la vía de señalización del AMP cíclico.

#### **II.4 La vía de la Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (MAPK)**

Las conservadas cascadas de Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK) encontradas en animales, plantas y hongos están involucradas en la transmisión de señales extracelulares e intracelulares, y de este modo regulan factores de transcripción por fosforilación mediante la MAPK. El estudio de las MAPK en hongos ha revelado su participación en varios procesos esenciales de desarrollo tales como la esporulación, apareamiento, crecimiento hifal y patogenicidad (Reithner *et al.*, 2007)

La activación de las MAPKs está asociada a una señal extracelular generalmente percibida por un receptor transmembranal, que posteriormente origina la activación de la cascada. La MAPKKK es activada por un receptor membranal o intracelular y por fosforilación activa a la MAPKK corriente abajo y ésta a su vez a la MAPK por eventos de fosforilación (Saucedo y col., 2005). En hongos, la vía MAPK son importantes para la señalización en respuesta a estrés y adaptación (Islas-Flores *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2010).

La vía MAPK mejor caracterizada es la denominada como HOG1 (High Osmolarity Glicerol) en *S. cerevisiae*. Uno de los mecanismos de activación, es a través del sistema de dos componentes, que está conformada por Sln1 (HK), Ypd1 (Hpt), Ssk1 (RR) y Skn7 (RR). Este sistema está conectado a la cascada de la MAPK HOG1 a través de Ssk1 (Salas-Delgado *et al.*, 2017) (Figura 5). Esta vía es esencial para la supervivencia de la levadura en condiciones de hiperosmolaridad (Maeda *et al.*, 1994).



**Figura 5. La vía de la MAPK Hog1 en levadura.** Esta vía de señalización, consiste en el sistema de dos componentes (Sln1-Ypd1-Ssk1) y la cascada de la MAPK Hog1 corriente abajo (MAPKKK Ssk2/Ssk22, MAPKK Pbs2 y MAPK Hog1). Skn7 regula respuestas a estrés oxidativo mediante Sln1-Ypd1. La activación de la vía estimula la expresión de genes de respuesta a estrés osmótico, mientras que la activación constitutiva causa letalidad (Imagen modificada de Furakawa y Hohmann, 2015).

#### II.4.1 La vía de las MAPK en las respuestas a la luz

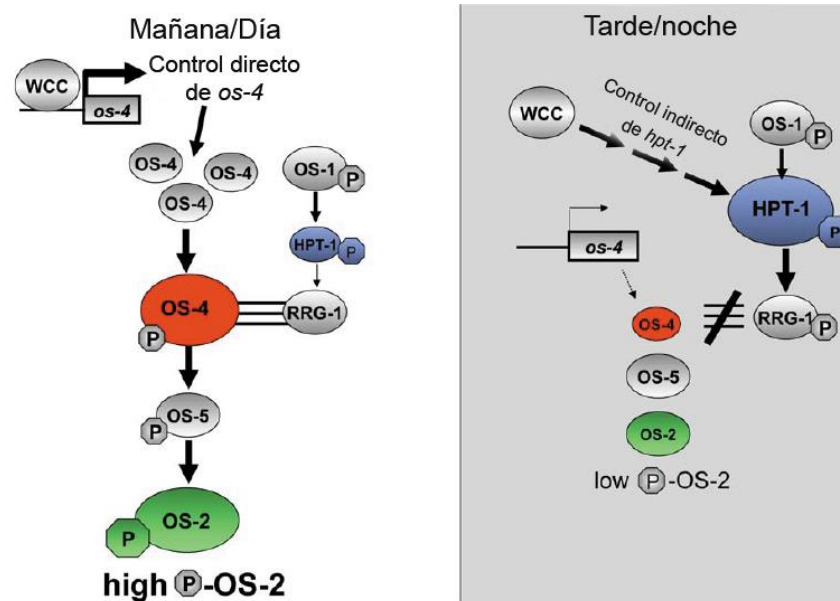
La luz es una de las señales ambientales que ejercen efectos sobre la fisiología y el comportamiento de los organismos, además sirve para sincronizar el ritmo circadiano con el ciclo del día y la noche (Weger *et al.*, 2011). En una variedad de organismos, la luz induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Neill *et al.*, 2002; Hirayama *et al.*, 2007), regula la producción de carotenoides o melanina, la expresión de numerosas enzimas de reparación de ADN, así como el desarrollo en numerosas especies (Fuller *et al.*, 2014).

Las vías de las MAPKs no solo regulan respuestas a estrés, sino también estímulos de luz. En mamíferos, el ritmo circadiano y la MAPK p38, una importante vía para regular estrés, son sistemas que responden a la luz. Estos dos sistemas, ayudan a los organismos a adaptarse a los cambios ambientales. Estudios realizados en *Drosophila melanogaster* demostraron que p38 se expresa en las neuronas reloj de manera circadiana, la cual es más activa en la noche y es inactivada por la luz (Dusik *et al.*, 2014).

Asimismo, en vertebrados como el pez zebra, observaron que, en células tratadas con luz, la producción de ROS es inducida y estimula la cascada de señalización de la MAPK/ERK, lo cual se traduce en la transcripción de genes en respuesta a la luz, genes reloj y genes involucrados en la reparación del ADN (Osaki *et al.*, 2011). Además, mediante un perfil transcriptómico identificaron numerosos genes con diferentes funciones celulares que son regulados por la luz, entre ellos genes de respuesta a estrés, reparación del ADN y relacionados con el ritmo circadiano (Weger *et al.*, 2011).

En el hongo filamentoso *N. crassa*, el efecto de la luz incluye el desarrollo de esporas asexuales y estructuras sexuales, la biosíntesis de pigmentos fotoprotectores en el micelio (carotenoides) y el ritmo circadiano (Olmedo *et al.*, 2013). Específicamente el ritmo circadiano en *N. crassa* es regulado por la MAPK OS-2 (vía que regula estrés osmótico) directamente por el WCC, el cual se une de manera rítmica al promotor del gen *os-4* y resulta en la acumulación de la proteína OS-4, la cual es una MAPKKK que participa en la activación de esta vía. Asimismo,

el gen *hpt-1*, también se expresa rítmicamente, pero con efecto opuesto a la activación de la vía de la MAPK OS-2 (Lamb *et al.*, 2011) (Figura 6).



**Figura 6. Modelo de la regulación circadiana de la vía de la MAPK OS.** Una sola flecha indica control directo y múltiples flechas control indirecto. El tamaño de HPT-1, OS-4 y OS-2 refleja su relativo nivel durante el día y la noche (Imagen modificada de Lamb *et al.*, 2011).

En *A. nidulans* las respuestas generadas por estrés osmótico y oxidativo, son regulados a través del sistema de dos componentes y la cascada de la MAPK SakA. Sin embargo, la MAPK SakA también es activada por fosforilación en presencia de luz roja vía el fitocromo FphA, el cual interactúa con YpdA; ya que, en cepas mutantes carentes del gen del fitocromo, la vía de la MAPK SakA fue capaz de activarse en respuesta a estrés osmótico, pero no a la luz (Yu *et al.*, 2016).

En *Trichoderma* spp. se han identificado tres vías de señalización MAPK, denotadas como Tmk1, Tmk2 y Tmk3, relacionadas con el micoparasitismo, desarrollo filamentoso, integridad de la pared celular y respuesta a estrés (Medina-Castellanos *et al.*, 2014). Recientemente se demostró que la vía de MAPK Tmk3 en *T. atroviride*, la cual regula múltiples respuestas de estrés, también es regulada por la luz, ya que en cepas mutantes carentes de *tmk3* se observó una reducción de



80% en la producción de conidios, además de ser necesaria para la represión e inducción de genes regulados por luz azul (Esquivel-Naranjo y col., 2016).

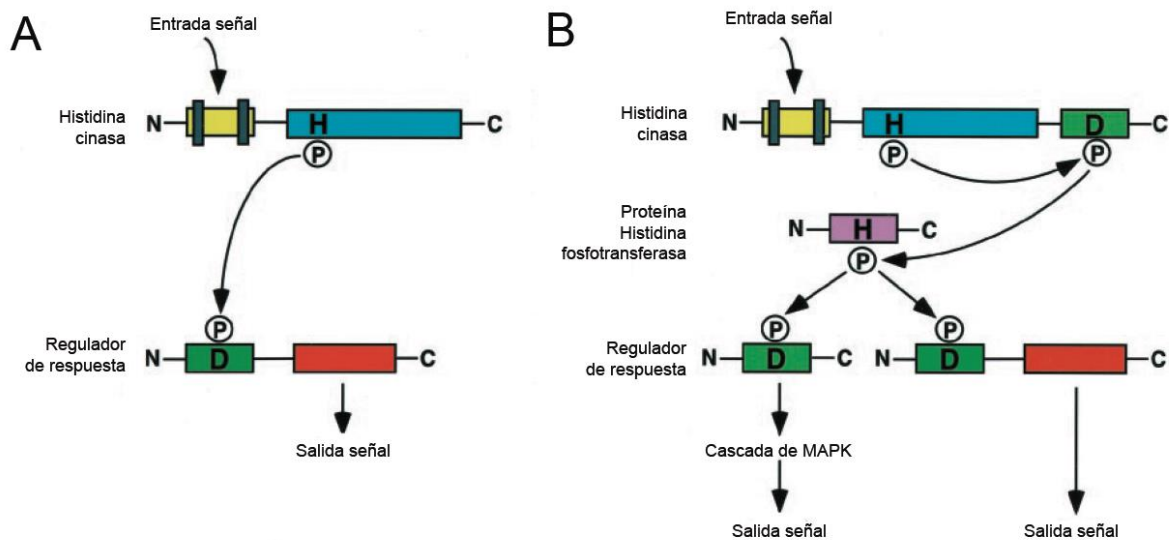
En *S. cerevisiae* la MAPK HOG1, ortólogo de Tmk3 en *T. atroviride*, es activada por dos vías diferentes: uno que actúa a través de la MAPKKK Ste11, y el segundo a través del sistema de dos componentes (Sln1-Ypd1-Ssk1) y la MAPKKK Ssk2/Ssk22. Una vez activada la MAPKKK, ésta activa la MAPKK Pbs2 y finalmente activa la MAPK HOG1 por eventos de fosforilación reversible. De acuerdo con el análisis funcional realizado en mutantes carentes de la MAPKKK Ste11 en *T. atroviride*, la regulación de las respuestas en diferentes tipos de estrés difiere de la mutante carente de la MAPK Tmk3, así como en la producción de conidios y la regulación de la expresión de genes por luz azul (Calcáneo-Hernández, 2016), lo cual sugiere que la activación de la MAPK Tmk3 es solo a través del sistema de dos componentes.

## **II.5 Sistema de Transducción de Señales de dos Componentes**

Los organismos continuamente interactúan con su ambiente y detectan los cambios ambientales; una respuesta apropiada a éste es crucial para su supervivencia y adaptación (Mascher *et al.*, 2006; Medina-Castellanos *et al.*, 2014). El procesamiento de los estímulos externos es llevado a cabo por un mecanismo que detecta y amplifica estas señales, para generar respuestas específicas (Buelow y Raivio, 2010).

Los sistemas de transducción de señales de dos componentes (TCTS: two-component signal transduction systems), compuestos por histidina cinasas y reguladores de respuesta, son los medios predominantes por los cuales los organismos detectan y responden a señales extracelulares. Estos permiten que las células se adapten a las condiciones al modificar su fisiología celular, lo que incluye iniciar la expresión génica, catalizar reacciones o modificar las interacciones proteína-proteína (Skerker *et al.*, 2005).

El sistema de dos componentes, fue descrito por primera vez en bacterias, posteriormente fue encontrado en hongos y plantas, pero no ha sido identificado en mamíferos y es un importante mecanismo para la transducción de señales (Bem *et al.*, 2015; Chapeland-Leclerc *et al.*, 2015; Chauhan, 2015). Este sistema envía las señales detectadas a través de la fosforilación sucesiva de dos proteínas en residuos de aminoácidos conservados de histidina y aspartato. Este sistema consiste en un sensor histidina cinasa (HK) unida a la membrana y un regulador de respuesta (RR) citoplasmático (Bem *et al.*, 2015; Nemhauser y Torii, 2016) (Figura 7-A). Además de estos dos componentes, muchos eucariotas tienen un tercer componente, una proteína histidina fosfotransferasa (Hpt) (Tang *et al.*, 2017) (Figura 7-B).



**Figura 7. Representación esquemática del sistema de dos componentes y el fosforelevo.** (A) En la vía de dos componentes en bacterias, se transfiere el grupo fosfato entre la proteína histidina cinasa y el regulador de respuesta. (B) En el sistema de fosforelevo de His-to-Asp de múltiples pasos, en hongos y plantas, la proteína fosfotransferasa sirve como un receptor y donador del grupo fosfato entre la proteína histidina cinasa híbrida y el regulador de respuesta. En *S. cerevisiae*, el sistema de dos componentes está conectado a la cascada de la MAPK Hog1 (Imagen modificada de Hwang *et al.*, 2002).

La HK actúa como un sensor ambiental, el cual regula y coordina la transducción de señales para controlar las respuestas a los cambios ambientales

(Besant *et al.*, 2003). Estas vías de transducción de señales tienen funciones en respuesta al estrés, resistencia a fungicida, desarrollo, osmorregularidad, morfogénesis y virulencia (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2015; Schmoll *et al.*, 2016). Las proteínas RR, son el último elemento del sistema de dos componentes (Zschiedrich *et al.*, 2016).

En bacterias, esta vía regula distintos procesos, incluyendo la virulencia y resistencia a los fármacos (Kruppa y Calderone, 2006). En hongos, parece ser una estrategia para percibir y responder al estrés ambiental, tales como cambios en osmolaridad, temperatura, hipoxia y nutrientes (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2015). Cuando los hongos detectan señales de estrés, algunos RR se conectan con otros sistemas de señalización como la vía de las MAPKs y son capaces de activarla río abajo para establecer una apropiada respuesta (Chauhan, 2015; Salas-Delgado *et al.*, 2017).

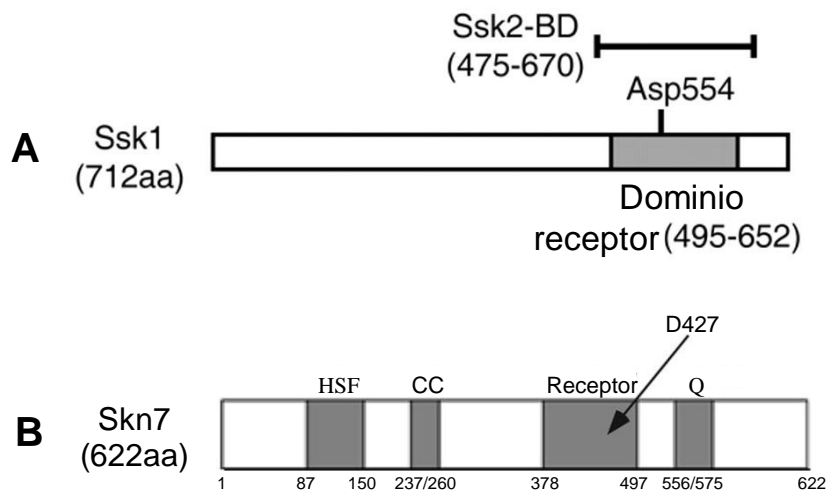
En *S. cerevisiae*, el TCS comprende a Sln1 (HK), Ypd1 (Hpt) y dos RR (Ssk1 y Skn7). La proteína Ypd1 transfiere, río abajo el grupo fosfato que recibe de Sln1 a Ssk1 y Skn7. El RR Ssk1 es desfosforilado bajo condiciones hiperosmóticas y controla la activación de la vía de MAPK Hog1, mientras que Skn7 funciona como un factor de transcripción que consiste en un dominio N-terminal de unión a ADN tipo HSF y un dominio receptor C-terminal, confiriendo regulación de la actividad transcripcional de Skn7 (Tang *et al.*, 2017) (Figura 8).

Los hongos patógenos usualmente tienen menos RR que HK, con excepción de *C. albicans* que tiene cuatro RR: Ssk1, Skn7, Srr1 y Rim15. En *C. albicans*, Ssk1 es requerido para responder a estrés oxidativo, biosíntesis de la pared celular, patogénesis, mientras que Skn7 para el estrés oxidativo y morfogénesis. Recientemente, Srr1 fue localizado en la mitocondria y juega un rol importante en el desarrollo de hifas, respuesta a estrés, virulencia y apoptosis (Chauhan, 2015).

El RR Skn7 es altamente conservado entre hongos y contribuye a la integridad de la pared celular, esporulación, estrés osmótico y oxidativo en levaduras y hongos filamentosos, aunque los roles exactos en adaptación contra

estrés oxidativo y la virulencia varía considerablemente en diferentes hongos (Tang *et al.*, 2017).

En el hongo patógeno de plantas *A. alternata*, la MAPK HOG1 es activada por Ssk1 bajo condiciones de hiperosmolaridad, mientras que Skn7 está involucrado en respuestas a estrés oxidativo y patogénesis. El RR Skn7 regula genes en condiciones de baja osmolaridad y Ssk1 es esencial en respuesta a estrés y colonización (Yu *et al.*, 2016).



**Figura 8. Representación esquemática de los dominios de los reguladores de respuesta en *S. cerevisiae*.** (A) Diagrama del RR Ssk1, el dominio receptor es fosforilado en el Asp554, y es el sitio de interacción con la MAPKKK Ssk2. (B) Dominios del RR Skn7. HSF, dominio de unión a ADN parecido a HSF, en la región N-terminal. CC, dominio coiled-coil involucrada en la interacción con algunas proteínas. Receptor, dominio que experimenta la fosforilación en el aminoácido aspartato en el regulador de respuesta. Q, dominio C-terminal rico en glutamina (Imagen modificada de Horie *et al.*, 2008 y He *et al.*, 2009).

Cabe mencionar que a diferencia de *S. cerevisiae*, donde la MAPKKK Ste11 y MAPKKK Ssk2/Ssk22 regulan la activación de la MAPK Hog1, se ha demostrado en otros organismos modelo como en *C. albicans*, *A. nidulans* y *C. neoformans*, la activación de la MAPK Hog1 es regulada solo a través de la MAPKKK Ssk2 y el sistema de dos componentes (Cheetham *et al.*, 2007, Furukawa *et al.*, 2005, Bahn *et al.*, 2007). Además, es importante mencionar, que el TCS de *S. cerevisiae* está compuesto por una sola HK, Sln1, a diferencia de los hongos filamentosos en los

cuales se han identificado muchas más, como en *A. nidulans* donde han identificado 15 HKs (Hagiwara *et al.*, 2007), y en el análisis del genoma de *T. atroviride*, se han identificado 12 HKs (Calcáneo-Hernández, 2016). Por lo que sugiere, que deben existir diferencias en la percepción de los estímulos ambientales por las HKs, que son transmitidos a los reguladores de respuesta río abajo, para posteriormente activar la vía de la MAPK en respuesta a estrés.

### III. JUSTIFICACIÓN

Recientemente se determinó en *Trichoderma atroviride* la función de la MAPK Tmk3 en las respuestas al estrés y a la luz azul; sin embargo, se desconocen los mecanismos río arriba para la activación de la vía de señalización frente a cada estímulo estresante. Datos recientes sugieren que la MAPKKK Ste11 no es el activador de la MAPK Tmk3, lo que sugiere que la activación es a través de la MAPKKK Ssk2 y el sistema de transducción de señales de dos componentes.

Con la finalidad de determinar los estímulos de estrés percibidos por las 12 histidinas cinasas (HKs), de las cuales no se conoce su función, se estudiaron la MAPKKK Ssk2 y los RR Ssk1 y Skn7, los cuales son las proteínas que reciben las señales de las 12 HKs, para determinar su implicación en la activación de la MAPK Tmk3 y en las respuestas al estrés y a la luz azul.

### IV. HIPÓTESIS

Los RR Ssk1 y Skn7, y la MAPKKK Ssk2, regulan las respuestas a diferentes tipos de estrés y a la luz azul a través de la MAPK Tmk3 en *Trichoderma atroviride*.

## **V. OBJETIVOS**

### **V.1 Objetivo General**

Determinar la participación de Skn7, Ssk1 y Ssk2 en las respuestas a diferentes tipos de estrés y la expresión de genes regulado por la luz azul en *Trichoderma atroviride*.

### **V.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar la función de los genes *skn7*, *ssk1* y *ssk2* en las respuestas a diferentes tipos de estrés celular.
2. Establecer el papel de la MAPKKK Ssk2, y los RR Ssk1 y Skn7 en la conidiación inducida por luz y daño mecánico.
3. Analizar la participación de Ssk2, Ssk1 y Skn7 en la expresión de genes regulados por la luz azul y daño mecánico.

## **VI. METODOLOGÍA**

### **VI.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo**

Se utilizó la cepa silvestre (WT) de *Trichoderma atroviride* IMI206040 y las cepas mutantes carentes de los genes *tmk3*, *pbs2* y *tmk1*. La cepa WT se utilizó para generar las mutantes carentes en los genes *ssk1*, *ssk2* y *skn7*, las cuales fueron propagadas en Medio Mínimo Vogels (2% sacarosa, 1.5% agar bacteriológico, sales Vogels 1X) y Papa-Dextrosa-Agar (PDA-Difco) y se incubaron a 27°C en una cámara iluminada con luz blanca constante (Thermo Scientific™). Los medios de cultivos empleados fueron previamente esterilizados en una autoclave a 15 psi por 15 min. La manipulación de las cepas se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

### **VI.2 Extracción y manipulación de los ácidos nucleicos**

La extracción de ADN se realizó de micelio crecido sobre placas de MMV o PDA cubiertas con celofán, crecidas en oscuridad por 48 h. El micelio se recolectó con una espátula metálica estéril y se colocó en un mortero con nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>) y se prosiguió a moler con el pistilo hasta obtener un polvo fino blanco. Se colocaron 500 µl del micelio pulverizado en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se adicionaron 600 µl 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). Los tubos se mezclaron por 2 min en vórtex y se dejaron incubar por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 600 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:48:2) y se mezclaron en vórtex por 10 min. En seguida se prosiguió a centrifugar los tubos a 10,000 rpm por 10 min. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en un nuevo tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. Se agregaron nuevamente 600 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se siguieron los pasos subsecuentes hasta la recuperación de la fase acuosa en un nuevo tubo eppendorf 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, constituidas



principalmente de ADN genómico. Se centrifugaron los tubos a 12,000 rpm por 10 min. Se observó la formación de la pastilla de ADN y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se adicionaron 500 µl de etanol al 70% y se mezclaron en vórtex. Se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos abiertos bocabajo. A continuación, se resuspendió la pastilla de ADN en 80 µl de H<sub>2</sub>O HPLC estéril. Por último, se adicionó 1 µl de RNAsa (10 mg/ml) (Invitrogen) a cada tubo y se incubó a 37°C por 20 min.

Se cuantificó el ADN de las muestras (Nanodrop) y se analizó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) con bromuro de etidio (10 mg/ml) y se visualizó en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, Bio-Rad).

### **VI. 3 Análisis *in silico* de la MAPKKK Ssk2 y los RR Ssk1 y Skn7 de *T. atroviride***

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la proteína Os-4 (MAPKKK), RRG-2 (RR) y RRG-1 (RR) de *Neurospora crassa* en la base de datos *Protein* del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Posteriormente, se realizó un BLASTp contra la base de datos del genoma de *T. atroviride* (<https://genome.jgi.doe.gov/Triat2/Triat2.home.html>), usando los siguientes parámetros: base de datos utilizada: *Trichoderma atroviride* v2.0 Gene Catalog (proteins), *Expect Value* = 1.0E-5 y usando el filtro de regiones de baja complejidad.

Para conocer los dominios en la secuencia de aminoácidos de Ssk2, Ssk1 y Skn7 en *T. atroviride*, se utilizó el programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), por medio del cual se analiza la secuencia de aminoácidos e identifica los dominios descritos en otros organismos. Se utilizaron los siguientes parámetros durante el análisis: homólogos atípicos y homólogos de estructura conocida, dominios PFAM, péptidos señales y repeticiones internas.

Asimismo, se introdujo la secuencia de aminoácidos de las tres proteínas en el programa PSORT II Prediction (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) para predecir la localización de la proteína en la célula. Así como el programa ScanProsite

(<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) para predecir el aminoácido que es fosforilado en los reguladores de respuesta.

Por otra parte, con la secuencia de aminoácidos de Ssk1 y Skn7 de *T. atroviride* se realizó un BLASTp contra la base de datos de Protein del NCBI para obtener las secuencias de aminoácidos de sus ortólogos en otros organismos. Todas las secuencias se analizaron con el programa MegAlign de Lasergene v7.1.0 (DNASTAR, Inc.), por medio del cual se realizó un alineamiento de las secuencias de las proteínas por el método *Clustal W* para determinar la conservación de los dominios entre hongos Ascomycetos, Basidiomycetos y Zigomicetos. De igual forma, con la secuencia de aminoácidos de los RR Ssk1 y Skn7, se realizó la construcción de un árbol filogenético. Se emplearon los programas Mesquite v3.51 para el alineamiento de las secuencias y el programa PAUP, para la construcción de los árboles de cada una de las respectivas proteínas.

#### **VI.4 Diseño de oligonucleótidos para la eliminación de los genes *ssk2*, *ssk1* y *skn7*.**

Después de la identificación de las proteínas Ssk2, Ssk1 y Skn7 en *T. atroviride*, se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de la base de datos del genoma, incluyendo 1,500 pares de bases (pb) de las secuencias río arriba y río abajo del marco de lectura abierto. Se utilizó el programa OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) para diseñar cuatro pares de oligonucleótidos para cada secuencia de nucleótidos obtenidos de los genes *ssk2*, *ssk1* y *skn7* de *T. atroviride* y un par de oligonucleótidos para amplificar el marcador de selección *hph* (Tabla 1, 2, 3 y 4).

**Tabla 1. Lista de oligonucleótidos para eliminar el gen *skn7*.**

No.	Secuencia blanco	Oligonucleótidos	Secuencia de nucleótidos (5' a 3')	Tamaño del amplicón (pb)
1	Promotor de <i>skn7</i>	<b>Pskn7-F</b>	GGT ACG AAC AAC GCC ATT GGC	1277
		<b>PQskn7-R</b>	GCT GCA ACA ACT GTG CCG GTG ATC GAC GTT AAC TGA TAT TGA AGG AGC A	
2	Terminador de <i>skn7</i>	<b>TQskn7-F</b>	CCC AGC ACT CGT CCG AGG GCA AAG GAA TAG ATG ATG ATT TCA CGC ACC GGT TG	1395
		<b>Tskn7-R</b>	CAG CCG TGG ATC TTC TGC TC	
3	Promotor de <i>skn7</i> anidado	<b>N5-<i>skn7</i>-F</b>	TGA TAC TGG ACG CTA ACA CAC AC	3884
	Terminador de <i>skn7</i> anidado	<b>N3-<i>skn7</i>-R</b>	GAG CCC AGG TAT TGA CAG CAT C	
4	ORF de <i>skn7</i>	<b>skn7-F</b>	GGC TGT GAT GTC GAG CAT GC	409
		<b>skn7-R</b>	GGA GGG AAT GCT CAA GTC TGT C	

**Tabla 2. Lista de oligonucleótidos para eliminar el gen *ssk1*.**

No.	Secuencia blanco	Oligonucleótidos	Secuencia de nucleótidos (5' a 3')	Tamaño del amplicón (pb)
1	Promotor de <i>ssk1</i>	<b>Pssk1-F</b>	GGA CAA CGG CAG TGA GCA GC	1442
		<b>PQssk1-R</b>	CTA CGA GTT TTG CCG TTC CCT GAT CGA CGT TAA CTG ATA TTG AAG GAG CA	
2	Terminador de <i>ssk1</i>	<b>TQssk1-F</b>	CCC AGC ACT CGT CCG AGG GCA AAG GAA TAG AGG AAG GCT CAC AGG AGG G	1341
		<b>Tssk1-R</b>	GGC TGA AGG AGG TGG AGA AG	
3	Promotor de <i>ssk1</i> anidado	<b>N5-<i>ssk1</i>-F</b>	CGA AGC AGG AGA GCA GCC AC	3979
	Terminador de <i>ssk1</i> anidado	<b>N3-<i>ssk1</i>-R</b>	GAG ATG GGC GTT GAT GTG AGG	
4	ORF de <i>ssk1</i>	<b>ssk1-F</b>	CTG ACG GCC AGC TCT CTC C	308
		<b>ssk1-R</b>	GGC AGA GGC GAT GGA GGC	

**Tabla 3. Lista de oligonucleótidos para eliminar el gen *ssk2*.**

No.	Secuencia blanco	Oligonucleótidos	Secuencia de nucleótidos (5' a 3')	Tamaño del amplicón (pb)
1	Promotor de <i>ssk2</i>	<b>Pssk2-F</b>	GTG GAT CGA GAA GCC CTT CAT G	1285
		<b>PQssk2-R</b>	CCG ACG CAG CCA GCG AAT GAT CGA CGT TAA CTG ATA TTG AAG GAG CA	
2	Terminador de <i>ssk2</i>	<b>TQssk2-F</b>	CCC AGC ACT CGT CCG AGG GCA AAG GAA TAG ACT TCT ACA TGG CGG GAT GCA G	1159
		<b>Tssk2-R</b>	CAT CAT CAT CAC CAT GTC CGC C	
3	Promotor de <i>ssk2</i> anidado	<b>N5-ssk2-F</b>	GAG CGT GGC AAG ACT GCA TG	3552
	Terminador de <i>ssk2</i> anidado	<b>N3-ssk2-R</b>	CCC TTT TGA AGC ACT GCT AAG AAG	
4	ORF de <i>ssk2</i>	<b>Ssk2-F</b>	GCT AGT CTG CTC GAG CAC G	318
		<b>Ssk2-R</b>	GTC CAT GAC TGG AAC ACC GAT G	

**Tabla 4. Lista de oligonucleótidos para amplificar el gen *hph*.**

No.	Secuencia blanco	Oligonucleótidos	Secuencia de nucleótidos (5' a 3')	Tamaño del amplicón (pb)
1	gen <i>hph</i>	<b>Hyg-F</b>	GAT CGA CGT TAA CTG ATA TTG AAG GAG CA	1397
		<b>Hyg-R</b>	CTA TTC CTT TGC CCT CGG ACG AGT GCT GGG	

## **VI.5 Generación de cepas mutantes carente de los genes *ssk1*, *ssk2* y *skn7*.**

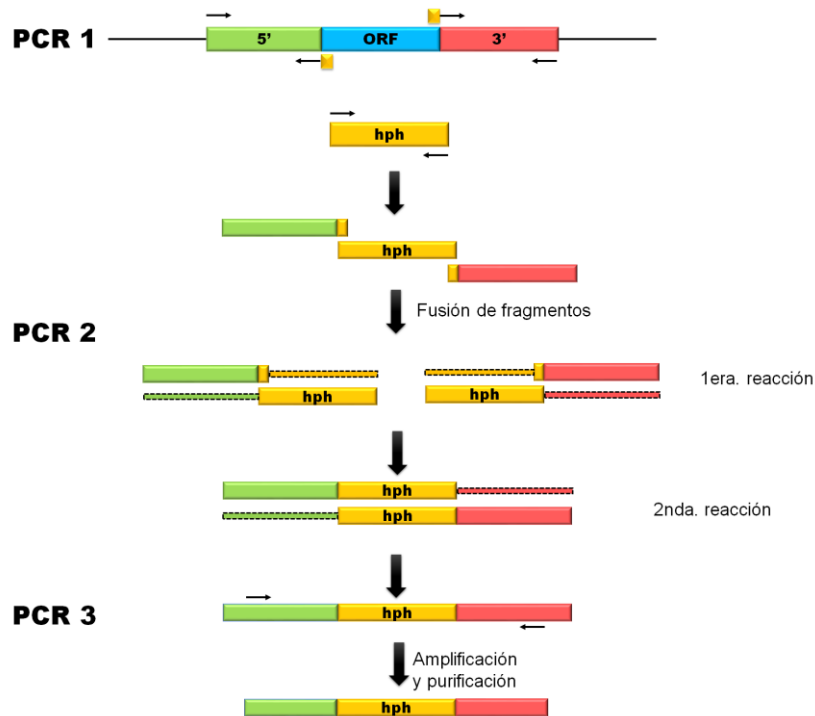
### **VI.5.1 Construcción de casetes para la eliminación de los genes *ssk1*, *ssk2* y *skn7***

La generación de las cepas mutantes carente de los genes *ssk2*, *ssk1* y *skn7* se realizó empleando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) doble unión para eliminar toda la región codificante de cada gen. La técnica consiste en la amplificación de diferentes fragmentos usando oligonucleótidos específicos mediante tres reacciones de PCR, descritas por Yu *et al.* (2004).

En un primer PCR se realizó la amplificación de la región promotora (región 5') y terminadora (región 3') de cada gen. Se utilizaron los pares de oligonucleótidos, señaladas en la Tabla 1, 2 y 3, dirigidos para las regiones indicadas, excluyendo el marco de lectura abierto de los respectivos genes. Asimismo, se realizó la amplificación del marcador de selección del gen *hph* de *Escherichia coli* con los pares de oligonucleótidos indicados en la Tabla 4. Este gen codifica para la higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia a Higromicina B en hongos. En el segundo PCR se llevó a cabo la fusión de los fragmentos de la región 5' y 3' de los respectivos genes con el marcador de selección *hph*. Para poder lograr este propósito, a los oligonucleótidos quiméricos (PQskn7-R, TQskn7-F, PQssk1-R, TQssk1-F, PQssk2-R, TQssk2-F) se les adicionó una secuencia complementaria a los extremos 5' y 3' del marcador de selección *hph*. En el tercer PCR se emplearon un par de oligonucleótidos anidados, con los cuales se realizó la amplificación de la construcción del casete de un menor tamaño, con la finalidad de obtener la construcción en mayor cantidad y darle mayor especificidad al momento de llevarse a cabo la eliminación del gen *in vivo* (Figura 9).

En las reacciones de PCR se utilizó la enzima Platinum *Taq* ADN Polimerasa High Fidelity (Invitrogen™), con las siguientes condiciones de reacción: (1) 3 min a 95 °C, 35 ciclos de: (2) 15 seg a 95 °C, (3) 15 seg a 60 °C y (4) 1min/Kb a 68 °C, y un último paso de (5) 5 min a 68 °C.

Los tres fragmentos amplificados en el PCR 1 y PCR 3, se purificaron mediante columnas de purificación, empleando el protocolo establecido del fabricante del QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN.



**Figura 9. Técnica de PCR de doble unión para eliminar las regiones codificantes de *ssk1*, *ssk2* y *skn7*.** PCR1, amplificación de las regiones 5' y 3' de los genes, así como del marcador de selección *hph*. PCR2, Fusión de los fragmentos 5' y 3' con el marcador de selección. PCR3, Amplificación del casete con oligonucleótidos anidados.

### VI.5.2 Transformación de *Trichoderma atroviride* mediante la técnica de Polietilenglicol- CaCl<sub>2</sub>

Las cepas mutantes carentes de los genes *ssk1*, *ssk2* y *skn7*, se generaron empleando la técnica de polietilenglicol-CaCl<sub>2</sub>. La transformación se llevó a cabo usando protoplastos obtenidos de germínulas de la cepa WT de *T. atroviride* y la construcción del casete obtenido por PCR para eliminar cada uno de los respectivos genes.

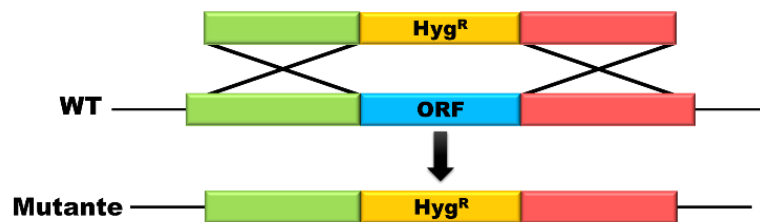
Para obtener las germínulas, se inocularon  $1 \times 10^8$  conidios de la cepa WT en 100 ml de medio estéril GEYEC (1.5% glucosa, 0.3% extracto de levadura y 0.5% hidrolizado de caseína), incubado a 27°C por 16 horas en agitación orbital constante. Posteriormente se filtraron las germínulas con ayuda de un embudo y tela magitel estéril, se recuperó con una espátula metálica estéril y se pesó 0.2 g, el cual fue colocado en un tubo falcón estéril de 50 ml con 7 ml de solución osmótica (50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 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). Se agitó vigorosamente en vórtex y se incubó a temperatura ambiente en agitación orbital constante a 120 rpm, hasta observar la formación de protoplastos en el microscopio.

Los protoplastos obtenidos fueron filtrados con tela magitel estéril, se lavaron con 3 ml de solución osmótica y se centrifugaron a 8,000 rpm por 10 minutos para su recolección. A continuación, se resuspendieron en un volumen mínimo de solución osmótica (1.2 ml) y se distribuyeron en cuatro tubos eppendorf estéril de 1.5 ml (300  $\mu\text{l}$  en cada tubo). Los tubos 1, 2 y 3 fueron empleados para la transformación de los genes *ssk1*, *ssk2* y *skn7*, y el número 4 fue empleado como control. A los tubos eppendorf 1, 2 y 3 se les procedió a añadir 29.5  $\mu\text{l}$  de solución osmótica, y en seguida 29.5  $\mu\text{l}$  de la construcción del casete para la eliminación de la región codificante de cada respectivo gen. Al cuarto tubo eppendorf se le adicionó 59  $\mu\text{l}$  de solución osmótica. Los cuatro tubos eppendorf se incubaron por 20 min en hielo y posteriormente se les añadió 359  $\mu\text{l}$  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.

Posteriormente, la mezcla de cada uno de los tubos eppendorf se vertió en tubos Falcón de 15 ml estéril con 10 ml de top agar (1 M sorbitol, 0.7% agar bacteriológico, 2% sacarosa, sales Vogels 1X), y se mezclaron por inversión suavemente. A continuación, el top agar de los tubos Falcón 1, 2 y 3 se vertieron en cajas Petri con medio selectivo (MMV, 100  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina B y 1 M de sorbitol). El top agar del cuarto tubo Falcón, se vertió en dos diferentes cajas Petri: en una primera caja con MMV 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.

Durante la transformación el evento del reemplazo génico se llevó a cabo mediante doble recombinación homóloga para insertar la construcción con el marcador de selección *hph* en el lugar del ORF de los respectivos genes (Figura 10), siendo así capaz de crecer solo transformantes resistentes al antibiótico, a las cuales se les realizó tres cultivos monospóricos en medio PDA o MMV suplementado con higromicina B (100 µg/ml).



**Figura 10. Reemplazo génico por doble recombinación homóloga en *Trichoderma atroviride*.** La interrupción del gen *in vivo* se lleva a cabo por medio del reconocimiento de las secuencias homólogas al genoma de *T. atroviride* con la construcción del casete y es incorporado por recombinación homóloga, realizándose el reemplazo del gen por el de *hph*.

### VI.5.3 Identificación de cepas mutantes carente de los genes *ssk2*, *ssk1* y *skn7*

La selección de las cepas transformantes, de cada uno de los respectivos genes, se realizó en MMV o en PDA con higromicina B (100 µg/ml). Después de tres cultivos monospóricos a las transformantes de *ssk2* y *ssk1* se les realizó un escrutinio preliminar por fenotipo de sensibilidad a estrés osmótico. Después se realizó la extracción de ADN de las cepas transformantes de los tres genes. Posteriormente, se realizó la identificación de las cepas mutantes por medio de PCR con oligonucleótidos específicos para detectar el reemplazo génico y la carencia de la región codificante de los genes de *ssk2*, *ssk1* y *skn7*.

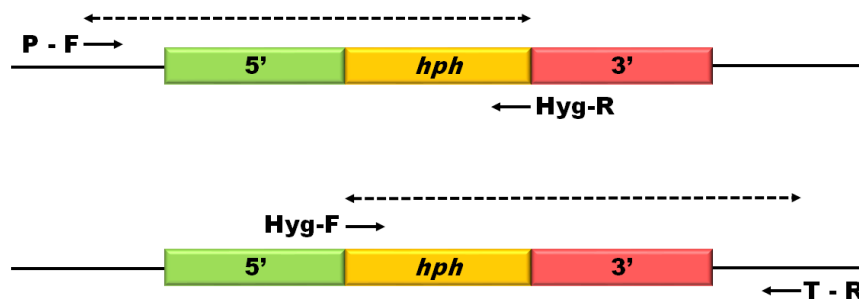
Para detectar el correcto reemplazo génico en las cepas mutantes, se realizaron dos PCR para amplificar fragmentos de la región 5' y 3' con el marcador de selección (5'-*hph*, *hph*-3'), empleando oligonucleótidos dentro y fuera de la construcción del casete (Figura 11-A). Asimismo, se realizó un tercer PCR para



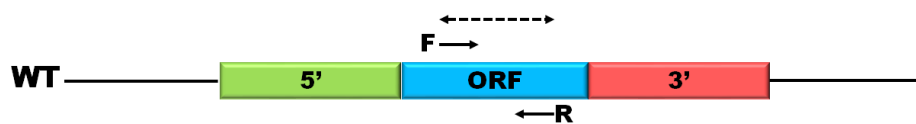
confirmar la carencia de la región codificante de cada uno de los genes, utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar el ORF de *ssk2*, *ssk1* y *skn7* (Figura 11-B).

Las condiciones de las tres reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: (1) 3 min a 95 °C, 35 ciclos de: (2) 30 seg a 95 °C, (3) 30 seg a 64 °C y (4) 1 min/Kb a 72 °C, y un último paso de (5) 5 min a 72 °C. En las reacciones de PCR se utilizó la enzima DreamTaq ADN Polimerasa (Thermo Scientific™).

**(A) PCR específicos para detectar el reemplazo génico**



**(B) PCR para determinar la carencia del gen**



**Figura 11. Identificación molecular de mutantes carentes de *ssk2*, *ssk1* y *skn7*.** (A) PCR para detectar el correcto reemplazo génico por el marcador de selección *hph* en las transformantes resistentes a higromicina B y (B) la carencia de la región codificante de los genes *ssk2*, *ssk1* y *skn7*.

**VI.6 Caracterización fenotípica de las cepas  $\Delta$ *ssk2*,  $\Delta$ *ssk1* y  $\Delta$ *skn7* en respuesta a estrés y a la luz azul**

La caracterización fenotípica de las cepas mutantes carente de los genes *ssk2*, *ssk1* y *skn7* se compararon con la cepa WT,  $\Delta$ *tmk3* y  $\Delta$ *pbs2*, con la finalidad de determinar su relación genética en la vía de señalización de la MAPK Tmk3.

Los ensayos de estrés se realizaron con conidios y micelio, y fueron sometidas a diferentes tipos de estrés como el osmótico, oxidativo, toxicidad por Cd, integridad de la pared celular, choque térmico e irradiación UV. Asimismo, se realizaron ensayos de conidiación con la cepa silvestre y las mutantes, inducido por un pulso de luz y daño mecánico, así como en luz constante. Después, se realizó la cuantificación de la producción de conidios en respuesta a estos diferentes estímulos.

