



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



**Mutagénesis insercional mediada por recombinación homóloga en el hongo
*Trichoderma atroviride***

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Microbiología

Presenta

Jairo Sánchez Flores

Director

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Presidente

Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Secretario

Firma

Dr. Fidel Landeros Jaime

Vocal

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Vocal

Firma

Ing. Gabriela Calcáneo Hernández

Vocal

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro. México.
12 de febrero de 2020

Resumen

El hongo *Trichoderma atroviride* tiene un genoma atractivo para estudiar micoparasitismo, metabolismo y fotomorfogénesis, debido a sus características biológicas distintivas como capacidad antagonista contra hongos fitopatógenos, amplio repertorio enzimático, conidiación inducida por luz azul y un efecto promotor de crecimiento en plantas. Análisis genómicos han mostrado genes clave para comprender procesos evolutivos, incluyendo micoparasitismo e interacciones recíprocas hongo-planta. Hasta la fecha, se han desarrollado y mejorado diversas herramientas genéticas con el objetivo de descubrir funciones de genes en hongos filamentosos, a pesar de eso la identificación de los genes mutados sigue siendo un cuello de botella en las estrategias de genómica funcional. En este trabajo, desarrollamos una nueva estrategia de mutagénesis, basada en la integración plasmídica por recombinación homóloga, facilitando la identificación de los genes interrumpidos. El plásmido pCB1004 fue utilizado para construir una biblioteca genómica, la cual contenía fragmentos de ADN de *T. atroviride* con tamaños entre 0.75 y 1.5 kbp. Después de dos pases monospóricos de cepas transformantes en medio selectivo con higromicina B, se realizaron pruebas de estabilidad para el marcador de selección, revelando que 224 de 800 transformantes resultaron estables, sugiriendo la integración del plásmido en el genoma en el 28% de las transformantes. En orden de determinar la identidad de las inserciones del plásmido, se implementó un nuevo enfoque de identificación a través de PCR y secuenciación. Los resultados indicaron que las inserciones ocurrieron mayoritariamente en eventos independientes únicos y dobles, distribuidas al azar a través del genoma de *T. atroviride*. La caracterización fenotípica de las transformantes a estrés metabólico, daño mecánico y ensayos de fotoinducción permitió determinar funciones génicas previamente no descritas en cepas mutantes con un crecimiento muy reducido (ID proteínas: 52977 unión a metales de transición, 143930 modificación y procesamiento de RNA, 317064 actividad de transporte, 33929 remodelación de la cromatina, 298021 función desconocida y 233373 actividad de transporte) y afectadas en fotoconidiación (48079 péptido sintetasa no ribosomal, 81320 actividad catalítica, 39327 actividad de transporte, 173440 plegamiento de proteínas, 307447 ubiquitina ligasa y factor de corte y empalme del ARNm). En conjunto, nuestros datos proveen evidencia del potencial promisorio de esta estrategia de mutagénesis, siendo una de sus mejores bondades la rapidez y facilidad para identificar el gen afectado.

Palabras clave: *T. atroviride*, mutagénesis insercional, recombinación homóloga, biblioteca de ADN, eficiencia de transformación, interrupción de genes.

Abstract

The fungus *T. atroviride* has an attractive genome to study mycoparasitism, metabolism and photomorphogenesis, due to its antagonistic capacity against many phytopathogenic fungi, enzymatic repertoire, light-induced sporulation and its plant-growth promoting effect. Genomic analyses have shown key genes to understand evolutionary processes, including mycoparasitism and reciprocal fungi-plant interactions. Until now, several genetic tools have been developed and improved in order to discover gene function in filamentous fungi, nevertheless identification of the mutated genes still represent a bottleneck in functional genomics strategies. In this work, we develop a novel mutagenesis approach, based in plasmid integration by homologous recombination, facilitating the identification of affected genes. Plasmid pCB1004 was used to construct a genomic bank, containing *T. atroviride* fragments with size among 0.75-1.5 kbp. After two monosporic cultures in selective media with hygromycin B, stability tests for the selection marker were performed, revealing that 224 out of 800 transformants were stable, suggesting that the plasmid was integrated in the genome in 28% of the transformants. In order to determine identity of plasmid insertions, a novel identification approach was implemented using PCR and sequencing. The results indicated that insertions occurred mainly in single and double independent events, distributed randomly through the genome of *T. atroviride*. The phenotypic characterization of the transformants under metabolic stress, mechanical injury and photoinduction assays, allowed determine genic functions previously undescribed in mutant strains with impaired growth (protein ID: 52977 transition metal ion binding protein, 143930 RNA processing and modification, 317064 transport activity, 33929 chromatin remodeling, 298021 unknown function y 233373 transport activity) and photoconidiation (48079 non-ribosomal peptide synthetase, 81320 catalytic activity, 39327 transport activity, 173440 protein folding, 307447 ubiquitin ligase and mRNA splicing factor). Altogether, our data provide evidence of the promissory potential of this mutagenesis strategy, being one of the advantages the quick and easy identification of the mutated gene.

Keywords: *T. atroviride*, insertional mutagenesis, homologous recombination, DNA library, transformation efficiency, gene disruption.

Agradecimientos institucionales

Agradezco al Laboratorio de Microbiología Molecular perteneciente a la Unidad de Microbiología Básica y Aplicada por permitirme realizar el proyecto de tesis al brindarme la infraestructura para trabajar. De manera particular, a los M. en C. Salvador Ramírez, Rosa Cecilia Gómez May y Evelia Judith Figueroa por instruirme en el uso de los equipos y enseñarme técnicas de biología molecular y microbiología. Al M. en C. Diego Josimar por proporcionarnos la cepa DH5-alpha.

Agradezco al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme el uso del electroporador celular y particularmente a la Dra. María Ofelia Mora Izaguirre y al Dr. Alfredo Varela Echavarría por abrirme las puertas del laboratorio, al Lic. Fernando Javier Soto Barragán por contactarme con los anteriores y ayudarme en la búsqueda del equipo, y a la M. en C. María Laura González Dávalos por enseñarme a utilizar el electroporador.

Finalmente, al Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo por dejarme integrar a su equipo de trabajo y proporcionarme todos los reactivos y equipos que necesité durante el desarrollo del proyecto, así como también por su valiosa asesoría y guía para concluir el trabajo.

Agradecimientos personales

Deseo agradecer a todos los compañeros del LAMIMO, Daniel Sánchez, Chava, Gaby, Tavares, Albo, Daniel Gallegos, Alejandra, Daniel Escárcega por acompañarme, aconsejarme, alentarme y hacer menos pesadas las jornadas de trabajo.

Y de manera particular a Ceci, Evelia, Haydar, Juanita sin quienes jamás habría podido terminar el trabajo, su valioso apoyo fue determinante para lograr concluir con éxito.

A mis amigos de la Universidad y al escuadrón de la muerte, por su grata compañía, por las risas y las pláticas prolíficas. A mis maestros Fausto, Karina, Roberto, Etzel, Antonio y Ulises quienes piensan que si se puede cambiar positivamente el planeta es a través de la ciencia y cuyas enseñanzas son invaluable.

A mis padres y mis hermanos quienes me recuerdan sin necesidad de palabras el verdadero significado de por qué hacer las cosas, por sus ganas de cambiar para bien, por su soporte y amor incondicional.

A Rocío quien me alentó y cuya habilidad para hacerme feliz nunca amainó a pesar de la pesadez e incertidumbre de los días, por impulsarme a mejorar como persona, por su amor siempre presente y por mostrarme los matices de la vida.

In Lak'ech - Hala K'in
(Yo soy otro tú - Tú eres otro yo)

Saludo maya.

Índice

Resumen	ii
Abstract	iii
Agradecimientos institucionales	iv
Agradecimientos personales	v
Índice de figuras	9
1. Introducción	10
2. Antecedentes	12
2.1 Trichoderma spp	12
2.1.1 Asociación planta-hongo	13
2.1.2 Aplicaciones industriales	14
2.1.3 Agente de biocontrol	14
2.1.4 Modelo de estudio de conidiación inducida por luz azul	15
2.2 Estrategias de mutagénesis en hongos filamentosos	16
2.2.1 Mutagénesis aleatoria	17
2.2.1.1 Mutagénesis física y química	17
2.2.1.2 REMI	18
2.2.1.3 AMT	20
2.2.1.4 TAGKO	21
2.2.2 Mutagénesis dirigida	23
2.2.2.1 Sistema Cre-loxP	23
2.2.2.2 TALEN	23
2.2.2.3 CRISPR/Cas	25
2.3 Integración de ADN exógeno en hongos filamentosos: NHEJ vs HR	27
2.3.1 Alternativas para incrementar la eficiencia de integración por homología	27
2.3.1 Integración por recombinación homóloga en <i>T. atroviride</i>	28
3. Justificación	29
4. Hipótesis	29
5. Objetivos	29
5.1. General	29
5.2 Particulares	30
6. Metodología	30
6.1 Cepa y condiciones de cultivo.	30

6.2 Extracción del ADN genómico (ADNg)	30
6.3 Digestión del ADNg y purificación de los fragmentos generados.....	31
6.4 Linearización y desfosforilación del plásmido pCB1004	32
6.5 Ligación de los fragmentos del genoma con el plásmido pCB1004	32
6.6 Preparación de células electrocompetentes.	32
6.7 Transformación bacteriana por electroporación.....	33
6.8 Purificación de la biblioteca de ADNg.....	33
6.9 Transformación por el método Polietilenglicol-CaCl ₂	34
6.10 Ensayo de estabilidad.	35
6.11 Escrutinio para ensayos de estrés osmótico y metabolismo.....	36
6.12 Ensayo de reparación de ADN en células tratadas con UV	36
6.13 Ensayo de producción de conidia estimulada por luz	37
6.14 Ensayo de crecimiento radial.....	37
6.15 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los insertos clonados.....	38
6.16 Identificación de la mutación.	38
6.17 Análisis bioinformático y anotación de las secuencias.....	38
6.18 Alineamiento de las secuencias	39
6.19 Análisis estadístico	39
6.20 Disposición de residuos biológicos.....	39
6.21 Resumen gráfico de la estrategia de mutagénesis insercional	39
7. Resultados.....	42
7.1 Digestión del genoma de <i>T. atroviride</i> con la enzima de restricción <i>Sau3AI</i>	42
7.2 Linearización y desfosforilación del plásmido pCB1004	43
7.3 Construcción de la biblioteca de ADNg	44
7.4 Análisis por restricción de las bibliotecas genómicas.....	45
7.5 Transformación de <i>T. atroviride</i> por el método PEG-CaCl ₂	47
7.6 Selección de transformantes estables.	49
7.7 Integración de las construcciones plasmídicas en el genoma.....	52
7.8 La inserción de los plásmidos por recombinación homóloga ocurre al azar a través del genoma de <i>T. atroviride</i>	55
7.10 Ensayos de estrés.....	59
7.10.1 Susceptibilidad a radiación UV-C.....	59
7.10.2 Estrés osmótico	62
7.11 Ensayos de metabolismo	63
7.12 Conidiación inducida por luz en las cepas transformantes estables.	68

7.13 Los fragmentos genómicos en las construcciones plasmídicas empalman con regiones codificantes en genes relacionados con metabolismo y fotoconidiación.	69
8. Discusión	71
8.1 Inserciones aleatorias de los plásmidos a través del genoma.	71
8.2 Estabilidad mitótica	71
8.3 Identificación de genes interrumpidos.	72
8.4 Genes implicados en crecimiento.	73
8.5 Identificación de nuevos genes implicados en fotoconidiación.	75
8.6 Nueva estrategia de mutagénesis insercional	76
9. Conclusiones.	77
10. Perspectivas.	77
11 Bibliografía.....	78
12. Anexo	96

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de figuras

Figura 1. Transformación REMI y recuperación del plásmido.	19
Figura 2. Estrategia AMT de transferencia del T-DNA en hongos filamentosos.	20
Figura 3. Knockout génico arreglado por transposones.	22
Figura 4. Estructuras TALE y TALEN.....	24
Figura 5. Plataforma de edición génica de CRISPR/Cas9	26
Figura 6. Ensayo de estabilidad para seleccionar mutantes con la inserción del plásmido	36
Figura 7. Estrategia de mutagénesis insercional.....	41
Figura 8. Digestión del ADNg de <i>T. atroviride</i>	43
Figura 9. Análisis de integridad del vector pCB1004 linealizado y desfosforilado.	44
Figura 10. Análisis por restricción de las bibliotecas genómicas.	47
Figura 11. Selección de transformantes potenciales generadas tras el procedimiento por PEG-CaCl ₂	48
Figura 12. Ensayo de estabilidad de las 800 transformantes generadas.....	52
Figura 13. Fragmentos de la biblioteca genómica contenidos en el plásmido pCB1004. .	55
Figura 14. Sitios de inserción localizados en el genoma de <i>T. atroviride</i>	57
Figura 15. Ensayos de estrés por daño UV-C.	62
Figura 16. Ensayo de estrés osmótico	63
Figura 17. Ensayos de metabolismo	65
Figura 18. Efecto de los medios de cultivo en el crecimiento radial de transformantes estables.....	66
Figura 19. Crecimiento radial en medio PDA.	67
Figura 20. Crecimiento radial en medio MC.	67
Figura 21. Crecimiento radial en medio MMV.	68
Figura 22. Conidiación inducida por luz en las transformantes estables.	68
Figura 23. Producción de esporas inducida por un pulso de luz azul.	69
Figura 24. Mapa génico de las regiones alteradas con las inserciones plasmídicas.	70
Figura 25. Alineamientos de los productos de PCR obtenidos de las transformantes con defectos en fotoconidiación y crecimiento con su respectiva secuencia del gen silvestre (<i>T. atroviride</i> v2.0).	98

1. Introducción

La especie saprófita, micoparásita y simbiote de plantas *T. atroviride* es globalmente valorada en la agricultura, debido a su efecto promotor de crecimiento en plantas, su fácil manipulación microbiológica y su habilidad para mantener bajo control poblaciones de hongos fitopatógenos mediante compuestos antibióticos, competencia por nutrientes y parasitismo (Reithner et al., 2011). Asimismo, ha representado un buen modelo para el estudio de esporulación asexual inducida por luz azul (Schmoll et al., 2010) y regeneración de las hifas tras daño mecánico (Hernández-Oñate et al., 2012). Además, debido a su extendida presencia en ambientes con condiciones con tan poca similitud y estilos de vida variables, también constituye un excelente organismo para estudios evolutivos de ecología y diversidad (Kubicek et al, 2008).

Actualmente, existen varias técnicas de manipulación genética a gran escala aplicables en *Trichoderma* spp., útiles para estudios de estructura-función génica que han permitido comprender mejor procesos complejos como micoparasitismo, interacciones planta-hongo, vías de señalización alteradas bajo diversos estímulos y diversidad metabólica. Entre las estrategias de mutagénesis aleatoria destacan las basadas en integración mediada por enzimas de restricción (REMI; Xu et al., 2005), transformación mediada por *Agrobacterium* (AMT; Wang y Li, 2008), knockout génico mediado por transposones (TAGKO; Firon et al., 2003) y mutagénesis química o por luz UV (Bose, 2014). Sin embargo, los anteriores sistemas tienen como desventajas demandar mucho tiempo y esfuerzo para la optimización del sistema, variabilidad en la eficiencia de transformación y una relativamente complicada identificación de las secuencias alteradas (Wang et al., 2017), lo cual vuelve un reto descubrir la función de un gran número de genes en un periodo corto de tiempo (Mukherjee et al., 2013).

Los sistemas de mutagénesis basados en recombinación homóloga en hongos filamentosos se consideran como poco eficientes, ya que se piensa que las integraciones ocurren de forma ilegítima a pesar de contener secuencias con un gran porcentaje de identidad, significando así un obstáculo para la manipulación genética (Herrera-Estrella, 1990; Haber, 1999). Ahora, es sabido que secuencias con alta homología son incorporadas principalmente por el sistema de recombinación homóloga generando así transformantes estables en el hongo *T. atroviride* (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, en

preparación). Adicionalmente, en hongos filamentosos no han sido desarrolladas estrategias basadas en integraciones por recombinación homóloga a gran escala.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se implementó un nuevo sistema de mutagénesis insercional aleatoria dirigida por recombinación homóloga en *T. atroviride*, utilizando el vector pCB1004 con fragmentos clonados provenientes del genoma del mismo hongo, con el objetivo de producir transformantes estables.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2. Antecedentes

2.1 *Trichoderma* spp

El género *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*) comprende a hongos ascomicetos filamentosos esporulantes encontrados en prácticamente cualquier lugar con material vegetal en descomposición (Jaklitsch, 2009). Sus integrantes presentan un comportamiento saprófito y antagonista contra hongos fitopatógenos de interés agroeconómico, debido a la producción de moléculas bioactivas que participan en la inhibición de éstos, micoparasitismo y competencia por nutrientes (Viterbo y Horowitz, 2010; Reithner et al., 2011). Ejemplos de los anteriores son *T. atroviride*, *T. virens*, *T. harzianum* y *T. asperellum*, los cuales son utilizados como agentes de biocontrol contra *Botrytis cinérea* y *Rhizoctonia solani*, dos de los principales hongos fitopatógenos (Benítez et al., 2004).

La primera descripción realizada del género *Trichoderma* se realizó como *Hypocrea* en su ciclo de vida sexual por Elias Fries , basándose en otro hongo de esporas hialinas, *Sphaeria rufa* Pers. Fr. (1825). El estadio teleomorfo usualmente es reconocido por presentar peritecia embebidos en estroma carnoso con tejido pseudoparenquimatoso o hifas sumamente compactadas y presenta ocho ascosporas septadas que se desarticulan en el desarrollo temprano, lo cual origina ascas con 16 ascosporas parciales (Chaverri y Samuels, 2003). *Hypocrea* tiene bastante similitud con el género *Podostroma* en sus características morfológicas y ecológicas, la única diferencia subyace en el estroma estipitado del primero (Rossman et al., 1999). El anamorfo, por otra parte, presenta fiálides hialinas formadas por ramificaciones denominadas conidióforos que poseen conidia que van de elipsoidales a ligeramente oblongas, generalmente lisas y raramente ornamentadas, cuyo color comúnmente es verde o hialino y menos frecuentemente amarillo (Chaverri y Samuels, 2003). Existe la posibilidad de que también se formen clamidosporas globosas localizadas en la punta hifal (Samuels et al., 2000).

Los integrantes del género *Trichoderma* se han convertido en importantes colonizadores de lugares con un amplio rango de condiciones ambientales, por lo que son considerados componentes predominantes de la micobiota del suelo en diferentes ecosistemas, que

incluyen campos de agricultura, marismas, pastizales, bosques, desiertos y praderas (Klein y Eveleigh, 1998). Dada su gran adaptabilidad ecológica el género representa un buen modelo para emprender estudios de diversidad y ecología (Kubicek et al, 2008).

2.1.1 Asociación planta-hongo

Indudablemente, el género *Trichoderma* se encuentra entre los hongos más importantes en términos de impacto biotecnológico en la agricultura, puesto que se ha encontrado que ciertas cepas de *Trichoderma* asociadas a la rizósfera tienen un efecto benéfico en el crecimiento, productividad, toma de nutrientes, resistencia a estrés abiótico, tasa de germinación de las semillas e inducción de la resistencia sistémica y local en plantas al ser simbioses oportunistas (Hermosa et al., 2011; Shores et al., 2010; Bae et al., 2009; Salas-Marina et al., 2015). El conjunto de efectores secretados por *T. atroviride* y *T. virens* puede variar de acuerdo con la presencia de una determinada planta u hongo huésped, con la capacidad de distinguir entre cepas de una misma especie (Guzmán-Guzmán et al., 2017)

La presencia de los hongos en las raíces está sustentada por los polisacáridos altamente hidratados de la capa mucilaginosa y por los mono- y disacáridos excretados por las plantas en la zona micorrizal (Hermosa et al, 2012). La sacarosa es un recurso clave excretado por la planta que favorece la colonización de *Trichoderma*, el desarrollo de mecanismos de defensa y un aumento en la tasa de fotosíntesis de la planta (Vargas et al, 2009). La colonización del anterior está mediada por hidrofobinas, proteínas tipo-expansina y enzimas degradadores de la pared celular (CWDE, Cell-wall-degrading enzymes). Asimismo, la colonización de la raíz es dependiente de la capacidad de cada cepa para tolerar el microambiente que acumula moléculas antimicrobianas y deposiciones en la pared celular de calosa y celulosa, los cuales previenen la entrada de *Trichoderma* a la estela vascular (Yedidia et al., 1999).