### **VI.6.1 Ensayo de estrés con conidios**

La cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta skn7$ , fueron empleadas para realizar los ensayos de estrés con conidios, los cuales se llevaron a cabo en cajas Petri de 9 cm con PDA adicionadas con 0.5% de Tritón X-100 (Golden Bell) y un agente estresante específico. Para generar cada uno de los diferentes tipos de estrés, se emplearon los siguientes compuestos químicos: KCl (J.T. Baker) y sorbitol (Sigma-Aldrich) para el estrés osmótico;  $H_2O_2$  (J.T. Baker) y menadiona (Sigma-Aldrich) para generar el estrés oxidativo;  $CdCl_2$  (Meyer) para observar la toxicidad por metales pesados; rojo Congo (Sigma-Aldrich) para el análisis de la integridad de la pared celular. Las placas se inocularon con gotas de 5  $\mu$ l conteniendo 500 conidios de cada una de las respectivas cepas, se incubaron por 6 días a 27 °C en una cámara iluminada con luz blanca constante u oscuridad. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **VI.6.2 Ensayo de estrés con micelio**

Los ensayos de estrés en micelio se realizaron a partir de un preinóculo de la cepa WT y las mutantes de  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta skn7$ , los cuales crecieron en placas de PDA a 27 °C por 48 horas en oscuridad. Posteriormente, dentro de un cuarto oscuro con luz roja de seguridad, se cortaron discos de micelio de 5 mm de diámetro con un sacabocados estéril. Los discos de micelio se cortaron del frente del crecimiento y con un bisturí estéril se colocaron en la parte central de

las placas de PDA adicionada con las mismas sustancias para el estrés con conidios; excepto el Tritón X-100. Se dejaron incubar por 4 días a 27 °C en una cámara iluminada con luz blanca constante u oscuridad.

### **VI.6.3 Ensayo de sensibilidad a choque térmico**

Una suspensión de conidios de la cepa silvestre,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta skn7$ , fueron incubados a 48, 50, 52 y 54 °C en un termo-block (Labnet) durante diferentes períodos de tiempos (5, 15 y 30 min). Concluido el período, se inocularon gotas de 500 conidios en placas de PDA adicionadas con 0.5% de Tritón X-100 y se incubaron durante 4 días a 27 °C en luz constante.

### **VI.6.4 Ensayo de reparación de ADN en células tratadas con UV**

Gotas con 500 conidios de la cepa silvestre,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta skn7$  fueron inoculados en placas de PDA con 0.5% de Tritón X-100. A continuación, fueron expuesta a diferente dosis de UV-C (0, 200, 300, 400 J/m<sup>2</sup>) usando un Crosslinkers UVP modelo CX-2000, el cual emite una longitud de onda de 254 nm. Las cepas irradiadas fueron incubadas durante 4 días a 27 °C en oscuridad y en luz blanca constante.

### **VI.6.5 Determinación de la producción de conidios estimulada por un pulso de luz azul**

Los ensayos de pulso de luz azul se realizaron a partir de preinóculos de la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta skn7$ , los cuales crecieron en placas de PDA a 27 °C por 48 horas en oscuridad. En un cuarto oscuro con luz roja de seguridad se cortaron del frente de crecimiento discos de micelio de 5 mm de diámetro con un sacabocados estéril y se colocaron en la parte central de las placas de PDA por triplicado, con una diferencia de 8 h entre las cepas  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ ,

$\Delta ssk2$  y  $\Delta ssk1$ , y la cepa silvestre y  $\Delta skn7$ , para igualar el diámetro de la colonia de todas las cepas. Se dejaron incubando a 27 °C en oscuridad por 38 h. Transcurrido este período, en el cuarto oscuro con luz roja de seguridad, se procedió a aplicar un pulso de luz azul de 5 min ( $145.27 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}$ ) y se incubaron nuevamente por 48 h a 27 °C en oscuridad. Posteriormente, se colectaron los conidios de las cepas con 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril, se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ , y se cuantificaron en el microscopio óptico Leica DM500 con una cámara de Neubauer.

#### **VI.6.6 Determinación de la producción de conidios estimulada por daño mecánico**

A partir de preinóculos de la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta tmk1$ ,  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta skn7$ , crecidos en placas de PDA a 27 °C por 48 h en oscuridad, se cortaron del frente del crecimiento discos de micelio de 5 mm de diámetro, en un cuarto oscuro con luz roja de seguridad, y se colocaron en la parte central de placas de PDA por triplicado, con una diferencia de 8 h entre las cepas  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta tmk1$ ,  $\Delta ssk2$  y  $\Delta ssk1$ , y la cepa silvestre y  $\Delta skn7$ . Se incubaron a 27 °C por 38 h en oscuridad. A continuación, en el cuarto oscuro con luz roja de seguridad, se procedió a realizar un corte en el micelio con un molde (para hacer galletas) estéril y se incubaron nuevamente a 27 °C por 48 h en oscuridad para observar la producción de conidios inducida por el daño mecánico. Posteriormente, se colectaron los conidios de las cepas con 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril, se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ , y se cuantificaron en el microscopio óptico Leica DM500 con una cámara de Neubauer.

#### **VI.6.7 Determinación de la producción de conidios inducida por luz blanca constante**

Para determinar la producción de conidios en las cepas  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta skn7$  comparadas con la cepa WT,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , se realizó el ensayo en una cámara con iluminación constante a 27 °C. A partir de preinóculos crecidos en

placas de PDA a 27 °C por 48 h en oscuridad, se cortaron discos de micelio de 5 mm de diámetro, y se colocaron del frente del crecimiento en la parte central de placas de PDA por triplicado. Se incubaron durante una semana en luz blanca constante con una fluencia de 0.2238  $\mu\text{moles m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . A continuación, se colectaron los conidios de las cepas con 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril, se realizaron diluciones de 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>, y se cuantificaron en el microscopio óptico Leica DM500 con una cámara de Neubauer.

## **VI.7 Análisis de la expresión de genes por RT-PCR**

### **VI.7.1 Análisis de la expresión de genes regulados por luz azul**

La expresión de genes regulados por luz azul se analizó por RT-PCR, realizándose primero ensayos de fotoinducción a partir de preinóculos de la cepa silvestre,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta skn7$ . Se inocularon conidios en placas de PDA y se incubaron por 48 horas a 27°C en oscuridad. Posteriormente, dentro de un cuarto oscuro con luz roja de seguridad, se cortaron del frente del crecimiento discos de micelio de 5 mm de diámetro de cada una de las cepas, y se colocaron con un bisturí estéril, en la parte central de placas de PDA con celofán y se dejaron incubar por 38 h a 27 °C en oscuridad. Transcurridas las 38 h, las fotoinducciones se realizaron exponiendo a las cepas a la luz azul por 30 min (871.56  $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}$ ), en un cuarto oscuro con luz roja de seguridad. El micelio de las colonias crecidas en oscuridad bajo las mismas condiciones, fueron empleadas como control. Posteriormente, se recolectó el micelio de las cepas control y las fotoinducidas con una espátula metálica estéril, se colocó en papel aluminio, se congeló en N<sub>2</sub> (l) y se almacenó a -80 °C hasta la extracción del ARN.

La extracción del ARN total se realizó utilizando el método de Trizol (Life Technologies™). Se analizó la calidad del ARN extraído mediante electroforesis del gel de agarosa al 1%, usando como referencia el ARN ribosomal. Las muestras de ARN se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/ml) y se visualizaron en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

La síntesis del ADNc se llevó a cabo con la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific™), utilizando el protocolo del fabricante y los oligonucleótidos específicos para los genes *blu1*, *grg2*, *env1* y *phr1* (Tabla 5). Para la normalización de los datos se realizó la detección de los niveles del transcrito del gen glicolítico *gpd*, con expresión constitutiva, que codifica la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.

**Tabla 5. Lista de oligonucleótidos para el análisis de expresión de los genes fotoregulados.**

No.	Oligonucleótidos	Secuencia de nucleótidos (5' a 3')
1	<b>gpd-F</b>	GCC GAT GGT GAG CTC AAG GG
	<b>gpd-R</b>	GGT CGA GGA CAC GGC GGG A
2	<b>blu1-F</b>	CGT TGG CTC TCG CCT GAC C
	<b>blu1-R</b>	GAA CGC CAT TGA AGG CCT CG
3	<b>grg2-F</b>	GAT TCC ATC AAG CAG GGT GCC
	<b>grg2-R</b>	GTT TAG ATA GCC TGC TTG TGG G
4	<b>env1-F</b>	GCC AAA ATG GTT CCT TCA GGG TC
	<b>env1-R</b>	GTT TGG TCG AGA CAC AAG TCG G
5	<b>phr1-F</b>	TCG GAC AGC CAG GGA CAG G
	<b>phr1-R</b>	GTG ATT GAG CTG ACG CAT CGC

Por último, se realizó la amplificación del ADNc mediante un PCR, utilizando la enzima DreamTaq ADN Polimerasa (Thermo Scientific™), utilizando las siguientes condiciones de reacción: (1) 3 min a 95°C, (2) 30 seg a 95 °C, (3) 30 seg a 58 °C, correspondiendo 25 ciclos para el gen *gpd* y 30 ciclos para los genes *blu1*, *grg2*, *env1* y *phr1*, (4) 30 seg a 72 °C y (5) 5 min a 72 °C. Los amplicones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (10 mg/ml) al 1.5% y se visualizaron en un fotodocumentador de luz UV (GelDoc XR+, BIORAD).

## VI.7.2 Análisis de la expresión de genes regulados en daño mecánico

La expresión de los genes regulados por daño mecánico se analizó por RT-PCR. A partir de preinóculos de la cepa silvestre,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta tmk1$ ,  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta skn7$ , crecidas en placas de PDA por 48 horas a 27°C en oscuridad, se cortaron del frente del crecimiento discos de micelio de 5 mm con un sacabocados estéril y se colocaron con un bisturí estéril en la parte central de placas de PDA con celofán y se dejaron incubar por 38 h a 27 °C en oscuridad. A continuación, en un cuarto oscuro con luz roja de seguridad, se realizaron cortes en la superficie del micelio con un bisturí estéril y posteriormente se dejaron incubar por 30 min en oscuridad. El micelio de las colonias crecidas en oscuridad bajo las mismas condiciones sin daño mecánico, fueron empleadas como control. En seguida, se recolectó el micelio de las cepas control y las dañadas con una espátula metálica estéril, se colocó en papel aluminio, se congeló en N<sub>2</sub> (l) y se almacenó a -80 °C hasta la extracción del ARN.

La extracción del ARN total y la síntesis del ADNc se llevó conforme a lo descrito en el apartado anterior. Se emplearon los oligonucleótidos específicos para los genes inducidos por daño (Tabla 6): *iig-1* (127833) e *iig-4* (33350) (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Para la normalización de los datos se realizó la detección de los niveles del transcrito del gen glicolítico *gpd*.

**Tabla 6. Lista de oligonucleótidos para el análisis de la expresión de los genes inducidos por daño mecánico.**

No.	Oligonucleótidos	Secuencia de nucleótidos (5' a 3')
1	<b>gpd-F</b>	GCC GAT GGT GAG CTC AAG GG
	<b>gpd-R</b>	GGT CGA GGA CAC GGC GGG A
2	<b>127833-F</b>	GTG CGT GGT TGA ACG ATG TTC G
	<b>127833-R</b>	CAA AGG CAC CCT CGC GCA G
3	<b>33350-F</b>	TGG CCG AGT TGA GCG AAG C
	<b>33350-R</b>	CGT CTC CAG CAA TCC GAG C

Por último, se realizó la amplificación del ADNc mediante un PCR, utilizando la enzima DreamTaq ADN Polimerasa (Thermo Scientific™), empleando las siguientes condiciones de reacción: (1) 3 min a 95°C, (2) 30 seg a 95 °C, (3) 30 seg a 58 °C, correspondiendo 25 ciclos para el gen *gpd* y 28 ciclos para los genes *igg-1* e *igg-4*, (4) 30 seg a 72 °C y (5) 5 min a 72°C. Los amplicones se analizaron bajo las mismas condiciones, señaladas en el apartado anterior.

## **VI.8 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico y la construcción de las gráficas, se usó el programa GraphPad Prism 7 (<https://www.graphpad.com>). Las gráficas presentadas muestran el promedio de al menos tres experimentos más la desviación estándar. Se realizaron pruebas de ANOVA de una vía, utilizando los Post-test de Tukey-Kramer con valores de 0.001 y 0.05.



## VII. RESULTADOS

### VII.1 Identificación *in silico* de la MAPKKK Ssk2 y los Reguladores de Respuesta Ssk1 y Skn7 en *Trichoderma atroviride*.

Con la finalidad de determinar el papel de la MAPKKK Ssk2 y los Reguladores de Respuesta Ssk1 y Skn7 en respuestas a estrés y luz en *T. atroviride*, se obtuvo la secuencia de la MAPKKK OS-4, los RR RRG-1 y RRG-2 del organismo modelo *Neurospora crassa*, en la base de datos de Proteín del NCBI y se realizó un BLASTp contra el genoma de *T. atroviride*, para adquirir la secuencia de nucleótidos y aminoácidos. El programa ScanProsite, predijo el residuo de aspartato fosforilado para ambos reguladores de respuesta, correspondiendo a Asp404 para Skn7 y Asp346 para Ssk1, los aminoácidos receptores del grupo fosfato.

Con el programa SMART se identificaron los dominios presentes en la secuencia de aminoácidos de las tres proteínas de *T. atroviride*. En el RR Skn7 se identificaron dos dominios: HSF (Heat Shock Factor), el cual es un dominio de unión a secuencias específicas de ADN (Sorger, 1991) y REC, un dominio receptor homólogo a CheY (Hess *et al.*, 1988), así también una región Coiled-coil (Figura 12). Sin embargo, en la secuencia de aminoácidos de Ssk1 solo se identificó el dominio REC (Figura 13).

```
MSGTEATNAPGGGMNASEFVRKLFRLLEDPTHQDVARWGKDGDSFVVVEGEKFTRSILPKHFKHSNMSSFIRQL  
NKYDFHKVKPSADGESASPNGNVLEFKHPYFRVDSKDDLDNIRRKAPATRKQPVAEDFTTSQHVS AVSEQLTAT  
QQQVQQLQELFADISQTNRLLVNEVLTLLQKMLNAQKQAQYEMLNFLSPYSHNRNNGMAHQMSNNGMSSSDGD  
ENVPELRRARELLSSVAPDTVADRELERLHDIYESPADSATMVT PVSMPMLHDPMNDI SRYPVYPVGGQTVGIDP  
FHSDHINKIPYAMPNENSSGSLDQHQQHTPQPNQMNSAPGSSLDKPAPLWGPKKPIVFLVEDDGTCAKIGIKFL  
KSMGCDVEHAINGAEAYNRISAVGRDHFDLIFMDIIMPRLDGVSATMYIROHCPTTPIIAMTSNIRPDEVNGYE  
EHGMNGVLAKPFTKEGMLKSVKTHLQHLKLNPPSQSDNGHGSFMMNVPYLNTSGNPIKFESPTPPAGAGGSNW  
SSGHMSQNGVDSGFGMMDGSNQYNMTQGRNAYSTMDASSGRLSDHDSPPPEKRQRLNNSQRTYA
```



**Figura 12. Secuencia de aminoácidos y dominios presentes en el RR Skn7 de *T. atroviride*.** Los dominios se señalan con los mismos colores en la secuencia de aminoácidos y en el esquema. **HSF**: dominio factor de choque térmico (Heat Shock Factor);

**REC:** dominio receptor homologo a CheY; **Región Coiled-coil** en verde. Aminoácido fosforilado: residuo de aspartato 404 (color amarillo).

```
MAEAARKI WVTRPKASATLVTTISPNDLVDDARDMILRKYANSLGKTYDSPDLTLYLKTTRTGFSRVMGPPEEHMG
TVLEEFFPNQGMVEEAFIIDI PRNVPTPRPSPRAPLPPVSGSASAAYYADDVRPSESGEGYFPPVVGATATSPR
LPTKHPNASIPHSMVINSGLPNI P SPGASKRAHRDRENHTPSPVVHNGGVAPNPASFHPTRHSHSRTHSSS
SEHIAVHPNSTMPRSPGHEIVAAARMGPGTPPSPPPQRLVSPHLPAAARLKKSKRGQTQQQEYIQNPPPPALNAK
VPP ISVLI VEDNPINLKLLEAFVKRLKVRWQTAMNGRDAVKKWRTGGFHLVLM DIQLPGMNGLEATREIRLRE
RINGIGVFSNAPAEELPEEPTEEDRLEGLAKFKSPVIIVALTASSLQSDRHEALAAGCNDFLTKPVNFVWLE
RKVMEWGCMQALIDYQGWREWKQYSAKAEAMEAANKRAQAFKKQSRKNRTQMSES
```



**Figura 13. Secuencia de aminoácidos y dominios presentes en el RR Ssk1 de *T. atroviride*.** El dominio se señala con el mismo color en la secuencia de aminoácidos y en el esquema. **REC:** dominio receptor homologo a CheY. Aminoácido fosforilado: residuo de aspartato 346 (color amarillo).

En la secuencia de la MAPKKK Ssk2 se identificó el dominio S\_TKc, un dominio catalítico, proteína Serina/Treonina cinasa y una región Coiled-coil (Figura 14).

```
MPNTSDRAVRFSGGSDDEATSIAIIQDLKQHALLEDDSSPESNGVDLHAIQLQDELGSLNRYANAPNSLTGSLNSLPPGTHINGGPPP
RAQRSSGGEDALQAQRPKGPIRTPSNTYNPSSSRKPAAVQPQSSSEAGRSSSKTRLRGGDSRFKAQERAYVQTLRQGGYTGEYFSQY
QQPNGNESDSEGGEGEGETPSEGGPFEDRLDQEETIMFYGNDDIQPTDEDIAPVENRERLEWHGMLAEVLTGDVVKQEKRLINSTDTTA
TKAAYISELWFE LRSEACGRVPVQRRIDEGRIAVDRVLDEVINFQVKGTIEAGKPPHEQVDIVKKEKCE TLYPSWSALVGEHSTA
ESPKFLAEAYEAIMSWYNTNEMINTELSILKKWVGNEDLDFSRTKQRSPAVDGITSDASFLDKLMKEDGLQSLYNDNAKVTLLKGDVQR
GMLQPISTVIDKAKQTLIHNSVFPQKRHLPPYLDELTLTISFP SRLIEEII RTRLEYTKKLNETAQQNPLMQSOMITQFQLLLQFAIRI
KNEYLSIENPEEGWDLPPCIDDSFDQVVLEALQFYFKMLNAKLSGNKNTFKEAELLFQEWDFANEIGTSLNRGNIKVAEQFSSLT LKAF
NRLSSTFDRELQVKPEESAADMSKRYKAALDSVRVRQRLQRF SRMLSENYEHVCDFN TSLPATTQMLYDHLVASGHFQVDTRGVLES
TGIYLLASPTLRDRLYDIQTMMAITANDRYPPDTGDVYILLIRPEGTFMWIGD TVSILLKEQTVDLKRGQVRLCATGSHSLSQARKLFL
DAADMHIDLVGESRSNIHKVNTRLTEIRRVAYKLSSETFMD SVEIIRNQ TQGKDCQELIQTCFIFATEFGQRSLLYMDSNRRQMNNIKLT
KLALDWVGFICDDCMASDRRTFRWAVTALEFAMFMTGRHILGLGEEYERVRAKVGGMCAVLI SHFDIMGARSNLAAQAERER IENLV
IQFKKDKNKNMDDDEATWGIQQRVAK LDLVDL RQEKESERRALGRVLETNNEADRS LAYLSASATNVTVR WQRGQFVGGGTFGNVYA
AMNLDTGHLMAVKEIRLQDPKLIPTIAESIREEMRVLELDHPNVVSYHGIEVHRDRVYIFMEFCSGGSLASLLEHGRIEEEEVIMVYA
LQLEGLAYLHESGIAHRDIKPENILLDHNGI IKYVDFGAAKLIARQGR TMAADLHATKPNKSMTGTPMYMSPEVIKGENPGKAGSVDV
WSLGCVI LEMATGRRPWANLDNEWAIMYNIAQGNPPQLPSPEQLSPQGI DFLTKCFARDEKQRPSAIELLQHEWIMTIRNQVVEPATPS
DAGSSQSPFVSTTSTRTSIGPDGFY
```



**Figura 14. Secuencia de aminoácidos y dominios presentes en la MAPKKK Ssk2 de *T. atroviride*.** El dominio se señala con el mismo color en la secuencia de aminoácidos y en el esquema. **S\_TKc:** dominio catalítico, proteína Serina/Treonina cinasa y **Región Coiled-coil** en verde.

## VII.2 Análisis *in silico* los Reguladores de Respuesta Ssk1 y Skn7 en *Trichoderma atroviride*.

Del mismo modo, se procedió a obtener la secuencia de aminoácidos de las proteínas ortólogas a Ssk1 y Skn7 en hongos ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos, en la base de datos de Protein del NCBI para comparar la secuencia entre estos hongos.

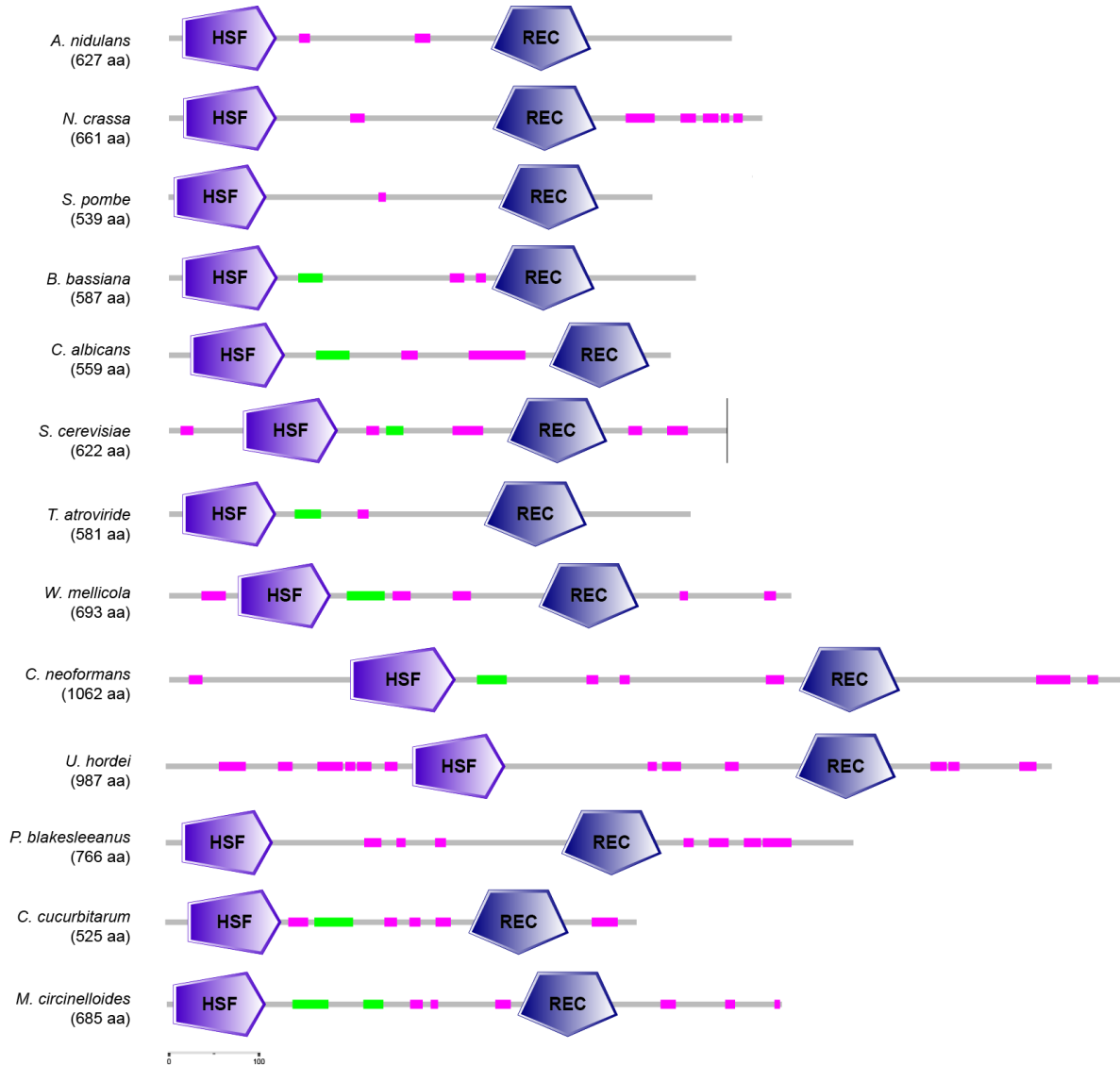
Mediante el programa SMART se identificaron los dominios de las secuencias de aminoácidos de 13 organismos y fue posible observar que en los ortólogos del RR Skn7, los dominios REC y HSF son muy conservados entre ellos; sin embargo, la región Coiled-Coil solo fue posible detectarla en *B. bassiana*, *S. cerevisiae*, *T. atroviride*, *C. albicans*, *W. mellicola*, *C. neoformans*, *C. cucurbitarum* y dos regiones Coiled-Coil en *M. circinelloides* (Figura 15).

Con la secuencia de aminoácidos de los ortólogos de Skn7, se procedió a realizar un alineamiento por el método *Clustal W* con el programa MegAlign (Lasergene, DNASTAR Inc.), para conocer la similitud entre las secuencias.

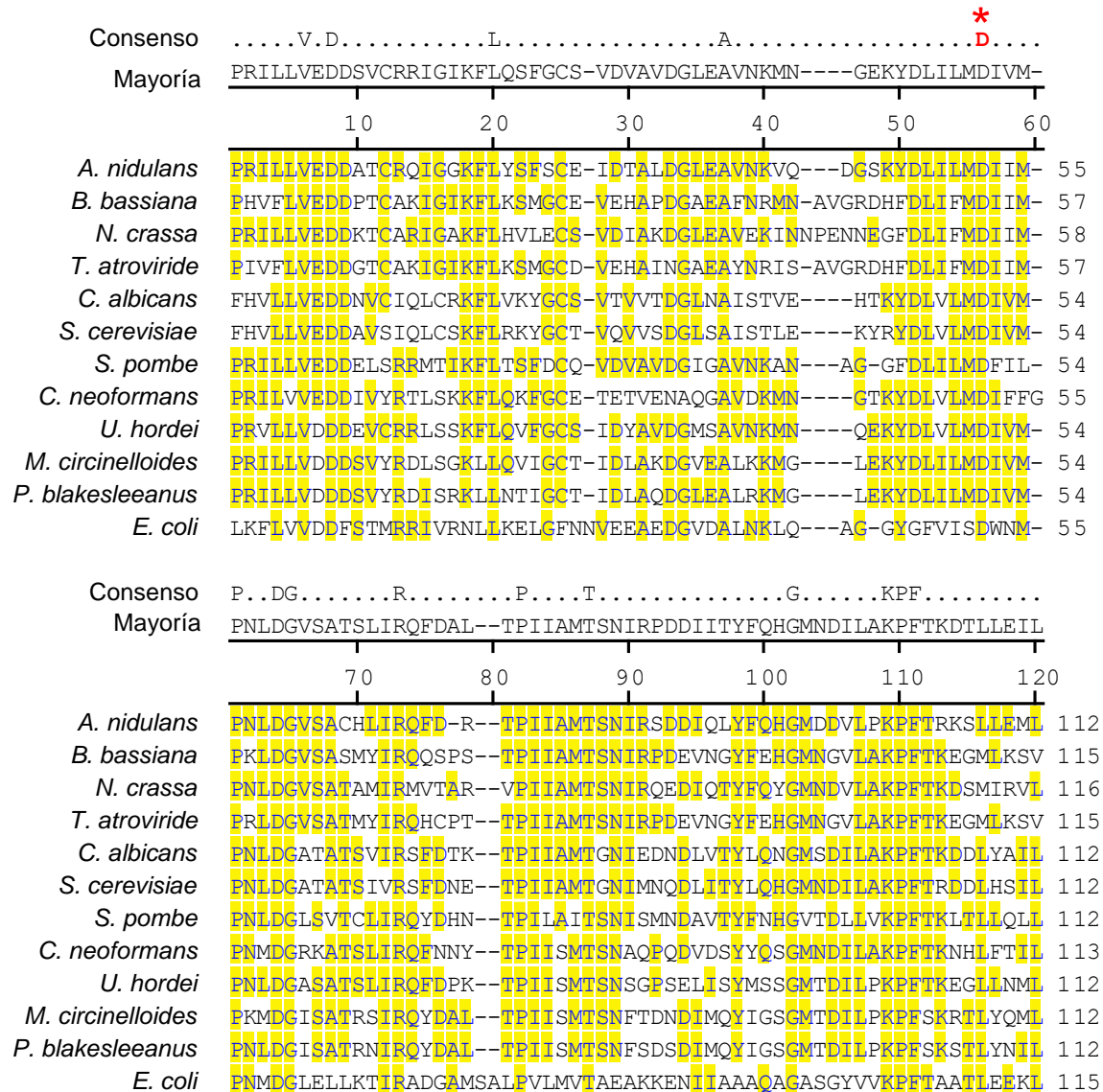
En la Figura 89 del apartado de apéndice, se muestra el alineamiento de las secuencias de los hongos, donde los recuadros amarillos señalan las zonas conservadas en la proteína, principalmente en los dominios HSF y REC. Los recuadros de color muestran los dominios y regiones encontrados en *T. atroviride*. Conforme a los organismos analizados, *B. bassiana* mostró mayor identidad con Skn7 de *T. atroviride* con 72.5%, *N. crassa* con 52.1%, *A. nidulans* con 41.4%, *W. mellicola* con 34%, *S. pombe* con 33.6%, *C. albicans* con 31.7%, *C. cucurbitarum* con 31.3%, *U. hordei* con 30.4%, *P. blakesleeanus* con 30.2%, *S. cerevisiae* con 29.4%, *M. circinelloides* con 27.6% y *C. neoformans* con 25.1%.

En la Figura 16 se muestra el alineamiento específicamente del dominio REC, en cual se analizó con el dominio REC de la proteína CheY de *E. coli*. Se señala con un asterisco, el residuo de aspartato conservado en todas las proteínas incluidas en el análisis y que corresponde al aminoácido receptor del grupo fosfato en Skn7. Asimismo, *B. bassiana* mostró mayor identidad en el dominio REC con un 88.7%, seguido de *N. crassa* con 56.5%, *A. nidulans* con 55.4%, *U. hordei* con

49.1%, *S. pombe* con 46.4%, *C. albicans* con 42.9%, *S. cerevisiae*, *C. neoformans*, *P. blakesleeanus* con 42%, *M. circinelloides* con 40.2% y *E. coli* con 25%.

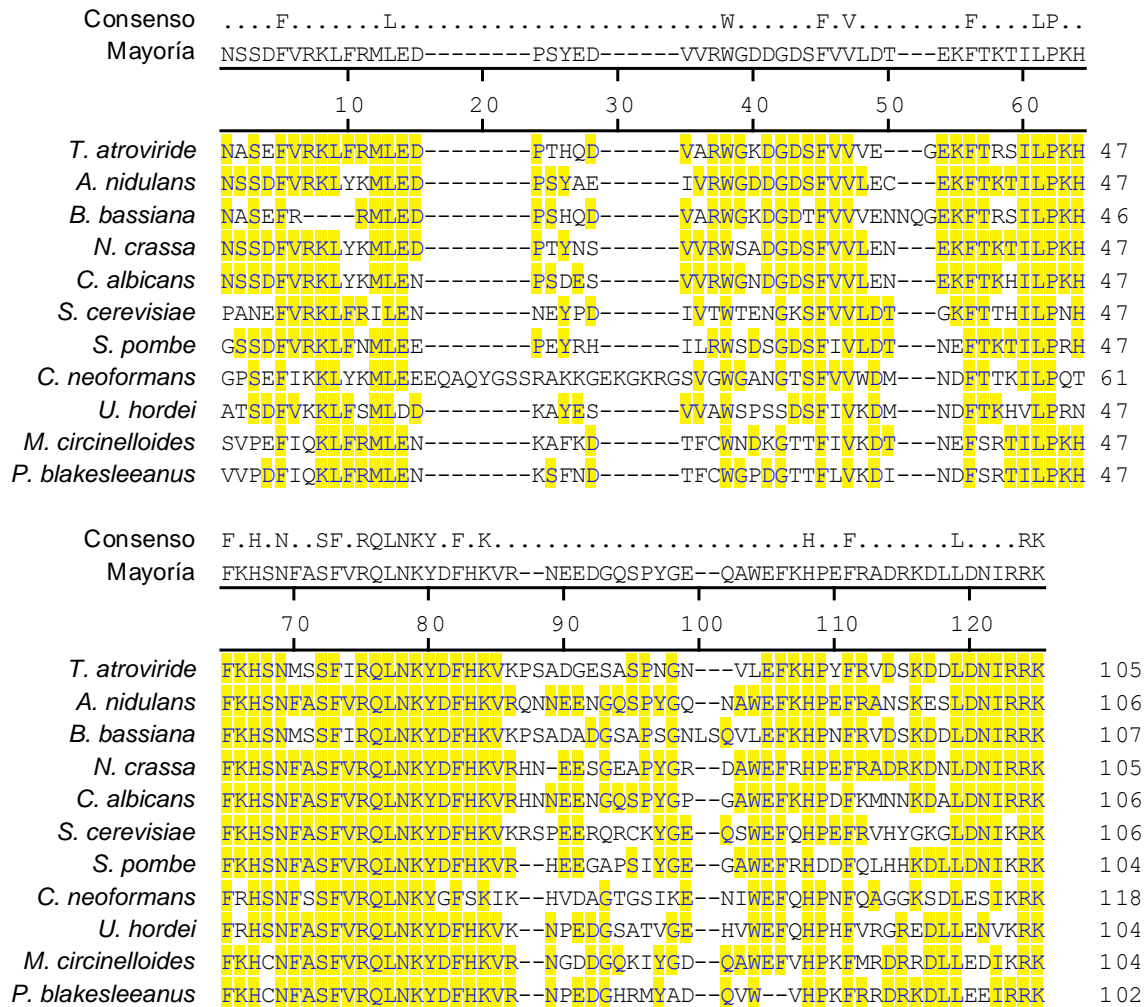


**Figura 15. Dominios presentes en los ortólogos al RR Skn7.** Los dominios HSF y REC se encuentran conservados entre los ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos. La distribución de los dominios, están bajo la misma escala.



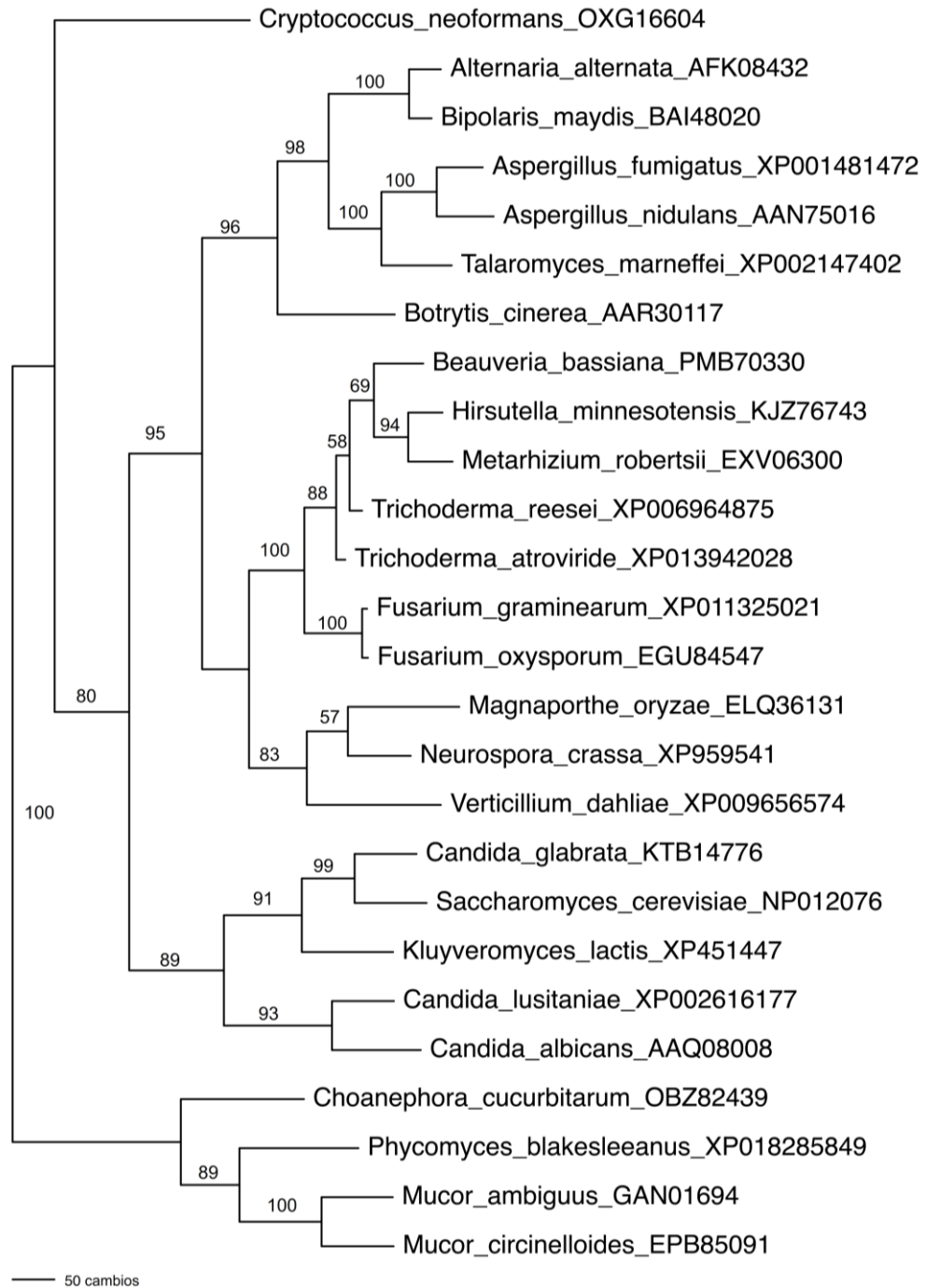
**Figura 16. Alineamiento del dominio REC del RR Skn7 en sus ortólogos.** En amarillo se resaltan los aminoácidos conservados en los dominios REC de las proteínas ortólogas a Skn7 y con un asterisco se señala el residuo conservado de aspartato que es fosforilado en *S. cerevisiae* (D427) (Brown *et al.*, 1994).

En la Figura 17 se muestra el alineamiento del dominio HSF de los ortólogos de Skn7. De igual manera, *B. bassiana* mostró mayor identidad con respecto a *T. atroviride* con un 90.1%, seguido de *N. crassa* con 67%, *A. nidulans* con 66.3%, *C. albicans* con 65.4%, *S. cerevisiae* con 56.7%, *S. pombe* con 54.9%, *P. blakesleeanus* con 52%, *M. circinelloides* con 49%, *U. hordei* con 48%, y *C. neoformans* con 46.1%.



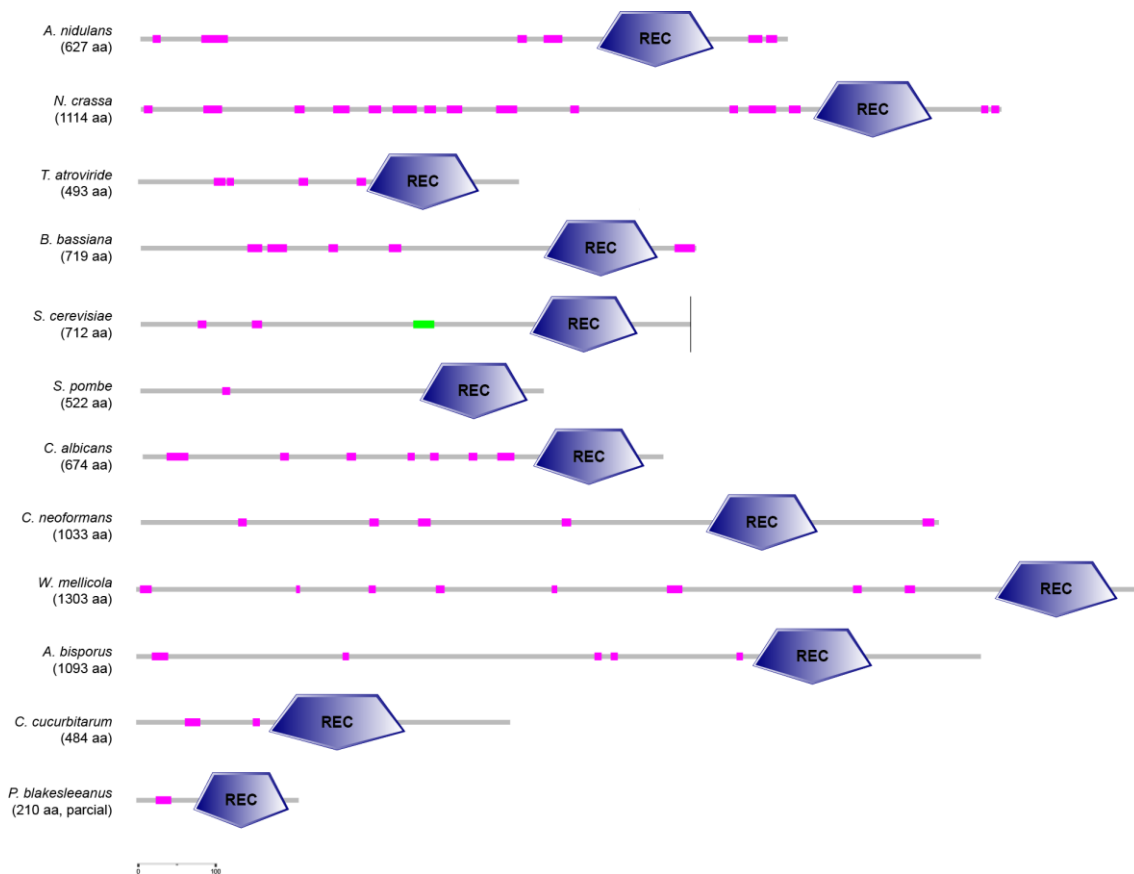
**Figura 17. Alineamiento del dominio HSF del RR Skn7 en sus ortólogos.** En amarillo se resaltan los aminoácidos conservados en los dominios HSF de las proteínas ortólogas a Skn7.

Con la finalidad de identificar a los organismos más estrechamente relacionados con *T. atroviride*, se realizó un análisis filogenético con 26 ortólogos de Skn7 con hongos Ascomycetos, Basidiomicetos y Zigomicetos (Figura 18). El RR Skn7 de *T. atroviride*, está estrechamente relacionado con *T. reesei*, *B. bassiana*, *H. minnesotensis* y *M. robertsii*. Sin embargo, aun cuando *T. reesei* está estrechamente cerca con *T. atroviride*, este se agrupa en otro linaje, probablemente debido a importantes cambios evolutivos con respecto a esta última. Asimismo, es posible observar que los hongos ascomycetos levaduriformes y filamentosos se agrupan en linajes diferentes, siendo los hongos zigomicetos el ancestro común para todos los hongos ascomycetos y basidiomicetos.