La inducción de la defensa en plantas se produce mediante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y/o patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs). Entre las proteínas MAMPs producidas por *Trichoderma* spp se encuentran xilanasas, celulasas, tipo-expansinas Swollenina TasSwo, endopoligaracturonasa, las cuáles desencadenan la biosíntesis de etileno, ácido siálico, inducción de defensa local y

resistencia sistémica inducida (Martínez et al., 2001; Rotblat et al., 2002; Djonovic´ et al., 2006; Brotman et al., 2008; Morán-Diez et al., 2009). Adicionalmente, se sabe que varias cepas del género tienen efectos benéficos en el crecimiento de plantas como el rábano, pimienta, pepino y jitomate (Baker et al., 1984; Chang et al., 1986), además de aumentar el desarrollo de raíces, potenciar la biodisponibilidad de P y Fe, crecimiento de pelos radiculares y el rendimiento de los cultivos y área foliar en determinadas plantas (Harman, 2000; Yedidia et al., 2001).

2.1.2 Aplicaciones industriales

Trichoderma spp. son buenas colonizadoras de ambientes y eficientes degradadoras de una amplia variedad de sustratos (Schuster y Schmoll, 2010), propiedades reflejadas en el vasto arsenal enzimático de especies como *T. harzianum*, *T. reesei* y *T. atroviride*, mostrando buenos rendimientos en la degradación de lignocelulosa y producción de bioetanol, razón por la cual son explotadas por la industria textil, de detergentes y papelera (Horta et al., 2018). Por lo anterior, son consideradas biofábricas con gran potencial industrial. Debido a que algunas cepas son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, otras aplicaciones industriales incluyen la expresión de proteínas heterólogas, uso en la fabricación de cerveza (Kunamneni et al., 2014), maceración de frutas en la producción de jugo y algunos aditivos alimentarios (Nevalainen et al., 1994 y 2005).

2.1.3 Agente de biocontrol

El término "biocontrol" se refiere a la reducción o control de la población de una plaga efectuada por un organismo natural (van den Bosch, 1982). Prácticamente todos los fitopatógenos son susceptibles al biocontrol. El uso de *Trichoderma* spp como antagonista de fitopatógenos ha sido explotado en el sector agrícola desde que en los 1930s se realizó el primer reporte como agente de biocontrol (Weindling, 1932). Sin embargo la competencia en la rizósfera, un término vinculado que se refiere a la competencia por nutrientes y colonización de las raíces de plantas, se acuñó desde 1987 para cepas de *Trichoderma* (Ahmad y Baker, 1987). Adicionalmente, se piensa que la competencia tan eficiente por parte de las especies de *Trichoderma* es el factor más importante para

prevenir la infección por fitopatógenos (Verma et al., 2007), dado que las primeras son consideradas como competidoras agresivas y eficientes movilizadoras de nutrientes en la rizósfera (Cuervo-Parra et al., 2014). Las especies de dicho género pueden controlar y antagonizar un amplio rango de hongos fitopatógenos como *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., y *Rhizoctonia* spp., bacterias y virus (Yedidia et al., 2003; Harman, 2006).

El tipo de interacción que consiste en que un hongo ataque directamente a otro hongo se denomina micoparasitismo. El micoparasitismo de *Trichoderma* es un proceso complejo en el que se piensa que las enzimas proteolíticas, quitinolíticas y las β -1,3-glucanasas juegan un papel crucial (Kamala y Devi, 2012). El proceso micoparasítico inicia cuando se establece un contacto con el huésped mediado por la unión de carbohidratos del huésped y lectinas presentes en la pared celular de *Trichoderma* spp, seguido de enrollamiento y formación del apresorio, el cuál funge como “taladro” de la pared celular del huésped (Omann y Zeilinger, 2010). Posteriormente, las especies de *Trichoderma* tienen la habilidad de reconocer las señales provenientes del huésped, las cuáles activan la penetración de las hifas del micoparásito dentro del lumen del hongo hospedero (Kubicek y Druzhinina, 2013), y el crecimiento hifal del huésped es inhibido por enzimas extracelulares. Finalmente, la multiplicación de *Trichoderma* ocurre en el interior celular (Lu et., 2004).

Otra forma de limitar las poblaciones de fitopatógenos es a través de la producción y secreción de metabolitos con capacidades antimicrobianas donde es dispensable el establecimiento de contacto físico, proceso denominado “antibiosis”. La antibiosis inicia cuando *Trichoderma* produce antibióticos o compuestos difusibles de bajo peso molecular que retardan el crecimiento del patógeno. Algunos de los compuestos tóxicos para fitopatógenos volátiles y no volátiles producidos por *Trichoderma* spp incluyen la tricolina, massoilactona, ácido heptelídico, gliovirina, 6-pentil- α -pirona, ácido harziánico, glisopreninas y peptaiboles (Qualhato et al., 2013).

2.1.4 Modelo de estudio de conidiación inducida por luz azul

La radiación electromagnética emitida por el sol tiene diversos efectos sobre los seres vivos, dependiendo de la cantidad de energía y el tiempo de exposición; por una parte

puede ser dañina en la células, provocando mutaciones por medio de la dimerización de pirimidinas y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Schmoll et al., 2010), y por otra parte puede ser informativa, orquestando diversos procesos celulares para modular el comportamiento (Herrera-Estrella y Horwitz, 2007; Tisch y Schmoll, 2009). En *Trichoderma* spp. el primer reporte del efecto de la luz se realizó cuando se observó que crecían en forma micelial en oscuridad, y con un pulso corto de luz se desencadenaba la producción de conidia color verde oscuro (Gutter, 1957), por lo que actualmente es utilizado como un modelo fotomorfogénico (Schmoll et al., 2010). Hay dos genes indispensables para la conidiación estimulada por luz y la expresión de genes regulada por luz azul, los cuales son *blr-1* y *blr-2* (Casas-Flores et al., 2004). Los anteriores son genes que codifican proteínas que funcionan como fotorreceptor heterodimérico, homólogas a las White-Collar (WC) de *Neurospora crassa* (Liu et al., 2003). La proteína BLR-1 posee un dominio de unión a ADN y tres dominios PAS, uno de los cuáles tiene un dominio sensor LOV (Light-Oxygen-Voltage) indispensable para interactuar con el cromóforo FAD (Casas-Flores et al., 2004; Rosales-Saavedra et al., 2006). Además, las proteínas BLR-1 y BLR-2 también tienen funciones independientes de la luz como conidiación inducida por limitación en la fuente de carbono y por adición de cAMP en oscuridad (Casas-Flores et al., 2006).

2.2 Estrategias de mutagénesis en hongos filamentosos

Los análisis genómicos de *T. reesei*, *T. atroviride* y *T. virens* revelaron genes únicos en estos organismos, mostraron evidencia acerca de los procesos evolutivos del micoparasitismo e interacción bidireccional planta-hongo y permitieron el estudio funcional de genes en una forma global (Mukherjee et al., 2013). Aunado a lo anterior, el uso de herramientas para la manipulación genética ha permitido realizar modificaciones dirigidas hacia genes específicos, evidenciando así su funcionalidad y los mecanismos de regulación, además de la producción de mutantes con características biotecnológicamente deseables (Li et al., 2017). Sin embargo, sigue siendo un reto descifrar la función de un vasto número de genes de un organismo en un lapso corto de tiempo (Mukherjee et al., 2013).

Estrategias para generar mutaciones al azar o dirigidas en el ADN han sido desarrolladas utilizando diversas herramientas de manipulación genómica en hongos filamentosos

(Wang et al., 2017). Algunas de las técnicas de mutagénesis aleatoria incluyen los métodos REMI (Xu et al., 2005), AMT (Wang y Li, 2008), TAGKO (Firon et al., 2003) y mutagénesis química o por luz UV (Bose, 2014). Por otra parte hay técnicas que ocasionan mutaciones dirigidas entre las cuales están las basadas en inserción por recombinación homóloga, edición génica mediante el uso de la recombinasa Cre y los sitios *LoxP* (Sistema Cre/*LoxP*; Forment et al., 2006), el método de nucleasa efectora tipo-activador de transcripción (TALEN) y los sistemas de edición basados en la proteína Cas9 y las regiones de repetidos palindrómicos cortos regularmente interespaciados y agrupados (CRISPR/Cas9; Liu et al., 2015). Las principales desventajas de los sistemas de mutagénesis al azar REMI, AMT y por radiación UV son: i) variabilidad de la eficiencia dependiente de la concentración y tipo de enzimas de restricción; ii) gran demanda en tiempo por la optimización de múltiples parámetros para alcanzar una alta eficiencia de transformación; iii) una complicada identificación de los sitios de mutación, respectivamente (Wang et al., 2017).

2.2.1 Mutagénesis aleatoria

2.2.1.1 Mutagénesis física y química

Entre las primeras estrategias utilizadas para estudiar la función génica se encuentra la mutagénesis física por exposición a radiación UV, rayos X, radiación gamma y a químicos como etil metano sulfonato (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y dietil sulfato (Chand et al., 2005; Wu et al., 2014). Las estrategias de mutagénesis por transposones, por enzimas de restricción y mediada por *Agrobacterium tumefaciens* presentan una desventaja frente a la mutagénesis química y física, ya que muchas de las mutaciones que pueden arrojar información útil no pueden ser investigadas con inserciones, sino con mutaciones puntuales que pueden evidenciar la importancia de un aminoácido esencial para que la proteína sea funcional, o bien la importancia de una determinada base para la regulación transcripcional y traduccional (Bose, 2016). La exposición a los químicos previamente mencionados puede provocar daños en el ADN que llevan a cambios en una sola base o deleciones. La incidencia de radiación UV sobre el ADN puede directa o indirectamente inducir daño en éste por medio de ROS (Ikehata y Ono, 2011), pudiendo ser aleatorias y con algunas zonas más susceptibles a sufrir cambios, "hot spots", cerca del origen de replicación (Miller, 1972).

En hongos, se han realizado varias estrategias de mutagénesis química y física con buenos resultados en orden de mejorar la producción de un metabolito, como la producción de xilanasas en *A. brasiliensis* y *Penicillium digitatum* (Burlacu et al., 2017), o con el objetivo de hacer una especie más resistente al efecto de un fungicida en *Lecanicillium attenuatum* (Xie et al., 2016) y para mejorar la capacidad antagónica frente a hongos fitopatógenos en algunas especies de *Trichoderma* (Rashmi et al., 2016).

2.2.1.2 REMI

REMI es una estrategia de mutagénesis en la que el ADN no homólogo se transfiere al genoma de la célula huésped por medio de enzimas de restricción. El método consiste en transformar al organismo blanco con un plásmido linealizado junto con enzimas de restricción que producen extremos compatibles entre el ADN genómico y el plásmido, dando lugar a una integración en un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción (Kahmann y Basse, 1999). En un principio la estrategia fue diseñada para *Saccharomyces cerevisiae* (Schiestl y Petes, 1991). En el primer organismo, la estrategia presenta variación en función de qué enzimas de restricción son utilizadas para cortar el ADN del huésped. Los genes mutados son identificados mediante PCR posterior a la recuperación del plásmido mediante escisión, recircularización y transformación en *Escherichia coli* (Wang et al., 2017; Figura 1). Ha sido uno de los métodos de elección para la identificación de genes asociados a patogenicidad de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Park y Lee 2013), *Rosellina necatrix* (Attri et al., 2017), *Magnaporthe grisea* (Shi y Leung 1995), *Fusarium oxysporum* (Imazaki et al. 2007). En otros hongos como *Pleurotus eryngii* (Noh et al. 2010) y *Monacrosporium sphaeroides* (Xu et al. 2005) también se ha realizado esta estrategia.

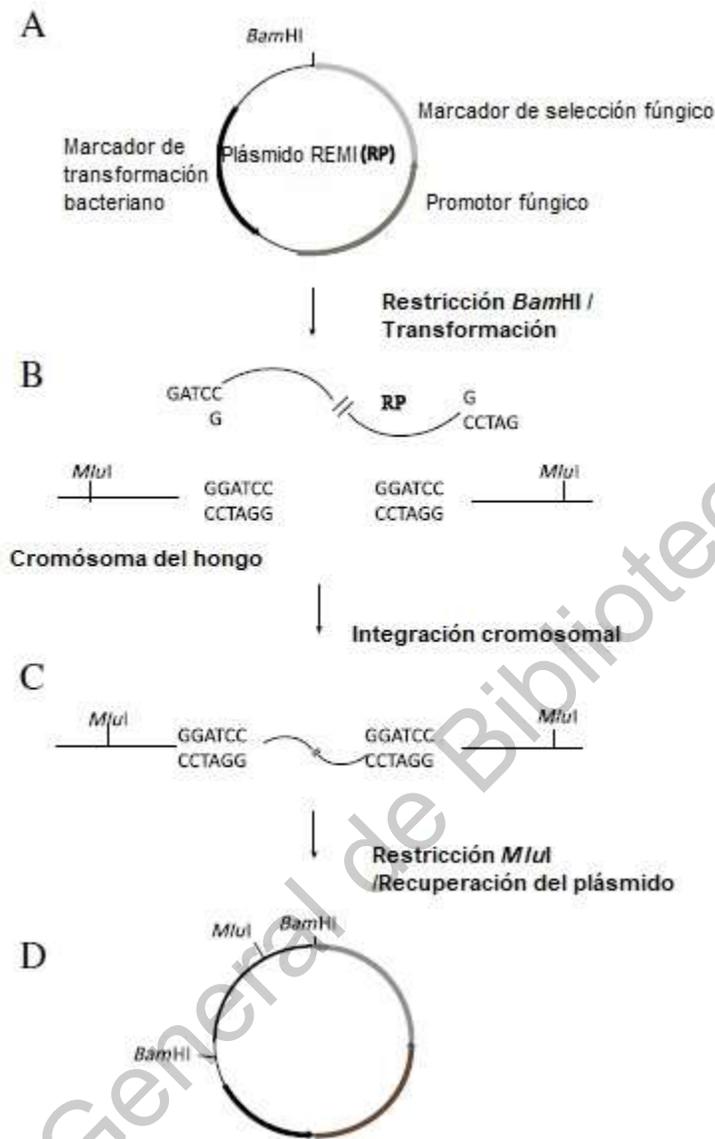


Figura 1. Transformación REMI y recuperación del plásmido. **A)** El plásmido REMI (RP) contiene un marcador de selección para el hongo y uno bacteriano con el fin de recuperar el plásmido. **B)** El RP linealizado se transfiere en células del hongo junto con la enzima de restricción (*Bam*HI), lo cual genera dos sitios de corte en el plásmido y en el cromosoma. **C)** Los extremos expuestos de los dos sitios digeridos se unen por complementariedad y se ligan. **D)** La recuperación del plásmido se realiza mediante escisión del genoma que contiene secuencias que flanquean el sitio de inserción (en este caso *Mlu*I) y se circulariza con una ligasa de ADN. Finalmente se transforma *E.coli* y se amplifica la secuencia de identidad desconocida. (Imagen modificada de Wang et al., 2017).

2.2.1.3 AMT

La estrategia AMT se basa en el uso de la bacteria gram-negativa del suelo *A. tumefaciens*, la cual genera tumores en las heridas de plantas dicotiledóneas infectadas. Durante la inducción de tumores la bacteria transfiere a la planta parte de su plásmido Ti, el T-DNA, flanqueado por repetidos imperfectos de 25 pb (Michielse et al., 2005). La inserción del T-DNA en el genoma de la planta ocurre en sitios aleatorios y es dependiente de la expresión de un conjunto de genes de virulencia (*vir*) presentes en el plásmido Ti (Zhu et al. 2000; Figura 2). Los genes *vir* son inducibles por compuestos que secretan las plantas debido a las heridas, como la acetosiringona. El sistema se adaptó primeramente en plantas, luego se utilizó en *S. cerevisiae* (Piers et al. 1996), y finalmente se explotó en hongos filamentosos (de Groot et al., 1998) y células de mamíferos.

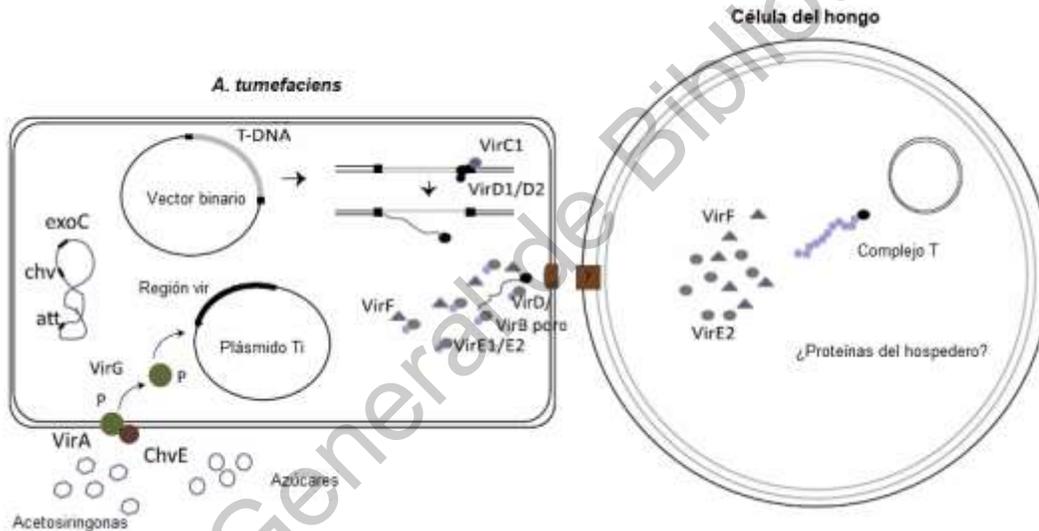


Figura 2. Estrategia AMT de transferencia del T-DNA en hongos filamentosos. Los genes *vir* se transcriben en presencia de acetosiringona y azúcares en el medio extracelular. Las proteínas VirA y VirG se activan en la presencia de acetosiringona y la proteína ChvE interactúa con la proteína VirA. Posteriormente, un grupo fosforilo se transfiere de la proteína VirA a la proteína VirG, la cual funciona como activador de la transcripción. *virG* es autoinducible y activa también a otros genes de virulencia. Las proteínas VirD2 y VirD1 escinden una de las cadenas flanqueadas por los repetidos, lo cual conduce a la liberación del T-DNA. El sistema de secreción tipo IV se encarga de transferir el T-DNA, donde participan las proteínas VirB (poro) y VirD (mediadora). El T-DNA es transferido junto con las proteínas VirF, VirE1/E2 y se integra de manera aleatoria en el genoma del hongo. Se desconoce la participación de las proteínas del huésped. (Imagen modificada de Michielse et al., 2005).

Entre los hongos que han resultado eficientemente transformados con el sistema AMT están *Aspergillus awamori* (Gouka et al., 1999), *A. niger*, *F. oxysporum* (Mullins et al., 2001), *T. reesei*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *N. crassa* y *Agaricus bisporus* (Chen et al., 2000). Para la identificación de las secuencias adyacentes alteradas por el plásmido Ti, se realiza una PCR termal de entrelazado asimétrico (TAIL-PCR), haciendo uso de oligonucleótidos específicos anidados con una temperatura de fusión (T_m) alta en reacciones consecutivas junto con un oligonucleótido arbitrario degenerado (AD) con una T_m baja (Liu y Chen, 2007). La técnica permite transformar células fúngicas en forma de protoplastos, hifas, esporocarpos y esporas (Wang et al., 2017). Generalmente, se obtienen una eficiencia de transformación y un porcentaje de inserciones únicas mayores en este método en comparación con la estrategia REMI (Rogers et al., 2004).

2.2.1.4 TAGKO

El enfoque TAGKO es una estrategia de mutagénesis desarrollada con el objeto de cubrir gran parte del genoma en hongos filamentosos. Los transposones han sido utilizados para generar mutaciones génicas, debido a su facilidad de transferencia entre células del huésped. De manera general, en esta técnica de mutagénesis se crean templados de secuenciación de genes mediante transposición *in vitro* (IVT) dentro de librerías de cósmidos (Hamer et al., 2001; Figura 3). La frecuencia de mutaciones inducidas por inserciones dirigidas hacia genes específicos es mayor con la estrategia de vectores cósmidos TAGKO que con vectores de interrupción de genes convencionales (Hamer et al., 2001). El sistema se desarrolló primero en *Magnaporthe grisea*, y posteriormente se implementó en *A. niger* con el transposón no autónomo *Vader* (Hihlal et al., 2011). Otros hongos filamentosos en los cuáles se han utilizado enfoques similares son *Penicillium griseoroseum* (de Queiroz y Daboussi 2003), *Aspergillus fumigatus* (Firon et al., 2003) y *Mycosphaerella graminicola* (Adachi et al., 2002).