**Figura 18. Análisis filogenético de los diferentes ortólogos del RR Skn7.** Las secuencias de aminoácidos de las proteínas ortólogas de Skn7 fueron obtenidas de la base de datos de Proteína de NCBI. El alineamiento se realizó con el programa Mesquite y la construcción del árbol con el programa PAUP. La barra inferior indica el número de sustituciones de aminoácido.

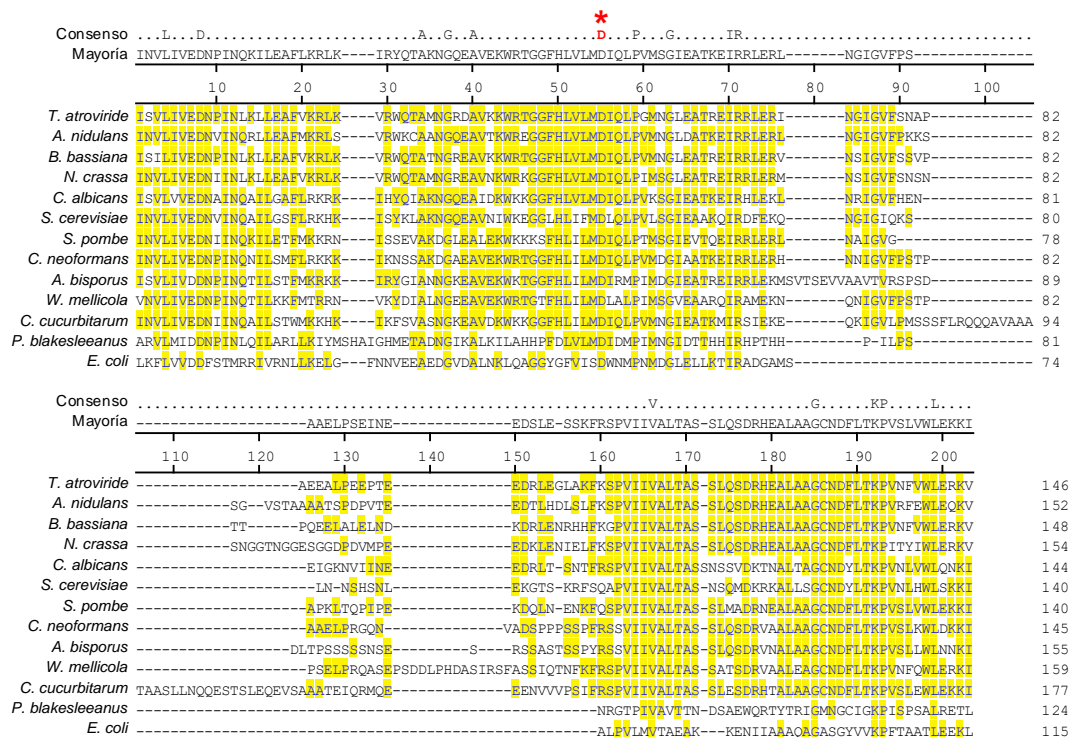
Igualmente, se identificaron los dominios de las secuencias de aminoácidos y fue posible observar que en los ortólogos del RR Ssk1, solamente el dominio REC está presente entre ellos y se identificó la región Coiled-Coil solo en *S. cerevisiae* (Figura 19). En el apartado de apéndice, la Figura 90 muestra el alineamiento de las secuencias de los hongos, los recuadros amarillos señalan las zonas conservadas en la proteína principalmente en el dominio REC y el recuadro de color muestra el dominio encontrado en *T. atroviride*. De acuerdo con el análisis, *B. bassiana* también mostró mayor identidad con Ssk1 de *T. atroviride* con 61.3%, seguido de *N. crassa* con 54%, *A. nidulans* con 49.9%, *C. cucurbitarum* con 42.5%, *S. pombe* con 41.5%, *C. albicans* con 39.3%, *C. neoformans* con 33.6%, *A. bisporus* y *P. blakesleeanus* con 32.3%, *W. mellicola* con 31.1% y *S. cerevisiae* con 28.6%.



**Figura 19. Dominios presentes en los ortólogos al RR Ssk1.** El dominio REC se encuentra conservado entre los ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos. La distribución de los dominios, están bajo la misma escala.



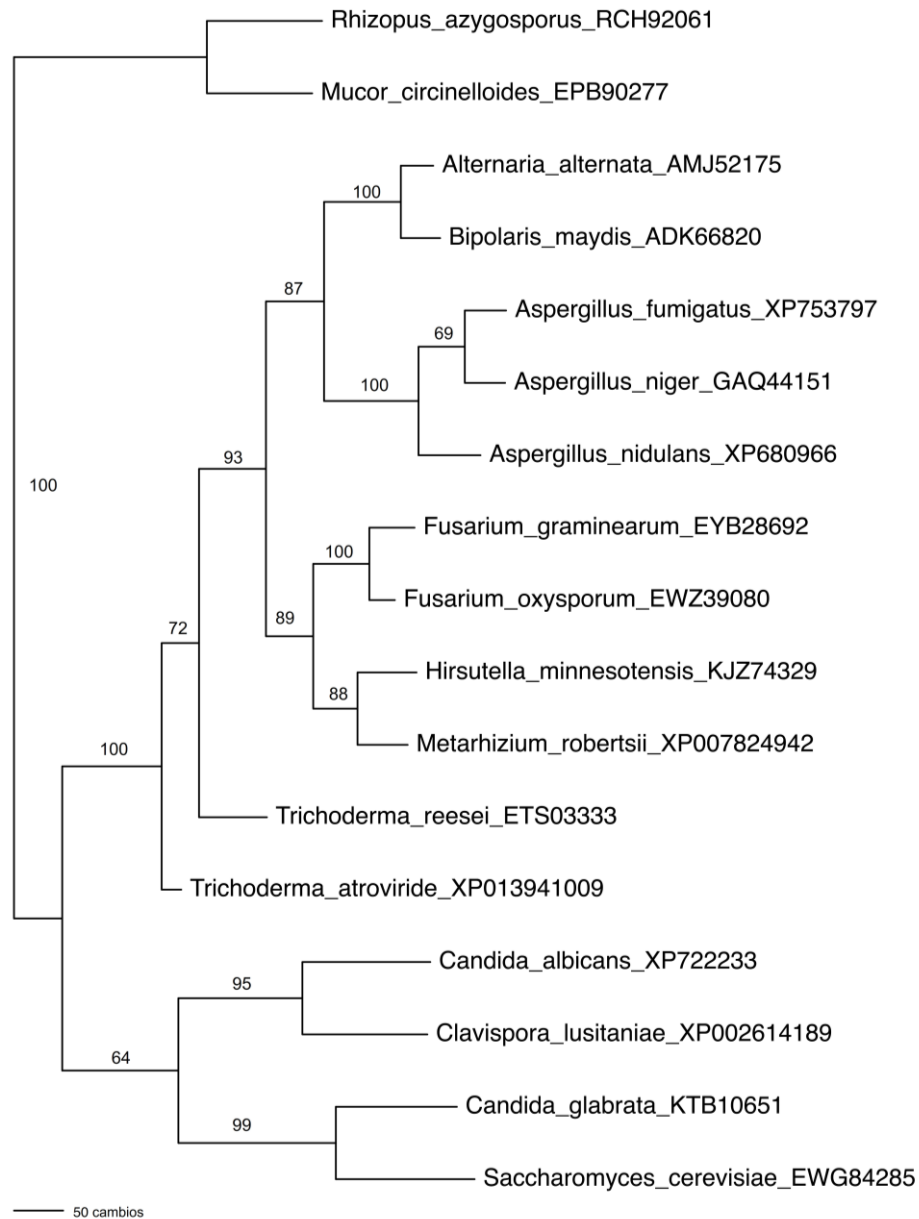
La Figura 20 muestra los alineamientos del dominio REC en los ortólogos de Ssk1, y de igual manera se analizó con el dominio REC de la proteína CheY de *E. coli*, con un asterisco se señala el residuo de aspartato conservado en todas las proteínas analizadas y que corresponde al aminoácido receptor del grupo fosfato en Ssk1. Del mismo modo, *B. bassiana* mostró mayor identidad con el dominio REC de *T. atroviride* con un 84.9%, *N. crassa* con 80.1%, *A. nidulans* con 75.3%, *S. pombe* con 61.4%, *C. neoformans* con 61.1%, *C. albicans* con 58.7%, *W. mellicola* con 58.6%, *A. bisporus* y *C. cucurbitarum* con 56.8%, *S. cerevisiae* con 47.1%, *P. blakesleeanus* con 32.5% y el más divergente fue *E. coli* con 29.2%.



**Figura 20. Alineamiento del dominio REC del RR Ssk1 en sus ortólogos.** En amarillo se resaltan los aminoácidos conservados en los dominios REC de las proteínas ortólogas a Ssk1 y con un asterisco se señala el residuo conservado de aspartato que es fosforilado en *S. cerevisiae* (D554) (Maeda *et al.*, 1994).

Asimismo, se realizó un análisis filogenético con 17 ortólogos de Ssk1 (Figura 21). El RR Ssk1 de *T. atroviride*, está nuevamente estrechamente relacionado con *T. reesei*, pero sigue siendo agrupado en otro linaje, similar a lo observado en el análisis de Skn7. De igual manera, es posible observar que los hongos ascomicetos

levaduriformes y filamentosos se agrupan en linajes diferentes, coincidiendo en esta característica con el RR Ssk1, siendo los hongos del género *Zigomicetos* el ancestro común para los hongos ascomicetos.

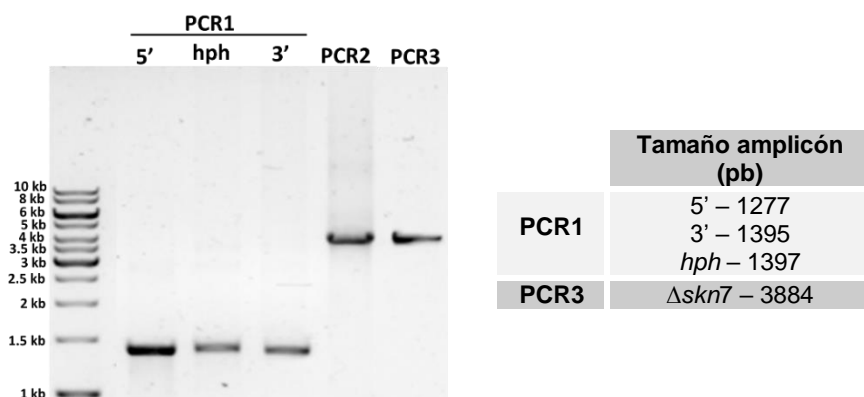


**Figura 21. Análisis filogenético de los diferentes ortólogos del RR Ssk1.** Las secuencias de aminoácidos de las proteínas ortólogas de Ssk1 fueron obtenidas de la base de datos de Protein de NCBI. El alineamiento se realizó con el programa Mesquite y la construcción del árbol con el programa PAUP. La barra inferior indica el número de sustituciones de aminoácido.

## VII.3 Análisis funcional del RR *Skn7* en *T. atroviride*

### VII.3.1 Generación de cepas mutantes carentes del gen *skn7*

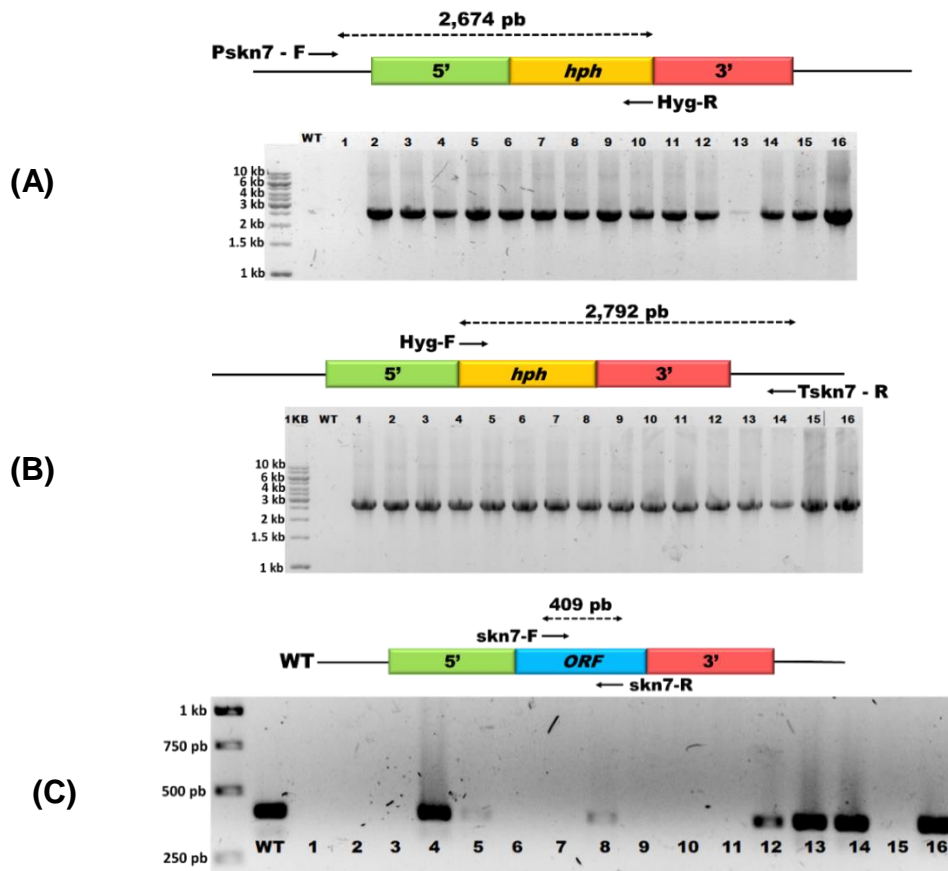
Las cepas mutantes carentes del gen *skn7*, se generaron con la técnica de PCR de doble unión, descrito en el apartado VI.5.1 de metodología, empleando los oligonucleótidos señalados en la Tabla 1 y 4. En el primer PCR, se amplificaron tres fragmentos de 1277, 1395 y 1397 pares de bases, correspondiendo a la región 5', 3' y el marcador de selección *hph*, respectivamente (Figura 22). En un segundo PCR se llevó a cabo la fusión de los tres fragmentos, y finalmente en el tercer PCR se realizó la amplificación del casete con los oligonucleótidos anidados N5-*skn7*-F y N3-*skn7*-R. En el PCR3 se amplificó un fragmento de 3884 pb que corresponde a la construcción del casete (Figura 22).



**Figura 22. Construcción del casete para eliminar el gen *skn7*.** **PCR1.** Amplificación de los fragmentos de las regiones 5' y 3' del gen *skn7*, y del marcador de selección *hph*. **PCR2.** Fusión de los tres fragmentos amplificados. **PCR3.** Amplificación del casete para la eliminación de la región codificante del gen *skn7*. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos.

La transformación se llevó a cabo con protoplastos, mediante la técnica de Polietilenglicol- $\text{CaCl}_2$ . Se obtuvieron 16 transformantes que fueron capaces de crecer en MMV con higromicina B. Se realizaron tres pases monospóricos, y posteriormente se procedió a realizar la extracción de ADN de las transformantes resistentes a higromicina B, con el objetivo de realizar la identificación molecular por PCR de las mutantes carentes de *skn7*.

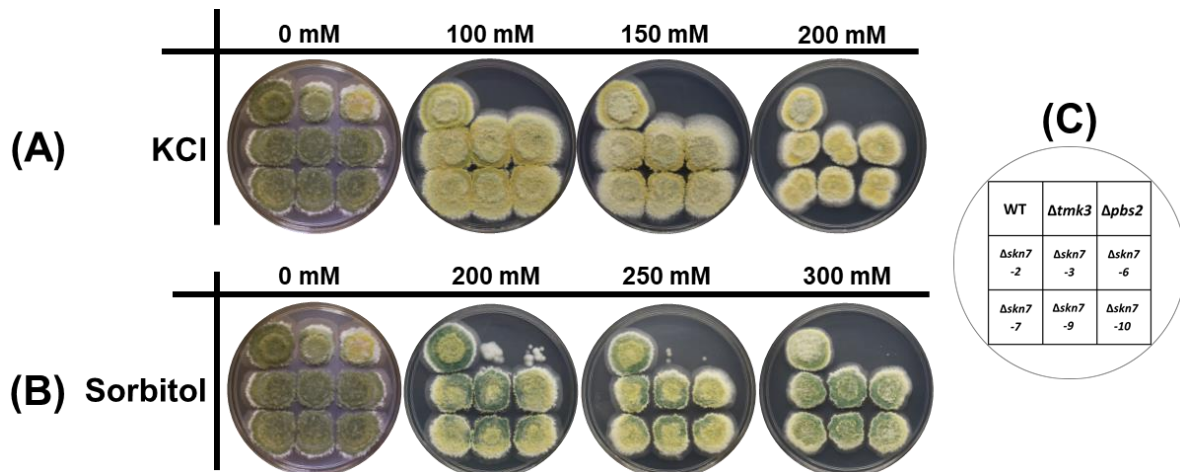
Se usaron dos pares de oligonucleótidos específicos para detectar el reemplazo del gen *skn7* por el marcador de selección *hph*, generando en las cepas mutantes amplificación de una banda de 2,674 pb en la región promotora y un amplicón de 2792 pb en la región terminadora (Figura 23-A y 23-B). Asimismo, se utilizó un tercer par de oligonucleótidos que amplificó un fragmento de 409 pb del marco de lectura abierto (ORF) del gen *skn7* en la cepa silvestre y en 7 cepas transformantes (Figura 23-C). Los resultados indicaron que se obtuvieron 8 transformantes (2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 15) que reemplazaron el gen *skn7* por el marcador de selección.



**Figura 23. Identificación del reemplazo del gen *skn7* por el marcador de selección.** PCR para detectar el reemplazo génico usando los pares de oligonucleótidos Pskn7-F con Hyg-R (A) y Hyg-F con Tskn7-R (B) en las transformantes resistentes a higromicina B. (C) Reacciones de PCR para determinar la carencia del gen *skn7*. El ADN genómico de la cepa silvestre se empleó como control en las tres reacciones de PCR. El marcador de peso molecular de 1kb se utilizó como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos.

### VII.3.2 El RR Skn7 regula negativamente la tolerancia a estrés osmótico de acuerdo con el estado de desarrollo del hongo

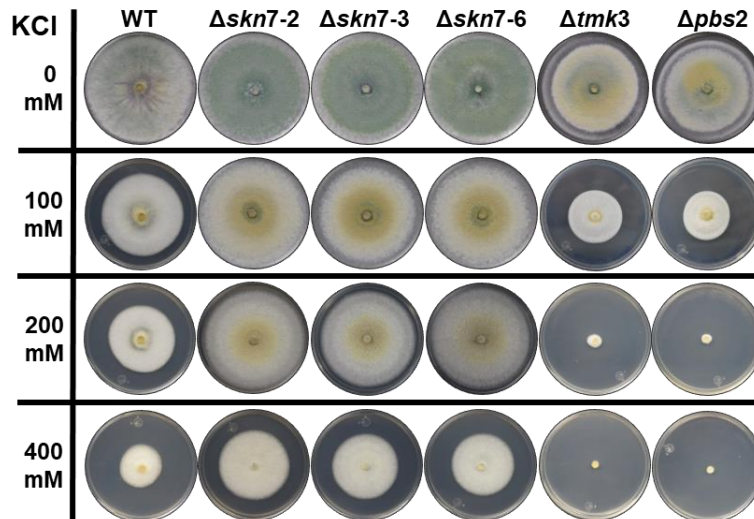
Las vías de las SAPKs son módulos importantes de señalización de estrés que se encuentran en todos los eucariotas (Smith *et al.*, 2010). En *T. atroviride*, la MAPK Tmk3 regula respuestas a estrés hiperosmótico (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). Las cepas WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta skn7$  se sometieron a condiciones de estrés osmótico usando KCl y sorbitol en diferentes concentraciones. En los ensayos con conidios, las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , mostraron letalidad a la concentración de 100 mM de KCl y 300 mM de sorbitol, mientras que las cepas de  $\Delta skn7$  fueron capaces de crecer de manera similar a la cepa WT en concentraciones de 200 mM de KCl y 300 mM de sorbitol (Figura 24). Este resultado sugiere que el RR Skn7 no regula la respuesta al estrés osmótico en conidio, siendo la vía de señalización de la MAPK Tmk3 esencial para tolerar este estrés.



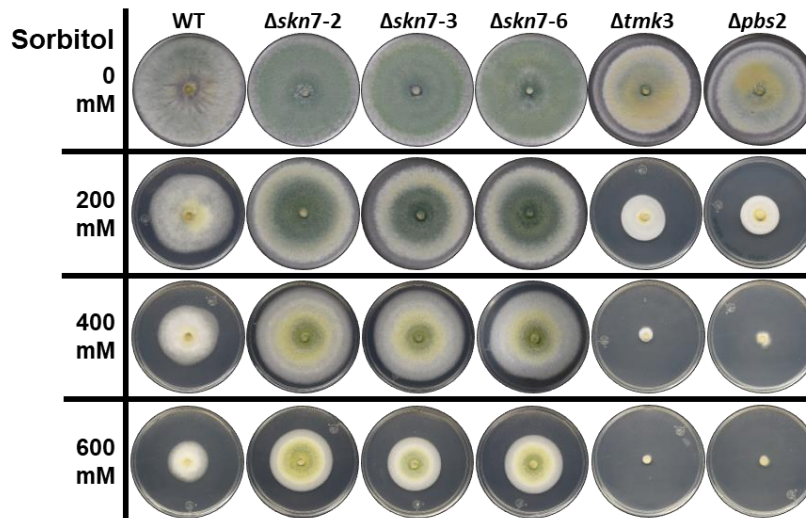
**Figura 24. Tolerancia a estrés osmótico en conidios de las cepas  $\Delta skn7$ .** En placas de PDA adicionada con 0.5% de Tritón X-100 y las concentraciones indicadas de KCl (A) y sorbitol (B), se inocularon 500 conidios de las cepas indicadas en C. Los cultivos se incubaron a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

Sin embargo, en los ensayos de estrés con micelio, las cepas mutantes de *skn7* mostraron una mayor tolerancia al estrés osmótico al comparar el diámetro de la colonia con la cepa silvestre. Las cepas de  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  mostraron letalidad a

concentraciones de 400 mM de KCl y 600 mM de sorbitol, mientras que la cepa WT y  $\Delta skn7$  fueron capaces aún de crecer, pero observándose mejor crecimiento en las tres cepas mutantes de *skn7* (Figura 25 y 26).



**Figura 25. Tolerancia a estrés osmótico por KCl en micelio de las cepas  $\Delta skn7$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con las concentraciones señaladas de KCl. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.



**Figura 26. Tolerancia a estrés osmótico por sorbitol en micelio de las cepas  $\Delta skn7$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con sorbitol con las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

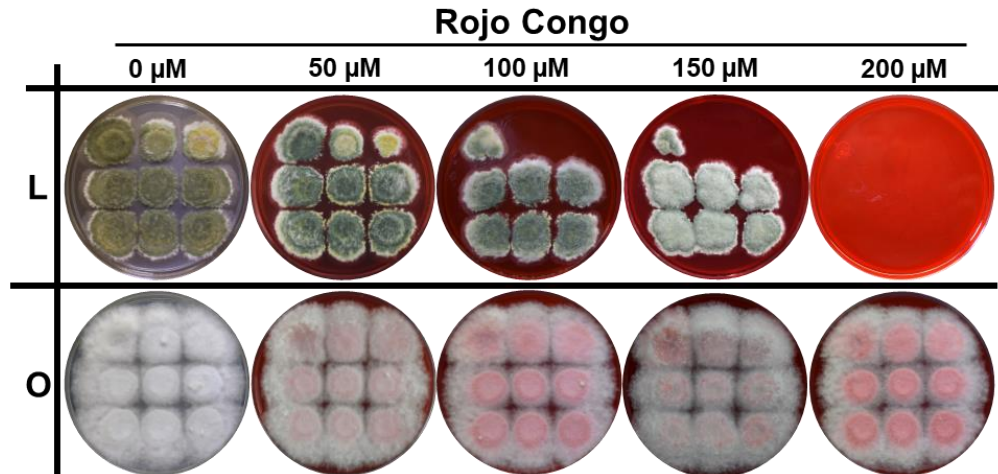
Estos resultados indican que la MAPK Tmk3 es esencial para la tolerancia a concentraciones altas de estos osmolitos tanto en conidios como en la fase vegetativa (micelio). Además, el regulador de respuesta Skn7 tiene funciones específicas de acuerdo con el estado de desarrollo en el que se encuentre el hongo, en el cual estaría actuando como un regulador negativo en el estado vegetativo.

### VII.3.3 Skn7 actúa como represor en la integridad de la pared celular

En *S. cerevisiae*, el regulador de respuesta Skn7 participa en la integridad de la pared celular (Li *et al.*, 1998), para conocer si Skn7 tiene una función similar en *T. atroviride*, se realizaron ensayos empleando rojo Congo, éste es un agente que provoca estrés sobre la pared celular, ya que interfiere con la formación de fibras de polisacáridos, al unirse al  $\beta$ -1,3-glucano, resultando en la pérdida de la rigidez de la pared celular (Kopecká y Gabriel, 1992).

Las cepas  $\Delta skn7$  se inocularon en placas de PDA con diferentes concentraciones de rojo Congo para observar su tolerancia a este colorante. En el ensayo con conidios se observó que las mutantes de *skn7* fueron capaces de crecer en 100  $\mu$ M de rojo Congo al igual que la cepa WT, siendo letal para las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ . En 150  $\mu$ M de rojo Congo, las cepas  $\Delta skn7$  fueron capaces de crecer, mientras que en la cepa silvestre se observa una drástica inhibición en su crecimiento. La concentración de 200  $\mu$ M de rojo Congo fue letal para todas las cepas (Figura 27).

De igual manera, se ha reportado que la luz es un factor que acentúa la sensibilidad al rojo Congo en las cepas carentes en *tmk3* (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016), por tal razón se realizó el ensayo con conidios en oscuridad, y se observó que todas las cepas fueron capaces de crecer hasta en la concentración de 200  $\mu$ M sin ninguna dificultad, mientras que ninguna presentó crecimiento en luz constante (Figura 27).

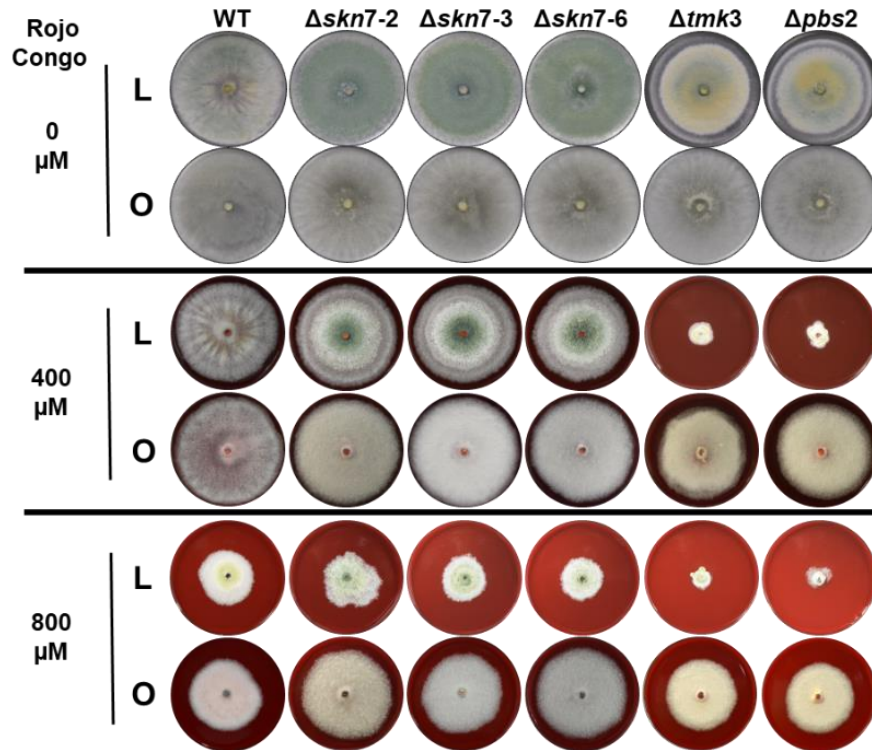


**Figura 27. Análisis de la integridad de la pared celular en conidios de las cepas  $\Delta skn7$ .** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de rojo Congo indicadas, se inocularon 500 conidios de las cepas siguiendo el orden indicado en la Figura 24-C. Los cultivos se incubaron a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

En los ensayos con micelio, se observó que las cepas mutantes carentes de *skn7* no participan en regular esta respuesta, ya que presentaron fenotipos similares a la cepa WT en las diferentes concentraciones, ya sea creciendo en oscuridad o en luz constante. Sin embargo, las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , presentaron una drástica inhibición en su crecimiento desde 400  $\mu\text{M}$  rojo Congo en luz constante. No obstante, en oscuridad  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  mostraron mayor crecimiento radial en concentraciones de hasta 800  $\mu\text{M}$  rojo Congo, contrario a lo observado cuando crecieron en condiciones de luz constante (Figura 28).

Estos datos sugieren, que Skn7 estaría actuando como un represor relacionado con vías relacionadas con la integridad de la pared celular en conidios, más no en micelio, al no observarse diferencias con la cepa WT (Figura 28). Cabe recalcar que la luz es un factor que intensifica el efecto del rojo Congo, debido a que las cepas presentan un mayor desarrollo en oscuridad y una importante inhibición al crecer en luz constante.





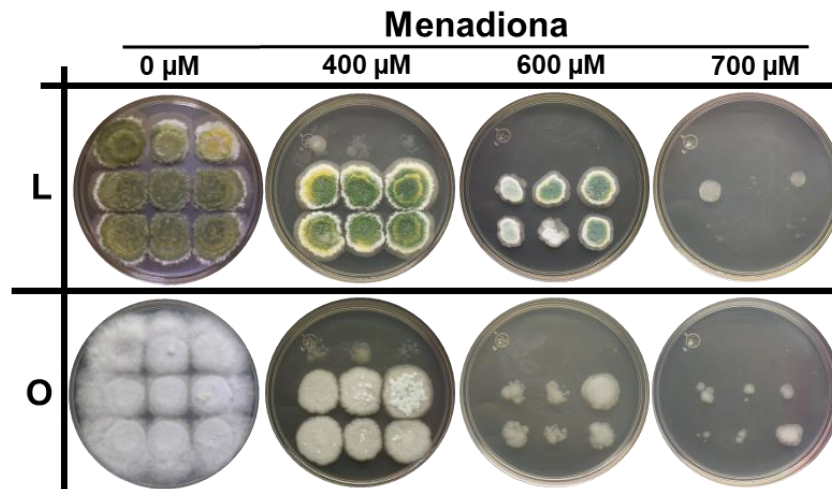
**Figura 28. Análisis de la integridad de la pared celular en las cepas  $\Delta skn7$  en estado vegetativo.** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con rojo Congo con las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

### VII.3.4 Skn7 es un represor de respuesta a estrés oxidativo

En el hongo oportunista *Aspergillus fumigatus*, Skn7 participa en la regulación de respuesta a estrés oxidativo generado por  $H_2O_2$  y *t*-BOOH, mas no por menadiona (Lamarre *et al.*, 2007). Asimismo, se ha reportado que las mutantes de *skn7* en *S. cerevisiae* son sensibles a los agentes oxidantes antes mencionados, incluyendo el cadmio, así como necesario para regular la inducción de la expresión de tiorredoxina y tiorredoxina reductasa (Morgan *et al.*, 1997). Para analizar si el RR Skn7 en *T. atroviride*, participaba en la regulación de estas respuestas, se realizaron los ensayos de estrés utilizando menadiona y  $H_2O_2$ .

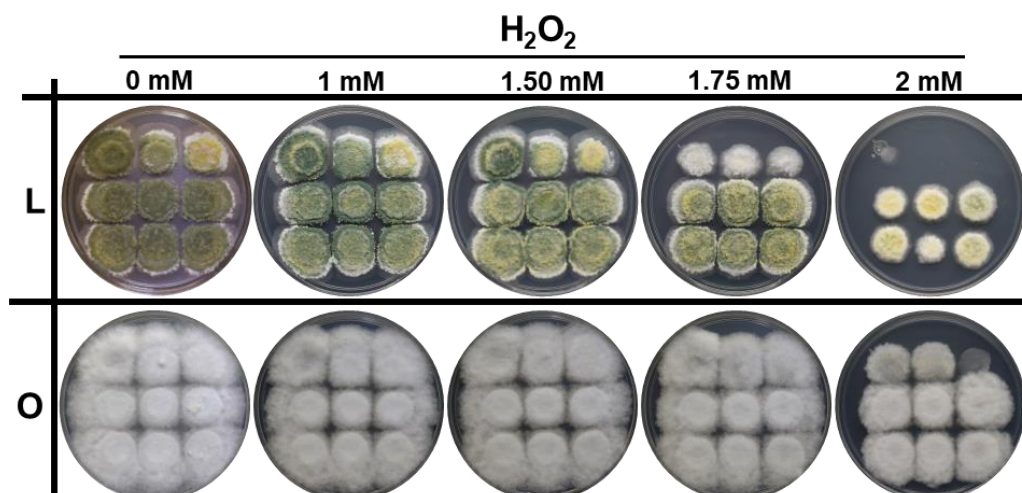
Los ensayos con conidios se realizaron en luz constante y en oscuridad. En los ensayos llevados a cabo con menadiona, se observó que las cepas  $\Delta skn7$  fueron capaces de crecer hasta en concentraciones de 700  $\mu M$ , pero letal para la cepa WT,

$\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  desde 600  $\mu\text{M}$ . Al parecer la luz, no es un elemento que este influyendo en la respuesta a este estímulo, ya que se observó el mismo comportamiento de todas las cepas creciendo tanto en oscuridad como en luz (Figura 29).



**Figura 29. Tolerancia a estrés oxidativo por menadiona en conidios de las cepas  $\Delta skn7$ .** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de menadiona indicadas, se inocularon 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 24-C. Los cultivos se incubaron a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

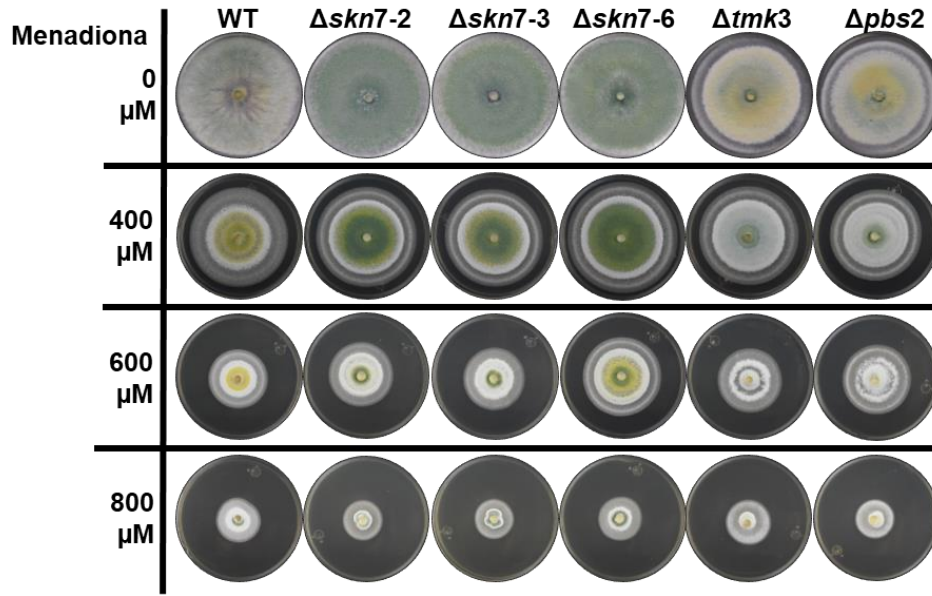
En los ensayos con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se observó que las mutantes de *skn7* fueron también tolerantes a este agente oxidante, ya que fueron capaces de crecer hasta en 2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mientras que la cepa WT mostró gran inhibición en su crecimiento y fue letal para las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  (Figura 30). De igual manera, el ensayo con este oxidante se realizó en oscuridad, donde se observó que todas las cepas crecieron hasta en 2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sin gran dificultad, por lo tanto, la luz estaría intensificando el efecto del estrés generado por este oxidante, el cual ya ha sido reportado (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016).



**Figura 30. Tolerancia a estrés oxidativo por  $H_2O_2$  en conidios de las cepas  $\Delta skn7$ .** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de  $H_2O_2$  indicadas, se inocularon 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 24-C. Los cultivos se incubaron a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

Asimismo, se realizaron dichos ensayos con micelio de las cepas WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta skn7$ . En el ensayo con menadiona, se observó que, en las tres diferentes concentraciones empleadas, el crecimiento radial de la cepa silvestre y de las mutantes fue similar (Figura 31). Por consiguiente, Skn7 no participa en regular este estímulo al igual que Tmk3, específicamente en este estado de desarrollo vegetativo del hongo, ya que se ha reportado que en *T. atroviride* la MAPK Tmk1 es la vía por la cual se lleva a cabo la regulación de este estímulo generado por menadiona (Calcáneo-Hernández, 2016).

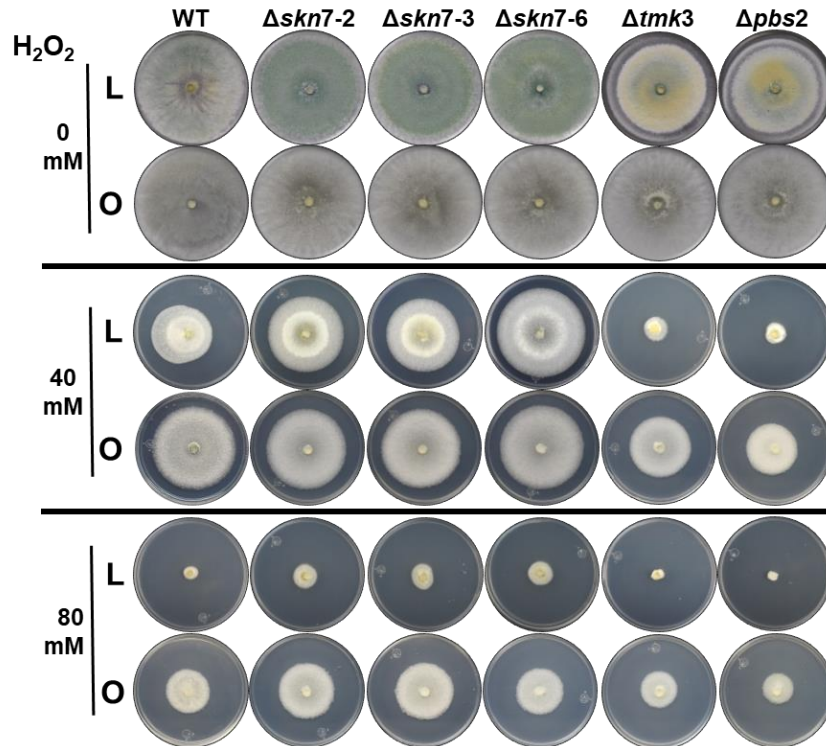
Sin embargo, cuando se realizó el ensayo usando  $H_2O_2$  se observó que las cepas mutantes de *skn7* fueron más tolerantes a 40 mM, ya que es posible percatarse de la diferencia en el tamaño del diámetro del micelio de la cepa WT y  $\Delta skn7$ , mientras que las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  mostraron una extrema sensibilidad en esta concentración, el cual ya ha sido previamente d-escrito (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). Incluso en la concentración de 80 mM de  $H_2O_2$ , fue posible observar un ligero mayor crecimiento de las cepas  $\Delta skn7$  comparado con la cepa WT (Figura 32).



**Figura 31. Tolerancia a estrés oxidativo por menadiona en micelio de las cepas  $\Delta skn7$ .** Discos de micelio fueron inoculados en placas de PDA con menadiona con las concentraciones y las cepas indicadas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

De acuerdo con lo observado en el ensayo con conidios, en el cual la luz fue un agente que incrementó el efecto de este oxidante, se procedió a realizar este ensayo de estrés, creciendo todas las cepas en oscuridad. Se observó que, en las diferentes concentraciones, todas las cepas fueron más tolerantes a este oxidante que creciendo bajo luz constante. Además, no es posible observar una notable diferencia entre la cepa WT y  $\Delta skn7$ . Asimismo, las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , aun cuando muestran inhibición en su crecimiento, fueron capaces de crecer en 80 mM  $H_2O_2$ , lo cual no ocurre cuando crecen en luz constante, donde fue letal para estas.

Estos resultados sugieren que la MAPK Tmk3, es importante para regular respuestas por estrés oxidativo, así como funciones específicas de acuerdo con el estado de desarrollo del hongo. Además, Skn7 parece estar actuando como un regulador negativo en respuesta a estos estímulos, dependiendo también del estado de desarrollo en el que se encuentra *T. atroviride*.



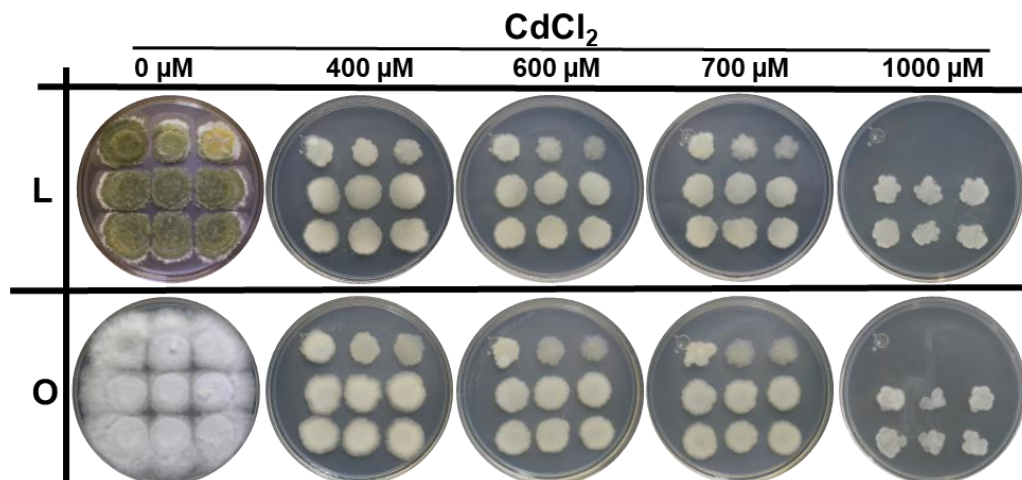
**Figura 32. Tolerancia a estrés oxidativo por  $H_2O_2$  en micelio de las cepas  $\Delta skn7$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con  $H_2O_2$  con las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

### VII.3.5 Skn7 modula negativamente la tolerancia a $CdCl_2$

El cadmio es un metal pesado muy tóxico aún en concentraciones pequeñas; su mayor efecto está asociado a la generación de estrés oxidativo, el cual genera radicales hidroxilos altamente reactivos (Vido *et al.*, 2001). En *S. cerevisiae*, las mutantes de *skn7* son significativamente más resistentes que la cepa silvestre a este metal (Lee *et al.*, 1999).