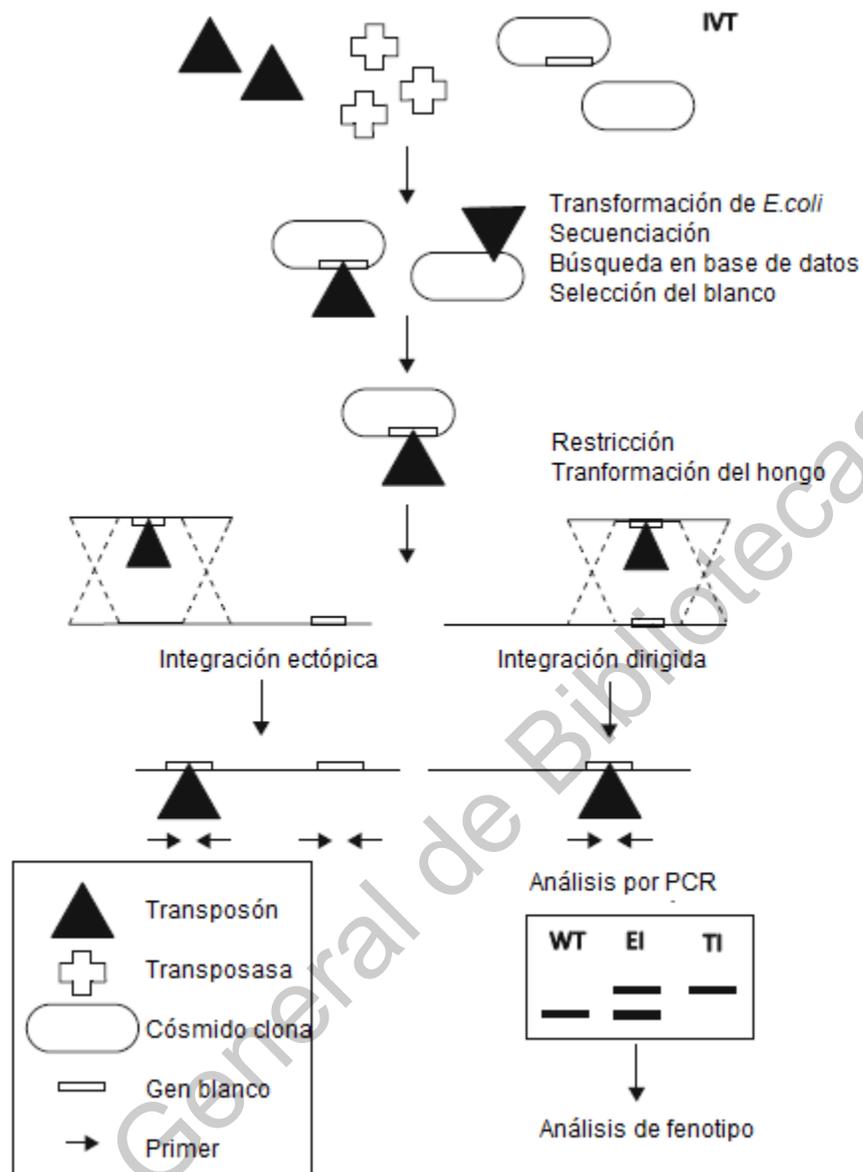


Figura 3. Knockout génico arreglado por transposones. La transposición *in vitro* (IVT) requiere de un ADN receptor y un transposón con su respectiva transposasa. El transposón contiene el gen *hph*, el cual confiere resistencia a higromicina en hongos filamentosos y *E. coli*. El ADN receptor consiste en clonas de un cósmido, que contiene sitios de restricción para endonucleasas homing que flanquean el sitio de clonación y el gen de β -lactamasa. Los productos de la IVT son transformados en *E. coli* y los sitios de inserción del transposón individuales se determinan por secuenciación. Los vectores que contienen una inserción de transposón apropiada son digeridos con endonucleasas homing para liberar los insertos completos para la transformación. La distinción de eventos de inserción dirigida (TI) y ectópica (EI) se lleva a cabo por análisis de PCR. (Imagen modificada de Hamer et al., 2001).

2.2.2 Mutagénesis dirigida

2.2.2.1 Sistema Cre-loxP

Esta técnica aparece como una alternativa de ingeniería genética en hongos en respuesta a la necesidad de nuevos marcadores de selección, además de los comúnmente utilizados (por ejemplo: gen de resistencia a higromicina B, *hph*; gen de resistencia a piriamina, *ptrA*; y gen de resistencia a fleomicina). La recombinasa Cre es parte de la familia de las integrasas del bacteriófago λ , la cual se une covalentemente a dos sitios *loxP* de 34pb y cataliza la recombinación entre estos (Pinkney et al., 2012). El sistema ha sido empleado para remover marcadores de selección (reciclaje), por lo que este tipo de sistema puede ser usado para manipulaciones multigénicas. Además, ha servido para estudiar la función génica en hongos como *P. oxalicum* (Jiang et al., 2016), *T. reesei* (Steiger et al., 2011), *S. cerevisiae* (Yamagishi et al., 2008), y especies de *Aspergillus* (Forment et al., 2006). El sistema FLP-FRT derivado de la levadura *S. cerevisiae* es muy parecido al sistema Cre-loxP, con la diferencia que en este caso se usa la recombinasa FLP y los sitios *FRT*, obteniendo resultados positivos en *P. chrysogenum* (Kopke et al., 2010), *Ustilago maydis* (Khrunyk et al., 2013) y *Acremonium chrysogenum* (Bloemendal et al., 2014).

2.2.2.2 TALEN

Los efectores tipo-activador de transcripción (TALE) fueron descubiertos en el género fitopatógeno *Xanthomonas* y se reconocieron como proteínas con la capacidad de modular la actividad de la planta hospedera (Cermak et al., 2011). Han sido empleados como herramientas moleculares artificiales, ya que ocasionan cortes en la doble cadena de ADN (DSB) y posteriormente modifican el genoma con la ayuda de una nucleasa, por lo que se consideran invaluable editores génicos en varios organismos (Joung y Sander, 2012). Un dominio repetido TALE, que funge como módulo de unión al ADN, y la nucleasa no específica FokI, que sirve como módulo de corte al ADN, conforman en conjunto el sistema TALEN (Figura 4). Los repetidos TALE se componen de una secuencia de 34 aminoácidos, que no considera el repetido di-residuo variable (RVD) que generalmente abarca el 12vo y 13vo aminoácido. El reconocimiento de base nitrogenada depende de los RVD específicos: NI=A; NG=T; NN=G; HD=C (Joung y Sander, 2013).

Adicionalmente, existe una variación de la técnica denominada Platinum TALEN, que incluye cambios en los repetidos di-residuo no variables (en la posición 4 y 32 de la secuencia de aminoácidos), con la cual se obtiene mayor actividad endonucleasa (Sakuma et al., 2012). En hongos filamentosos, la anterior técnica solamente se ha implementado en *Pyricularia oryzae* (Araoz et al., 2015) con excelentes resultados. Sin embargo, sigue siendo un reto y una desventaja clonar una gran cantidad de secuencias repetidas (Gaj et al., 2013).

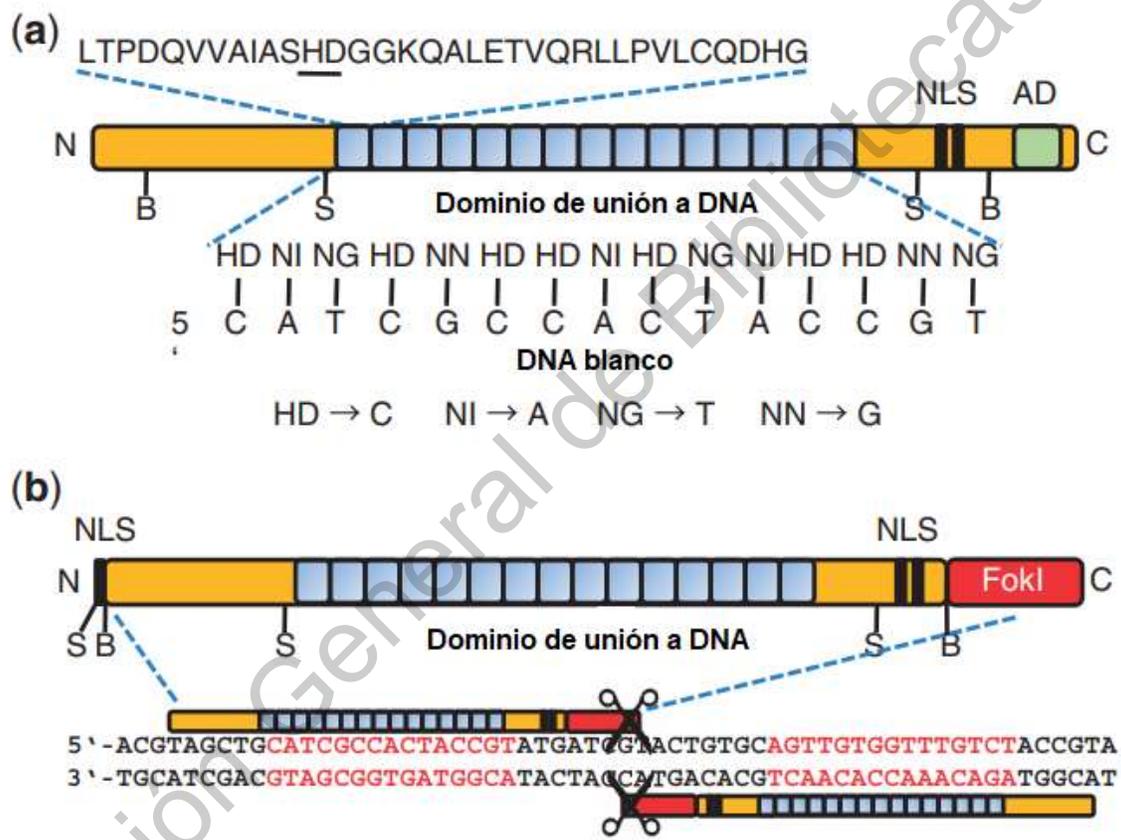


Figura 4. Estructuras TALE y TALEN. A) Estructura de un TALE encontrado en la naturaleza. Una secuencia consenso repetida que contiene un RVD (subrayado) que determina la secuencia nucleotídica reconocida. Debajo se muestran los RVD más comunes con sus nucleótidos de reconocimiento asociados. **B)** Estructura de un TALE fusionado a la proteína endonucleasa FokI (TALEN). Se necesita un homodímero TALEN para cortar el ADN blanco. NL, señal de localización nuclear; AD, dominio de activación de la transcripción; B, sitio de reconocimiento *Bam*HI; S, sitio de reconocimiento *Sph*I. (Imagen modificada de Cermak et al., 2011).

2.2.2.3 CRISPR/Cas

Los sistemas CRISPR/Cas son parte de la maquinaria adaptativa inmunitaria de bacterias y arqueas. Durante una infección por un fago, éste introduce su ADN al interior del hospedero, el cual se almacena en un arreglo CRISPR, de modo que tras un segundo encuentro con el mismo ADN del fago, se sintetiza un ARN CRISPR maduro (crRNA) seguido de un RNA transactivador (tracrRNA) con afinidad por la endonucleasa Cas9, y en conjunto degradan el ADN del fago por complementariedad (Hsu et al., 2014). Se han encontrado tres distintos tipos de sistemas CRISPR/Cas que se distinguen por las proteínas Cas involucradas. En los sistemas tipo I y III participan varias proteínas Cas y presentan mayor complejidad, por lo que el sistema tipo II hallado en *Streptococcus pyogenes* es ampliamente utilizado gracias a su fácil manipulación (Makarova et al., 2011).

El sistema CRISPR/Cas tipo II consiste en dos componentes, la endonucleasa Cas9 y el ARN guía corto (sgRNA) sintético, que a su vez se compone de 20 nt de la secuencia blanco unida a una estructura scaffold de aproximadamente 80 nt, necesaria para la unión con la proteína Cas9, donde el tracrRNA y el crRNA conforman la estructura scaffold (Jinek et al., 2012; Figura 5). La homología de secuencia dada por el sgRNA otorga mucha especificidad. Los sistemas CRISPR/Cas9 son dependientes de un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) y actúan hasta 6 pb de distancia del blanco (Wang et al., 2017). Para que la edición genómica sea efectiva usando este sistema, es necesario que la endonucleasa y el sgRNA estén presentes en el núcleo. Las estrategias para lograr lo anterior incluyen la transformación e integración de las secuencias que codifican el sgRNA y la proteína Cas9 dentro del genoma, la transformación del gen que codifica para Cas9 y posteriormente la transformación del sgRNA sintetizado *in vitro*, y la transformación del complejo ribonucleoproteico CRISPR/Cas9-sgRNA (Schuster y Kahmann, 2019). Algunos grandes problemas para implementar exitosamente este sistema en hongos y otros organismos son la correcta producción, localización y funcionamiento del sgRNA, expresión de la proteína Cas9 y eficiencia en la edición (Schuster y Kahmann, 2019).

La primera aplicación del CRISPR/Cas9 como herramienta de edición génica en hongos filamentosos se realizó en *T. reesei* para interrumpir el gen *ura5*, optimizando el uso de

codones específicos y produciendo el ARN *in vitro* (Liu et al., 2015). Desde entonces, dicha herramienta se ha utilizado en los géneros *Aspergillus* (Nødvig et al., 2015), *Penicillium* (Pohl et al., 2016), *Neurospora* (Matsu-ura et al., 2015), *Alternaria* (Wenderoth et al., 2017), *Magnaporthe* (Foster et al., 2018), *Phytophthora* (Miao et al., 2018), *Ustilago* (Schuster et al., 2016), *Sclerotinia* (Li et al., 2018), *Fusarium* (Wang et al., 2018) entre muchos otros.

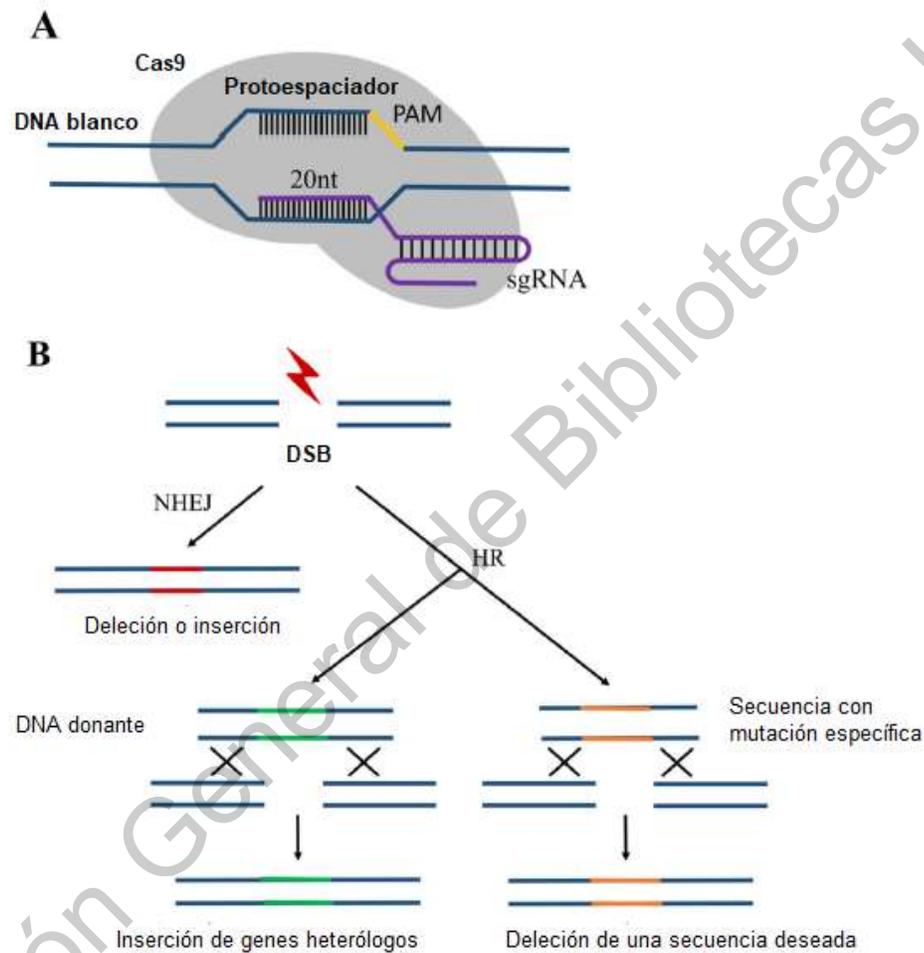


Figura 5. Plataforma de edición génica de CRISPR/Cas9. **A)** El sgRNA se une a la endonucleasa Cas9 y genera una DSB en la secuencia blanco del genoma, que consiste en una secuencia de aproximadamente 20pb complementaria al protoespaciador del sgRNA y a una secuencia PAM. **B)** El mecanismo de reparación del ADN que sigue a la producción del DSB por la ribonucleoproteína sgRNA-Cas9, puede ser por unión de extremos no homólogos (NHEJ) o por recombinación homóloga (HR). (Imagen modificada de Shi et al., 2017).

2.3 Integración de ADN exógeno en hongos filamentosos: NHEJ vs HR

La interrupción génica dirigida mediada por recombinación homóloga es una técnica comúnmente utilizada como herramienta molecular en hongos. Su eficiencia es dependiente de la competencia entre dos sistemas de reparación: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). Cuando se presenta un DSB, la vía NHEJ predomina sobre la vía HR en la mayoría de los eucariotas multicelulares (Zhang et al., 2007), mientras que en *S. cerevisiae* ocurre lo contrario, ya que el sistema HR sobrepasa al NHEJ. El sistema de reparación NHEJ se compone de las proteínas KU70, KU80 y Mus-53 (Lig4), donde las dos primeras forman un heterodímero y se unen a los extremos de ADN para reclutar a la tercera y otras proteínas del complejo reparador (Davis y Chen, 2013). Por otro lado, el grupo de genes, altamente conservado, RAD52 constituye varios componentes de la maquinaria HR (Symington, 2002). Así, el ADN extracromosomal será integrado en función de la competencia de unión a los extremos de ADN de las proteínas KU y Rad52, dando lugar a integraciones por homología o ilegítimas (o ectópicas), respectivamente (Haber, 1999).

La baja eficiencia de integraciones estables utilizando secuencias homólogas en hongos filamentosos ha significado una barrera para la manipulación genética, puesto que en dichos organismos generalmente ocurren integraciones ectópicas cuando se pretende hacer mutagénesis dirigida. Se estima que es requerida una secuencia de al menos 1kb de ADN homólogo a la secuencia blanco para alcanzar una integración por homología del 10% (van den Hondel y Punt, 1991). En *S. cerevisiae*, se han realizado integraciones dirigidas y knock-in de genes por métodos de recombinación homóloga, con un mínimo de 50 pb para que se produzca la integración (Hua et al., 1997); sin embargo, en hongos filamentosos este recurso no ha tenido impulso debido a la baja tasa de integración por homología y la dificultad de producir protoplastos (Wang et al., 2017).

2.3.1 Alternativas para incrementar la eficiencia de integración por homología

A pesar de las anteriores limitantes, se han realizado varios esfuerzos por mejorar la eficiencia de integración por recombinación homóloga, con base en la producción de células mutantes en genes involucrados en procesos NHEJ, como *ku70* (Catalano et al., 2011; Xu et al., 2014), *ku80* (Goins et al., 2006) y *mus-53* (Ishibashi et al., 2006; Steiger et

al., 2011), favoreciendo así la vía HR. No obstante, se ha reportado que suprimir alguno de los componentes del sistema NHEJ tiene consecuencias no deseadas como la alteración en la estabilidad genética y el mantenimiento de la integridad del ADN. Adicionalmente, las proteínas KU juegan un rol en el mantenimiento de los telómeros, organización espacial del núcleo y recombinación mitótica (Taddei et al., 2004; Fisher y Zakian, 2005). Los reportes incluyen a *A. niger*, donde mutantes de *ku70* o *ku80* promueven la inestabilidad genómica y un incremento en la cantidad de daños al ADN (Zhang et al., 2011) y *N. crassa* donde cepas deficientes en KU70/KU80 son más sensibles al metil metanosulfonato (MMS), EMS y bleomicina, aunque no ocurrió lo mismo con radiación UV, hidroxurea, camptotecina ni 4-nitroquinolina 1-óxido (Ninomiya et al., 2004).