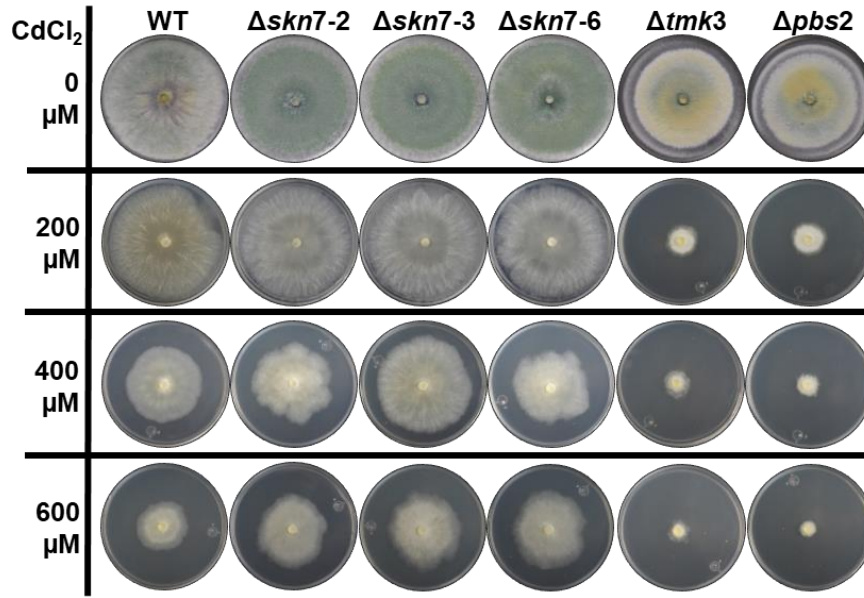
Para analizar la respuesta de Skn7 ante este estrés, las mutantes se sometieron al estrés generado por  $CdCl_2$ . En el ensayo con conidios, todas las cepas fueron capaces de crecer en las concentraciones empleadas sin gran afectación en su crecimiento, donde las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  también fueron capaces de crecer hasta en 700  $\mu M$   $CdCl_2$ , pero con un ligero menor tamaño de la colonia comparada con la cepa WT y  $\Delta skn7$ . Sin embargo, en 1000  $\mu M$   $CdCl_2$  solo

las cepas mutantes carentes de *skn7* mostraron crecimiento, siendo letal para la cepa WT,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  (Figura 33). De igual manera, este ensayo se llevó a cabo en oscuridad, con la finalidad de observar si la luz estuviese participando en acentuar el efecto del  $CdCl_2$ , y fue posible observar que no hay diferencias significativas, ya que el fenotipo fue similar al ensayo realizado en luz constante. Por consiguiente, la luz no sería un factor importante que estuviese contribuyendo al estrés generado por Cd.



**Figura 33. Tolerancia a cadmio en conidios de las cepas  $\Delta skn7$ .** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de  $CdCl_2$  indicadas, se inocularon 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 24-C. Los cultivos se incubaron a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

En los ensayos con micelio, fue posible observar que las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  presentaron gran sensibilidad a partir de 200  $\mu M$   $CdCl_2$ , contrario a la cepa WT y  $\Delta skn7$ , las cuales fueron capaces de crecer sobre toda la caja. En 600  $\mu M$   $CdCl_2$  fue posible observar una diferencia en el diámetro radial de las cepas  $\Delta skn7$  comparada con la WT (Figura 34), ya que mostraron mayor tolerancia al efecto del Cd específicamente en el estado vegetativo de *T. atroviride*.



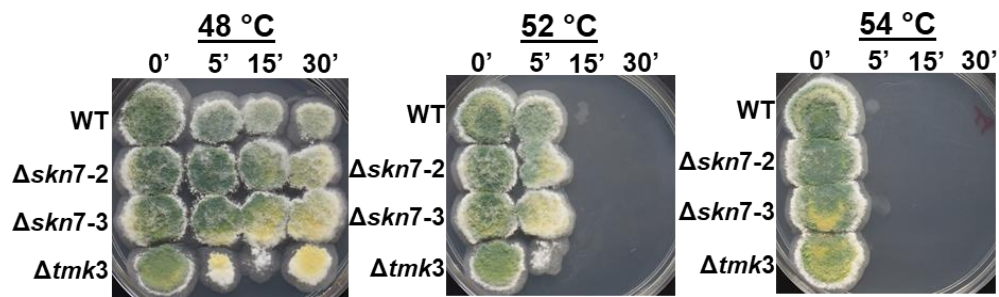
**Figura 34. Tolerancia a cadmio en micelio de las cepas  $\Delta skn7$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con las concentraciones señaladas de  $CdCl_2$ . Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

La vía de la MAPK Tmk3 en *T. atroviride*, es importante para regular respuestas al estrés generado por metales pesado, concretamente por cadmio (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). Skn7 participa en este estímulo en conidios y micelio, presentan mayor tolerancia que la cepa WT en ambos estados, datos que coinciden con lo ya reportado en *S. cerevisiae* (Lee *et al.*, 1999). Estos resultados, estarían sugiriendo la participación de Skn7 como un regulador negativo de la tolerancia a esta respuesta.

### VII.3.6 Skn7 no regula respuesta a choque térmico y daño al ADN por UV

En el hongo *Hirsutella minnesotensis*, las mutantes de *HIM-SKN7* son sensibles a altas temperaturas, mientras que su sobreexpresión permitió al hongo ser más termotolerante que la cepa silvestre (Hussain *et al.*, 2016). En *T. atroviride* se analizó la sensibilidad por choque térmico de dos cepas mutantes de *skn7*, comparándola con la cepa WT y  $\Delta tmk3$ . Se observó que, durante los tratamientos

de 5, 15 y 30 min a 48 °C, todas las cepas fueron capaces de crecer. Sin embargo, la cepa  $\Delta tmk3$  mostró mayor sensibilidad a partir de los 5 min a 52 °C, mientras que la cepa WT y  $\Delta skn7$  fueron capaces de tolerar el estrés térmico a esta temperatura sin dificultad. A partir del tratamiento de 5 min a 54 °C la cepa  $\Delta tmk3$  no fue capaz de sobrevivir; sin embargo, es posible observar un ligero crecimiento de la cepa WT y  $\Delta skn7$  (Figura 35). Al observarse el mismo fenotipo de la cepa WT y  $\Delta skn7$ , esto nos sugiere que Skn7 no participa en la respuesta ante un choque térmico como la MAPK Tmk3.

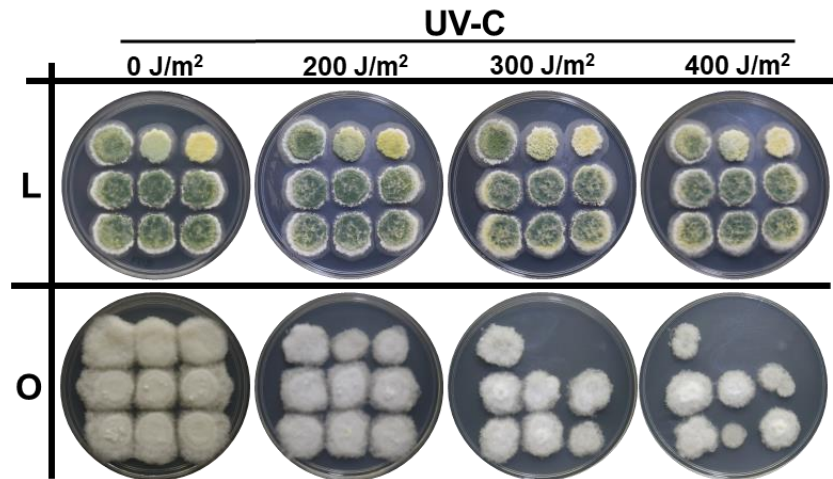


**Figura 35. Tolerancia a choque térmico con conidios de las cepas  $\Delta skn7$ .** Una suspensión de 100 conidios por  $\mu\text{l}$  fue incubada en un termo-block a la temperatura y tiempos indicados. Posteriormente, gotas de 500 conidios fueron inoculados en placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% e incubado a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

En *T. atroviride*, se ha reportado que la vía de la MAPK Tmk3 es esencial en la regulación de los sistemas de reparación de ADN que operan en la oscuridad (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). Ante esto, se realizaron ensayos con conidios de la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta skn7$ , las cuales fueron irradiadas con diferentes dosis de UV-C, y fueron incubados a 27 °C bajo luz constante y oscuridad. En condiciones de luz constante, la cepa silvestre y las mutantes fueron capaces de crecer hasta en concentraciones de 400  $\text{J}/\text{m}^2$ , lo cual nos indica que los sistemas de fotorreparación son independientes de Tmk3 y Skn7. No obstante, los ensayos realizados en oscuridad fue posible observar que a partir de la dosis de 300  $\text{J}/\text{m}^2$  fue letal para las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , pero no para la cepa WT y  $\Delta skn7$ , ya que estas fueron capaces de crecer en el tratamiento con 400  $\text{J}/\text{m}^2$  (Figura 36). Esto nos



indica que el RR Skn7, no participa en regular los sistemas de reparación de ADN en oscuridad, sino que es a través de la MAPK Tmk3.



**Figura 36. Sensibilidad a la luz UV en conidios de las cepas  $\Delta skn7$ .** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5%, se inocularon 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 24-C, posteriormente se aplicaron pulsos de luz UV-C (254 nm) con las dosis señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

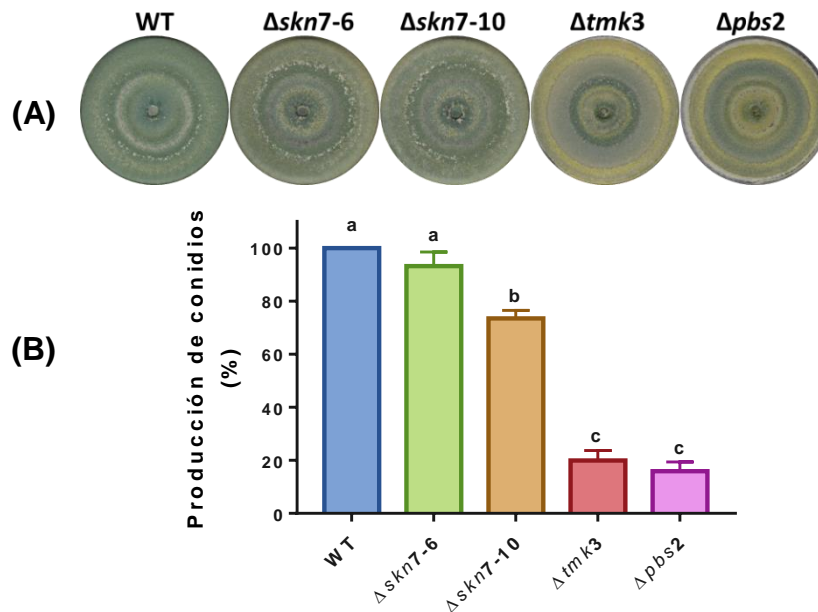
### VII.3.7 Skn7 es dispensable para la regulación de la producción de conidios por exposición a luz constante

La luz es un factor abiótico, el cual regula la reproducción asexual en *T. atroviride* (Casas- Flores *et al.*, 2004). La vía de la MAPK Tmk3 regula la conidiación inducida por luz, ya que las mutantes carentes de *tmk3* y *pbs2* tienen defectos en la producción de conidios estimulada por luz de alrededor de un 80% (Esquivel-Naranjo, 2016). Se analizó la participación del RR Skn7 en la reproducción asexual regulada por luz y se compararon con la cepa WT,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ .

Las cepas mutantes de *skn7* se crecieron en luz constante por siete días y presentaron una pigmentación verde, similar a la WT, mientras que las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  mostraban una tonalidad amarilla en este mismo tiempo de incubación (Figura 37-A). Asimismo, se realizó la cuantificación de los conidios en la cepa WT y las mutantes, en los cuales se observó en las cepas  $\Delta skn7$  hay una disminución

entre el 7-27% con respecto a la WT, mientras que en las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , la reducción de la producción de conidios fue de un 80%, coincidiendo con lo mencionado anteriormente (Figura 37-B).

Estos datos nos sugieren que el RR Skn7 no tiene una participación importante en la reproducción asexual del hongo, mientras que la MAPK Tmk3 es indispensable bajo estas condiciones.

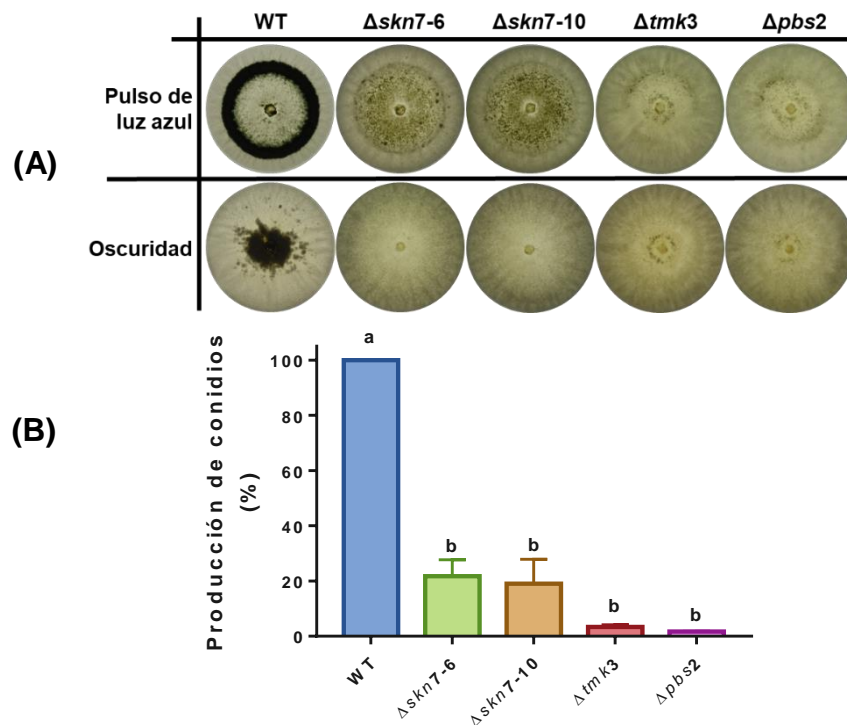


**Figura 37. Producción de conidios inducido por luz blanca constante en las cepas  $\Delta skn7$ .** (A) Fotoconidiación. Discos de micelio se inocularon en placas de PDA de las cepas indicadas, los cultivos se incubaron en presencia constante de luz blanca durante una semana a 27 °C. (B) Producción de conidios. Las barras representan los promedios de los valores  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados con el método Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

### VII.3.8 Skn7 regula la conidiación inducida por un pulso de luz azul

La producción de conidios en *T. atroviride* es regulada por la luz, no obstante, también responde a períodos cortos de exposición a la luz azul, formando un anillo de conidios (Casas-Flores *et al.*, 2004). Para analizar si Skn7 participa en la producción de conidios inducidas por un pulso de luz azul, se inocularon placas de

PDA con discos de micelio de la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta skn7$ , y después de 38 h se aplicó un pulso de 5 min de luz azul y se incubaron por otras 48 h. En la cepa WT se observó la formación de un anillo de conidios en respuesta a este corto estímulo, mientras que en las mutantes carentes en *tmk3*, *pbs2* y *skn7* no se observó la formación del anillo verde brillante característico de la producción de conidios (Figura 38-A). Sin embargo, fue posible observar que en la cepa  $\Delta skn7$  una pigmentación amarilla sobre el micelio fue más prominente que en las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ .



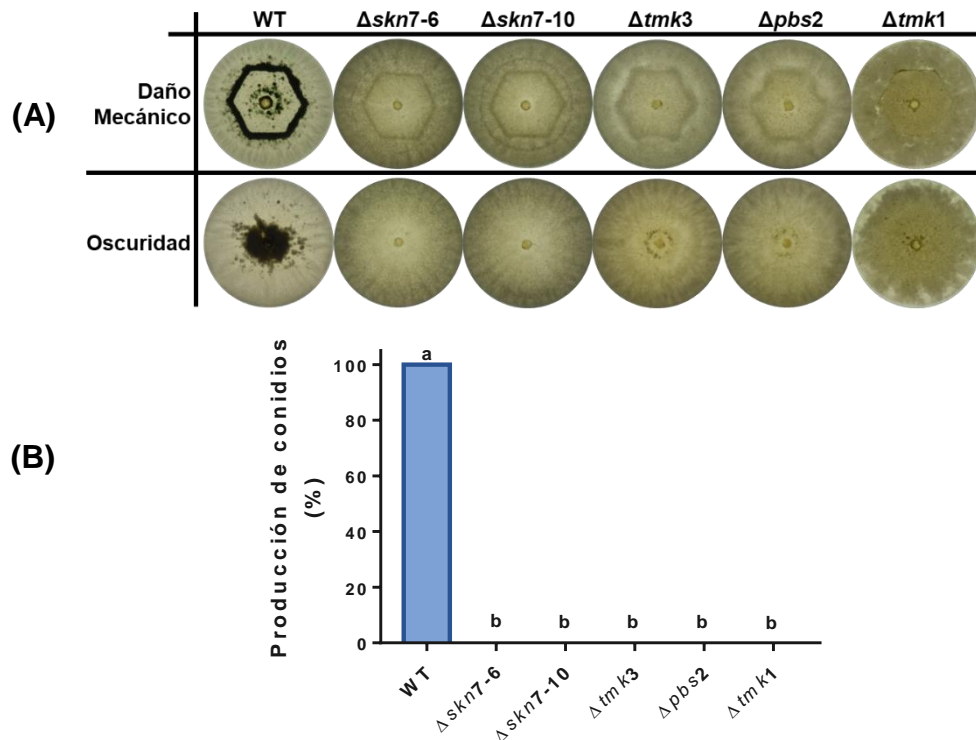
**Figura 38. Participación del RR Skn7 en la conidiación inducida con un pulso de luz azul. (A)** Conidiación inducida con un pulso de luz. Discos de micelio se inocularon en placas de PDA de las cepas indicadas y se incubaron a 27 °C durante 36 h en oscuridad, posteriormente a las colonias se les aplicó un pulso de 5 min de luz azul ( $145.27 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ ) y se volvieron a incubarse por otras 48 h en oscuridad. Control crecido en oscuridad por 4 días. **(B)** Producción de conidios estimuladas con un pulso de luz azul. Se representan los promedios de los valores  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados con el método Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

Asimismo, se realizó la cuantificación de conidios en respuesta a este estímulo con la finalidad de saber que tan afectadas se encontraban las cepas mutantes en su producción, observándose que en la cepa  $\Delta skn7$  había una disminución de aproximadamente un 80% en relación con la cepa WT, mientras que para la cepa  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  fue más severo, al haber una disminución de aproximadamente un 96% (Figura 38-B). Estos datos sugieren que Skn7 es indispensable para regular la reproducción asexual en respuesta ante un pulso de luz azul, y que Tmk3 es muy importante para que el hongo responda de manera oportuna ante este estímulo.

### VII.3.9 Skn7 regula la conidiación inducida por daño mecánico

*T. atroviride* responde al estímulo de daño mecánico mediante la producción de conidios específicamente en el área micelial donde se realizó el daño (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). En *T. atroviride*, la MAPK Tmk1 regula respuesta a daño mecánico al igual que la MAPK Tmk3, ya que las mutantes carentes de estos genes exhiben una disminución drástica en la producción de conidios (Medina-Castellanos *et al.*, 2014).

Para determinar si el RR Skn7 regula la producción de conidios específicamente a un pulso de luz o es un regulador de la reproducción asexual que participa también en la conidiación inducida por daño mecánico, se realizaron ensayos en las cuales se comparó con la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta tmk1$ . Curiosamente, las mutantes de *skn7* mostraron un fenotipo similar a la mutante de *tmk3*, *pbs2* y *tmk1*, en las cuales no se observó la formación de conidios en el área donde se realizó el daño en comparación con la WT (Figura 39-A). Estos datos sugieren que el RR Skn7 también participa en la producción de conidios inducidos por daño, probablemente con la interacción de otras vías involucradas en la respuesta a este estímulo. Asimismo, se realizó la cuantificación de la producción de conidios ante esta respuesta, y en todas las mutantes hay una disminución de aproximadamente un 99% en relación con la cepa WT (Figura 39-B).



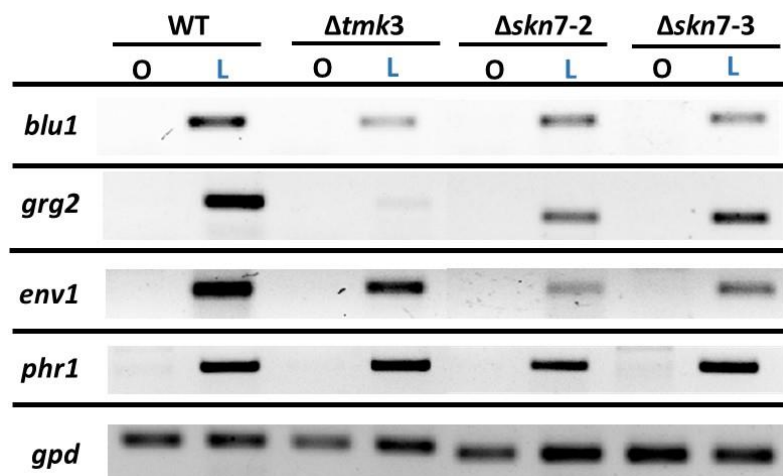
**Figura 39. Participación de Skn7 en la conidiación inducida por daño mecánico. (A)** Conidiación inducida con daño mecánico. Discos de micelio se inocularon en placas de PDA de las cepas indicadas, transcurrido 36 h se realizó cortes en el micelio con un molde y se volvieron a incubar por 48 h a 27 °C en oscuridad. Control crecido en oscuridad por 4 días. **(B)** Producción de conidios. Las barras representan los promedios de los valores  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados con el método Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

### VII.3.10 El RR Skn7 regula la expresión de genes regulados por luz

Debido a que el RR Skn7 regula respuestas tempranas a la luz azul, se analizó la expresión de genes que son inducidos por la luz tanto dependientes (*blu1* y *grg2*) como independientes (*env1* y *phr1*) de la vía de señalización de la MAPK Tmk3. Los genes *blu-1* y *grg-2* codifican proteínas reprimibles por glucosa (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016), mientras que *env1* codifica para un fotorreceptor (Schmoll *et al.*, 2005) y *phr1* una fotoliasa (Berrocal-Tito *et al.*, 2007) regulados por luz azul a través de Blr1/Blr2.

El nivel de transcrito de *blu1* en  $\Delta skn7$  fue muy similar a lo detectado en la cepa  $\Delta tmk3$ , lo cual nos sugiere que Skn7 es indispensable para su regulación.

Asimismo, la expresión del gen *grg2* se vio afectada en la cepa  $\Delta skn7$  comparado con la silvestre y éste no se detectó en las cepas mutantes de *tmk3*, indicando una implicación parcial de Skn7 en la expresión de este gen. Sin embargo, los niveles de expresión del gen *env1* se ve reducido en comparación a la WT y  $\Delta tmk3$ , sugiriendo la participación de Skn7 en la expresión de este gen. La expresión del gen *phr1* se regulan de manera independiente de la MAPK Tmk3 y del RR Skn7 (Figura 40).



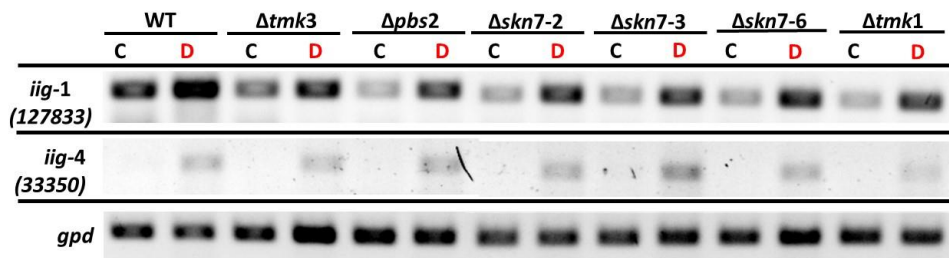
**Figura 40. Expresión de genes regulados por luz azul en las cepas  $\Delta skn7$ .** A partir de ARN total extraído de micelio de las cepas WT,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta skn7$  crecidas en oscuridad (O) o expuesto a la luz azul por 30 min (L), se sintetizó ADNc. A continuación, se amplificó mediante una reacción de PCR y los niveles de transcritos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd*. La expresión de los genes se analizó a los 30 ciclos para los genes *blu-1*, *grg-2*, *env-1* y *phr-1*, y 25 ciclos para *gpd*.

### VII.3.11 El RR Skn7 regula parcialmente la expresión de genes en daño mecánico

En el análisis transcriptómico de la respuesta temprana a daño mecánico, fueron detectados 522 genes que fueron inducidos en respuesta a este estímulo. Mediante análisis de Northern blot, los transcritos del gen *iig-1* (127833), codifica para leucotrieno B4 12-hidroxidehidrogenasa dependiente de NADP, e *iig-4*

(33350), codifica una lipoxigenasa, detectaron que se acumulan rápidamente después de 15 min de experimentar el estímulo (Hernández-Otañe *et al.*, 2012).

De acuerdo con el fenotipo presentado por las mutantes carentes en *skn7* en respuesta a daño, se procedió a analizar la expresión de estos dos genes comparándola con la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta tmk1$ . Los resultados sugieren que la expresión de *iig-1* es regulado de manera parcial por el RR Skn7 y la vía de la MAPK Tmk3 y Tmk1, al compararse con la WT, ya que la expresión de este no se ve severamente afectada. En la expresión de *iig-4*, se observó que los niveles de transcritos en las cepas  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta skn7$  fueron similares con la WT, pero en la cepa  $\Delta tmk1$ , se puede observar un bajo nivel de expresión del gen, por el que estos datos pueden sugerir que la expresión de este gen es independiente de la vía MAPK Tmk3 y Skn7, pero dependiente de la vía de la MAPK Tmk1 (Figura 41). Estos datos plantean la posibilidad de que Skn7 podría estar participando de manera parcial en regular genes específicos en respuesta a daño, en conjunto con la vía de la MAPK Tmk3.

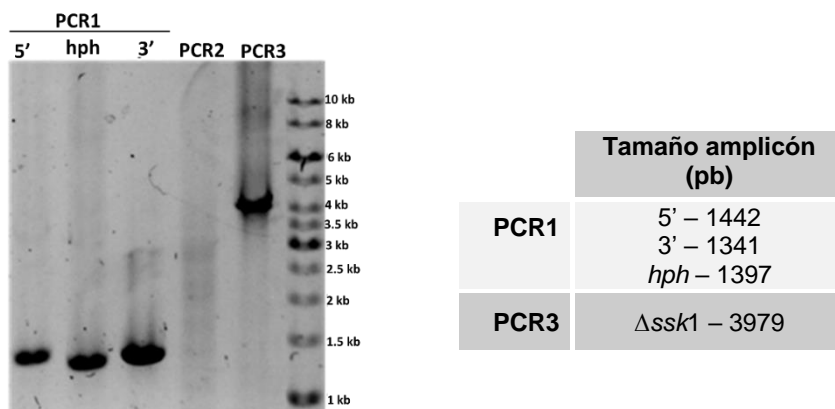


**Figura 41. Expresión de genes regulados por daño mecánico en las cepas  $\Delta skn7$ .** A partir de ARN total extraído del micelio de las cepas indicadas, crecidas en oscuridad sin daño mecánico (C) o dañadas con un bisturí después de 30 min (D), se sintetizó ADNc. Posteriormente, el ADNc se amplificó mediante una reacción de PCR y los niveles de transcritos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd*. La expresión de los genes se analizó a los 28 ciclos para *iig-1* e *iig-4*, y 25 ciclos para *gpd*.

## VII.4 Análisis funcional del RR Ssk1 en *T. atroviride*

### VII.4.1 Generación de mutantes carentes del gen *ssk1*.

Las cepas  $\Delta$ *ssk1*, se generaron con la técnica de PCR de doble unión, empleando los oligonucleótidos señalados en la Tabla 2 y 4. En el PCR1, se amplificaron los fragmentos de la región 5', 3' y el marcador de selección *hph*, de 1442, 1341 y 1397 pb, respectivamente. En el PCR2 se llevó a cabo la fusión de los tres fragmentos y finalmente en el PCR3 se amplificó de la construcción del casete usando los oligonucleótidos anidados N5-*ssk1*-F y N3-*ssk1*-R. El tamaño final de la construcción del casete fue de 3979 pb (Figura 42).

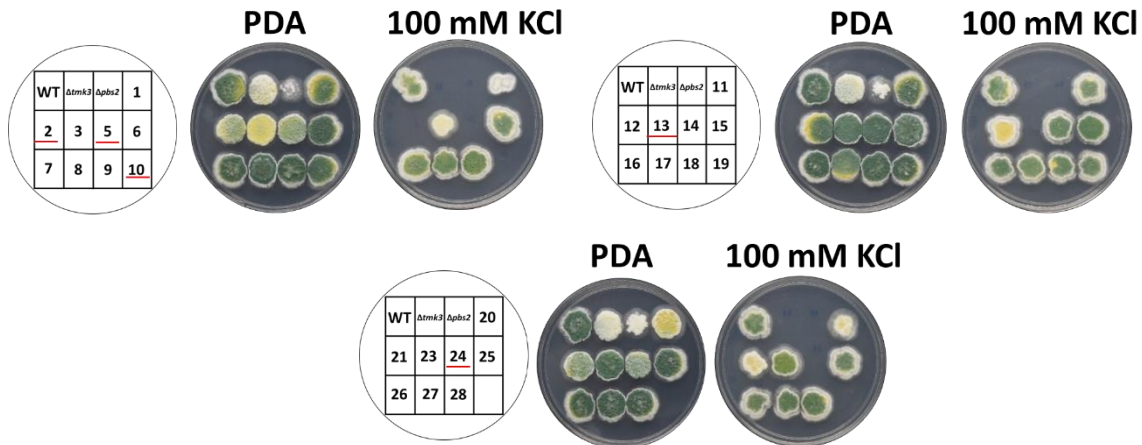


**Figura 42. Construcción del casete para eliminar el gen *ssk1*.** **PCR1.** Amplificación de los fragmentos de las regiones 5' y 3' del gen *ssk1*, y del marcador de selección *hph*. **PCR2.** Fusión de los tres fragmentos amplificados. **PCR3.** Amplificación del casete para la eliminación de la región codificante del gen *ssk1*. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados.

La transformación se llevó a cabo con protoplastos, de manera similar a lo realizado con *skn7*, de la cual se obtuvieron 28 transformantes resistentes a higromicina B. Se realizaron tres pases monospóricos en PDA con higromicina B, y después se realizó un escrutinio fenotípico por sensibilidad a estrés osmótico en medio de cultivo PDA con 100 mM de KCl. En este ensayo de estrés se observó que las transformantes 2, 5, 10, 13 y 24 fueron incapaces de tolerar el estrés provocado con KCl, mostrando un fenotipo similar a la cepa  $\Delta$ *tmk3* y  $\Delta$ *pbs2*,

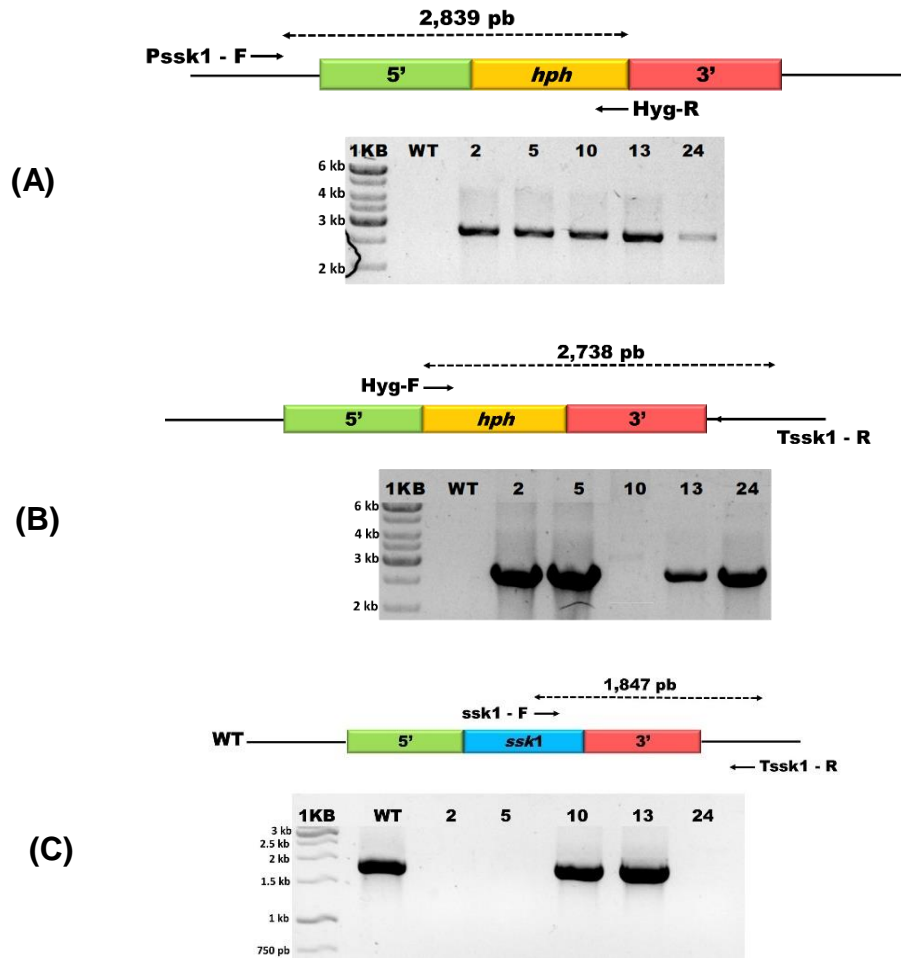


mientras que el resto de los transformantes seleccionados por la resistencia a higromicina B mostraron un crecimiento similar a la cepa WT (Figura 43).



**Figura 43. Escrutinio fenotípico para identificar mutantes carentes del gen *ssk1*.** Gotas de 500 conidios de la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y transformantes del gen *ssk1* se inocularon en placas de PDA con 0.5% de Tritón X-100 adicionado con 100 mM de KCl. Se incubaron por 4 días a 27 °C en luz constante.

Posteriormente, se procedió a realizar la extracción del ADN para identificar por PCR las posibles mutantes carentes en *ssk1*. Se realizaron dos reacciones de PCR para identificar el correcto reemplazo génico, usando dos pares de oligonucleótidos, uno que se uniera dentro y fuera de la construcción del casete. Se usaron los oligonucleótidos Pssk1-F y Hyg-R para amplificar un fragmento de 2839 pb correspondiente a la región 5' con el marcador de selección (Figura 44-A) y los oligos Hyg-F y Tssk1-R para amplificar el marcador de selección con la región 3' del gen *ssk1*, de un tamaño de 2738 pb (Figura 44-B). Además, se realizó una tercera reacción de PCR para determinar la carencia del ORF de *ssk1*, con los oligos Ssk1-F y Tssk1-R que amplificaron un fragmento de 1847 pb (Figura 44-C). En los dos primeros PCR se obtuvieron amplicones que coincidieron con los tamaños teóricos, confirmando el correcto reemplazo del gen *ssk1* por el marcador de selección. En el tercer PCR, fue posible observar que el ORF de *ssk1* aún se detectaba en las transformantes 10 y 13 (Figura 44-C). Confirmando la obtención de tres cepas mutantes carentes del gen *ssk1* (2, 5, 24).

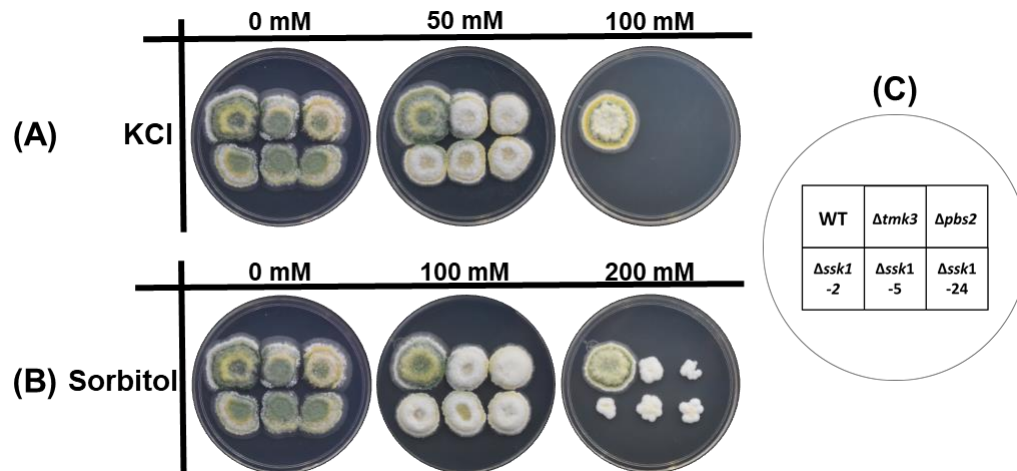


**Figura 44. Identificación de mutantes carente del gen *ssk1*.** PCR para detectar el reemplazo génico usando los pares de oligonucleótidos Pssk1-F/Hyg-R (A) y Hyg-F/Tssk1-R (B). Reacción de PCR para identificar la carencia del gen *ssk1* en las transformantes (C). El ADN genómico de la cepa silvestre se empleó como control en las tres reacciones de PCR. El marcador de peso molecular de 1kb se utilizó como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados.

#### VII.4.2 El RR Ssk1 regula respuesta a estrés osmótico

El RR Ssk1 forma parte del sistema de dos componentes en *S. cerevisiae* y es esencial para la activación de la MAPK Hog1 en presencia de estrés hiperosmótico (Posas y Saito, 1998). Las mutantes carentes de *ssk1* fueron sometidas a estrés osmótico al agregar concentraciones altas de KCl y sorbitol en el medio de cultivo. En los ensayos de conidios, las cepas  $\Delta ssk1$  fueron capaces de crecer en 50 mM KCl al igual que las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , pero 100 mM KCl fue

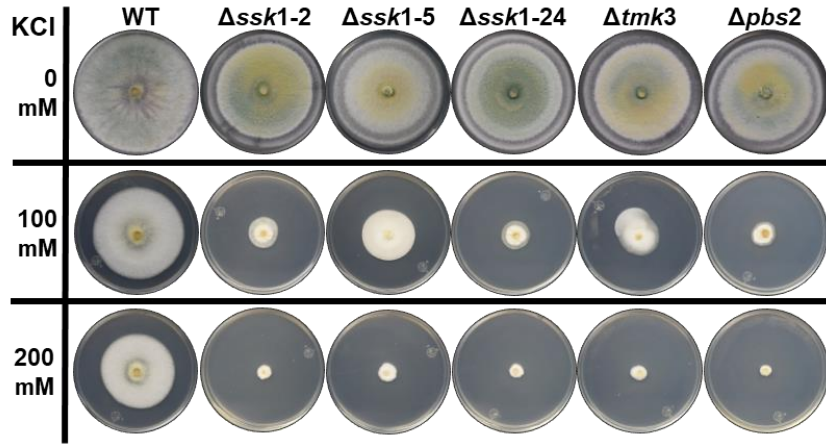
letal para todas las mutantes, siendo la cepa WT la única capaz de crecer sin dificultad (Figura 45-A). En sorbitol, las cepas mutantes fueron capaces de crecer hasta en 200 mM, pero con una clara inhibición en su crecimiento comparado con la WT, observando fenotipos similares entre  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta ssk1$  (Figura 45-B).



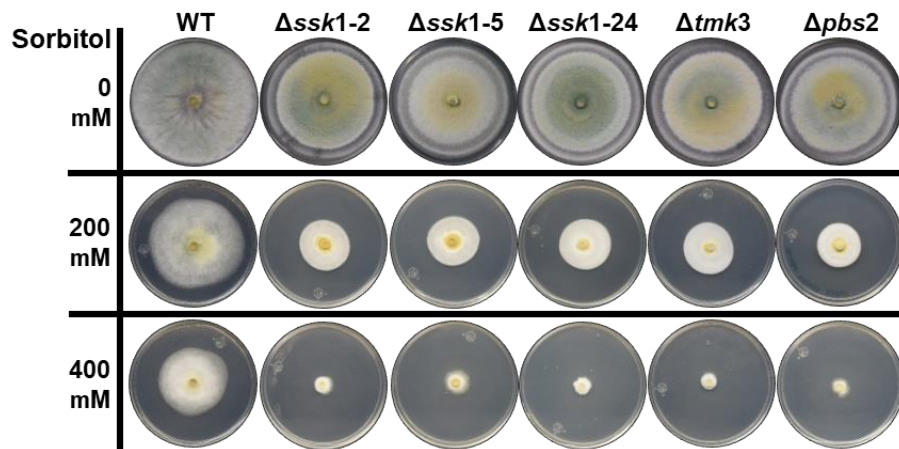
**Figura 45. Participación del RR Ssk1 en la tolerancia a estrés osmótico en conidios.** En placas de PDA adicionada con 0.5% de Tritón X-100 y las concentraciones indicadas de KCl (A) y sorbitol (B), se inocularon 500 conidios de las cepas en el orden indicado en C. Los cultivos fueron incubados a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

En los ensayos con micelio, se observó que a partir de 100 mM KCl presentaron una gran inhibición del crecimiento las cepas  $\Delta ssk1$  en comparación con la WT, mientras que a 200 mM KCl fue letal para todas las cepas mutantes (Figura 46). En 200 mM de sorbitol se observó similar sensibilidad a este osmolito entre las cepas  $\Delta ssk1$ ,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  y letalidad en 400 mM, en la cual la cepa WT aún fue capaz de crecer (Figura 47).

En ambas condiciones de estrés en las cuales se usaron diferentes osmolitos, las cepas  $\Delta ssk1$ ,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  presentaron fenotipos similares, ya que desde concentraciones de 100 mM KCl o 200 mM sorbitol, mostraron gran sensibilidad. Al presentar fenotipos similares entre las mutantes, esto nos sugiere que Ssk1 es un componente de la vía de señalización de la MAPK Tmk3 para regular el estrés osmótico.