Otras estrategias se han valido de la especificidad de los sistemas de ARNs pequeños interferentes (siRNAs) para silenciar transitoriamente genes clave en la vía de reparación NHEJ, o en la disrupción transitoria de éstos mediante un sistema bipartito de mutagénesis dirigida. Con estas alternativas el sistema puede ser alterado en menor medida y presentar menor variabilidad en los fenotipos, si se compara con las mutantes carentes de los mismos genes. Algunos de los genes silenciados con éxito por medio de las anteriores estrategias son *ku70* en *A. nidulans* (Nielsen et al., 2003) y *mus53* en *T. reesei* (Chum et al., 2017), con eficiencias del 95% y 59% respectivamente.

2.3.1 Integración por recombinación homóloga en *T. atroviride*

En *T. atroviride* se pensaba que la transformación de plásmidos que contenían secuencias heterólogas mediante electroporación o por biolística, generalmente se incorporaba en sitios altamente recombinogénicos, por lo que la integración ocurría ectópicamente al recombinarse de forma ilegítima (Herrera-Estrella, 1990). Además, un porcentaje importante de transformantes perdía la resistencia a higromicina B cuando se les retiraba la presión de selección, por lo que se clasificaron como transformantes inestables (Herrera-Estrella, 1990; Lorito et al., 1993). No obstante, ahora se sabe que plásmidos con secuencias con alta homología se integran preferentemente por HR en *T. atroviride* produciendo transformantes estables, aunque la inestabilidad en estos experimentos sigue ocurriendo. En contraste, plásmidos que no presentan secuencias homólogas se replican autónomamente por varias generaciones sin experimentar cambios

dando lugar a transformantes inestables (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, en preparación).

En el presente proyecto se pretende aplicar un nuevo enfoque de mutagénesis insercional a mediana escala, basado en las construcciones resultantes de la clonación de fragmentos del genoma de *T. atroviride* en el plásmido pCB1004, las cuales serán incorporadas por recombinación homóloga en el genoma de dicho hongo con el objetivo de generar y aislar transformantes estables de manera relativamente sencilla.

3. Justificación

La obtención de transformantes del hongo *T. atroviride* utilizando un nuevo método de mutagénesis insercional puede ampliar el conocimiento de la biología del hongo en diversas áreas, que engloben mecanismos de regulación génica ante diversos estímulos ambientales, resistencia a diversos tipos de estrés, interacción hongo-planta, micoparasitismo, e indudablemente generar información relevante acerca de la función de genes no estudiados y su función. Además, implementar esta estrategia abriría el panorama para la utilización de enfoques similares en otros hongos y representaría una eficiente herramienta para la generación de cepas mutantes con propiedades de interés agrobiotecnológico.

4. Hipótesis

Las integraciones, mediadas por recombinación homóloga, de los fragmentos de ADN genómico aleatorio de *T. atroviride* clonados en el plásmido pCB1004, generan un banco de cepas mutantes estables.

5. Objetivos

5.1. General

Producir un banco de cepas mutantes de *T. atroviride* basado en la integración por recombinación homóloga de la biblioteca de ADN genómico contenida en el plásmido pCB1004.

5.2 Particulares

- 1.-Construir un biblioteca del genoma de *T. atroviride* en el plásmido pCB1004.
- 2.-Generar transformantes estables de *T. atroviride* usando la biblioteca genómica.
- 3.-Determinar si la integración mediada por homología ocurre en diferentes loci del genoma de *T. atroviride*.

6. Metodología

6.1 Cepa y condiciones de cultivo.

Se cultivó la cepa silvestre (WT) *T. atroviride* IMI206040 en el caldo Papa-Dextrosa (PDB) a 27°C con agitación orbital (150 rpm) durante 48-60 h para la extracción de ADN y posterior fragmentación del mismo. Para los ensayos de metabolismo, las cepas transformantes se cultivaron en Medio Mínimo Vogels (2% sacarosa, 1.5% agar bacteriológico, sales Vogels 1X), medio completo (MC: PDB, 0.3% extracto de levadura, 0.5% hidrolizado de caseína, 1.5% agar, higromicina 100µg/ml). La cepa TOP 10 F' de *E. coli* fue crecida en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) líquido o sólido a 37°C durante 16-20 h, con agitación orbital (150 rpm) en caso del medio líquido, adicionando 34 µg/mL de cloranfenicol. Los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave a 15 Lb de presión y 121 °C durante 15 min. Para los medios selectivos, después de esterilizarlos se dejaron enfriar y se agregó el antibiótico a las concentraciones requeridas. Para asegurar las condiciones de esterilidad durante la manipulación de las células se empleó una campana de flujo laminar.

6.2 Extracción del ADN genómico (ADNg).

Con el propósito de obtener y purificar ADNg, el micelio fue filtrado a través de tela magitel estéril y se recolectó con una espátula metálica estéril, y posteriormente se colocó en un mortero con nitrógeno líquido (N₂) para ser rápidamente pulverizado en partículas finas de color blanco que se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL (500 µl por tubo). Se

agregaron 600 µl de una solución buffer de urea (7 M Urea, 0.35 M NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA y 1 % de N-Lauril Sarcosina) y se mezcló durante 2 min en vórtex y se incubó a 30 min a temperatura ambiente (TA). Pasado este tiempo se añadieron 600 µl de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (50:48:2) y se agitó en vórtex por 10 min, para seguir con la centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se recuperó y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo. Se repitieron los pasos anteriores a partir de la adición del fenol-cloroformo-álcohol isoamílico. Posteriormente, se precipitó el ADN con 1 volumen de isopropanol y se mezcló por inversión suave hasta observarse hebras blancas. Los tubos fueron centrifugados a 12,000 rpm por 10 min y después fue descartado el sobrenadante. Se agregaron 500 µl de etanol al 70% y se agitaron en vórtex. Nuevamente, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min y en seguida se descartó el sobrenadante. Los tubos se dejaron secar abiertos boca abajo a TA. Una vez secos, se añadieron 50 µl de H₂O HPLC estéril y 1 µl de RNAsa (10 mg/ml) (Invitrogen) a cada tubo y se incubaron a 37°C por 20 min. La cuantificación del ADNg se realizó mediante Nanodrop y se verificó la integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa (1%) adicionado con bromuro de etidio (10 mg/mL).

6.3 Digestión del ADNg y purificación de los fragmentos generados.

Para la construcción de la biblioteca genómica en el plásmido pCB1004, se realizó la restricción de 50 µg de ADNg de *T. atroviride* con la enzima de restricción *Sau3AI* (Promega), con un volumen final de 20 µl e incubación de 4 h a 37°C siguiendo las recomendaciones del fabricante. La inactivación de la enzima de restricción se realizó mediante incubación a 65°C por 15 min. Con el propósito de purificar los fragmentos del genoma en el rango de 0.75-1.5 kpb, la restricción con *Sau3AI* se separó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) con bromuro de etidio (10 mg/ml). Tomando como referencia el marcador de peso molecular 1 Kb, se realizó el corte de la porción del gel con los fragmentos de interés con ayuda de una navaja metálica estéril y se colocó dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril. La purificación de los fragmentos contenidos en el gel se llevó a cabo con el kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN). La determinación de la concentración se realizó por medio de Nanodrop.

6.4 Linearización y desfosforilación del plásmido pCB1004

Con el propósito de generar extremos cohesivos entre los fragmentos de ADN_g y el vector, la linearización del plásmido pCB1004 se realizó con la enzima de restricción *Bam*HI (Thermo Scientific™). Se emplearon 10 µg del vector con un tiempo de incubación de 3 h a 37°C. Para evitar la autoligación del vector vacío, el plásmido linearizado se trató con la enzima fosfatasa alcalina termosensible FastAP (Thermo Scientific™) siguiendo las sugerencias del fabricante para la eliminación de los grupos fosfato en los extremos 5´.

6.5 Ligación de los fragmentos del genoma con el plásmido pCB1004

Con la finalidad de clonar los diversos fragmentos de ADN_g en el plásmido pCB1004 desfosforilado, se realizó una ligación con una proporción molecular 1:3 entre el plásmido y los fragmentos genómicos, usando la ligasa T4 (Thermo Scientific™) e incubando los fragmentos por 22 h a 4°C y 16°C durante 12 h, tomando en cuenta las recomendaciones del fabricante. Las sales de las reacciones de ligación fueron removidas utilizando un nanofiltro (Milipore) con un tamaño de poro de 0.025 µm.

6.6 Preparación de células electrocompetentes.

Para producir células huéspedes para reproducir y propagar los plásmidos con fragmentos variables de la biblioteca genómica, se siguió el protocolo de Sharma y Schimke (1996) con algunas modificaciones. Brevemente, se tomó una colonia de *E. coli* TOP 10 F´ con un palillo estéril y se inoculó en 3 mL de medio YENB (extracto de levadura 0.75% y caldo nutritivo 0.8%) contenidos en un tubo Falcon de 15 mL, los cuáles se incubaron por 16 h a 37°C con agitación orbital (150 rpm). El inóculo fue vertido en un matraz con 300 mL de medio YENB en las condiciones de incubación anteriores hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0.4-0.5. Una vez alcanzada la concentración de células correspondiente, se separaron los 300 mL en 6 tubos Sorvall de 50 mL. Estos, se dejaron enfriar en hielo durante 5 min y las células se concentraron a 4000 g con una centrifuga (Thermo Scientific™) por 10 min a 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces la pastilla celular con 50mL de H₂O grado HPLC seguido por una centrifugación idéntica a la del paso anterior. El sobrenadante se descartó y la pastilla fue

resuspendida en 10 mL de solución de glicerol al 10% previamente enfriada. Una vez más se centrifugó como en los pasos previos y se removió el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 800 μ L de solución fría de glicerol al 10%. La solución con células competentes se separó en alícuotas de 49 μ L en microtubos de 1.5 mL (Axygen™). Las alícuotas se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C

6.7 Transformación bacteriana por electroporación.

La transformación de las construcciones plasmídicas con la biblioteca genómica se llevó a cabo en la bacteria *E. coli* TOP 10 F' mediante electroporación. Se adicionaron 200 ng de las construcciones plasmídicas a una alícuota de células electrocompetentes y se dejó en hielo durante 1 min. Después se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación de 2 mm, a la cual se le aplicó una descarga de 2.5 kV (capacitancia=25 μ F, resistencia=200 Ω) en un electroporador GenePulser Xcell (BioRad). Inmediatamente, se adicionaron 900 μ L de medio LB en campana de flujo laminar, para facilitar la recuperación de las células en microtubos de 1.5 mL. Después, las células transformadas se incubaron durante 1 h a 37°C con agitación y finalmente para seleccionar las transformantes se cultivaron por dispersión en medio LB sólido adicionado con cloranfenicol (34 μ g/ml), incubando los cultivos 16 h a 37°C. Como control positivo se usó el plásmido intacto (sin inserto) y como control negativo, la purificación de la reacción de ligación del plásmido linearizado y desfosforilado.