**Figura 46. Sensibilidad a estrés osmótico por KCl en micelio de las cepas  $\Delta ssk1$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con KCl con las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

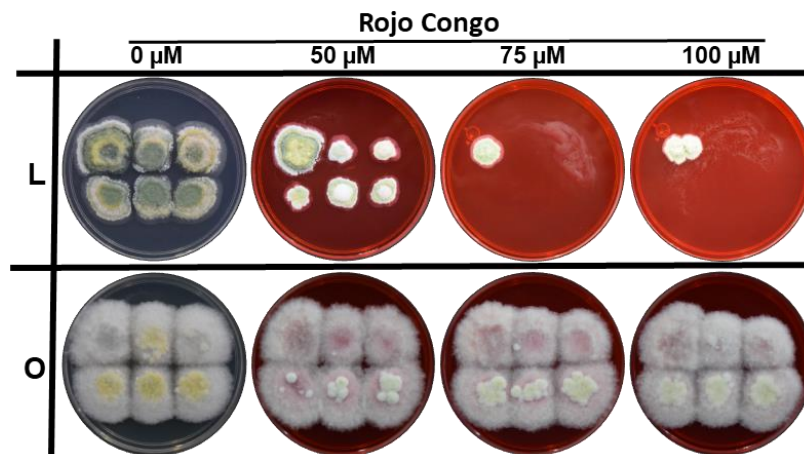


**Figura 47. Sensibilidad a estrés osmótico por sorbitol en micelio de las cepas  $\Delta ssk1$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con sorbitol con las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

#### VII.4.3 Ssk1 es indispensable para regular la integridad de la pared celular

La MAPK Tmk3 regula la integridad de la pared celular en *T. atroviride* (Esquivel-Naranjo, 2016). Para analizar la participación del RR Ssk1, se empleó rojo Congo en los ensayos de estrés. Los conidios de todas las cepas mutantes analizadas en 50  $\mu$ M rojo Congo mostraron gran sensibilidad e inhibición en su

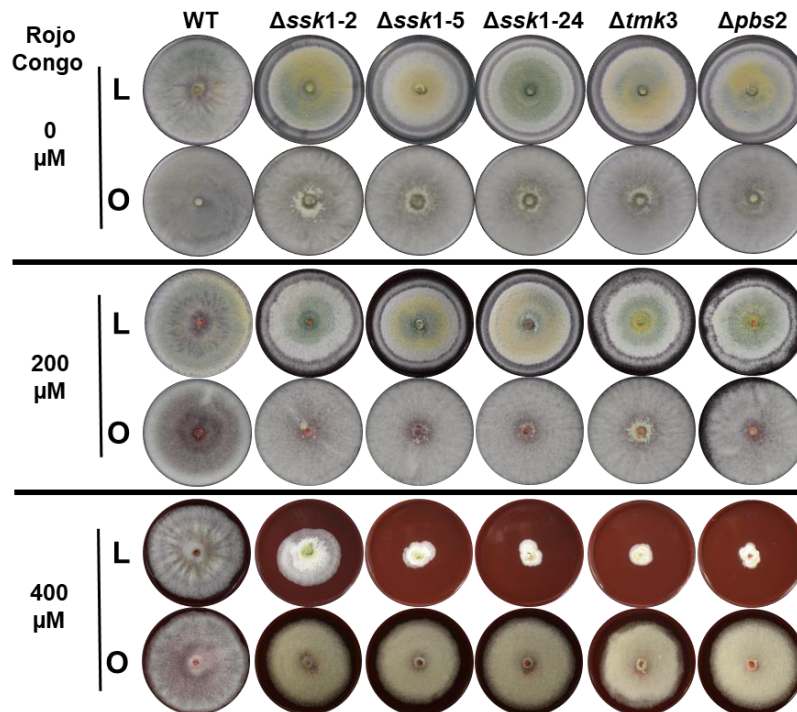
crecimiento; siendo letal para todas las mutantes en 75  $\mu\text{M}$  rojo Congo solo la cepa silvestre fue capaz de crecer incluso en 100  $\mu\text{M}$  de este colorante (Figura 48). Asimismo, este ensayo se llevó a cabo en oscuridad, observando que las cepas mutantes fueron capaces de crecer hasta 100  $\mu\text{M}$  rojo Congo sin ninguna dificultad; por lo tanto, la luz estaría participando en incrementar el efecto inhibitorio del rojo Congo sobre las mutantes y esta vía de señalización brinda tolerancia a la combinación de ambos factores.



**Figura 48. Participación del RR Ssk1 en la integridad de la pared celular en conidios.** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de rojo Congo señaladas, se inocularon 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 45-C. Los cultivos fueron incubados a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

En los ensayos con micelio, fue posible observar que en concentraciones de 200  $\mu\text{M}$  la cepa WT y las cepas  $\Delta\text{ssk1}$ ,  $\Delta\text{tmk3}$  y  $\Delta\text{pbs2}$  crecen sin un importante grado de inhibición; no obstante, en concentraciones de 400  $\mu\text{M}$  se observó gran sensibilidad en todas las mutantes, donde las cepas  $\Delta\text{ssk1}$  presentaron fenotipos similares a  $\Delta\text{tmk3}$  y  $\Delta\text{pbs2}$ . Del mismo modo, este ensayo se llevó a cabo en oscuridad, mostrando que hasta en 400  $\mu\text{M}$  rojo Congo todas las cepas fueron capaces de crecer hasta casi cubrir la caja por completo, caso contrario a lo observado cuando crecen bajo luz constante mostrando una exacerbada sensibilidad al colorante (Figura 49). Por lo tanto, el RR Ssk1 es importante para regular la integridad de la pared celular en el hongo, ya que las cepas mutantes

carentes de este gen presentaron una gran sensibilidad a este colorante en presencia de luz, además de coincidir en fenotipo con la cepa  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , los cuales son también importantes para responder a este estímulo.



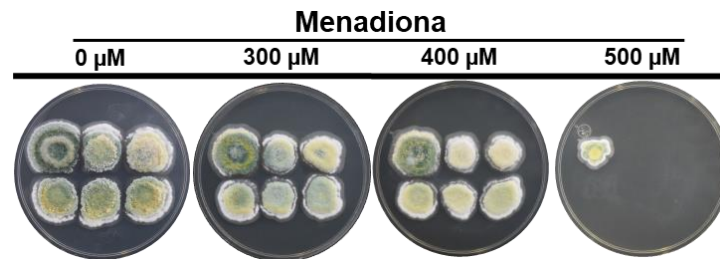
**Figura 49. Análisis de la integridad de la pared celular en micelio de las cepas  $\Delta ssk1$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con rojo Congo con las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

#### VII.4.4 Ssk1 es un regulador importante en la tolerancia al estrés oxidativo

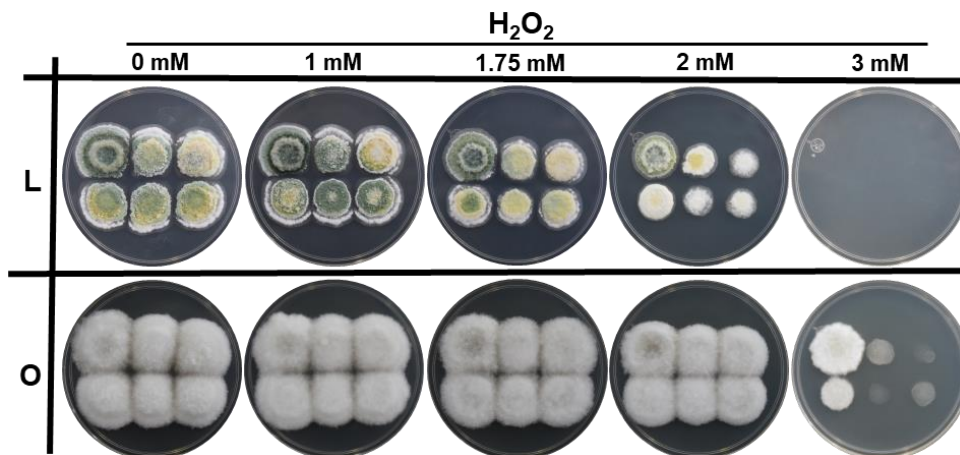
En *C. albicans*, Ssk1 es importante para la adaptación de la célula a varios oxidantes, como el  $H_2O_2$ , *t*-BOOH, menadiona y superóxido de potasio (Chauhan *et al.*, 2003). Para analizar la participación de Ssk1 en respuestas a estrés oxidativo, se emplearon menadiona y  $H_2O_2$  para realizar los ensayos de estrés con conidios y micelio.

En el ensayo con menadiona, las cepas mutantes fueron capaces de crecer hasta en la concentración de 400  $\mu M$  al igual que la cepa WT, pero con un menor tamaño de las colonias, siendo letal en 500  $\mu M$  menadiona para las cepas  $\Delta ssk1$ ,

$\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  (Figura 50). En los ensayos con  $H_2O_2$ , todas las cepas fueron capaces de crecer hasta en la concentración 2 mM  $H_2O_2$ ; no obstante, la colonia de las cepas mutantes, mostraron un tamaño menor que la cepa WT. La concentración 3 mM  $H_2O_2$  fue letal para todas las cepas. Sin embargo, en oscuridad crecieron en esta última concentración, en donde las cepas mutantes mostraron importante inhibición en su crecimiento en comparación con la cepa WT (Figura 51).

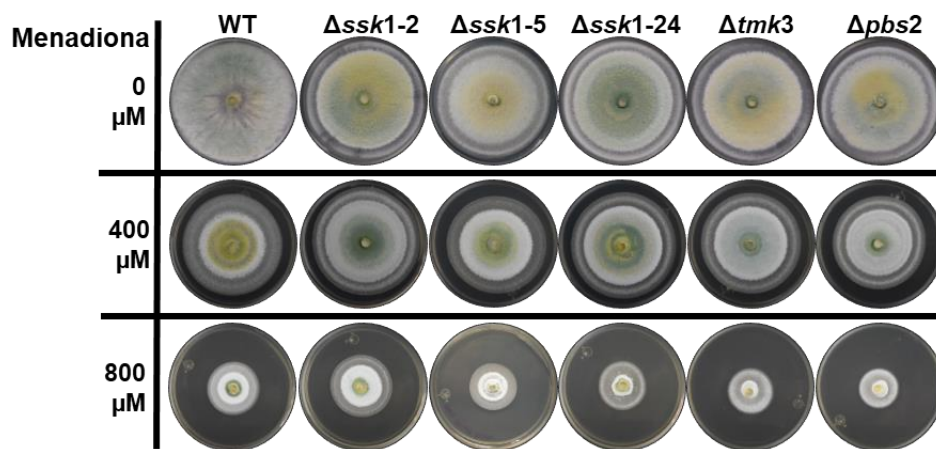


**Figura 50. Participación del RR Ssk1 en la tolerancia al estrés oxidativo por menadiona en conidios.** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de menadiona señaladas, se inocularon con 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 45-C. Los cultivos fueron incubados a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante.



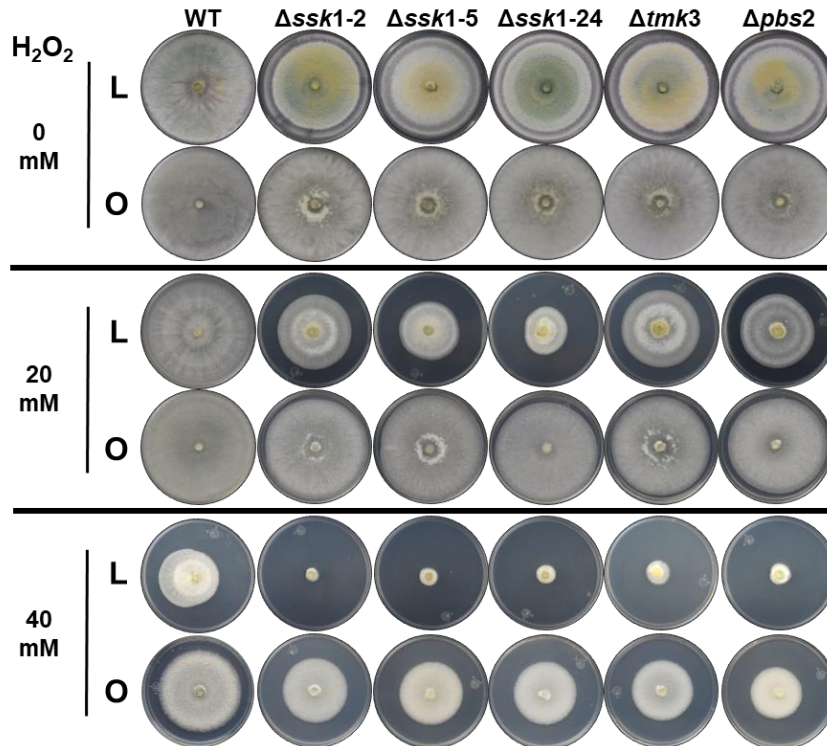
**Figura 51. Participación del RR Ssk1 en la tolerancia al estrés oxidativo por  $H_2O_2$  en conidios.** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de  $H_2O_2$  señaladas, se inocularon con 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 45-C. Los cultivos fueron incubados a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

En el ensayo con micelio, las cepas  $\Delta ssk1$ ,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  fueron capaces de crecer en las concentraciones de 400  $\mu\text{M}$  y 800  $\mu\text{M}$  de menadiona, donde el diámetro de las colonias fue muy similar a la cepa WT en ambas concentraciones (Figura 52). De igual modo, se realizó el ensayo utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  bajo condiciones de luz constante y oscuridad, ya que la luz es un factor importante en acrecentar el efecto en este oxidante. En los ensayos realizados en condiciones de luz constante, las cepas mutantes fueron capaces de crecer en 20 mM, pero con una notable disminución en su crecimiento, en comparación con la cepa WT que fue capaz de crecer sobre toda la caja. En 40 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  las cepas  $\Delta ssk1$ ,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  mostraron extrema sensibilidad, puesto que presentaron una gran inhibición en su crecimiento en comparación a la WT (Figura 53). No obstante, las cepas mutantes exhibieron un diámetro radial mayor cuando crecieron en oscuridad bajo estas dos concentraciones. Estos resultados indican que el RR Ssk1 es un componente de la vía de señalización de la MAPK Tmk3 e intervienen en la tolerancia al estrés oxidante provocado por peróxido de hidrógeno cuando se combina con la luz.



**Figura 52. Tolerancia a estrés oxidativo por menadiona en micelio de las cepas  $\Delta ssk1$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con menadiona con las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.





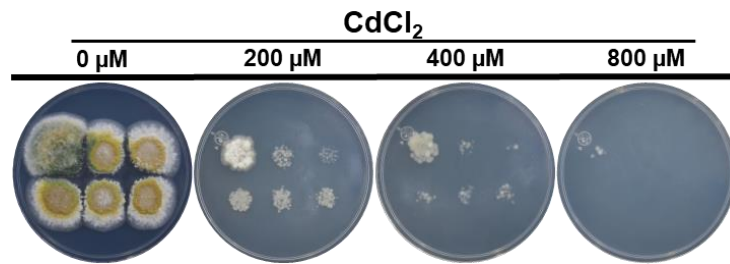
**Figura 53. Efecto de la luz en la tolerancia a estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en micelio de las cepas  $\Delta$ ssk1.** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

De acuerdo con estos datos experimentales, la respuesta al estrés oxidativo es regulado a través de la vía de la MAPK Tmk3 y sugiere que el RR Ssk1 estaría participando río arriba para activar esta vía. Además, Ssk1, al igual que la vía de la MAPK Tmk3, no regula la tolerancia al estrés generado por menadiona, cuando *T. atroviride* se encuentra en su estado de desarrollo vegetativo, indicando que tienen funciones específicas del estadio de desarrollo.

#### VII.4.5 Ssk1 es indispensable para la tolerancia a CdCl<sub>2</sub>

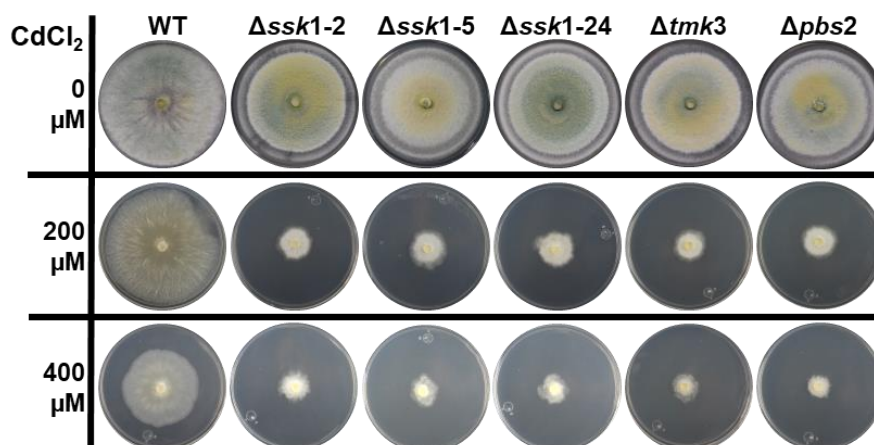
En *T. atroviride*, la MAPK Tmk3 es esencial para tolerar altas concentraciones de cadmio (Esquivel-Naranjo, 2016). Para llevar a cabo este ensayo de estrés se utilizó CdCl<sub>2</sub> con la cepa WT,  $\Delta$ ssk1,  $\Delta$ tmk3 y  $\Delta$ pbs2. Las cepas mutantes fueron capaces de crecer hasta en concentraciones de 400  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>; sin embargo, desde

200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  mostraron mayor inhibición en su crecimiento en comparación con la cepa WT. En 800  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  solo la cepa WT fue capaz de crecer, pero con una clara afectación en su crecimiento. (Figura 54).



**Figura 54. Participación del RR Ssk1 en la tolerancia a cadmio en conidios.** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  indicadas, se inocularon 500 conidios de las cepas señaladas en la Figura 45-C. Los cultivos fueron incubados a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

En los ensayos realizados con micelio, las mutantes carentes de *ssk1* presentaron extrema sensibilidad a partir de 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , en comparación de la cepa WT la cual creció sin inhibición sobre toda la caja, y este fenotipo de la cepa  $\Delta\text{ssk1}$  fue similar a lo observado en las cepas  $\Delta\text{tmk3}$  y  $\Delta\text{pbs2}$  (Figura 55). Por lo tanto, el RR Ssk1 estaría participando para regular la tolerancia a cadmio a través de la MAPK Tmk3 en *T. atroviride*.

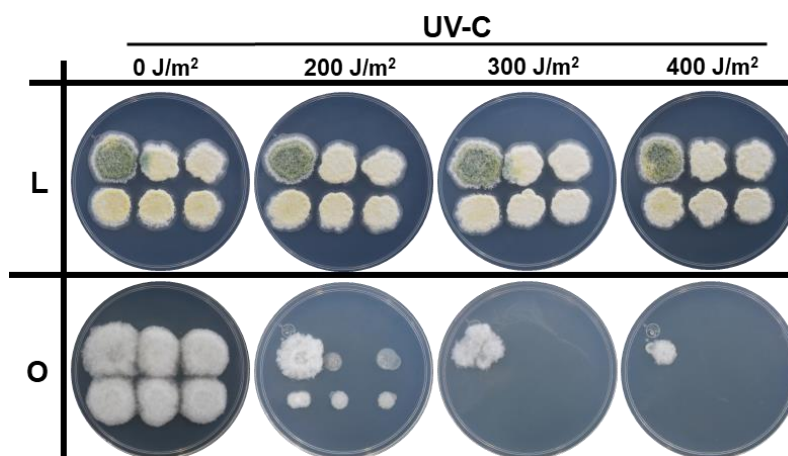


**Figura 55. Participación del RR Ssk1 en la tolerancia a cadmio en micelio.** Discos de micelio fueron inoculados en placas de PDA con  $\text{CdCl}_2$  con las concentraciones y cepas indicadas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

#### VII.4.6 El RR Ssk1 participa en la reparación al ADN por daño UV y en choque térmico a través de la MAPK Tmk3

La vía de la MAPK Tmk3 es un importante regulador de los sistemas de reparación de ADN que operan en oscuridad, ya que los conidios irradiados con luz UV-C creciendo en oscuridad muestran defectos en germinación (Esquivel- Naranjo *et al*, 2016). Para este ensayo, conidios de las cepas fueron irradiadas con dosis de 200, 300 y 400 J/m<sup>2</sup> fueron incubados en condiciones de luz constante y oscuridad.

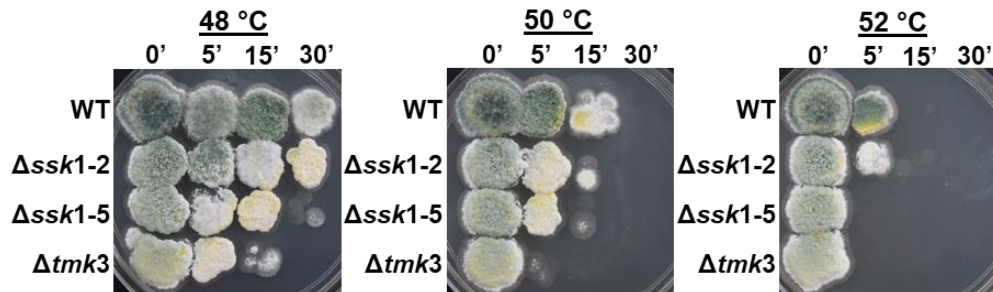
En los cultivos donde las cepas crecieron en luz constante, se observó que todas fueron capaces de crecer sin inhibición hasta en la dosis de 400 J/m<sup>2</sup>; sin embargo, las cepas mutantes que crecieron en oscuridad mostraron menor tamaño de las colonias a partir de 200 J/m<sup>2</sup>, y letalidad a partir de 300 J/m<sup>2</sup> donde solo la cepa WT fue capaz de crecer, hasta en la dosis de 400 J/m<sup>2</sup> (Figura 56). Estos datos indican la participación del RR Ssk1, a través de la vía de la MAPK Tmk3, en los sistemas de reparación de ADN que operan en oscuridad en *T. atroviride*.



**Figura 56. Sensibilidad a la irradiación con UV en conidios de las cepas  $\Delta ssk1$ .** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5%, se inocularon 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 45-C, posteriormente se aplicaron pulsos de luz UV-C (254 nm) con las dosis señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

La vía de la MAPK Tmk3 es importante para una respuesta en estrés térmico, debido a que las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  muestran mayor sensibilidad que la WT y

defectos de germinación al ser sometidas a un tratamiento térmico (Esquivel-Naranjo, 2016). Con la finalidad de analizar si Ssk1 participa en regular esta respuesta, una suspensión de conidios de las cepas WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta ssk1$ , fueron tratados a diferentes temperaturas y por diferentes tiempos. En el tratamiento a 48 °C por 30 min, la cepa  $\Delta ssk1$  mostró sensibilidad; no obstante, fue aún capaz de crecer al igual que la WT mientras que  $\Delta tmk3$  solo fue capaz de crecer hasta los 15 min del tratamiento. En el tratamiento a 50 °C, se observó que las cepas mutantes fueron más sensibles a partir del tratamiento de los 15 min, mientras que la WT creció sin dificultad. En el tratamiento a 52 °C, solo la cepa WT y una cepa mutante de *ssk1* fue capaz de crecer a los 5 min del tratamiento; sin embargo, es notable el efecto del tratamiento térmico sobre la mutante, en comparación con la WT (Figura 57). Estos datos sugieren la participación del RR Ssk1 vía Tmk3, para regular respuestas a estrés térmico.



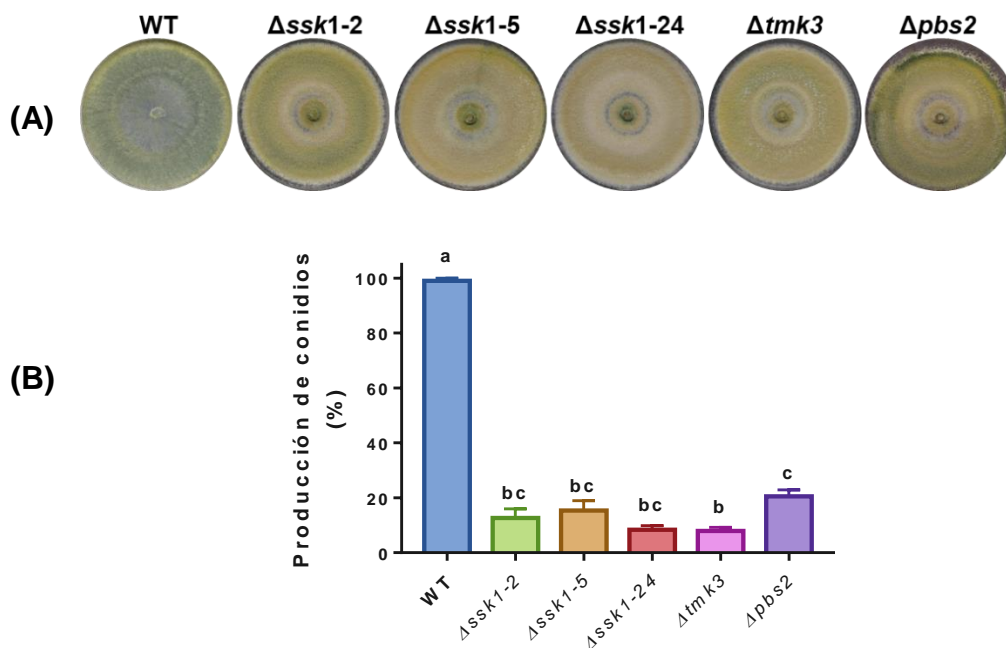
**Figura 57. Tolerancia en conidios de las cepas WT,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta tmk3$  a choque térmico.** Una suspensión de 100 conidios por ml fue incubada en un termo-block a la temperatura y tiempos indicados. Posteriormente, gotas de 500 conidios fueron inoculados en placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5%, y se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

#### VII.4.7 Ssk1 participa en la reproducción asexual inducida por luz

Durante los diferentes ensayos de estrés se observó que las cepas  $\Delta ssk1$  presentaron fenotipos similares con la cepa  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , claramente sugiriendo que es un componente de esta vía de señalización. Además, la MAPK Tmk3 es importante para regular la reproducción asexual de *T. atroviride*, razón por la cual

se analizó la producción de conidios de la cepa  $\Delta ssk1$  bajo condiciones de luz blanca constante.

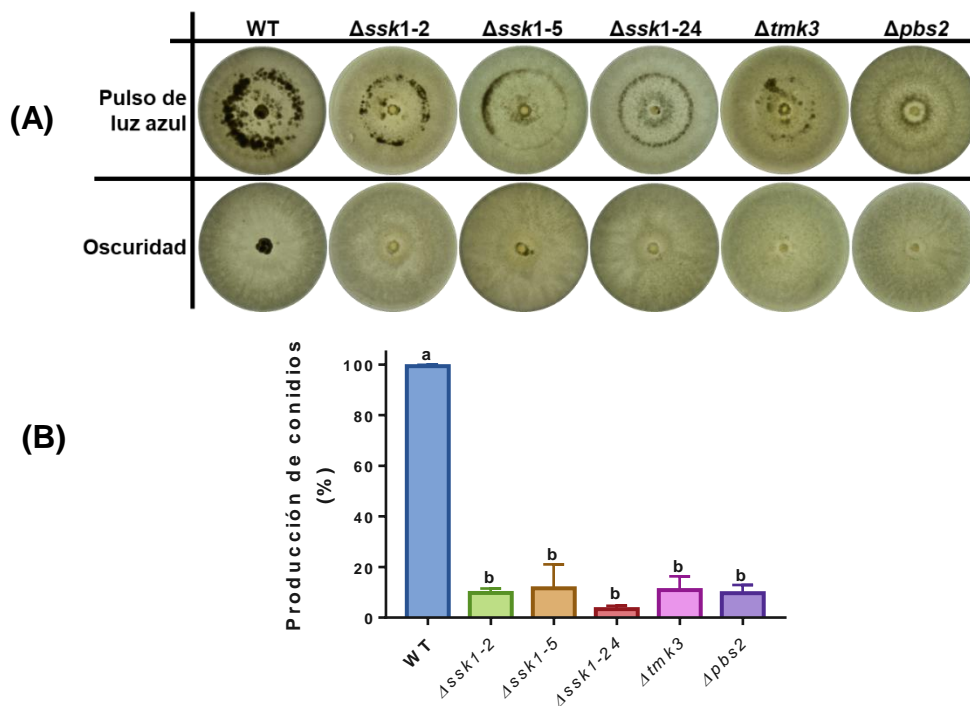
Las cepas  $\Delta ssk1$ ,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y WT crecieron en condiciones de luz blanca constante durante 7 días y se observó que la pigmentación del micelio de las cepas  $\Delta ssk1$  fueron de una tonalidad amarilla, coincidiendo con la cepa  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  (Figura 58-A). Con el objetivo de analizar la afectación en la producción de conidios estimulada por luz, estos se colectaron y cuantificaron. Los datos obtenidos mostraron que en las cepas  $\Delta ssk1$  tuvieron una reducción aproximadamente entre el 85-92% en la producción de conidios al compararse con la cepa WT, mientras que la cepa  $\Delta tmk3$  mostró una reducción del 93% y  $\Delta pbs2$  del 80% (Figura 58-B). Por lo tanto, el RR Ssk1 regula la reproducción asexual de *T. atroviride* a través de la vía de la MAPK Tmk3.



**Figura 58. Participación del RR Ssk1 en la producción de conidios inducida por luz blanca constante. (A)** Fotoconidiación. Discos de micelio se inocularon en placas de PDA de las cepas indicadas, los cultivos se incubaron en presencia constante de luz blanca durante una semana a 27 °C. **(B)** Producción de conidios. Las barras representan los promedios de los valores  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados con el método Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

#### VII.4.8 Ssk1 es indispensable para regular la conidiación inducida por un pulso de luz azul

El RR Ssk1 es indispensable para regular la reproducción asexual del hongo. Además, la MAPK Tmk3 participa en regular respuesta ante un pulso de luz azul. Por esta razón, se realizaron ensayos de fotoinducción en un período corto de exposición a la luz azul para observar la respuesta en la cepa  $\Delta ssk1$ . Después de realizar los ensayos de pulso de luz azul sobre las cepas WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta ssk1$ , se observó que las mutantes están afectadas en responder de manera adecuada a este estímulo, ya que no forman el característico anillo verde de conidios como la cepa WT, pero si una pigmentación amarilla sobre el área del micelio al momento del ser expuesto a la luz azul, sugiriendo una respuesta a la luz severamente atenuada (Figura 59-A). Asimismo, se realizó la recolección y cuantificación de conidios, los datos indicaron una reducción de aproximadamente entre el 89-97% en la producción de conidios en las cepas  $\Delta ssk1$  en comparación con la WT, mientras que en las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  fue del 90% (Figura 59-B).



**Figura 59. Participación del RR Ssk1 en la conidiación inducida por un pulso de luz azul. (A)** Conidiación inducida con un pulso de luz. Discos de micelio se inocularon en

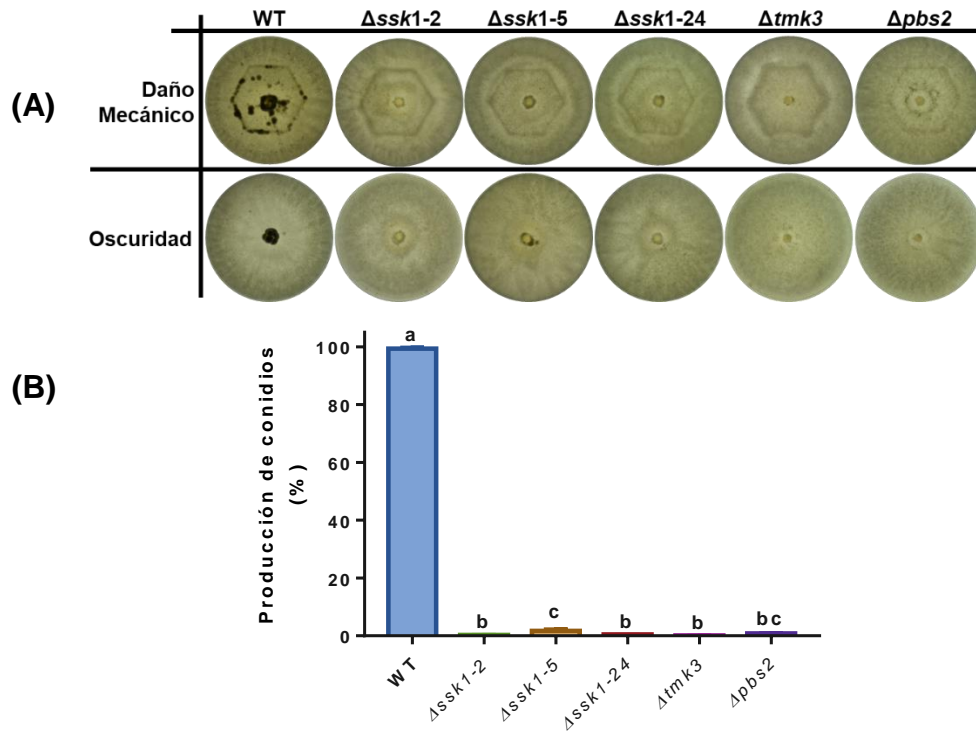
placas de PDA de las cepas indicadas y se incubaron durante 36 h a 27 °C en oscuridad. Posteriormente, se les aplicó un pulso de luz azul de 5 min ( $145.27 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ ) y se incubaron por otras 48 h en oscuridad. Control crecido en oscuridad por 4 días. **(B)** Producción de conidios estimuladas con un pulso de luz azul. Las barras representan los promedios de los valores  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados con el método Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

#### VII.4.9 El RR Ssk1 participa en respuesta por daño mecánico

La MAPK Tmk3 regula respuestas por daño mecánico (Medina-Castellanos *et al.*, 2014), además los datos previamente descritos sugieren que el RR Ssk1 regula la reproducción asexual inducida por la luz en *T. atroviride*. Por lo tanto, se procedió a analizar la respuesta a daño mecánico para saber si Ssk1 es un regulador general de la reproducción asexual.

En respuesta a este estímulo, las cepas  $\Delta\text{ssk1}$  mostraron defectos en la producción de conidios en el área donde se realizó el daño, en comparación con la cepa WT en la cual se puede ver los conidios en el área donde se realizó el corte, y mostrando fenotipos similares a las cepas de  $\Delta\text{tmk3}$  y  $\Delta\text{pbs2}$ . Cabe mencionar que en las cepas  $\Delta\text{tmk3}$ ,  $\Delta\text{pbs2}$  y  $\Delta\text{ssk1}$ , hubo una mayor presencia de micelio aéreo en la zona donde se realizó el corte (Figura 60-A). De igual manera, se realizó la recolección de conidios de todas las cepas y se procedió a su cuantificación. Los datos indicaron que en todas las cepas mutantes la producción de conidios fue igual o menor del 1% comparado con la cepa WT (Figura 60-B).

Por lo tanto, el RR Ssk1 es igual de indispensable como la MAPK Tmk3 para regular respuesta por daño mecánico. Finalmente, podemos mencionar que el RR Ssk1 regula de manera general la conidiación en *T. atroviride*.



**Figura 60. Participación del RR Ssk1 en la conidiación inducida por daño mecánico.** **(A)** Conidiación inducida con daño mecánico. Discos de micelio se inocularon en placas de PDA de las cepas indicadas a 27 °C en oscuridad, transcurrido 36 h se realizaron cortes en el micelio con un molde y se incubaron por 48 h a 27 °C en oscuridad. Control crecido en oscuridad por 4 días. **(B)** Producción de conidios. Las barras representan los promedios de los valores  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados con el método Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

#### VII.4.10 El RR Ssk1 regula la expresión de genes regulados por luz azul

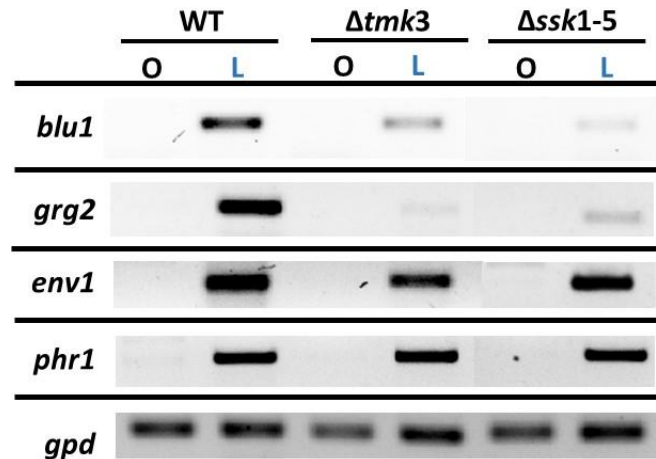
Conforme a lo observado en las cepas mutantes de *ssk1*, en respuesta a un pulso de luz, y coincidiendo en fenotipo con las cepas de  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , se procedió a analizar si los genes que son fotoregulados de manera dependiente e independiente de Tmk3, se comportan igual en la cepa carente del RR Ssk1 con el objetivo de generar más evidencia de que el RR Ssk1 está operando en la vía de señalización de la MAPK Tmk3.

En los resultados, el patrón de expresión de *blu1* y *grg2* coincidieron en las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta ssk1$ , donde la expresión se ve severamente reducida en relación



con la WT. Además, la expresión de *env1* y *phr1* no se ve afectada en las cepas mutantes, coincidiendo con el patrón de expresión de la cepa WT (Figura 61).

Estos datos sugieren que los estímulos de luz son percibidos a través de las HKs, que forman parte del sistema de dos componentes, y activaría la MAPK Tmk3 en *T. atroviride* para finalmente regular respuesta a este estímulo.

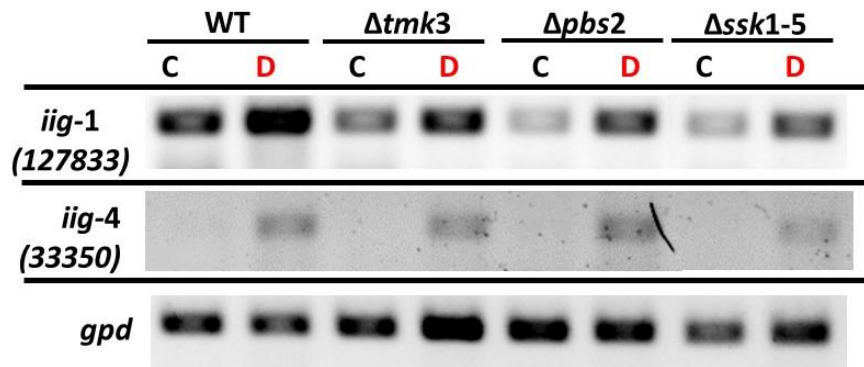


**Figura 61. Participación del RR Ssk1 en regular la expresión de genes dependientes de la MAPK Tmk3.** El ADNc se sintetizó a partir de ARN total extraído de micelio de las cepas WT,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta ssk1$ , crecidas en oscuridad (O) o expuesto a la luz azul por 30 min (L). Posteriormente, se amplificó mediante una reacción de PCR los genes fotoregulados, y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd*. La expresión de los genes se analizó a los 30 ciclos para los genes *blu-1*, *grg-2*, *env-1* y *phr-1*, y 25 ciclos para *gpd*.

#### VII.4.11 El RR Ssk1 regula parcialmente la expresión de genes de daño mecánico

El RR Ssk1 regula la reproducción asexual inducida por daño al igual que la MAPK Tmk3 y la MAPKK Pbs2. Con el objetivo de conocer si a nivel molecular existe un corregulación de genes entre los componentes de esta vía de señalización, se analizó la expresión de dos genes regulados por este estímulo. En los datos obtenidos, se observó una ligera reducción de la expresión del gen *iig-1* (127833), codifica para leucotrieno B4 12-hidroxidehidrogenasa dependiente de NADP, en las cepas mutantes carentes de *tmk3*, *pbs2* y *ssk1* en relación con la WT,

mientras que en los niveles del transcrito de *iig-4* (33350), codifica una lipoxigenasa, mostraron similar patrón de expresión en la cepa WT y mutantes (Figura 62). Estos datos sugieren, que probablemente la vía de la MAPK Tmk3 participa de manera parcial en regular la expresión de genes específicos en respuesta a daño mecánico, sugiriendo la participación de otras vías de señalización que regulan la expresión de genes en respuesta a este estímulo.

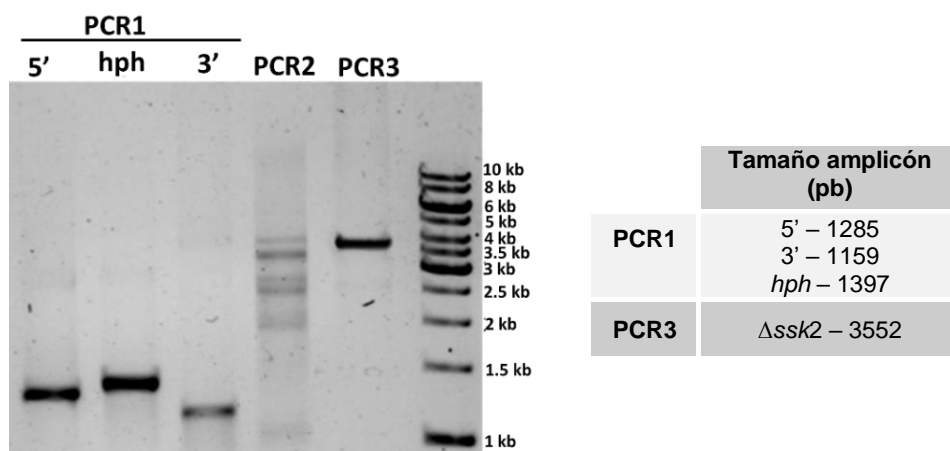


**Figura 62. Expresión de genes regulados por daño mecánico en la cepa  $\Delta ssk1$ .** A partir de ARN total extraído del micelio de las cepas indicadas, crecidas en oscuridad sin daño mecánico (C) o dañadas con un bisturí después de 30 min (D), se sintetizó ADNc. Posteriormente, el ADNc se amplificó mediante una reacción de PCR y los niveles de transcritos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd*. La expresión de los genes se analizó a los 28 ciclos para *iig-1* e *iig-4*, y 25 ciclos para *gpd*.

## VII.5 Análisis funcional de la MAPKKK Ssk2 en *T. atroviride*

### VII.5.1 Generación de cepas mutantes carentes del gen *ssk2*.

La cepa mutante carente del gen *ssk2* se generó con la técnica de PCR de doble unión, descrito en el apartado VI.5.2 de metodología, empleando los oligonucleótidos señalados en la Tabla 3 y 4. En el PCR1, se amplificaron los fragmentos de la región 5', 3' y el marcador de selección *hph*, de 1285, 1159 y 1397 pb, respectivamente. En el PCR2 se llevó a cabo la fusión de los tres fragmentos y finalmente en el PCR3 se llevó la amplificación de la construcción del casete con oligonucleótidos anidados N5-*ssk2*-F y N3-*ssk2*-R. El tamaño final de la construcción del casete fue de 3552 pb (Figura 63).

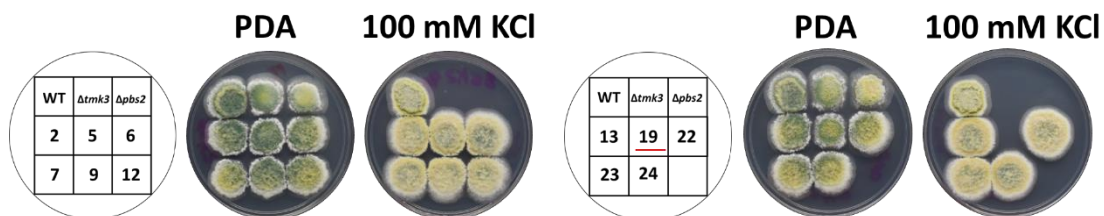


**Figura 63. Construcción del casete para eliminar el gen *ssk2*.** **PCR1.** Amplificación de los fragmentos de las regiones 5' y 3' del gen *ssk2*, y del marcador de selección *hph*. **PCR2.** Fusión de los tres fragmentos amplificados. **PCR3.** Amplificación del casete para la eliminación del gen *ssk2*. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1kb como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos.

La transformación se llevó a cabo con protoplastos mediante la técnica de Polietilenglicol-CaCl<sub>2</sub>. Se obtuvieron 24 transformantes que fueron capaces de crecer en MMV con higromicina B. Después de tres pasos monospóricos, se realizó la extracción de ADN de las transformantes y se identificaron 11 transformantes que

habían realizado el correcto reemplazo génico, pero que aún amplificaban el fragmento correspondiente al ORF de *ssk2*.

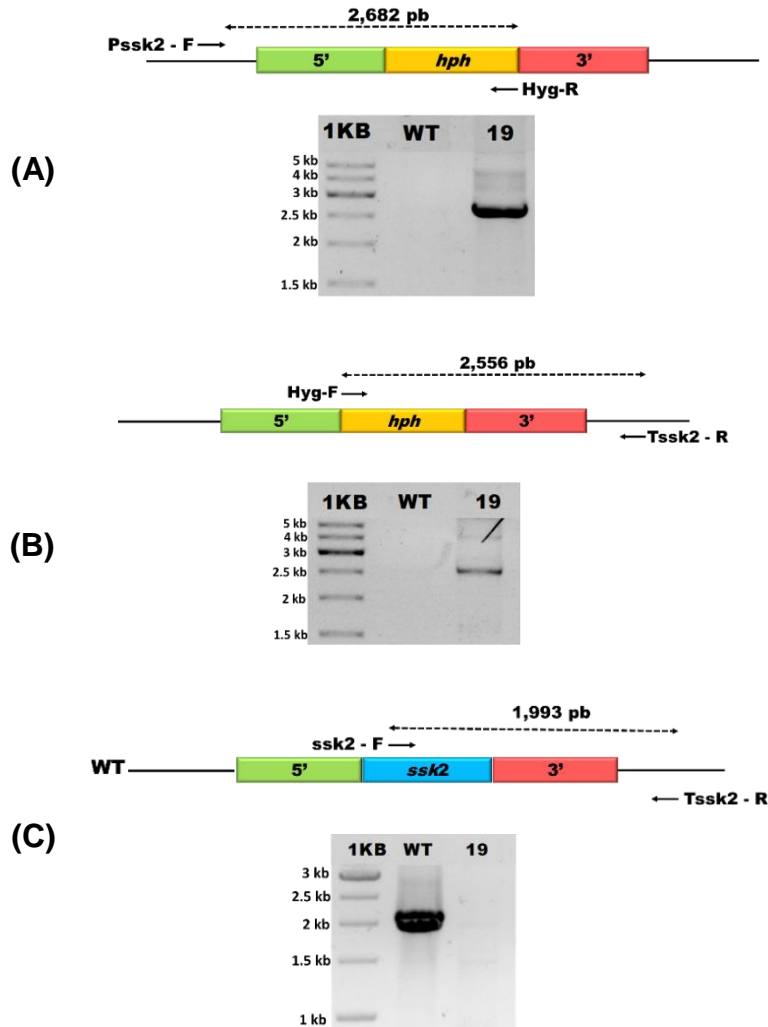
A continuación, se realizaron otros seis pasos monospóricos en PDA con higromicina B y se procedió a realizar un escrutinio fenotípico por sensibilidad a estrés osmótico en 100 mM de KCl con conidios. En el ensayo de estrés se observó que la transformante 19 mostró el fenotipo similar a la cepa  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , ya que no fue capaz de tolerar el estrés provocado por KCl a diferencia de la cepa silvestre (Figura 64).



**Figura 64. Escrutinio fenotípico para identificar mutantes carentes del gen *ssk2*.** Gotas de 500 conidios de la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y transformantes del gen *ssk2* se inocularon en placas de PDA con 0.5% de Tritón X-100 adicionado con 100 mM de KCl. Los cultivos se incubaron por 4 días a 27 °C en luz constante.

Se procedió a extraer el ADN de la cepa 19 y se realizaron dos reacciones de PCR para identificar nuevamente el reemplazo génico, usando dos pares de oligonucleótidos que se unieran dentro y fuera de la construcción del casete. En el primer fragmento amplificado se obtuvo un amplicón de 2,682 pb (Figura 65-A) y de 2,556 pb (Figura 65-B). Se realizó un tercer PCR para identificar la carencia del marco de lectura abierto de *ssk2* con los oligonucleótidos Ssk2-F y Tssk2-R, amplificando un fragmento de 1,993 pb (Figura 65-C).

El tamaño de los amplicones de los dos primeros PCR correspondieron a los esperados, ratificando el correcto reemplazo génico por en el genoma, y en el tercer PCR se confirmó la carencia del ORF de *ssk2*, por lo cual podemos afirmar que se obtuvo una cepa mutante carente de *ssk2*.

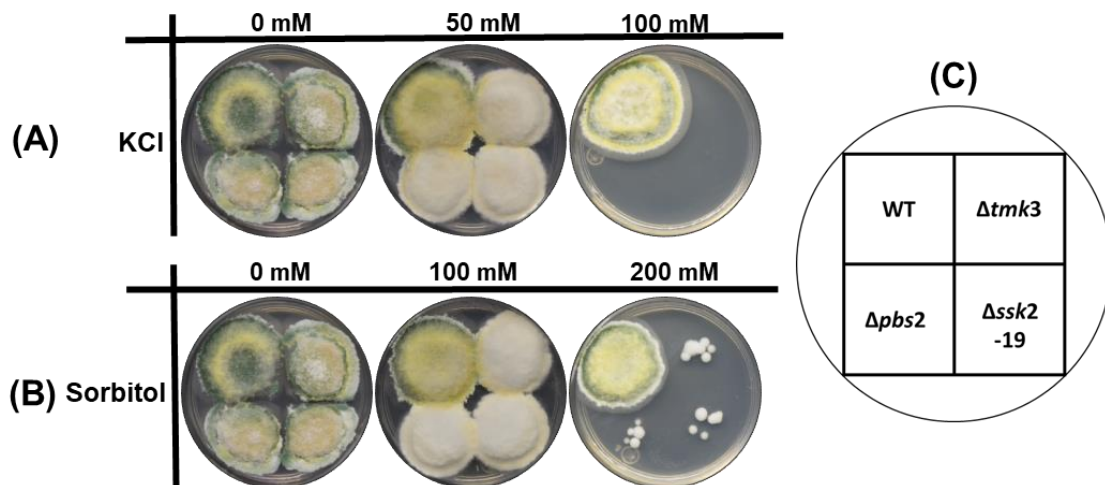


**Figura 65. Identificación por PCR de la cepa mutante carente del gen *ssk2*.** PCR para detectar el reemplazo génico usando los oligonucleótidos Pssk2-F/Hyg-R (A) y Hyg-F/Tssk2-R (B). (C) Reacciones de PCR para identificar la carencia del gen *ssk2* en la transformante. El ADN genómico de la cepa silvestre se empleó como control en las tres reacciones de PCR. El marcador de peso molecular de 1kb se utilizó como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados.

### VII.5.2 La MAPKKK Ssk2 regula respuesta a estrés osmótico

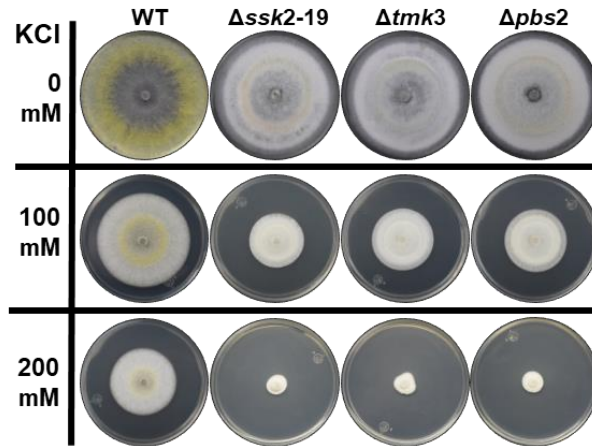
En *Candida albicans*, la activación de la MAPK Hog1 es regulada solo a través de la MAPKKK Ssk2, y esta vía participa en respuestas a estrés osmótico, oxidativo y metales pesado, ya que la mutantes de ambos genes son sensibles y muestran fenotipos similares en estos estreses (Cheetham *et al.*, 2007).

En los ensayos de estrés osmótico llevados a cabo con KCl y sorbitol con conidios de la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta ssk2$ , se observó que las tres mutantes tuvieron fenotipos idénticos en estrés generados con estos dos osmolitos, ya que fue letal en 100 mM KCl (Figura 66-A) y presentaron extrema sensibilidad en 200 mM sorbitol (Figura 66-B), concentraciones en las cuales la cepa WT creció sin dificultad.

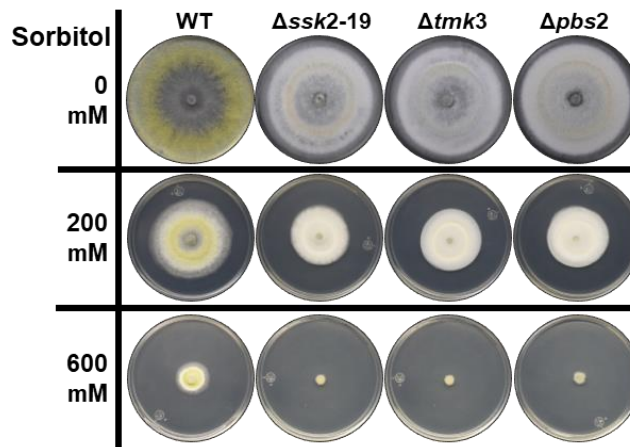


**Figura 66. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la tolerancia a estrés osmótico en conidios.** En placas de PDA adicionada con 0.5% de Tritón X-100 y las concentraciones indicadas de KCl (A) y sorbitol (B), se inocularon 500 conidios de las cepas en el orden indicado en C. Los cultivos fueron incubados a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

En los ensayos con micelio, los fenotipos de sensibilidad entre las cepas mutantes fueron similares, ya que en 100 mM KCl mostraron un crecimiento menor a la cepa WT y gran inhibición en 200 mM KCl (Figura 67), mientras que en 600 mM de sorbitol fue letal para todas las mutantes (Figura 68). Estos resultados indican que la MAPKKK Ssk2 es el activador de la vía de la MAPK Tmk3, al regular respuesta a estrés osmótico.



**Figura 67. Sensibilidad a estrés osmótico por KCl en micelio de la cepa  $\Delta ssk2$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con las concentraciones señaladas de KCl. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.



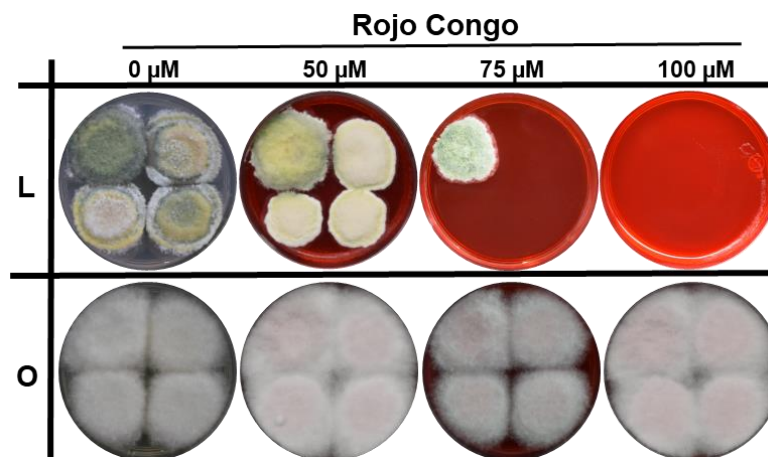
**Figura 68. Sensibilidad a estrés osmótico por sorbitol en micelio de la cepa  $\Delta ssk2$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con sorbitol con las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

### VII.5.3 La MAPKKK Ssk2 regula la integridad de la pared celular a través de la MAPK Tmk3

La vía de la MAPK Tmk3 en *T. atroviride* regula la integridad de la pared celular (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). Para analizar si Ssk2 juega también un rol en esta respuesta, se realizaron ensayos con rojo Congo. En los ensayos de estrés

con conidios, las mutantes carentes de *tmk3*, *pbs2* y *ssk2* aún crecieron en 50  $\mu\text{M}$  rojo Congo, pero notablemente más pequeñas que la cepa WT, y fue letal para todas las cepas mutantes en 75  $\mu\text{M}$  rojo Congo donde solo la cepa WT creció; sin embargo, la concentración de 100  $\mu\text{M}$  rojo Congo fue incluso letal para la cepa silvestre (Figura 69).

Del mismo modo, este ensayo se realizó en oscuridad, y todas las cepas fueron capaces de crecer hasta en concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  sin ningún grado de inhibición, resaltando la importancia de la luz como un factor abiótico que incrementa el efecto del rojo Congo sobre la célula en *T. atroviride*.

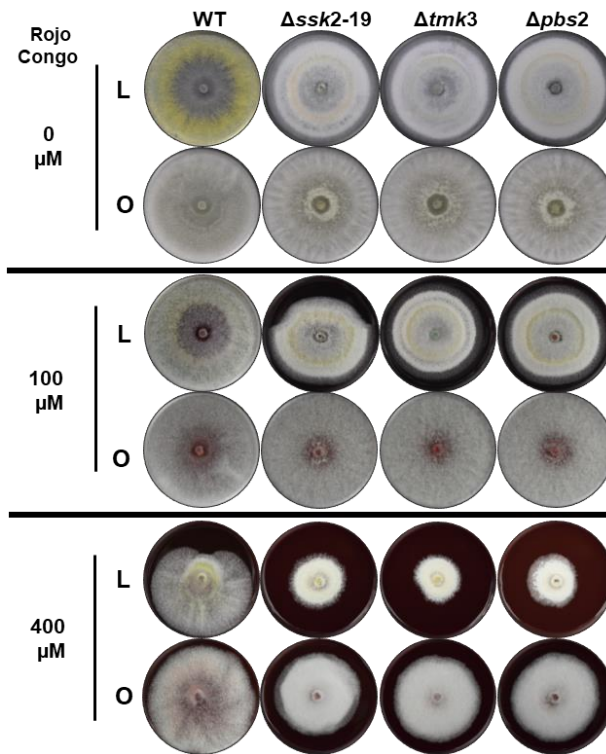


**Figura 69. Análisis de la integridad de la pared celular en conidios de la cepa  $\Delta\text{ssk2}$ .** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de rojo Congo, se inocularon con 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 66-C. Los cultivos fueron incubados a 27  $^{\circ}\text{C}$  por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

Los ensayos con rojo Congo también se llevaron a cabo con micelio de la cepa WT y las mutantes. En 100  $\mu\text{M}$  rojo Congo, las cepas mutantes crecieron solo con un ligero tamaño radial menor a la cepa silvestre. Sin embargo, a 400  $\mu\text{M}$  de rojo Congo fue perceptible la sensibilidad de las mutantes en relación con la WT (Figura 70). De manera similar al ensayo con conidios en oscuridad, las mutantes crecieron sin un importante grado de inhibición en 400  $\mu\text{M}$  de rojo Congo, caso contrario cuando crecieron en condiciones de luz constante. Conforme a estos



resultados, podemos concluir que la MAPKKK Ssk2 participa también en regular la integridad de la pared celular a través de la activación de la MAPKK Pbs2, el cual activa finalmente a la MAPK Tmk3.



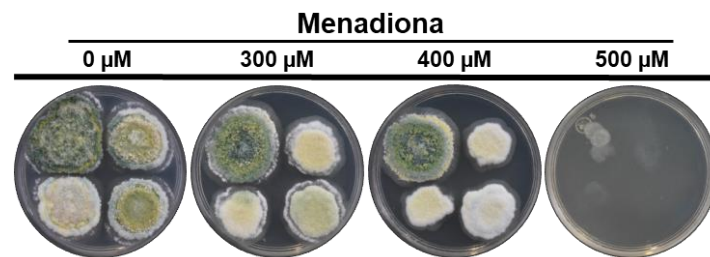
**Figura 70. Análisis de la integridad de la pared celular en micelio de la cepa  $\Delta ssk2$ .** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con rojo Congo con las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

#### VII.5.4 La MAPKKK Ssk2 participa en regular estrés oxidativo

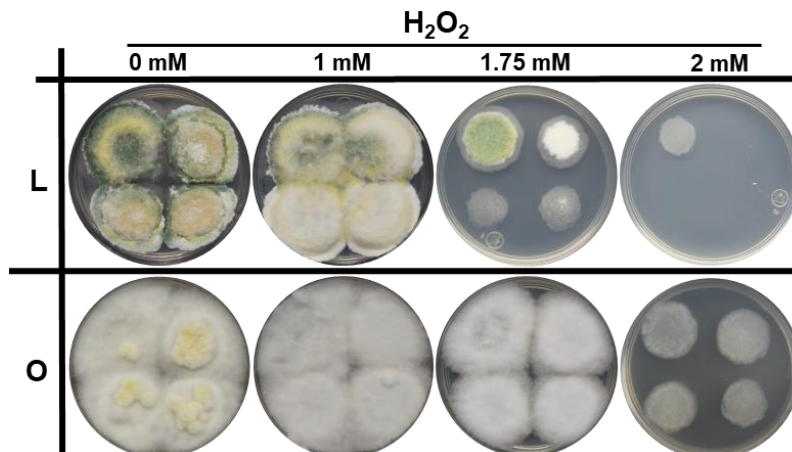
El RR Ssk1 es el activador de la MAPKKK Ssk2/Ssk22 en *S. cerevisiae* (Posas y Saito, 1998). En los anteriores ensayos de estrés oxidativo, las cepas  $\Delta ssk1$  mostraron sensibilidad a estrés por menadiona y  $H_2O_2$ , así como fenotipos similares a la cepa  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$ . Debido a esto, se procedió a realizar los ensayos utilizando los mismos agentes oxidantes con conidios y micelio.

Las cepas  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta ssk2$ , en 400  $\mu M$  menadiona mostraron inhibición en su crecimiento en comparación con la cepa WT, y letalidad en 500  $\mu M$  para todas

las cepas mutantes, donde solo la cepa WT fue capaz de crecer (Figura 71). En el ensayo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de luz constante, en la concentración de 1.75 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observó inhibición del crecimiento de todas las cepas mutantes y letalidad en 2 mM, donde solo la cepa WT fue capaz de crecer. Sin embargo, bajo condiciones de oscuridad, las cepas  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta ssk2$  fueron capaces de crecer en 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 72).

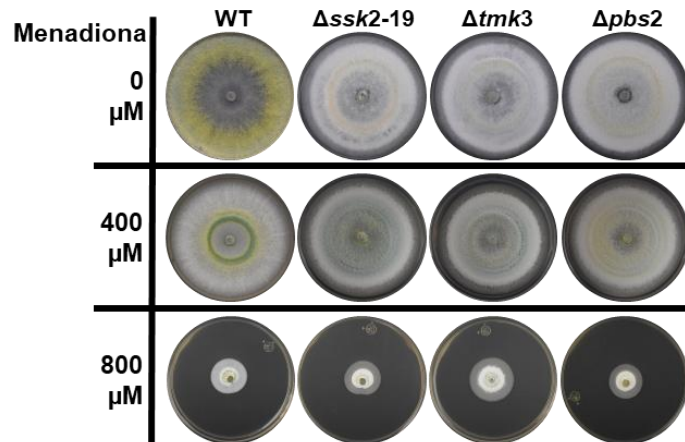


**Figura 71. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la tolerancia a estrés oxidativo por menadiona en conidios.** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de menadiona señaladas, se inocularon con 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 66-C. Los cultivos fueron incubados a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante.



**Figura 72. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la tolerancia a estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en conidios.** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas, se inocularon 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 66-C. Los cultivos fueron incubados a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

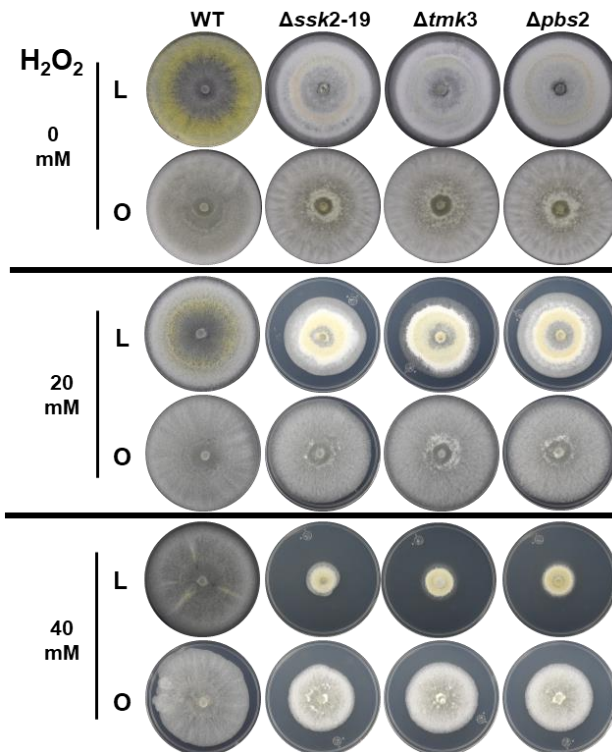
En estrés por menadiona con micelio, el diámetro radial de la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta ssk2$ , fue similar entre ellas en las concentraciones de 400  $\mu\text{M}$  y 800  $\mu\text{M}$  (Figura 73). Por lo tanto, la MAPKKK Ssk2 no estaría participando en regular la respuesta a estrés por menadiona al igual que la MAPK Tmk3 y la MAPKK Pbs2.



**Figura 73. Tolerancia a estrés oxidativo por menadiona en micelio de la cepa  $\Delta ssk2$ .** Discos de micelio fueron inoculados en placas de PDA con menadiona con las concentraciones y las cepas indicadas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

En los ensayos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  crecieron en condiciones de luz constante, las cepas mutantes mostraron un diámetro menor en 20 mM en relación con la cepa WT, que creció sobre toda la caja. En 40 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , las cepas mutantes mostraron una gran inhibición en su crecimiento en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, cuando crecieron en oscuridad se observó menor inhibición en el crecimiento de las cepas mutantes (Figura 74).

De acuerdo con estos resultados experimentales, los componentes de la cascada de señalización SAPK, participan en regular el estrés oxidativo en *T. atroviride*, así como para tolerar estos oxidante en condiciones de luz a través de la MAPK Tmk3.

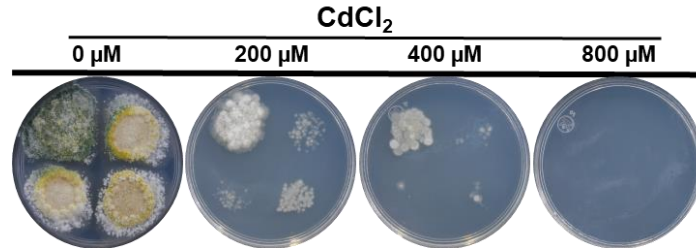


**Figura 74. Efecto de la luz en la tolerancia a estrés oxidativo provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en micelio de la cepa  $\Delta$ ssk2.** Discos de micelio de las cepas indicadas, fueron inoculados en placas de PDA con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las concentraciones señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

### VII.5.5 La MAPKKK Ssk2 regula la tolerancia a Cd en *T. atroviride*

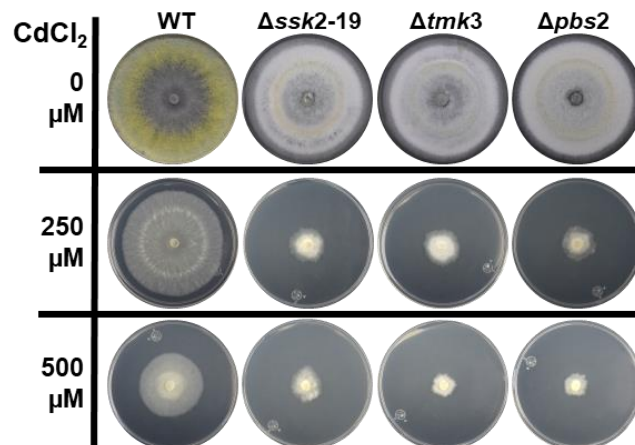
La MAPKKK Ssk2 en *C. albicans* participa en regular respuestas a estrés por metales pesados (Cheetham *et al.*, 2007). Para determinar si la MAPKKK Ssk2 estaría participando en regular estrés por metales pesados a través de la MAPK Tmk3, se realizaron los ensayos con CdCl<sub>2</sub> con conidios y micelio.

En los ensayos con conidios, la cepa  $\Delta$ ssk2 fue capaz de crecer hasta en 400  $\mu$ M, pero con una severa inhibición en su crecimiento; sin embargo, a partir de 200  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> fue posible observar el efecto del cadmio en las cepas mutantes, en comparación con la WT. En la concentración de 800  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> las cepas mutantes y WT mostraron letalidad (Figura 75).



**Figura 75. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la tolerancia a cadmio en conidios.** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de CdCl<sub>2</sub> indicadas, se inocularon 500 conidios de las cepas señaladas en la Figura 66-C. Los cultivos fueron incubados a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

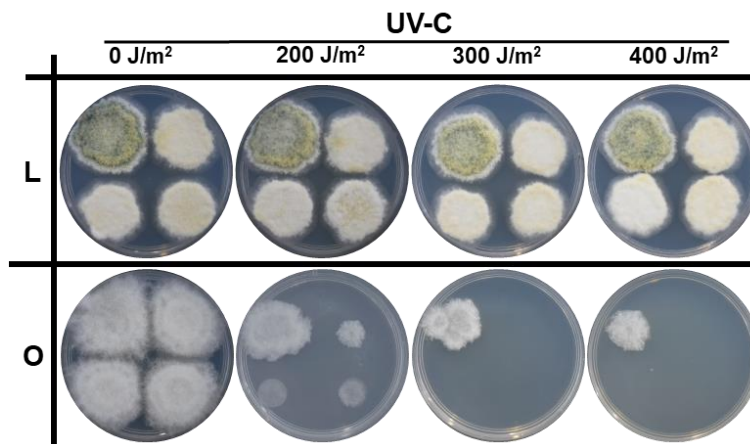
En el estado vegetativo, la cepa mutante de *ssk2* mostró gran inhibición de su crecimiento a partir de 250 μM CdCl<sub>2</sub> en comparación con la cepa silvestre, la cual presentó un mayor diámetro radial, y su fenotipo coincidió con las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ . (Figura 76). La cepa WT aún fue capaz de tolerar la concentración de 500 μM CdCl<sub>2</sub>, lo cual nos señala que la MAPK Tmk3 es importante para tolerar altas concentraciones de cadmio a través de su activación por la MAPKKK Ssk2 y la MAPKK Pbs2.



**Figura 76. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la tolerancia a cadmio en micelio.** Discos de micelio fueron inoculados en placas de PDA con CdCl<sub>2</sub> con las concentraciones y cepas indicadas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

### VII.5.6 La MAPKKK Ssk2 regula respuesta a estrés térmico y daño al ADN por UV

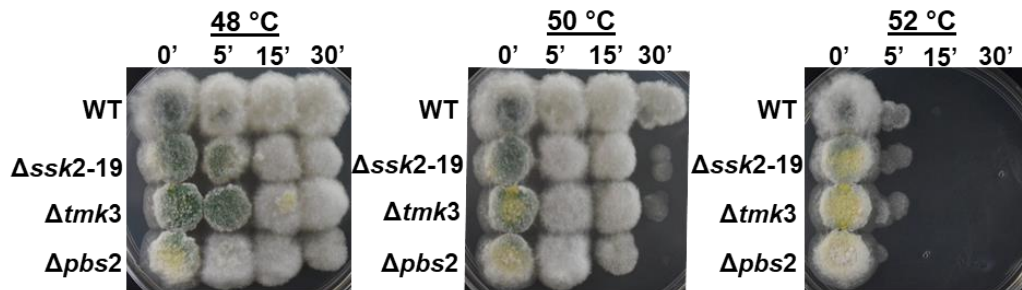
La MAPK Tmk3 participa en regular el sistema de reparación de ADN en oscuridad en *T. atroviride* (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). Para analizar si la MAPKKK Ssk2 participa a través de la vía de la MAPK Tmk3, conidios de la cepa WT,  $\Delta tmk3$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta ssk2$  fueron irradiadas con diferentes dosis de UV-C y posteriormente incubadas en condiciones de luz y oscuridad. Los conidios que crecieron en condiciones de luz constante fueron capaces de crecer hasta en dosis de 400 J/m<sup>2</sup>, indicando que los sistemas de fotorreparación son independientes de la vía de la MAPK Tmk3. Sin embargo, cuando crecieron en oscuridad, en las dosis de 200 J/m<sup>2</sup> las cepas mostraron inhibición en su crecimiento en comparación con las cepas no irradiadas; sin embargo, a partir de la dosis 300 J/m<sup>2</sup> las cepas mutantes mostraron letalidad en comparación con la cepa WT (Figura 77).



**Figura 77. Sensibilidad a la luz UV en conidios de la cepa  $\Delta ssk2$ .** En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5%, se inocularon 500 conidios de las cepas indicadas en la Figura 66-C, posteriormente se aplicaron pulsos de luz UV-C (254 nm) con las dosis señaladas. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante (L) y oscuridad (O).

Asimismo, se analizó la sensibilidad de la cepa  $\Delta ssk2$  ante estrés térmico a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento, comparándola con la cepa WT,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ . En el tratamiento a 48 °C, a los 5, 15 y 30 min, todas las cepas

crecieron sin dificultad, no obstante, en el tratamiento a 50 °C a los 30 min, las cepas mutantes fueron más sensibles que la cepa WT. En el tratamiento a 52 °C, todas las cepas solo fueron capaces de crecer a los 5 min del tratamiento, pero con gran afectación en la germinación (Figura 78).

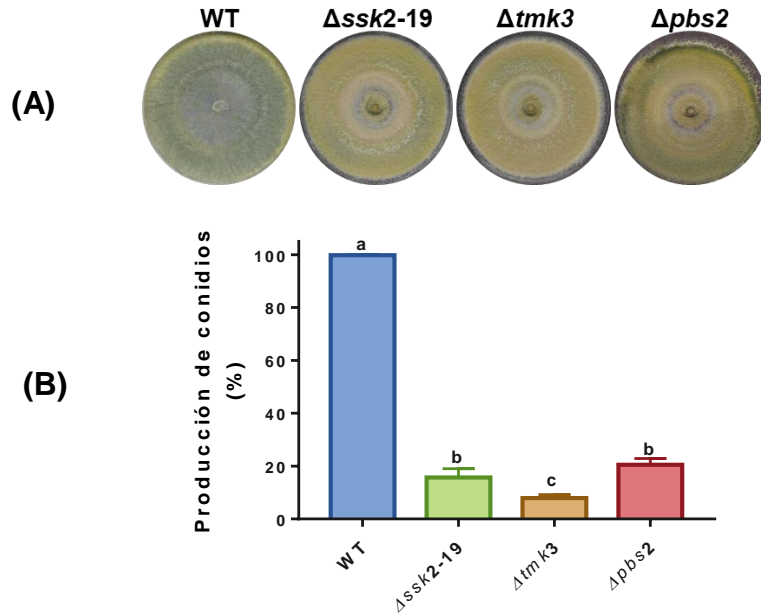


**Figura 78. Tolerancia en conidios de las cepas WT,  $\Delta$ ssk2,  $\Delta$ tmk3 y  $\Delta$ pbs2 a choque térmico.** Una suspensión de 100 conidios por ml fue incubada en un termo-block a la temperatura y tiempos indicados. Posteriormente, gotas de 500 conidios de cada tratamiento fueron inoculados en placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

### VII.5.7 La MAPKKK Ssk2 regula la reproducción asexual en *T. atroviride*

La MAPK Tmk3 y MAPKK Pbs2 regulan la reproducción asexual en *T. atroviride*, donde se ha demostrado que en cepas mutantes carentes de estos genes la producción de conidios se ve reducida aproximadamente en un 80% en relación con la cepa WT (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). Además, los datos mostraron que el RR Ssk1 participa en regular la reproducción asexual, y al considerarse el activador de la MAPKKK Ssk2/Ssk22 en *S. cerevisiae*, se procedió a analizar la producción de conidios estimulada por luz.

Las cepas  $\Delta$ ssk2,  $\Delta$ tmk3,  $\Delta$ pbs2 y WT crecieron en condiciones de luz constante durante 7 días. Las cepas mutantes mostraron fenotipos similares, ya que el micelio de estas, presentaron una tonalidad amarilla (Figura 79-A). Al analizar la producción de conidios, los datos mostraron que en la cepa  $\Delta$ ssk2 hubo una reducción de aproximadamente el 85% al compararse con la cepa silvestre, mientras que la cepa  $\Delta$ tmk3 fue del 93% y en  $\Delta$ pbs2 del 80% (Figura 79-B).



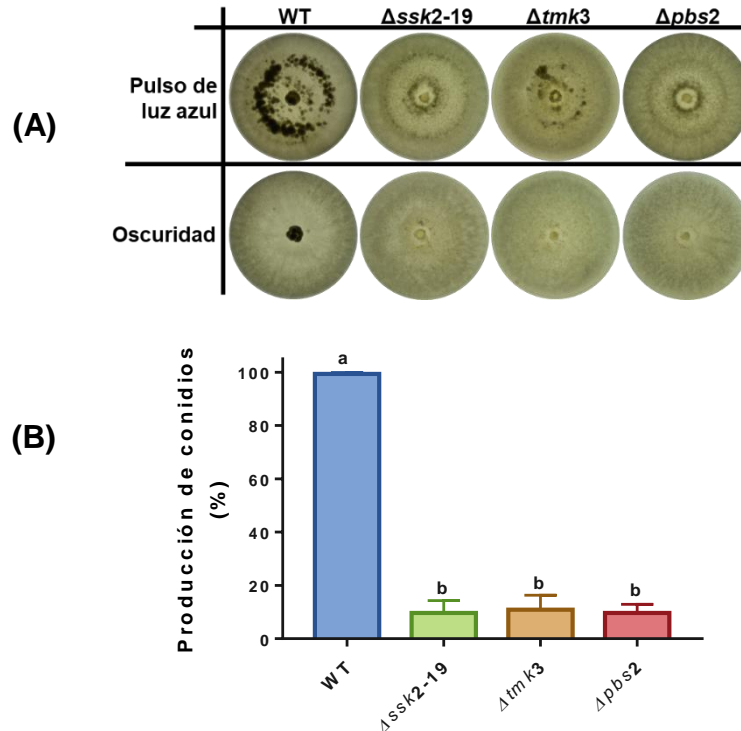
**Figura 79. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la producción de conidios inducida por luz blanca constante. (A)** Fotoconidiación. Discos de micelio se inocularon en placas de PDA de las cepas indicadas, los cultivos se incubaron en presencia constante de luz blanca durante una semana a 27 °C. **(B)** Producción de conidios. Las barras representan los promedios de los valores  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados con el método Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

### VII.5.8 La MAPKKK Ssk2 regula la conidiación inducida por un pulso de luz

La MAPK Tmk3 regula respuestas a períodos cortos de exposición a la luz azul. De acuerdo, a los datos antes mencionados, la MAPKKK Ssk2 participa en la reproducción asexual a través de la MAPK Tmk3, al observarse el defecto en la producción de conidios en la cepa mutante carente de *ssk2*.

Después de realizar los ensayos de fotoinducción, se observó que las cepas mutantes mostraron defectos para responder ante este estímulo, y coincidiendo el fenotipo entre las tres cepas mutantes (Figura 80-A). De igual forma, se procedió a la recolección y cuantificación de conidios, los datos indicaron una reducción de aproximadamente del 93% en la cepa  $\Delta pbs2$  y  $\Delta ssk2$ , y del 90% en  $\Delta tmk3$ , en comparación con la cepa silvestre (Figura 80-B). Por lo tanto, Ssk2 al igual que Tmk3 son importantes para responder de manera oportuna a un pulso de luz azul.



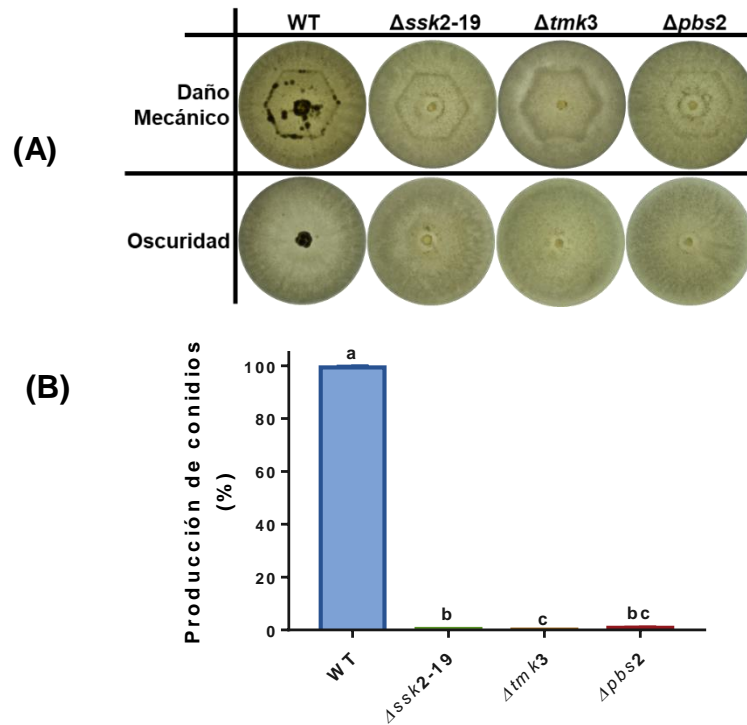


**Figura 80. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la producción de conidios inducidos por un pulso de luz azul.** (A) Conidiación inducida con un pulso de luz. Discos de micelio se inocularon en placas de PDA de las cepas indicadas y se incubaron a 27 °C durante 36 h a 27 °C en oscuridad. Posteriormente, se les aplicó un pulso de 5 min de luz azul ( $145.27 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ ) y se incubaron por otras 48 h en oscuridad. Control crecido en oscuridad por 4 días. (B) Producción de conidios estimuladas con un pulso de luz azul. Se representan los promedios de los valores  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados con el método Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

### VII.5.9 La MAPKKK Ssk2 participa en respuestas por daño mecánico

Las cepas mutantes carentes de *tmk3* y *pbs2* mostraron defectos en la producción de conidios en respuesta a daño mecánico en el micelio. Con la finalidad de establecer si la MAPKKK Ssk2 regula la respuesta a este estímulo, se procedió a realizar un corte sobre el micelio y después de 48 h se evaluó la respuesta. La cepa  $\Delta ssk2$  mostró defectos en la producción de conidios en la zona de daño a diferencia de la cepa WT, coincidiendo en fenotipo con las cepas  $\Delta pbs2$  y  $\Delta tmk3$  (Figura 81-A). Asimismo, se realizó la recolección y la cuantificación de los conidios. Todas las cepas mutantes mostraron una reducción de aproximadamente un 99%

en la producción de conidios en comparación con la cepa silvestre (Figura 81-B). Por lo tanto, la MAPKKK Ssk2 estaría participando en regular, de manera general, la reproducción asexual del hongo a través de la MAPK Tmk3.

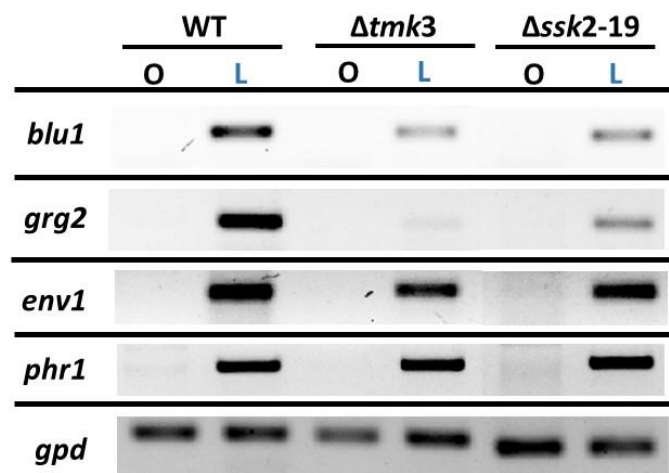


**Figura 81. Participación de la MAPKKK Ssk2 en la producción de conidios inducido por daño mecánico.** (A) Conidiación inducida con daño mecánico. Discos de micelio se inocularon en placas de PDA de las cepas indicadas a 27 °C en oscuridad, transcurrido 36 h se realizaron cortes en el micelio con un molde y se incubaron por 48 h a 27 °C en oscuridad. Control crecido en oscuridad por 4 días. (B) Producción de conidios. Las barras representan los promedios de los valores  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes analizados con el método Tukey-Kramer ( $\alpha=0.05$ ). Las diferencias significativas se representan por las distintas letras sobre las barras.

#### VII.5.10 La MAPKKK Ssk2 regula la expresión de genes regulados por luz azul

En los ensayos de fotoconidiación la  $\Delta ssk2$ , mostró fenotipos similares a las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , debido a la drástica disminución en la producción de conidios inducidos por un pulso de luz o en condiciones de luz constante, coincidiendo de igual manera con las cepas  $\Delta ssk1$ . Conforme a lo anterior, se procedió a analizar la

expresión de los genes dependientes (*blu1* y *grg2*) e independientes (*env1* y *phr1*) de la MAPK Tmk3 en las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta ssk2$ , comparando con la cepa WT. Los resultados mostraron que el nivel de transcrito de *blu1* y *grg2*, se ve severamente reducida en la cepa  $\Delta ssk2$ , coincidiendo con la cepa  $\Delta tmk3$ . Asimismo, los niveles de expresión de *env1* y *phr1* no se vieron afectados en las cepas mutantes (Figura 82). Por lo tanto, estos datos sugieren la participación de Ssk2 en la regulación de estos genes a través de la MAPK Tmk3.

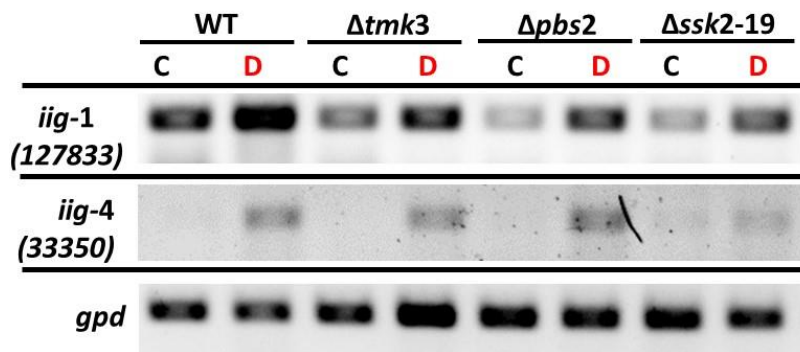


**Figura 82. Participación de la MAPKKK Ssk2 en regular la expresión de genes dependientes de la MAPK Tmk3.** El ADNc se sintetizó a partir de ARN extraído de micelio de las cepas WT,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta ssk1$ , crecidas en oscuridad (O) o expuesto a la luz azul por 30 min (L). Posteriormente, se amplificó mediante una reacción de PCR los genes fotoregulados, y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd*. La expresión de los genes se analizó a los 30 ciclos para los genes *blu-1*, *grg-2*, *env-1* y *phr-1*, y 25 ciclos para *gpd*.

### VII.5.11 La MAPKKK Ssk2 regula parcialmente la expresión de genes de daño mecánico

La MAPKKK Ssk2 participa en la conidiación inducida por daño mecánico, similar a la MAPK Tmk3, la MAPKK Pbs2 y el RR Ssk1, ya que las mutantes de cada uno de los respectivos genes mostraron defectos en la respuesta a este estímulo. Con la finalidad de conocer si Ssk2 participa en la expresión de genes

regulados por el estímulo de daño mecánico, se analizó la expresión del gen *iig-1* (127833), codifica para leucotrieno B4 12-hidroxidehidrogenasa dependiente de NADP, e *iig-4* (33350), codifica una lipoxigenasa. En los niveles del transcrito del gen 127833 se observó una ligera reducción de su expresión en las cepas mutantes, comparándola con la WT. Sin embargo, los niveles de expresión del gen 33350 mostraron un similar patrón de expresión en las cepas mutantes y WT. Estos datos sugieren que probablemente la MAPKKK Ssk2 participa en regular la expresión de manera parcial de genes específicos de daño mecánico a través de la vía de la MAPK Tmk3, sugiriendo la participación de otras vías de señalización para regular este estímulo.



**Figura 83. Expresión de genes regulados por daño mecánico en la cepa  $\Delta$ ssk2.** A partir de ARN total extraído del micelio de las cepas indicadas, crecidas en oscuridad sin daño mecánico (C) o dañadas con un bisturí después de 30 min (D), se sintetizó ADNc. Posteriormente, el ADNc se amplificó mediante una reacción de PCR y los niveles de transcritos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como control de carga se amplificó el gen de expresión constitutiva *gpd*. La expresión de los genes se analizó a los 28 ciclos para *iig-1* e *iig-4*, y 25 ciclos para *gpd*.

## VIII. DISCUSIÓN

### VIII.1 El sistema de dos componentes en *T. atroviride*

En *T. atroviride* se han identificado los componentes del sistema de señalización de dos componentes, el cual está conformado por 12 HKs, una proteína intermediaria, Ypd1 y dos reguladores de respuesta, Ssk1 y Skn7. En *S. cerevisiae*, Ssk1 es el activador de la MAPKKK Ssk2, el cual activa a la MAPK Hog1 por medio de la MAPK Pbs2, para regular la respuesta a estrés osmótico (Maeda *et al.*, 1994; Posas y Saito, 1998).

En el análisis *in silico* realizado con los reguladores de respuesta, se observó que en ortólogos de Ssk1 y Skn7, los dominios REC y HSF se encuentran conservados entre los hongos Ascomicetos, Basidiomicetos y Zigomicetos, diferenciándose solo por la presencia del dominio Coiled-coil que no es altamente conservado entre las diferentes especies (Figura 15 y 19). Además, el aminoácido de aspartato que es fosforilado en el dominio REC de cada una de las respectivas proteínas es altamente conservado entre las diferentes especies de hongos (Figura 16 y 20). Asimismo, en el árbol filogenético con ortólogos de Ssk1 y Skn7, *T. atroviride* se agrupó dentro del linaje de los hongos ascomicetos filamentosos y estrechamente emparentado con *T. reesei*, pero este último se agrupó en un linaje diferente a la de *T. atroviride* (Figura 18 y 21).

Sin embargo, aun cuando el regulador de respuesta Skn7 es muy conservado en el reino Fungi, entre los hongos Ascomicetos, Basidiomicetos y Zigomicetos, y que se encuentren conservados los dominios HSF y REC entre los ortólogos, así como el residuo conservado de aspartato que es fosforilado, las respuestas que regulan difieren entre ellos, ya que la eliminación de Skn7 en *Metarhizium robertsii* no afecta su sensibilidad a estrés osmótico, oxidativo y choque térmico, pero es requerido para el mantenimiento de la pared celular y regula la producción de conidios (Shang *et al.*, 2015). En *Magnaporthe oryzae* la delección del gen no afecta su virulencia, ni formación de apresorios, además de no regular estrés oxidativo y osmótico (Motoyama *et al.*, 2008); asimismo en *Fusarium graminearum* su capacidad de infección no se ve afectada (Jiang *et al.*, 2015). No obstante, la

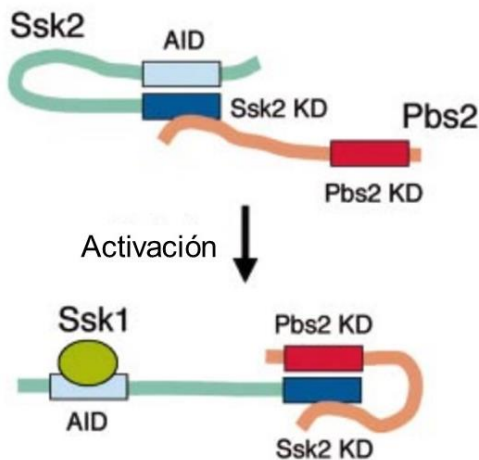
carencia de Skn7 en *C. albicans* atenúa su virulencia (Singh *et al.*, 2004) e incrementa su sensibilidad a peróxido en *Monascus ruber* (Shao *et al.*, 2016). En *Verticillium dahliae*, Skn7 regula la producción de conidios, formación de esclerocios, mantenimiento de la pared celular, virulencia y la adaptación solo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (Tang *et al.*, 2017), mientras que en *A. fumigatus* regula estrés oxidativo generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *t*-BOOH, pero no por menadiona (Lamarre *et al.*, 2007). Por lo que tanto, las respuestas reguladas por los ortólogos de Skn7 varían entre las diferentes especies de hongos.

## VIII.2 Rol de la MAPKKK Ssk2 y los RR Ssk1 y Skn7 en respuestas a estrés

En *S. cerevisiae*, una proteína fosfotransferasa, Ypd1, representa un punto de bifurcación entre la vía Sln1-Ypd1-Ssk1 responsable de las respuestas a estrés osmótico, y la vía Sln1-Ypd1-Skn7 involucrada en la biosíntesis de la pared celular y el control del ciclo celular (Porter y West, 2005). En *C. albicans* y *A. nidulans*, la activación de la vía ortóloga a Hog1 de *S. cerevisiae*, es solo a través del sistema de dos componentes, por medio de la interacción del RR Ssk1 y la MAPKKK Ssk2 (Cheetham *et al.*, 2007 y Furukawa *et al.*, 2005). En *S. cerevisiae*, han reportado que la interacción entre estas dos proteínas en respuesta a estrés osmótico, ocurre a través del dominio receptor C-terminal de Ssk1 con un segmento de N-terminal de Ssk2 (Figura 84), autofosforilandose rápidamente y activando la MAPKK Pbs2, y la MAPK Hog1 (Posas *et al.*, 1996; Posas y Saito, 1998; Tatebayashi *et al.*, 2003).

Con el objetivo de determinar la participación de Ssk2, Ssk1 y Skn7 en *T. atroviride* en las respuestas a diferentes tipos de estrés, se realizaron ensayos cuando el hongo se encontró en su fase latente (conidios) y en su estado vegetativo (micelio). En los diferentes ensayos de estrés, las cepas mutantes carentes de *ssk1* y *ssk2*, mostraron fenotipos similares a las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ . En *C. albicans*, la eliminación de *SSK2* resulta en comparables fenotipos en estrés y morfología con la cepa  $\Delta hog1$ , así como necesaria para la fosforilación y acumulación nuclear de Hog1 (Cheetham *et al.*, 2007). Sin embargo, en *T. atroviride* los fenotipos

observados en las cepas  $\Delta skn7$ , difieren de  $\Delta ssk1$  y  $\Delta ssk2$ , ya que incluso presentaron mayor tolerancia que la cepa WT.



**Figura 84. Modelo de activación de la MAPKK Pbs2 por la MAPKKK Ssk2.** En un estado inactivo, el dominio autoinhibidor (AID) N-terminal de Ssk2, se une y bloquea la actividad de su propio dominio cinasa (KD). Pbs2 está unido de forma constitutiva a Ssk2, a través de su dominio de acoplamiento N-terminal, pero el dominio cinasa Pbs2 no tiene acceso para desbloquear el dominio cinasa de Ssk2. Cuando el activador de Ssk2, el RR Ssk1, se une a una región cercana a AID, el dominio cinasa Ssk2 se vuelve accesible para el dominio de cinasa Pbs2 (Imagen modificada de Tatebayashi *et al.*, 2003).

En estrés osmótico, las cepas  $\Delta ssk1$  y  $\Delta ssk2$  presentaron letalidad en 100 mM KCl y gran inhibición en su crecimiento en 200 mM sorbitol con conidios (Figura 45 y 66). Asimismo, a partir de 100 mM KCl (Figura 46 y 67) y 200 mM sorbitol (Figura 47 y 68) presentaron mayor sensibilidad en estado vegetativo que la cepa WT. Sin embargo, el RR Skn7 parece no regular las respuestas en estrés osmótico en conidios, ya que presentan igual tolerancia que la cepa silvestre en KCl y sorbitol (Figura 24). No obstante, cuando se realizaron los ensayos de estrés en estado vegetativo del hongo, las cepas mutantes de *skn7* mostraron mayor tolerancia que la cepa WT,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  (Figura 25 y 26). En *V. dahliae*, han reportado que las mutantes de *VdSkn7* no muestran sensibilidad en NaCl, KCl y sorbitol (Tang *et al.*, 2017), ocurriendo lo mismo en las mutantes de  $\Delta skn7$  de *C. neoformans* en medio con KCl (Bahn *et al.*, 2006). De igual forma, se analizó la integridad de la pared

celular empleando rojo Congo en condiciones de luz constante y oscuridad. En los ensayos con conidios, la concentración de 75  $\mu\text{M}$  rojo Congo fue letal para las cepas  $\Delta\text{ssk1}$ ,  $\Delta\text{ssk2}$ ,  $\Delta\text{tmk3}$  y  $\Delta\text{pbs2}$  (Figura 48 y 69), y mostraron mayor inhibición en su crecimiento radial en 400  $\mu\text{M}$  rojo Congo en micelio (Figura 49 y 70) cuando crecieron en condiciones de luz constante, efecto que es revertido cuando crecieron en oscuridad. En los ensayos con las cepas de  $\Delta\text{skn7}$ , estas mostraron mayor tolerancia que la cepa WT al rojo Congo en conidios (Figura 27). Sin embargo, en micelio las mutantes mostraron fenotipos similares a la WT (Figura 28). En *C. albicans* y *S. pombe*, la carencia de los homólogos de *skn7*, no afecta la integridad de la pared celular (Shang *et al.*, 2015). Por lo tanto, el RR Ssk1 y la MAPKKK Ssk2, estarían participando en regular respuesta a estrés osmótico y la integridad de la pared celular a través de la MAPK Tmk3, mientras que el RR Skn7 actuaría como un regulador negativo en respuesta a estos estímulos dependiendo del estadio de desarrollo en que se encuentre *T. atroviride*.

En *C. albicans*, Ssk1 es esencial para regular estrés oxidativo (Chauhan *et al.*, 2003). En los ensayos con conidios, las cepas  $\Delta\text{ssk1}$ ,  $\Delta\text{ssk2}$ ,  $\Delta\text{tmk3}$  y  $\Delta\text{pbs2}$  mostraron severa inhibición en su crecimiento en menadiona (Figura 50 y 71) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 51 y 72). No obstante, en micelio las cepas mutantes no regulan el estrés generado por menadiona (Figura 52 y 73), coincidiendo en fenotipo con la cepa WT, pero en los ensayos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  las cepas mutantes mostraron severa inhibición a partir de 40 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual es más visible cuando crecieron en condiciones de luz constante que en oscuridad (Figura 53 y 74). Las cepas mutantes carentes de *skn7* mostraron fenotipos de mayor tolerancia en conidios a estrés oxidativo por menadiona y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en comparación con la cepa WT,  $\Delta\text{tmk3}$  y  $\Delta\text{pbs2}$  (Figura 29 y 30). En estado vegetativo, Skn7 no participa en regular estrés oxidativo por menadiona (Figura 31), similar a lo observado en las cepas  $\Delta\text{ssk1}$  y  $\Delta\text{ssk2}$ , aunque en  $\text{H}_2\text{O}_2$  mostraron ser más tolerantes que las mutantes (Figura 32). En *A. fumigatus*, las mutantes de *afskn7* mostraron mayor sensibilidad en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y *t*-BOOH, pero no en menadiona (Lamarre *et al.*, 2007); sin embargo, en el hongo *M. robertsii*, se ha documentado que la cepa WT son más sensibles a *t*-BOOH que las cepas  $\Delta\text{Mrskn7}$  (Shang *et al.*, 2015), lo cual coincide con lo observado con las cepas



$\Delta skn7$ , lo que implica que *Skn7* estaría actuando como un regulador negativo en estrés oxidativo, mientras que *Ssk1* y *Ssk2* estarían regulando este estímulo a través de la MAPK *Tmk3*.

La MAPKKK *Ssk2* en *C. albicans* regula respuestas por metales pesados (Cheetham *et al.*, 2007). En *T. atroviride*, la vía de la MAPK *Tmk3* es importante para tolerar la toxicidad por metales pesados (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). En los ensayos con cadmio, las mutantes carentes de *ssk1* y *ssk2* mostraron severa inhibición en su crecimiento a partir de 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (Figura 54 y 75) en comparación con la cepa WT, mostrando similitud con las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , dicho efecto es también notable en su estado vegetativo, donde a partir de 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (Figura 55 y 76) mostraron importante inhibición en su crecimiento con relación a la cepa WT. No obstante, las cepas de  $\Delta skn7$  mostraron una gran tolerancia a este metal, ya que la concentración de 1000  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  fue letal para las cepas WT,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , mientras que las cepas  $\Delta skn7$  fueron más tolerantes a este estrés oxidante (Figura 33). De la misma forma, el micelio de las mutantes del RR *Skn7* mostraron un diámetro radial mayor que la cepa silvestre, mientras que las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  mostraron una drástica inhibición en su crecimiento desde 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  y letalidad a 600  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (Figura 34). El fenotipo observado de la cepa  $\Delta skn7$  de *T. atroviride* es similar al reportado en *S. cerevisiae*, ya que la mutante carente de *skn7* mostró mayor resistencia que la cepa silvestre y sugieren que la proteína *Yap1* es la que regula la toxicidad por cadmio, ya que las mutantes de este gen mostraron extrema sensibilidad a este metal (Lee *et al.*, 1999).

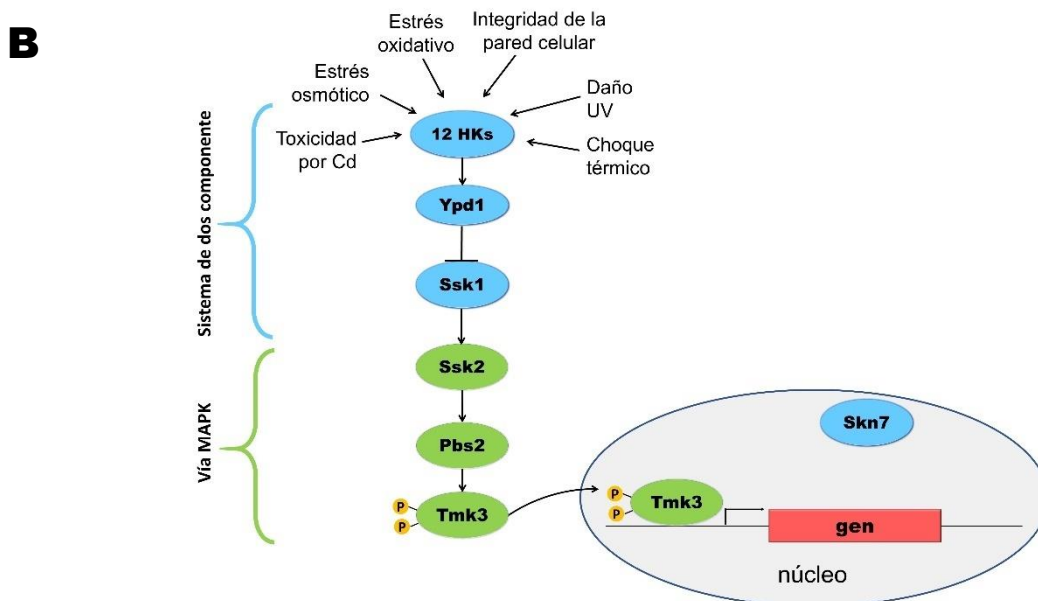
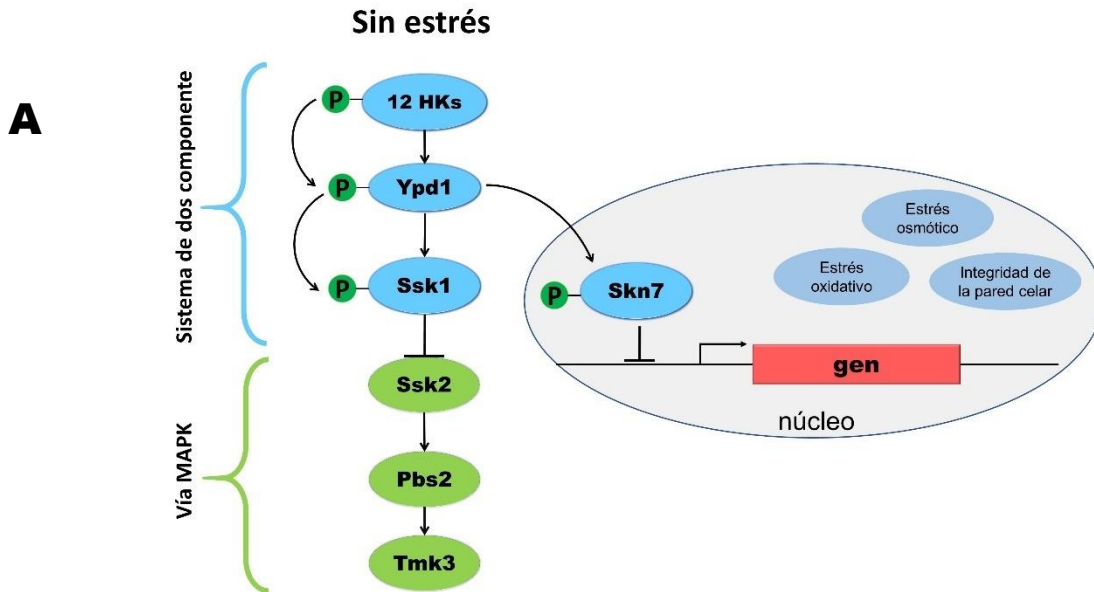
La vía de la MAPK *Tmk3* regula estrés térmico y participa en los sistemas de reparación de ADN que operan en oscuridad (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016), razón por la cual se realizaron los ensayos con conidios de las cepas  $\Delta ssk1$  y  $\Delta ssk2$  que fueron irradiados con luz UV-C y tratadas térmicamente, siendo comparadas con las cepas WT,  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ . Las cepas mutantes irradiadas con diferentes dosis de luz UV-C, mostraron defectos de germinación cuando crecieron en oscuridad a partir de 200  $\text{J}/\text{m}^2$ , efecto revertido cuando crecen en condiciones de luz blanca constante (Figura 56 y 77), mientras que la cepa  $\Delta skn7$  mostró un fenotipo similar a la WT en las diferentes dosis de irradiación (Figura 35). En el tratamiento térmico,

las cepas  $\Delta ssk1$  y  $\Delta ssk2$ , mostraron inhibición en su crecimiento en comparación de la WT (Figura 57 y 78), donde la cepa  $\Delta skn7$  mostró similitud con esta. En *Candida lusitanae*, se ha reportado que el RR Skn7 no regula respuestas por choque térmico y por UV (Ruprich-Robert *et al.*, 2008), coincidiendo este fenotipo con lo observado en *T. atroviride*. Cabe mencionar que, en los ensayos de estrés térmicos, se emplearon dos cepas mutantes de *ssk1* y *skn7*, cada una de las cuales se comportó de manera diferente, pero aun fue posible observar el efecto del tratamiento y compararse con la WT, por lo cual en dichos ensayos sería conveniente realizar un ensayo cuantitativo de los conidios capaces de germinar después de un tratamiento térmico y poder establecer con precisión la participación de las respectivas proteínas en respuesta a estrés térmico.

Los resultados en los diferentes ensayos de estrés, nos indican que el RR Ssk1 y la MAPKKK Ssk2 actúan río arriba de la MAPKK Pbs2 y la MAPK Tmk3 en regular estrés osmótico, oxidativo, integridad de la pared celular, tolerancia a altas concentraciones a CdCl<sub>2</sub>, choque térmico y daño por UV, mientras que el RR Skn7 tiene un rol de represor, que depende del estado del estado de desarrollo de *T. atroviride* (Figura 85).

### **VIII.3 Rol de Ssk2, Ssk1 y Skn7 en respuesta a daño mecánico**

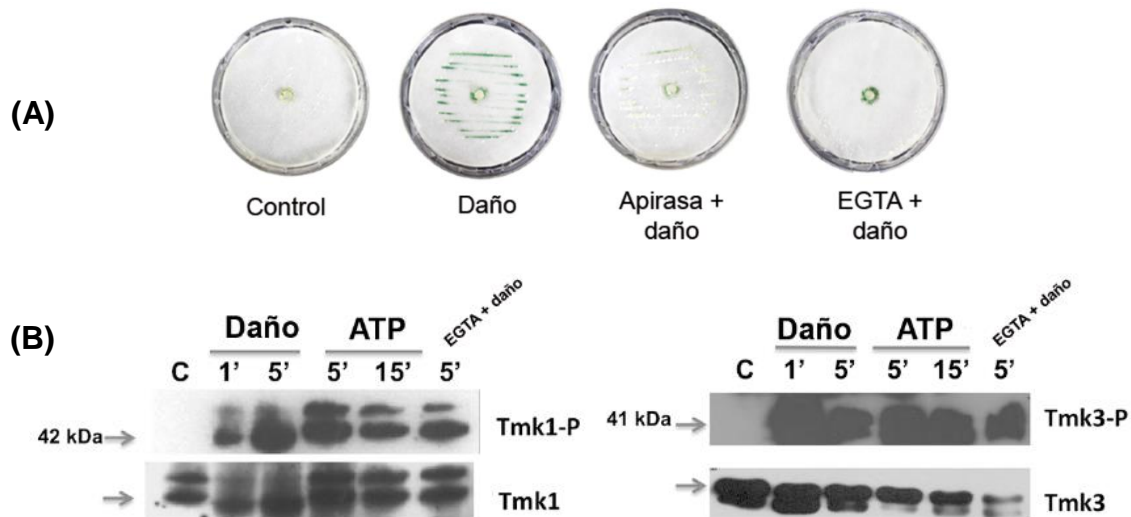
En *T. atroviride* la conidiación puede ser inducida al realizar daño mecánico sobre el micelio (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). En estos ensayos, las cepas  $\Delta skn7$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta ssk2$  se fueron incapaces de responder apropiadamente a este estímulo, compartiendo fenotipos con las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$  (Figura 39, 60 y 81). La producción de conidios en todas las cepas mutantes se vio reducida aproximadamente en un 99%, reforzando así el hecho de que participan a través de la vía de la MAPK Tmk3 u otras vías de señalización.



**Figura 85. Modelo hipotético de la participación de Ssk2, Ssk1 y Skn7 en *T. atroviride* en respuestas a estrés.** (A) Se propone que el sistema de dos componentes (TCS) transfiera el grupo fosfato de las HKs a Ypd1, y este a los reguladores de respuesta Ssk1 y Skn7 cuando no hay la percepción de algún estímulo extracelular. El RR Ssk1 actúa como un represor de la vía de la MAPK Tmk3, mientras que el RR Skn7 fosforilado es un regulador negativo, involucrado en respuestas a estrés osmótico, oxidativo y la integridad de la pared celular. (B) Cuando se percibe un estímulo por las HKs, el TCS se desfosforila y Ssk1 interactúa con la MAPKKK Ssk2, quien activa la MAPKK Pbs2 y finalmente a la MAPK Tmk3, para regular la expresión de genes en respuesta al estímulo recibido.

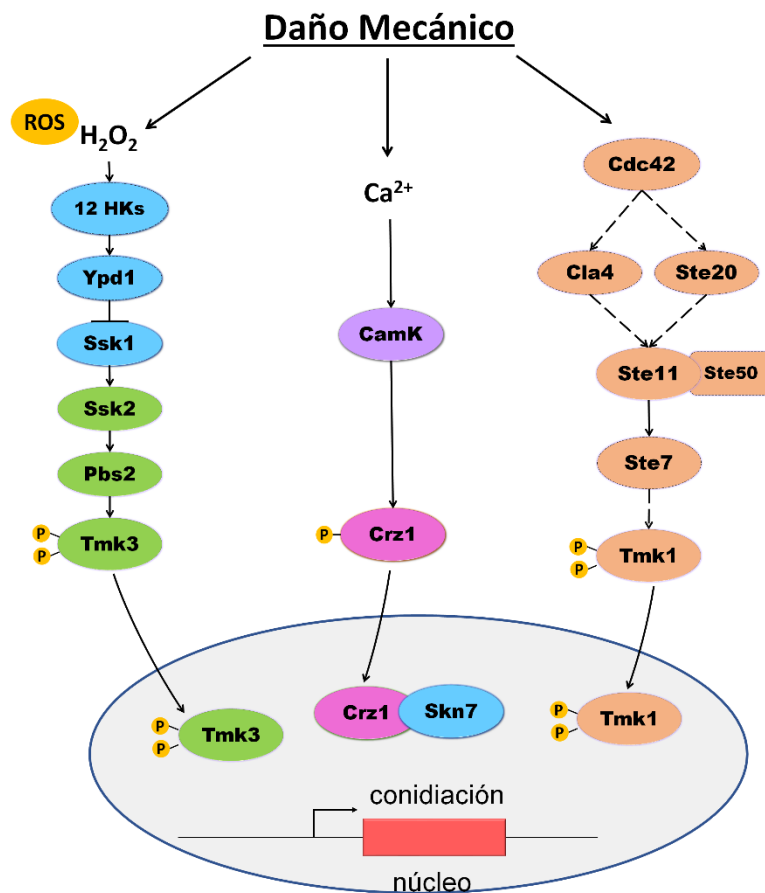
Con respecto a los fenotipos observados en las cepas mutantes, se procedió al análisis de la expresión de dos genes inducidos en respuesta al daño mecánico. El patrón de expresión de *iig-1* fue similar en todas las mutantes y ligeramente menor en comparación a la cepa WT, mientras que los niveles del transcrito de *iig-4* fueron similares entre las cepas tanto mutantes como WT, a excepción de la cepa  $\Delta tmk1$  donde se observó una menor expresión (Figura 41, 62 y 83). Estos datos nos sugieren la probable participación parcial de Ssk1, Ssk2 y Skn7, en conjunto con Tmk3 y Pbs2, en regular la expresión de genes específicos de daño y la intervención de otras vías de señalización.

En *T. atroviride*, las respuestas a daño mecánico son reguladas a través de la MAPK Tmk3, Tmk1 y la vía de señalización de calcio. Durante esta respuesta, especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas por el complejo NADPH oxidasa (Nox1/NoxR), el cual es estimulado por ATP extracelular (eATP), y activa por fosforilación la vía de la MAPK Tmk3, mientras que el  $Ca^{2+}$  es una potencial molécula señal de daño, ya que al usar un agente quelante de calcio (EGTA) después del estímulo, se reduce la conidiación en un 98% en la cepa WT (Medina-Castellanos *et al.*, 2014) (Figura 86).



**Figura 86. Respuestas en *T. atroviride* en daño mecánico. (A)** Efecto de la apirasa y EGTA en la conidiación inducida por daño mecánico. **(B)** Fosforilación de Tmk1 y Tmk3 en respuesta a daño mecánico y ATP extracelular (eATP). La cepa WT fue tratada con ATP (0.1 mM) o EGTA (15 mM) (Imagen modificada de Medina-Castellanos *et al.*, 2014).

En *S. cerevisiae*, se ha descrito que la forma no fosforilada de Skn7 participa en la transcripción de genes dependientes de calcineurina/Crz1, inducidos por  $Ca^{2+}$ , a través de su interacción con Crz1, confiriéndole estabilidad a esta proteína (Williams y Cyert, 2001). Por lo tanto, el RR Skn7 de *T. atroviride* posiblemente estaría participando en la vía de señalización de calcio a través de la interacción con Crz1, mientras que Ssk1 y Ssk2 lo estarían haciendo a través de la vía de la MAPK Tmk3 (Figura 87).



**Figura 87. Modelo hipotético de la participación de Ssk2, Ssk1 y Skn7 en respuesta a daño mecánico en *T. atroviride*.** La respuesta a daño mecánico es regulada a través de tres vías de señalización que son indispensable para una oportuna respuesta: la vía de señalización de calcio, la vía de la MAPK Tmk3 y Tmk1. La activación de la vía de la MAPK Tmk3 es llevada a cabo por la producción de ROS, mientras que el  $Ca^{2+}$  activa la vía de señalización de calcio. El RR Ssk1 y la MAPKKK Ssk2 estarían participando a través de la vía de la MAPK Tmk3, en cambio el RR Skn7 podría estar participando en la vía de señalización del calcio, a través de la interacción con Crz1.

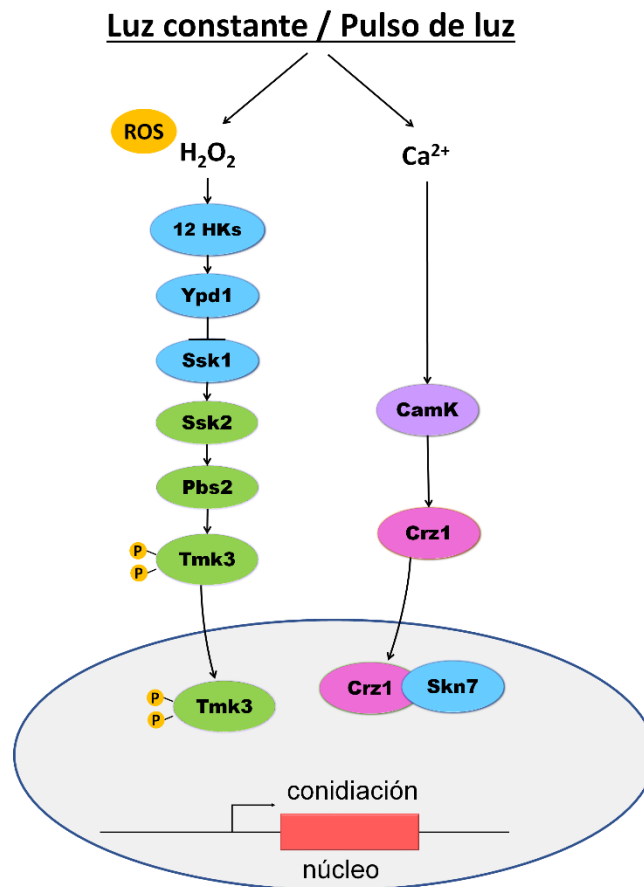
#### VIII.4 Participación de *Skn7*, *Ssk1* y *Ssk2* en respuestas a la luz

La MAPK *Tmk3* es un importante regulador de la reproducción asexual de *T. atroviride*, ya que las cepas mutantes carentes de *tmk3* y de *pbs2*, mostraron una drástica reducción en la producción de conidios (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). Este fenotipo concordó con lo observado en las cepas  $\Delta ssk1$  y  $\Delta ssk2$ , donde mostraron una reducción de aproximadamente el 85-92% en  $\Delta ssk1$  y de 85% en  $\Delta ssk2$  (Figura 58 y 79). Sin embargo, en las cepas  $\Delta skn7$  su fenotipo es similar a la WT, las cuales mostraron una reducción en la producción de conidios entre el 7-27% con respecto a la cepa silvestre (Figura 37).

Después de este análisis, se procedió a evaluar la respuesta de las cepas  $\Delta ssk1$ ,  $\Delta ssk2$  y  $\Delta skn7$  en un pulso de luz azul. Las cepas  $\Delta ssk1$  y  $\Delta ssk2$  mostraron defectos en la producción de conidios en respuesta a este estímulo (Figura 59 y 80) en comparación con la cepa WT y coincidiendo con las cepas  $\Delta tmk3$  y  $\Delta pbs2$ , pero sorprendentemente las cepas  $\Delta skn7$  mostraron un fenotipo similar (Figura 38). Al analizar la reducción de la producción de conidios por un pulso de luz, se observó que las cepas  $\Delta skn7$  se vieron afectadas en un 80%, mientras que en  $\Delta ssk1$  fue entre 89-97% y del 93% en  $\Delta ssk2$ , en comparación con la cepa WT. Estos datos nos indican, que el RR *Ssk1* y la MAPKKK *Ssk2* regulan de manera general la reproducción asexual del hongo. Además, nos sugieren que los mecanismos moleculares para desarrollar una respuesta temprana o una respuesta por exposiciones prolongadas a la luz son diferentes, al observarse diferentes fenotipos en las cepas  $\Delta skn7$  cuando están creciendo en luz constante o al ser expuesta a un pulso de luz. En los análisis de RT-PCR de los genes fotoregulados, los niveles del transcrito de *blu1* y *grg2* de la cepa  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$  y  $\Delta skn7$ , coincidieron con lo observado en la cepa  $\Delta tmk3$ , ya que mostraron una drástica disminución en su expresión, mientras que los niveles de expresión de *env1* y *phr1* se mostraron de manera similar entre las mutantes y la cepa WT (Figura 40, 61 y 82).

La luz induce la producción de ROS (Neill *et al.*, 2002) y en *T. atroviride* han comprobado que la producción de ROS dependiente de Nox-1, participa en la activación de la MAPK *Tmk3*, ya que en la cepa  $\Delta nox1$  no observan la fosforilación

de Tmk3 (Medina-Castellanos *et al.*, 2014). Además, en *S. cerevisiae* han determinado que la vía de calcio  $\text{Ca}^{2+}$ -calcineurina-Crz1 es activada por la luz azul, ya que Crz1 muestra una localización nuclear rápida y permanente inducida por la iluminación (Bodvard *et al.*, 2013), sin olvidar que Skn7 es necesaria para la activación transcripcional y estabilización de Crz1 (Williams y Cyert, 2001). Por lo tanto, el RR Ssk1 y la MAPKKK Ssk2 estarían participando en la misma vía regulando los estímulos de luz a través de la MAPK Tmk3, mientras que el RR Skn7 podría estar participando mediante la interacción con Crz1 por medio de la vía de calcio en *T. atroviride* (Figura 88).



**Figura 88. Modelo hipotético de la participación de Ssk1, Ssk2 y Skn7 en respuesta a la luz en *T. atroviride*.** En el modelo se propone que Ssk1 y Ssk2 forman parte de la misma vía que percibe los estímulos de la luz azul a través de las HK del TCS, dicha respuesta es regulada a través de la MAPK Tmk3. El RR Skn7 estaría interactuando con Crz1, para regular de manera temprana la exposición a un pulso de luz.

Estudios recientes en la vía de la MAPK SakA de *A. nidulans*, ortóloga a Tmk3, han determinado que, además de regular respuestas a estrés, también es activada por la luz roja (Yu *et al.*, 2016), la cual regula su reproducción. En *T. atroviride*, los resultados obtenidos indicarían que la vía de la MAPK Tmk3 regula respuestas a la luz azul, abriendo la posibilidad que una de las HK sea el receptor de luz azul, para finalmente activar la MAPK Tmk3.



## IX. CONCLUSIONES

- El RR Ssk1 y la MAPKKK Ssk2 forman parte de la misma vía de señalización que regula diferentes tipos de estrés a través de la MAPKK Pbs2 y la MAPK Tmk3 en *T. atroviride*.
- Las HKs son los receptores del estímulo de luz azul, ya que los fenotipos de las cepas mutantes carentes de *ssk1*, *ssk2*, *pbs2* y *tmk3* son similares en respuesta a luz.
- El RR Ssk1 y la MAPKKK Ssk2 regulan la conidiación inducido por luz azul y daño mecánico al igual que la MAPK Tmk3.
- El RR Skn7 es un regulador negativo en respuestas a estrés osmótico, oxidativo y la integridad de la pared celular de acuerdo con el estado de desarrollo de *T. atroviride*.
- El RR Skn7 es indispensable para regular la conidiación en pulso de luz y daño mecánico.
- El mecanismo molecular implicado en la conidiación inducida por exposiciones cortas o prolongadas a la luz es diferente, ya que Skn7 es requerida en un pulso de luz azul, mas no en una exposición prolongada a la luz blanca.

## X. PERSPECTIVAS

- Confirmar por Southern-blot el reemplazo de los genes *ssk2*, *ssk1* y *skn7* en las cepas mutantes.
- Analizar por Western-blot, la fosforilación de la MAPK Tmk3 en las mutantes carentes de *ssk2*, *ssk1* y *skn7* bajo condición de estrés oxidativo y luz azul.
- Analizar la activación por fosforilación de la MAPK Tmk3 en las mutantes carentes de *ssk2*, *ssk1* y *skn7* en respuesta a daño mecánico.
- Realizar una mutación puntual en los residuos conservados de aspartato de Ssk1 y Skn7 y analizar sus respuestas en estrés y luz azul.
- Generar cepas complementadas de las cepas  $\Delta$ *ssk2*,  $\Delta$ *ssk1* y  $\Delta$ *skn7*, para restaurar el fenotipo original.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambra, R., Grimaldi, B., Zamboni, S., Filetici, P., Macino, G., Ballario, P.** (2004) Photomorphogenesis in the hypogeous fungus *Tuber borchii*: isolation and characterization of Tbwc-1, the homologue of the blue-light photoreceptor of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*, **41**: 688-697.
- Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Peña-Cabriales, J.J.** (2009) El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev Int Contam Ambient*, **25**: 257-269.
- Avalos, J., Estrada, A.F.** (2010) Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genet Biol*, **47**: 930-938.
- 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*. *Mol Biol Cell*, **17**: 3122-3135.
- Bahn, Y.S., Geunes-Boyer, S., Heitman, J.** (2007) Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase governs divergent patterns of the stress-activated Hog1 signaling pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*, **6**: 2278-2289.
- Ballario, P., Macino, G.** (1997) White collar proteins: PASSing the light signal in *Neurospora crassa*. *Trends Microbiol*, **5**: 458-462.
- Bayram, O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P., Braus, G.H.** (2008) More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell*, **19**: 3254–3262.
- Bayram, O., Braus, G.H., Fischer, R., Rodriguez-Romero, J.** (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol*, **47**: 900-908.
- Belozerkaya, T.A., Gessler, N.N., Isakova, E.P., Deryabina, Y.I.** (2012) *Neurospora crassa* light signal transduction is affected by ROS. *J Signal Transduct*, **2012**: 791963, doi: 10.1155/2012/791963.
- Bem, A.E., Velikova, N., Pellicer, M.T., Baarlen, P.V., Marina, A., Wells, J.M.** (2015) Bacterial Histidine Kinases as novel antibacterial drug targets. *ACS Chem Biol*, **10**: 213-224.
- Berrocal-Tito, G.M., Esquivel-Naranjo, U.E., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A.** (2007) *Trichoderma atroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. *Eukaryot Cell*, **6**: 1682–1692.

- Besant, P.G., Tan, E., Attwood, P.V.** (2003) Mammalian protein histidine kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**: 297-309.
- 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. *Curr Biol*, **15**: 1833–1838.
- Bodvard, K., Jörhov, A., Blomberg, A., Molin, M., Käll, M.** (2013) The yeast transcription factor Crz1 is activated by light in a Ca<sup>2+</sup>/Calcineurin-dependent and PKA-independent manner. *PLoS ONE*, **8**: e53404. doi:10.1371/journal.pone.0053404
- Brown, J.L., Bussey, H., Stewart, R.C.** (1994) Yeast Skn7 functions in eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J*, **13**: 5186-5194.
- Buelow, D.R. and Raivio, T.L.** (2010) Three (and more) component regulatory systems – auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol*, **75**: 547-566.
- Calcáneo-Hernández, G.** (2016). Papel de la HK Os-1 y la MAPKKK Ste11 en las respuestas a estrés y la luz azul en *Trichoderma atroviride*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Carreras-Villaseñor, N., Sánchez-Arreguín, J. A., Herrera-Estrella, A. H.** (2012) *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology* **158**: 3–16.
- 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.
- Casas-Flores, S. Rios-Momberg, M., Rosales-Saavedra, T., Martínez-Hernández, P. Olmedo-Monfil, V., Herrera-Estrella, A.** (2006) Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot Cell*, **5**: 499-506.
- Castellanos, F., Schmoll, M., Martínez, P., Tisch, D., Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A., Esquivel-Naranjo, E. U.** (2010). Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol*, **47**: 468-76.
- Cerdá-Olmedo, E.** (2001) *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol Rev*, **25**: 503–512.
- Chapeland-Leclerc, F., Dilmaghani, A., Ez-Zaki, L., Boisnard, S., Da Silva, B., Gaslonde, T., Porée, F.H., Ruprich, R.** (2015) Systematic gene deletion and functional characterization of histidine kinase phosphorelay receptors (HKRs) in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*, **84**, 1-11.

- Chauhan, N., Inglis, D., Roman, E., Pla, J., Li, D., Calera, J.A., Calderone, R.** (2003) *Candida albicans* Response Regulator gene *SSK1* regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot Cell*, **2**: 1018-1024.
- Chauhan N.** (2015) Two-component phosphorelays in fungal mitochondria and beyond. *Mitochondrion*, **22**: 60-65.
- Cheetham, J., Smith, D.A., da Silva Santas, A., Doris, K.S., Patterson, M.J., Bruce, C.R., Quinn, J.** (2007) A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, **18**: 4603-4614.
- Chen, C.H., Dunlap, J.C., Loros, J.J.** (2010) *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genet Biol*, **47**: 922-929.
- Corrochano, L.M., Garre, V.** (2010) Photobiology in the Zygomycota: multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genet Biol*. **47**: 893-899.
- Dubey, M.K., Ubhayasekera, W. Sandgren, M., Jensen, D.F. y Karlsson, M.** (2012) Disruption of the *Eng18B* ENGase gene in the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* affects growth, conidiation and antagonistic ability. *PLoS One*, **7**. E36152, doi: 10.1371/journal.pone.0036152.
- Dusik, V., Senthilan, P.R., Mentzel, B., Hartlieb, H., Wülbeck, C., Yoshii, T., Raabe, T., Helfrich-Förster** (2014) The MAP Kinase p38 is part of *Drosophila melanogaster*'s circadian clock. *PLoS Genet*, **10**, e1004565. doi:10.1371/journal.pgen.1004565
- Esquivel-Naranjo E.U., García-Esquivel M., Medina-Castellanos E., Correa-Pérez, V.A., Parra-Arriaga J.L., Landeros-Jaime F., Cervantes-Chávez J.A., Herrera-Estrella A.** (2016) A *Trichoderma atroviride* stress-activated MAPK pathway integrates stress and light signals. *Mol Microbiol*, **100**: 860-876.
- Fuller, K.K., Hurley, J.M., Loros, J.J., Dunlap, J.C.** (2014) 6 Photobiology and Circadian Clocks in *Neurospora*. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research), *Fungal Genomics* **13**: 121-148.
- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., Abe, K.** (2005) *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol*, **56**: 1246-1261.
- Furukawa, K., Hohmann, S.** (2015). A fungicide-responsive kinase as a tool for synthetic cell fate regulation. *Nucleic Acids Research*, **43**: 7162–7170.
- 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 gene both in red and blue light. *Fungal Biol*, **120**: 500-512.

**Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Furukawa, K., Kanamaru, K., Kato, M., Abe, K., Kobayashi, T., Yamashita, T., Mizuno, T.** (2007) The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**: 1003-1014.

**Harman, G.E.** (2011) *Trichoderma* - not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, **39**: 103-108.

**He, X.J., Mulford, K.E., Fassler, J.S.** (2009) Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryot Cell*, **8**: 768-778.

**Hernández-Oñate, M.A., Esquivel-Naranjo, E.U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A., Herrera-Estrella, A.** (2012) An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**: 14918-14923.

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

**Hess, J.F., Oosawa, K., Kaplan, N., Simon, M.I.** (1988) Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell*, **53**: 79-87.

**Hirayama, J., Cho, S., Sassone-Corsi, P.** (2007) Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**: 15747-15752.

**Horie, T., Tatebayashi, K., Yamada, R., Saito, H.** (2008) Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Mol Cell Biol*, **28**: 5172-5183.

**Hussain, M., Hamid, M.I., Wang, N., Bin, L., Xiang, M., Liu, X.** (2016) The factor transcription *SKN7* regulates conidiation, thermotolerance, apoptotic-like cell death and parasitism in the nematode endoparasitic fungus *Hirsutella minnensotensis*. *Sci Rep*, **6**: 30047: 1-12.

**Hwang, I., Chen, H.C., Sheen, J.** (2002) Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **129**: 500-515.

**Idnurm, A., Hietman, J.** (2005) Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungi kingdom. *PLoS Biol*, **3**: 0615-0626.

- Idnurm, A., Rodríguez-Romero, J., Corrochano, L.M., Sanz, C., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P., Heitman, J.** (2006) The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**: 4546-4551.
- Islas-Flores, I., Sánchez-Rodríguez, Y., Brito-Argáez, L., Peraza-Echeverría, L., Rodríguez-García, C., Couoh-Uicab, Y., James, A., Tzec-Simá, M., Cancho-Canché, B. y Peraza-Echeverría, S.** (2011) The amazing role of the Group III of Histidine Kinase in plant pathogenic fungi, an insight to fungicide resistance. *Asian Journal of Biochemistry*, **6**: 1-14.
- Jiang, C., Zhang, S., Zhang, Q., Tao, Y., Wang, C., Xu, J. R.** (2015) FgSKN7 and FgATF1 have overlapping functions in ascosporeogenesis, pathogenesis and stress responses in *Fusarium graminearum*. *Environ Microbiol*, **17**: 1245–1260.
- Kazuhisa, T., Katsuyuki, Y., Hajime, M., Masashi, A., Takashi, K.** (2005) The *dst1* gene Involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics*, **171**: 101-108.
- Kopecká, M., Gabriel, M.** (1992). The influence of Congo Red on the wall cell and (1→3)- $\beta$ -D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*, **158**: 115-126.
- Kruppa, M., Calderone, R.** (2006) Two-component signal transduction in human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res*, **6**: 146-159.
- Lamarre, C., Ibrahim-Granet, O., Du, C., Calderone, R., Latgé, J.P.** (2007). Characterization of the *SKN7* ortholog of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*, **44**:682-690.
- Lamb, T.M., Goldsmith, C.S., Bennett, L., Finch, K.E., Bell-Pedersen, D.** (2011) Direct transcriptional control of a p38 MAPK pathway by circadian clock in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE*, **6**: e27149. doi:10.1371/journal.pone.0027149.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., Toledano, M.B.** (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *Journal Biol Chem*, **274**: 16040-16046.
- Lee, N., D'Souza, C.A., Kronstad, J.W.** (2003) Of smuts, blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, **41**: 399-427.
- Li, S., Ault, A., Malone, C.L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L.H., Deschenes, R.J., Fassler, J.** (1998). The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J*, **17**:6952-6962.

- Lu, Y.K., Sun, K.H. and Shen, W.C.** (2005) Blue light negatively regulates the sexual filamentation via the Cwc1 and Cwc2 proteins in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*, **56**: 480-491.
- 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.
- Mascher, T., Helmann, J.D., Unden, G.** (2006) Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiol Molecular Biol Rev*, **70**: 910-938.
- Martínez, B., Infante, D., Reyes, Y.** (2013) *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev Protección Veg*, **28**: 1-11.
- 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**: 1-11.
- Morgan, B.A., Banks, G.R., Toone, W.M., Raitt, D., Kuge, S., Johnston, L.H.** (1997). The Skn7 response regulator control gene expression in the oxidative stress of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **16**:1035-1044.
- Motoyama, T., Ochiai, N., Morita, M., Iida, Y., Usami, R., Kudo, T.** (2008) Involvement of putative response regulator genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicide action, and pathogenicity. *Curr Genet*, **54**: 185–195.
- Mukherjee, M., Mukherjee, P.K., Kale, S.P.** (2007) cAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*. *Microbiology*, **153**: 1734-1742.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J.** (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol*, **5**: 388-395.
- Nemčovič, M., Farkaš, V.** (1998) Stimulation of conidiation by derivatives of cAMP in *Trichoderma viride*. *Folia Microbiologica*, **43**: 399-402.
- Nemhauser, J.L., Torii, K.U.** (2016) Plant synthetic biology for molecular engineering of signaling and development. *Nat Plants*, **2**:16010, doi: 10.1038/nplants.2016.10.
- Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., Luque, E.M., Corrochano, L.M.** (2013) Regulation of transcription by light in *Neurospora crassa*: A model for fungal photobiology? *Fungal Biol Rev*, **27**:10-18.
- Osaki, T., Uchida, Y., Hirayama, J., Nishina, H.** (2011) Diphenyleiodonium chloride, an inhibitor of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase,



suppresses light-dependent induction of clock and DNA repair genes in Zebrafish. *Biol Pharm Bul*, **34**: 1343-1347.

- Osorio-Concepción, M., Casas-Flores, S., Cortés-Penagos, C.** (2013) Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. *Rev Mex Mic*, **37**: 41-50.
- Porter, S.W. y West, A.H.** (2005) A common docking site for response regulators on the yeast phosphorelay protein YPD1. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1748**: 138-145.
- Posas, F. Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., Saito, H.** (1996) Yeast HOG MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell*, **86**: 865-875.
- Posas, F., Saito, H.** (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J*, **17**: 1385-394.
- Pruss, S., Fetzner, R., Seither, K., Herr, A., Pfeiffer, E., Metzler, M., Lawrence, C.B., Fischer, R.** (2014) Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor LreA (White-Collar 1) in spore formation and secondary metabolism. *Appl Environ Microbiol*, **80**: 2582-2591.
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., Schoser, M., Haas, H., Espeso, E.A., Atoui, A., Calvo, A.M., Fischer, R.** (2008) Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol*, **18**: 255–259.
- Reither, B., Schuhmacher, R., Stoppacher, N., Pucher, M., Brunner, K., Zeilinger, S.** (2007) Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genet Biol*, **44**: 1123-1133.
- 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.
- Ruprich-Robert, G., Chapeland-Leclerc, F., Boissard, S., Florent, M., Bories, G., Papon, N.** (2008) Contributions of the Response Regulators Ssk1p and Skn7p in the pseudohyphal development, stress adaptation, and drug sensitivity of the opportunistic yeast *Candida lusitanae*. *Eukaryot Cell*, **7**: 1071-1074.
- Salas-Delgado, G., Ongay-Larios, L., Kawasaki-Watanabe, L., López-Villaseñor., I., Coria, R.** (2017) The yeast phosphorelay systems: a comparative view. *World J Microbiol Biotechnol*, **33**:111, doi:10.1007/s11274-017-2272-z.

- Saucedo, M. y Gavilanes, M.** (2005) Las MAP cinasas: Elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. Facultad de Química, UNAM. *REB* 24 (1): 4-11.
- Segovia, M., Gordillo, F.J., Schaap, P., Figueroa, F.L.** (2001) Light regulation of cyclic-AMP levels in the red macroalga *Porphyra leucosticta*. *J Photochem Photobiol B*, **64**: 69-74.
- Schmoll, M., Franchi, L., Kubicek, C. P.** (2005). Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. *Eukaryot Cell*, **4**: 1998–2007.
- Schmoll, M., Esquivel-Naranjo, E.U., Herrera-Estrella, A.** (2010) *Trichoderma* in the light of day – Physiology and development. *Fungal Genet Biol*, **47**: 909-916.
- 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.D.J., García-Esquivel, M., Gómez-Rodríguez, E.Y., Greenwood, D.R., Hernández-Oñate, M., Kruszewska, J.S., Lawry, R., Mora-Montes, H.M., Muñoz-Centeno, T., Nieto-Jacobo, M.F., Nogueira-Lopez, G., Olmedo-Monfil, V., Osorio-Concepcion, M., Piłsyk, 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.
- Schumacher, J., Simon, A., Cohrs, K.C., Traeger, S., Porquier, A., Dalmais, B., Viaud, M., Tudzynski, B.** (2015) The VELVET Complex in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*: Impact of BcLAE1 on differentiation, secondary metabolism, and virulence. *Mol Plant Microbe Interact*, **28**: 659-674.
- Schumacher, J.** (2017) How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genet Biol*, **106**: 26-41.
- Schuster, A., Schmoll, M** (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **87**: 787-799.
- Shang, Y., Chen, P., Chen, Y., Lu, Y., Wang, C.** (2015) MrSkn7 controls sporulation, cell wall integrity, autolysis, and virulence in *Metarhizium robertsii*. *Eukaryot Cell*, **14**: 396-405.
- Shao, Y., Yang, S., Zhang, Z., Zhou, Y., Chen, F.** (2016) *mrskn7*, a putative response regulator gene of *Monascus ruber* M7, is involved in oxidative stress response, development, and mycotoxin production. *Mycologia*, **108**: 851–859.

- Silva, F., Torres-Martínez, S., Garre, V.** (2006) Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol*, **61**: 1023–1037.
- Singh, P., Chauhan, N., Ghosh, A., Dixon, F., Calderone, R.** (2004). *SKN7* of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun*, **72**: 2390–2394.
- Skerker, J.M., Prassol, M.S., Perchuk, B.S., Biondi, E.G., Laub, M.T.** (2005) Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell progression in a bacterium: A system-level analysis. *PLoS Biol*, **3**: e334.
- Smith, D.A., Morgan, B.A., Quinn, J.** (2010) Stress signaling to fungal stress-activated protein kinase pathways. *FEMS Microbiol Lett*, **306**: 1-8.
- Sorger, P.K.** (1991) Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, **65**: 363-366.
- Tan, K.K.** (1975) Recovery from the blue-light inhibition of sporulation in *Botrytis cinerea*. *Transactions of the British Mycological Society*, **64**: 223–228.
- Tang, C., Xiong, D., Fang, Y., Tian, C., Wang, Y.** (2017) The two-component response regulator VdSkn7 plays key roles in microsclerotial development, stress resistance and virulence of *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet Biol*, **108**: 26-35.
- Tatebayashi, K., Takekawa, M., Saito, H.** (2003) A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J*, **22**: 3624-3634.
- Thomas, L., Marondedze, C., Ederli, L., Pasqualini, S., Gehring, C.** (2013) Proteomic signatures implicates cAMP in light and temperature responses in *Arabidopsis thaliana*. *J Proteomics*, **83**: 47-59.
- Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B., Labarres J.** (2001) A proteome analysis of the Cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **276**: 8469-8474.
- Vieira-Nogueira, K.M., Costa, M. do N., de Paula, R.G., Mendonça-Natividade, F.C., Ricci-Azevedo, R., Silva, R.N.** (2015) Evidence of cAMP involvement in cellobiohydrolase expression and secretion by *Trichoderma reesei* in presence of the inducer sophorose. *BMC Microbiol*, **30**:15, doi: 10.1186/s12866-015-0536-z.
- Waghunde, R.R., Shelake, R.M. y Sabalpara, A.** (2016) *Trichoderma*: A significant fungus for agricultura and environment. *African Journal of Agricultural Research*, **11**: 1952-1965.
- Weger, B.D., Sahinbas, M., Otto, G.W., Mracek, P., Armant, O., Dolle, D., Lahiri, K., Vallone, D., Ettwiller, L., Geisler, R., Foulkes, N.S., Dickmeis, T.** (2011) The light

responsive transcriptome of the Zebrafish: function and regulation. *PLoS ONE*, **6**: e17080.

**Williams, K. E., Cyert, M.S.** (2001) The eukaryotic response regulator Skn7p regulates calcineurin signaling through stabilization of Crz1p. *EMBO J*, **20**: 3473-3483.

**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 Genet Biol*, **41**: 973-981.





**Yu, P.L., Chen, L.H., Chung, K.R.** (2016) How the pathogenic fungus *Alternaria alternata* copes with stress via the Response Regulators SSK1 and SHO1. *PLoS One*, **11**: e0149153. doi: 10.1371/journal.pone.0149153.plos

**Yu, Z., Armant, O., Fischer, R.** (2016) Fungi uses the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signalling. *Nat Microbiol*, **1**:16019, doi: doi:10.1038/nmicrobiol.2016.19

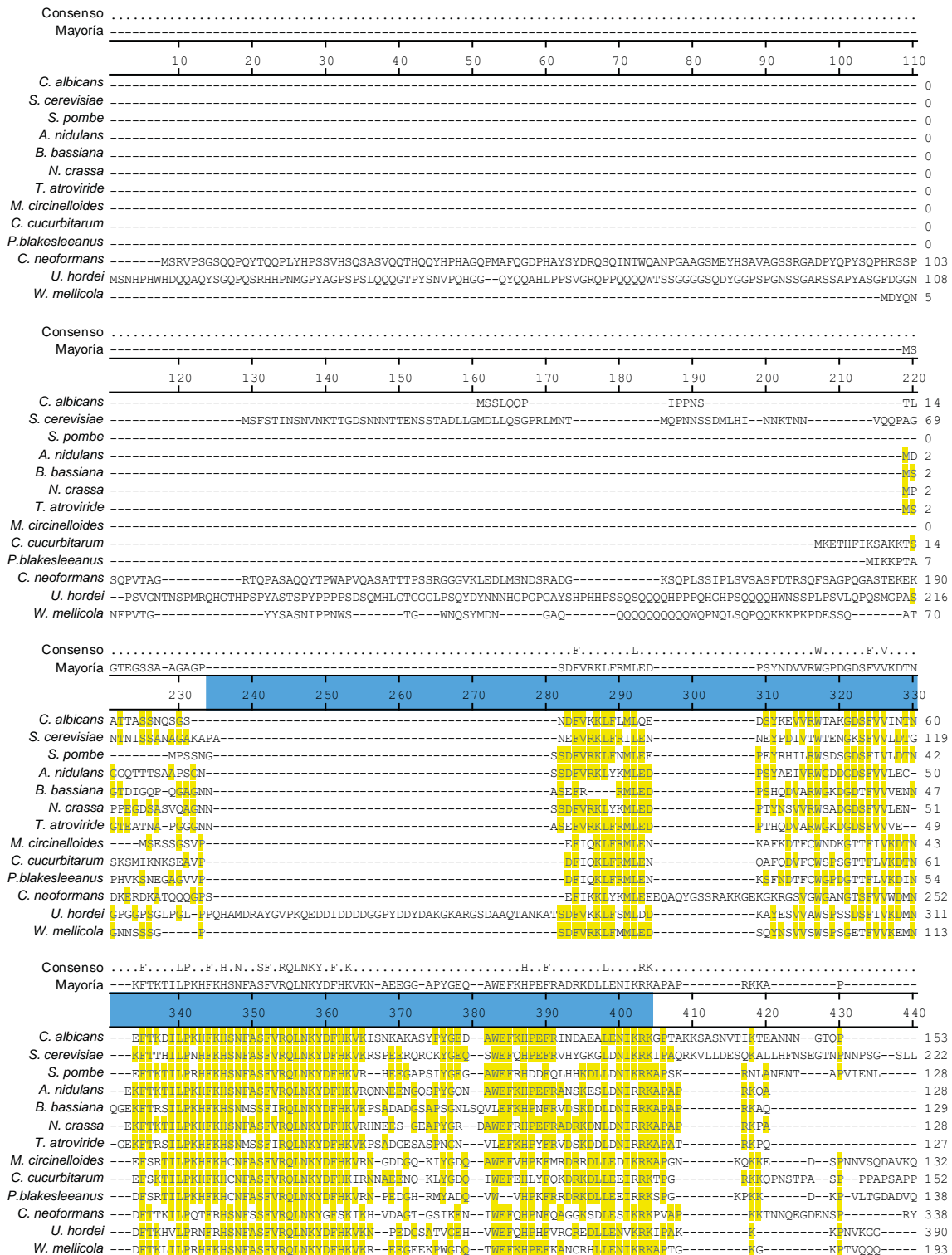
**Zschiedrich, C.P., Keidel, V., Szurmant, H.** (2016) Molecular mechanisms of two-component signal transduction. *J Mol Biol*, **428**; 3752-3775.

## XII. APÉNDICE

### XII.1 Simbología

Símbolos de dominios	
	<b>HSF</b> (Heat Shock Factor). Dominio de unión a secuencias específicas de ADN, parecida al factor de choque térmico.
	<b>REC</b> . Dominio receptor homólogo a CheY, el cual es el receptor del grupo fosfato en un aminoácido conservado de aspartato.
	<b>S_TKc</b> . Dominio catalítico, Serina/Treonina proteína cinasas.
	<b>Coiled-coil</b> . Región que permite la interacción con otras proteínas.

## XII.2 Alineamientos



Consenso .....  
 Mayoria -----TQNEDQ-----EQSIDVLSQELAAALQQVDQLKELQAEMSQTRILLVNEVLTV--L-----FQKNVAAQDQLIQELLNLLSSLDQ--KR-----

450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550

*C. albicans* ---TCNHNSYQLVLS---ATNHLKQVESLKKDKHS-----LYDEL SVLERKYKVVVENIVA---IN--TFN-ERYRSMNVLINSIVNGMK----- 228  
*S. cerevisiae* NESTTELLLSNVTSK---DAFGNRRRVKDKLKLMSMESYATKVELQKLNKYNVYIESIT---FK--TIN-ENLNNFVTLCTSTANNG----- 307  
*S. pombe* ---KQVQTS---ILDFKLLDRNLGSLATSYTILIMFELKRGIESHDLMSIIISYLCDEGSTQFQANPGMFVPSHPTQELLNAYQALAGQVATTSPQ--- 225  
*A. nidulans* ---SAHDD---SVPTQQILLNQLVAVQSSQIQHISDRYQMSVDHQLMLQEVYLR-----VCHTVNHENVHQVLYVYVSIARQKEDNK----- 208  
*B. bassiana* ---QPE---FTTSHVSVIHESETATQQQLQELFVVSQTRNLLVNEVTL-----LQRMNNAKSAQHMLLYLTP---GATNP--M--- 205  
*N. crassa* ---QADTT---FGASQIVVLSLSTATQHIAQLQVYFLAQTNKVLLNENIS-----LQRMFRACSVSNELITHLNIED--RRNSRHS--- 209  
*T. atroviride* ---VAED---FTTSHVSAVSESETATSSQQLQELFADISQTRNLLVNEVTL-----LQMLNACKAQYEMLFLSPYSH--NRNNG--M--- 205  
*M. circinelloides* ADITLNTI-----IQEIRNIGNLQSSIQSLKSRNAEMKNNRKLQTDNQIFIELSE---ESHMMAKDLVKRFKSVTEK---ASG----- 212  
*C. cucurbitarum* PPPESPFLSCSMHRS---FESEELMKYTRELQSLQELKQTQTTLESLEALNQEKELILTGLSG---LQNSLRTKQRLTDCLELKN---SR--- 237  
*P.blakesleeanus* PLATSTIQEPHQSS-----SLLSLLRHRCANVQGLRKSQTDLELQMKMNRADQIADQLVQ---FNKSMAKNLLQFVKIDTENNAQST----- 227  
*C. neoformans* VG-LSNEDSRMHLM---DRNIEIDAIAKSRSEAEARMREMANMGLVMDMIG--HIAASESE---AIGSPATTTGHSPRVHLKSLFN--- 421  
*U. hordei* ---LLEAFRDDSPLPFLVAGARSASNAIDIRANIANITAVDQHQLHLAIKATQKQSVIGEMLT---FORNMVQCPQMLNNTIQYLSMIEDDRPHGISAAATFSPQ 493  
*W. mellicola* ---TITAA---LQNGSTFHEINLSSQIENLNRNQETNLQFDNLQSNVLEVNGIMS---FORNLINGCCQIENIQHII--EEDM----- 272

Consenso .....  
 Mayoria -----ADSS---GGVASSIG-----QL-A-ELLSS-----T-AP-----D--SDRELEPL-----

560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660

*C. albicans* ---LPLPLFPFPVQLPDLGGLG--S---NL-----GPISSD-----ALFS--I---SHHLSL---PHH-----QQLLN 278  
*S. cerevisiae* ---QIPNQIQQASAAATLSSKMT-----VDTNLGTAQPSLYN-----TPSSDYELANQEKPADS----- 307  
*S. pombe* ---QIFNQIQQASAAATLSSKMT-----VDTNLGTAQPSLYN-----TPSSDYELANQEKPADS----- 276  
*A. nidulans* ---AGSFQAQVQASPTQVTP---MDDGVSTPLQQAISL-----IMNAEVQFNLVPEVSMGEPPTK--- 264  
*B. bassiana* ---MNRSMAPNGAZQTE---DSDAPELRRRARELLASV-----H---VVAADRELERLHDVYGF--- 257  
*N. crassa* ---HSHSHSHSPTFHAGSLGLPDGADEPAEELRRARETINGV---S---SQADRELERLSVAYHQNGSPS--- 275  
*T. atroviride* ---MAHQMSNSGEMSSSD---DENVEPLRRARELLASV-----H---TVADRELERLHDIYES--- 257  
*M. circinelloides* ---APQIQHL---LDSYSRRAESNK--EQLNLLNQCGLGIVPIKLENE---RYTSEAPTAAPMHKTIVN---LQQEQE--- 276  
*C. cucurbitarum* ---QPQQLP---SSLSLSP-----TPPT-----TPIMNTPSATSMCPSTV--- 275  
*P.blakesleeanus* ---QRTOEQ---NHHTTINMSS--VE--NMQ---IVDTST---ST---TPTNYQNTISKLDQSKRKRDCGGACETNEDIWLQOQQOQQO--- 307  
*C. neoformans* ---LARYPP---EIVHNSAR-----OPT-----MPY--TPAQPCQHQSFNLAAYNFAFGSSVVG---AAQAQASP 479  
*U. hordei* NHGSGANPSNGSFMAPDMPDKLARSFR--DVSGSRFGMNRGDGSGSSNSNNMLKAAQGS--SVGSSG--GASSSTNAGSS---TRLS- 577  
*W. mellicola* -T---NNYVNDKVNRLIGKYEAAS-----STFSMGDLNRIKISS---YNQRKRVST--- 319

Consenso .....  
 Mayoria -----ASSPSMGT-L-----A-----PGSM-----P-----FVYVGLTVGIDPPT-----

670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770

*C. albicans* RTI---RP-LSFIDIPVVKLQQSLGQNLQAPIG--TP-SA---VFFSEEASSSIQAAT---PAPL-----AQVPAQINQPPPPP 348  
*S. cerevisiae* ---IEVIFSD-----NG-----NRNPTGN 324  
*S. pombe* ---MSSAALNIPSSNDHSLNPHA---HSSYPMYERKQ---PIQH-----P--NIGSFTHLSSNA 327  
*A. nidulans* ---GVVSTTMTAPRRVAPQP--IA---AATNPAVLYPK---MNGEM-----EPVVFVGAINGIDPMY 318  
*B. bassiana* ---MTDSANVI---FVTLFMLHDF---ITDLS-----RYEYFVFGQVIGIDPFA 298  
*N. crassa* ---ESATSVNFTQSG---HPPHMLHDF---LNDP-----RHMIFVFGQVIGIDPFF 319  
*T. atroviride* ---PDAATMVI---FVTFMLHDF---MNDIS-----RYEYFVFGQVIGIDPFF 298  
*M. circinelloides* ---QLPQPFPPIINNHAEATASAAAAAASMNAG-S--LISPP-----LK-----TADGLTFVILRLSSN 330  
*C. cucurbitarum* ---PPPVLPTVQLQEMKPTDLTHSFMYG---TP-IP-----TL-PPPTVIV 315  
*P.blakesleeanus* ---QQQGNSTPSETAQFREIQAIPFVHLAKQS--FDES CGMAHNPEMAIHLQK---M-ERVALTVVRLAAT 376  
*C. neoformans* HTDGTGSRGSLGPTTEIKPPASSRRLRAASNAGVV--PFGSVNASVPAVSPGSGNPPAGPVAVHVEDPAEDVIEIPNQMDMYGGESVSIAPLFVETPAWLETTIPL 587  
*U. hordei* ---GMTAASSTAAPLSPKS---VASPMDGNTGRTHES---QQLTSM-----TMQPP-RLSSEAN 630  
*W. mellicola* ---VATPPAQPC---FC-----QPQQIVHHPHPC 345

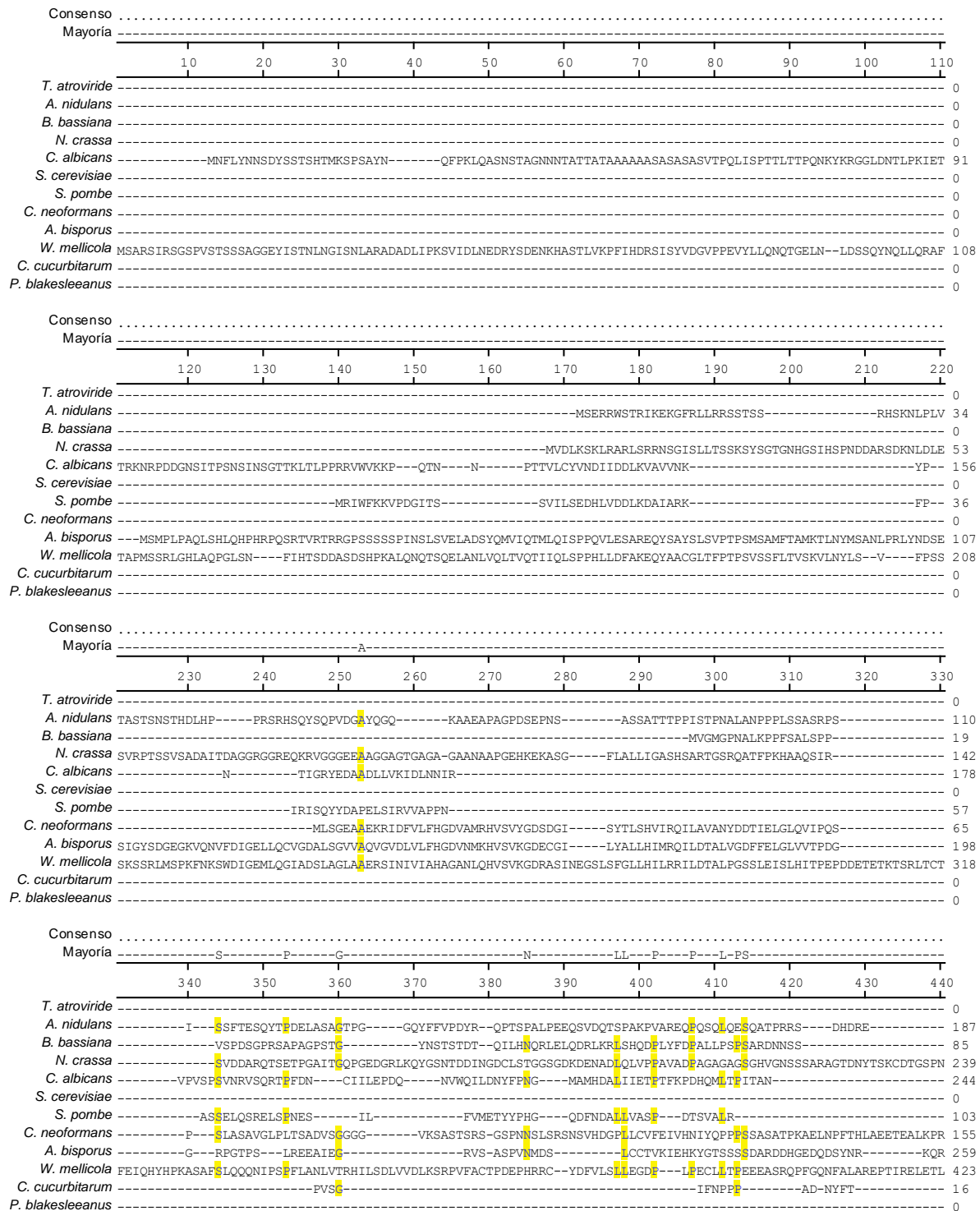
Consenso .....  
 Mayoria SSSHANNQPY-----SA-----SAADSN-----SQSTP-----S-----PG-----

780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880

*C. albicans* PPPATCQ---P-----LPPPPPPAT---ATVQIPAPPPPT--QQQVGTSSSSVPTISKSGQIVVNSA---PTTSAQISTTS---VP 420  
*S. cerevisiae* TNPAT---TIIQSNNN-----TNNASPATFVSLQLPNLPDQNLTPNAQNNT---VT 372  
*S. pombe* SMAKSFQISND---LAKAS-----SVATMSQM---GAAVTTG---L 363  
*A. nidulans* GEVNVVPTVPP---KQDMD---LRR---QFPE-----NRKKSNHV---DGP 354  
*B. bassiana* SDHIQKLPVAMPG---EAAAG---ALDAHHA---QCHTPTSSGPTPIMGAAAPANLREAPA---IWS 356  
*N. crassa* SDHINIFVTRPL---NPNNA---MADA---LIIT---P---P-KDQGTS---MWS 357  
*T. atroviride* SDHINKLPVAMPN---ENSSG---SLOH---QCHTQ---PNQMNAPGSSLDKFP---LWS 347  
*M. circinelloides* MVRDNTAIEIIMADQPTLGLTTLQRPLGL---KRRKPTASS---TSSSQ---SSSSSQ---VS 386  
*C. cucurbitarum* SSLAG---EMNK---G---KQKMV---H 333  
*P.blakesleeanus* PNTATSNP--KEIALNDC---GEKQQRQIMD---TTEITKVSMPV---MTNRLMN---SGSATGKVAL---PG 436  
*C. neoformans* TMYRKQSDGQALKAVYQAFAGGKLPAGEGQDEDNIAIASGSSSTALEIMAGSSQMGLOQSYDAGPSTTGTILPMDGSPSSSES SRKGGKSRGTSLSKEQRESKLRH 697  
*U. hordei* NGLANANGP-----GDTRPKLDARNGPNS---VPGFDSNQNKENS LAPM---DKKRSSG--ANLLRVRRNT---F---VPG 697  
*W. mellicola* AQPASAGLK-----VFTFGQLRQRDGNNAYM---AQGAPQVSLGASTS---TVKTEPEGPTTLQKQP-----AH- 407









Consenso .....  
 Mayoría ---RELHPAE---V---FSPGGQ-V-A-LIDIP-RR---TPTESP-----S-L-VY---EE-IRPKESGLDYFP---PGAGNLFSP---

890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990

*T. atroviride* ---RVMGPEEHMGTVLEEFNNGMVEEAFIIDIIP-RN---VPIPRSPRAP-----LPPVSGASAAY---ADDVRFSESEGGYFF---VVVSTATSFF--- 145  
*A. nidulans* ---DRILSPEEPLWAVDSYYPGGQTVGEALLIETPORR---TPKPSF-----HR--N--VY---FAQSEFGLHG-DYFFILM---PTNINLSTFP--- 458  
*B. bassiana* ---RLIQDDEHMCRTLDMFFGGQTVDDAILIIDIIP-RR---TPKASHPVQLGHGQ---QHHVPHATAAIIYV---TEDGFLPESGEGYFF---P-VGALFSP--- 367  
*N. crassa* ---ERVLGPEEPMARTLDAVFFGGQTVDEALVIDIIPRR---TPKESFRTGPP-----HVPHG-LPTYV---EETHRFSEGGYFF---FGALAHLAGIG 678  
*C. albicans* KTEVIVS-----SKLKPN-----DNNKSYQAKQEQQTAEQSE---NGFS--- 439  
*S. cerevisiae* IIFEPELAINIYKELFGTMSQSPASQPLLI FSNVNLRDQVPLDILNVVDYVPTNEEISQKQTOPTDHGAVGVFHLDDHISPGEGSLKQITGDKADLTKDGNSSFQE- 354  
*S. pombe* TAERLAKAEV---ATFTNSR-----SISHSLSLYT-----KQSGTAGVLPFAVNADIDANRNM--- 297  
*C. neoformans* ---ALHTAVKQPMDFPFSFIATSPRSPPGGYFGGLR---TPTERESGFFD-----S---VA---EHPHEEADSRPNAATVQKARSLGFEFFPSAA- 516  
*A. bisporus* ---ALHTAATRAPADPFFLLTSSSPGTPGLPVFGSYP---TFSFPTNTQT-----SPSGTFV---NRSSFPASRSNVERSTKEHS-FTTSLFSPS- 621  
*W. mellicola* PVEELHSDKKNENETKGSNTTASSNPSRVKRNRRHSNANAVSRHG-----SVRRRQALYKFNIGLKMIDRAKSNGLVEDEARAEDEDSKNAIVRRAST 905  
*C. cucurbitarum* ---SEVA---I---FEK-----KA---KTEIIVDNAPDLA-----AFSP--- 129  
*P. blakesleeanus* -----TSSSLG-----FSLSLFSP--- 38

Consenso .....  
 Mayoría -----S-P-----SISPIAAGHLP--PSPG-----LDRSRDG-RPPGAD-H--S-----PTQSHK-----T---

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100

*T. atroviride* ---RLPTKHPN---ASTPH---MAVINSGHLENIFFSG---ASKRAHRDREN-HTFSPVVHNG-----GVAPN-----FASFNPTRHSHSRH- 216  
*A. nidulans* ---VHQPAANNSAGAHSAF---SISILTTGHAPOVPSFG---GRTRR-RPPLARNITHSP-----TIR-----GMSQSKP----- 519  
*B. bassiana* ---HMQLAMPATAVHGQOPH---SLAVGSHHTIIPFSGG-LRPRGRHEQTC-RFRVARTHTS-----TSAMNGSHGNYSHGTHLHP-RLAHSRH- 451  
*N. crassa* GGPVMTAFVNGPQPSHPH---TMINLGPCHIIQLFSPFG-TRPRQYRERPD-RPRLGROHTSSPTILNVV---GAGGHAATIAVSSANHGMOSSVSKVQVSRH- 775  
*C. albicans* ---ETASFEAVHNS-----KAALPLTKS---STTA-----TITS----- 469  
*S. cerevisiae* ---FKLITDEEQLRRASQELKDEEKDAESFWQIILLPKGYKGVDFRNKPVHAHTDSSFNEDTITHSELEVNTGSPSQESGSLNEAGIGITQPMSEVDRK- 459  
*S. pombe* ---PDIS---QFTIADNKK---PLNLD---TQALHGF- 324  
*C. neoformans* ---QIVRTNQLHLHSLTPNEIMTPAPEYFSGSSKSPSG---ASGVVMQSPGC-RPFGMFFPPIKN-----E---RRGSTRHPTSDSIRKQANRRASTSD 605  
*A. bisporus* ---PL---GIPDS---VEYFDPAPRIGASFS---GYVSSPPG-QPAGIFFHPPSKKNGSPPEKSGVQTTIQRRGS---SFLQVLDKAMPFAALH- 703  
*W. mellicola* TALHEVAQESA---ERFDTLNHSQDDPPAMYADAA-PSITSLPKFTLDESEDIPIRPSDQH---GTPT---PTQSVKGIQPGPKKK- 983  
*C. cucurbitarum* -----ANPVDEKKG-LPK-----KIVSN- 148  
*P. blakesleeanus* ---VTFPAPFFN---YS- 51

Consenso .....  
 Mayoría -----SSSSQT-----P---STPK--P---S-----PA-SPR-----R--S-----K-----T

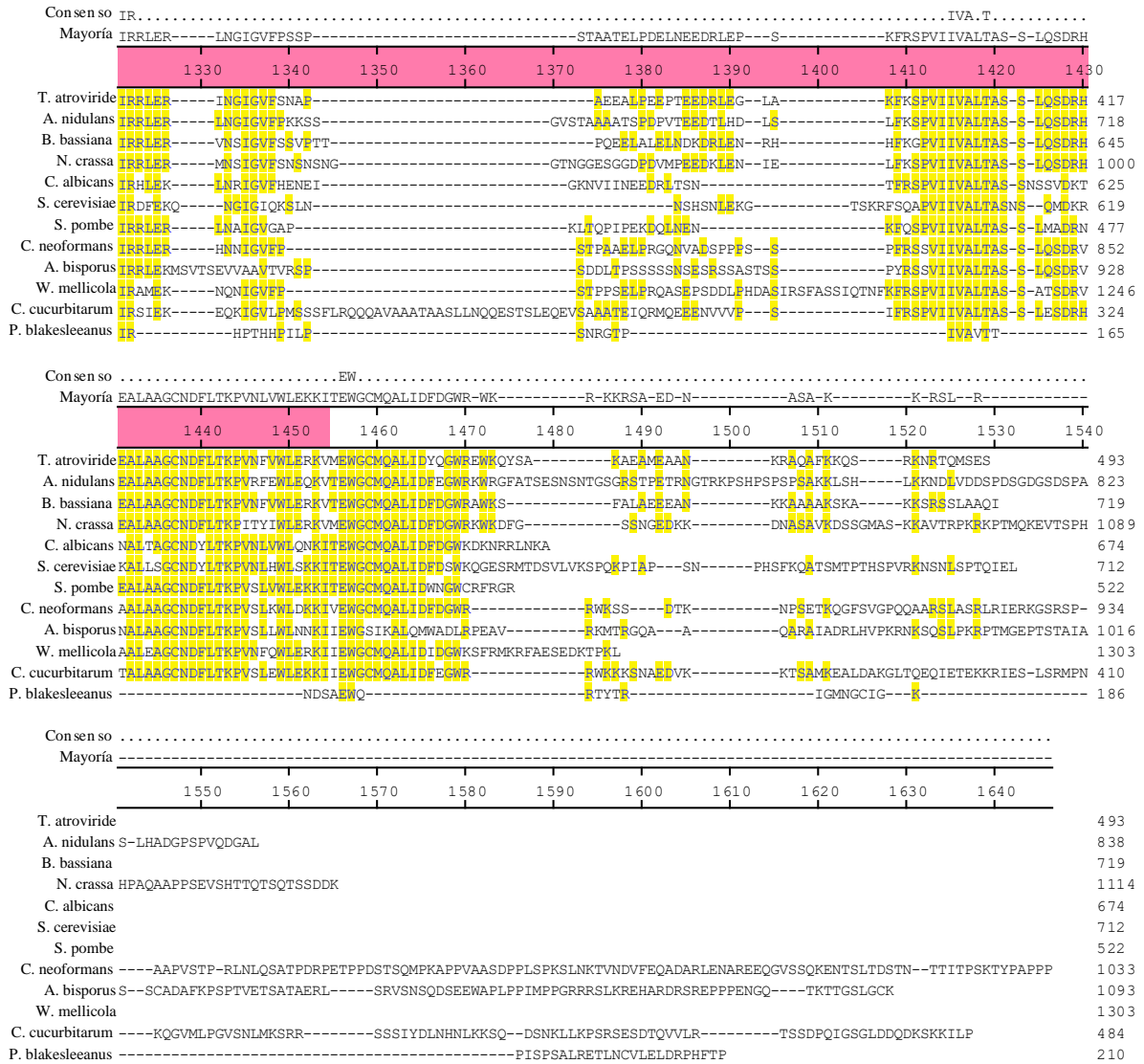
1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210

*T. atroviride* ---SSSSSEH---IAVHF---NSTMPRSFGHEIVAA---ARMFGTTP-SP-----PQLIVS-PHLP---AARLK---KSKRG 273  
*A. nidulans* ---VSSST---AAESQPTPEVPTP-----PGPFAESTK-----TKAHTPPARVSPRPG---PVKPKK---SNRAS 574  
*B. bassiana* ---SSSDP---VGMFPGTVSVMPSPGHEHVYS---SSGRVGI-P-SFM-----LETASA-NRP---KRRPKN---VDFAG 512  
*N. crassa* ---IASSEQST---TGAVFG---PFASAPHAPHVPS---APPLPTPP-AAQEVPVAIPTQHVVTPPARVA-PRPPTAMATR- 853  
*C. albicans* ---NSTSNMNN---TS---KKG-----KFSQKLAANDPTP-----LFTTTS- 498  
*S. cerevisiae* SPILTSSCPHYSN-SLYNAPFAVSSPFDPLN-----LFTTTS- 497  
*S. pombe* ---NQIDGIVG---TSPVN---VLTFPG-----IGAKAFALLEG----- 357  
*C. neoformans* EPFSSP-T---ALPFRRSITSTGNEEHRSPIANVTRDRPHTSRVNSRRKNNLPAEQPILAVGRA---KGRERSETVT---KGDLSRKG- 690  
*A. bisporus* EASKTPSGT---AEAK---STPTSTKAPEG---STAAGTSQEGTPTTLGRKS---PQSPFNED-----TPS-----KKAI-GKRP- 769  
*W. mellicola* ---NSSQEVQSQSVSTASASTSTIVKEGNSASVSTFGNSLDI PKTDSPDVQEQKENFDNLVERSPPGERPA---LNTQRKSVL---KSI---KDAQ 1075  
*C. cucurbitarum* ---TK---LH-----KKKKK- 162  
*P. blakesleeanus* ---STP---PAQTRPSA-----ESS---K--- 68

Consenso .....  
 Mayoría -----DAVPPINVLIVEDNPIQKILEAFMKRLKIRYQ---TAKNGQEAWEKWRGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATKE

1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320

*T. atroviride* QTQQEQYIQNPPP-----PALNAKVPFISVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 360  
*A. nidulans* LLNGAFG---GLIEGTVPFINVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 655  
*B. bassiana* ---SAVVAVFPFISVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 586  
*N. crassa* PDHTP---LPA---VMLSSAVFPFINVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 935  
*C. albicans* ---TDIVLPSISVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 570  
*S. cerevisiae* ---EKVFPKINVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 568  
*S. pombe* ---VIPPINVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 426  
*C. neoformans* PAASPRIEKKELERGETKSLAPSTAPTKKNAKVVVFPFINVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 796  
*A. bisporus* HEKQDSIGKGT---GKKGKALTPSD---GNIVFPFISVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 862  
*W. mellicola* AARRDVQSKYNESK---TNDYPAKSVSSGWMSSGNIIVFPFINVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 1176  
*C. cucurbitarum* PFA---IVVSPFINVLIVEDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 236  
*P. blakesleeanus* AT---VIFARVIMIDNPIQLKLEAFVRLKVRWQ---TAMNGRDVKKWRTGGFHLVLMIDIQFLVMSGIEATRE 142



**Figura 90. Alineamiento de los reguladores de respuesta ortólogos a Ssk1.** El dominio encontrado en *T. atroviride* se representa con el rectángulo de color. En amarillo se resaltan los aminoácidos conservados en los dominios REC de las proteínas ortólogos a Ssk1 y con un asterisco se señala el residuo conservado de aspartato que es fosforilado en *S. cerevisiae* (D554) (Maeda *et al.*, 1994).