6.8 Purificación de la biblioteca de ADNg

Con la finalidad de tener representada la biblioteca genómica con la mayor cantidad de fragmentos correspondientes a genes distintos, y para preparar las construcciones plasmídicas para la transformación en *T. atroviride*, las colonias transformantes fueron recuperadas tras 16h de crecimiento a 37°C se adicionaron 5 ml de H₂O destilada directamente sobre el medio de cultivo. Posteriormente se mezclaron con un asa de vidrio estéril, para finalmente ser recuperadas y crecidas en 600 ml de caldo LB suplementado con cloranfenicol (34 μ g/ml) por 12 h a 37°C con agitación orbital a 150 rpm constante. La recuperación de los plásmidos recombinantes se realizó usando el kit QIAGEN plasmid midiprep (QIAGEN) con base en las instrucciones del fabricante.

6.9 Transformación por el método Polietilenglicol-CaCl₂.

Con la intención de introducir los plásmidos recombinantes a *T. atroviride*, la cepa WT se transformó utilizando las construcciones obtenidas del plásmido pCB1004. Primero, se obtuvieron germínulas inoculando 100 ml de medio estéril GEYEC (1.5% glucosa, 0.3% extracto de levadura y 0.5% hidrolizado de caseína) con 1×10^8 esporas, incubando por 16 h a 27°C en agitación orbital constante. Las germínulas se filtraron a través de tela magitel estéril y se colocaron 0.2 g en un tubo Falcon estéril de 50 ml que contuvo 7 ml de solución osmótica (50 mM CaCl₂, 0.5 M Manitol y 50 mM MES, con pH 5.5 ajustado con KOH) y 0.1 g de enzimas líticas de *T. harzianum* (Sigma-Aldrich). Se mezcló a máxima velocidad en vortex y se incubó a TA con agitación orbital a 120 rpm constante. La agitación se detuvo cuando fueron visibles protoplastos en el microscopio. Una vez formados, los protoplastos se filtraron con tela magitel estéril y se lavaron con 3 ml de solución osmótica salina, se centrifugaron a 8,000 rpm por 10 minutos y la pastilla de protoplastos se resuspendió en un volumen de 2.5 ml de solución osmótica. A la par, se prepararon 10 tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles con 30 µl de solución con las construcciones plasmídicas y 30 µl de solución osmótica; y un tubo control que contenía 60 µl de solución osmótica salina. A dichos tubos (11 en total) se les adicionaron 240 µl de solución con protoplastos y se incubaron en hielo por 30 min. Se les adicionaron 300 µl de PEG-8000 (Thermo Scientific™ – USB) al 40% estéril y precalentado a 42°C, después se invirtieron suavemente 8 veces y se incubaron por 30 min a TA. La mezcla de cada tubo se colocó en 12 ml de agar suave (PDB, agar 0.8%, 1M sorbitol) contenidos en 11 diferentes tubos Falcon de 15 ml. Los tubos Falcon con las mezclas se invirtieron suavemente para homogeneizar la solución y los que contenían plásmido se vertieron en agar selectivo (Agar Papa-Dextrosa, 1M sorbitol, higromicina 200µg/ml) dividido en dos cajas Petri, mientras que el tubo control sin plásmido se vertió en una placa con agar selectivo (control negativo) y otra caja con el mismo medio sin higromicina (control de viabilidad). Las cajas se incubaron a 28°C con luz constante hasta la formación de transformantes resistentes a higromicina.

6.10 Ensayo de estabilidad.

Las transformantes de *T. atroviride* se colectaron 72 h después con ayuda de un bisturí y se colocaron en tubos Falcon de 15 ml con 3 ml de MC sólido con higromicina (100 µg/mL). Con el fin de seleccionar transformantes mitóticamente estables del hongo y de limpiar el fondo genético (núcleos sin inserciones de las construcciones plasmídicas) se realizaron dos pases monospóricos en medio completo selectivo. Para seleccionar los transformantes estables, colonias del segundo cultivo monospórico se cortaron e inocularon en medio completo sin higromicina B hasta la esporulación de las cepas. Finalmente, gotas de 5 µL de esporas en suspensión se colocaron en MC con y sin higromicina B (Figura 6) y se incubaron por 72h a 27°C en luz constante. Las cepas capaces de crecer en ambos medios fueron consideradas transformantes estables, mientras que aquellas que crecieron únicamente en un medio sin higromicina B fueron descartadas. En las transformantes estables se sometieron a un tercer cultivo monospórico previo a la caracterización fenotípica de las cepas mutantes estables.

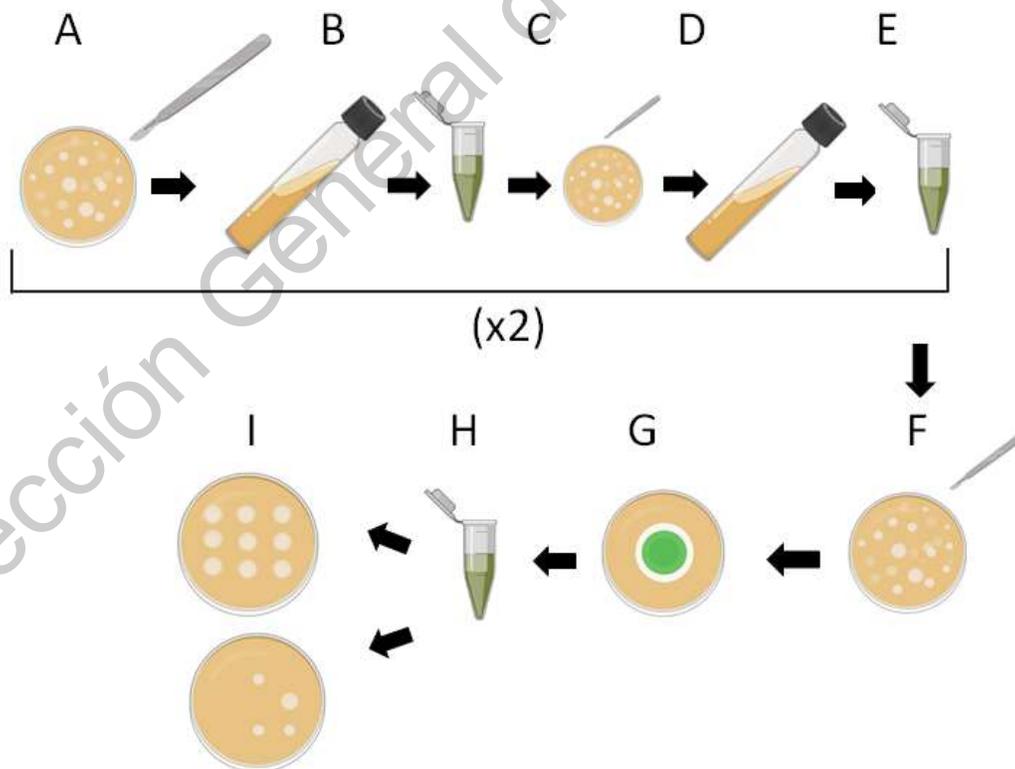


Figura 6. Ensayo de estabilidad para seleccionar mutantes con la inserción del plásmido. A partir de las placas con PDA+Higromicina B (A) se aislaron transformantes en tubos Falcon inclinados de 15 mL con 3 mL de MC selectivo (B) y se incubaron hasta la esporulación. Se recuperaron las esporas en 800 μ L de H₂O destilada estéril (C), y se sembró una dilución de las esporas en suspensión que permitiera aislar fácilmente el micelio proveniente de una spora, utilizando MC selectivo, adicionado con Tritón X-100 (Golden Bell) al 0.5%. Las placas se incubaron de 48-72h hasta observar claramente micelio, que después se cortó y llevó nuevamente a tubos Falcon con 3 mL de MC selectivo (D), de los cuales se recuperaron las esporas (E). Al finalizar el segundo pase monospórico, los conidios obtenidos fueron crecidos en placas de MC selectivo, de las que se cortaron micelios provenientes de una spora (F). Finalmente se cultivaron las cepas transformantes en MC sin higromicina B (G) por 72 h a 28°C con luz blanca constante, las esporas se recuperaron en 800 μ L de H₂O destilada estéril (H) y se inocularon en MC con y sin higromicina B (I).

6.11 Escrutinio para ensayos de estrés osmótico y metabolismo.

Con el objetivo de identificar fenotipos interesantes (crecimiento atenuado o exacerbado respecto a la cepa WT) en las transformantes estables ante condiciones de estrés osmótico y diferentes componentes del medio, se inocularon 5 μ l con 500 esporas en cajas Petri (90mmx15mm) con MC y Tritón X-100 al 0.5% (Golden Bell) adicionando alguno de los siguientes compuestos para el estrés osmótico: KCl (J.T. Baker) y sorbitol (Sigma-Aldrich). Para los ensayos de metabolismo se utilizaron los medios MC, PDA y MMV todos con Tritón X-100. La incubación se llevó a cabo por 4 días a 27°C con luz constante para ensayos de estrés osmótico y dos días a 27°C con luz constante para ensayos metabólicos.

6.12 Ensayo de reparación de ADN en células tratadas con UV

Para identificar cepas con mayor susceptibilidad a radiación UV, se evaluó la capacidad de reparación de este tipo de daño y crecimiento en las transformantes estables. Se inocularon 500 conidia en cajas Petri (90mmx15mm) con MC con 0.5% de Tritón X-100, y posteriormente se sometieron a distintas dosis de UV-C (0, 200, 400 y 600 J/cm²) en el equipo Crosslinker UVP CX-2000. Cuidando no alterar las respuestas inducidas por luz azul, los experimentos se realizaron en un cuarto oscuro con luz roja como única fuente.

La incubación se llevó a cabo en condiciones de luz blanca y oscuridad durante 4 días a 27°C.

6.13 Ensayo de producción de conidia estimulada por luz

Para identificar transformantes estables con una producción aumentada o disminuida, comparada con la cepa WT, de esporas estimulada por luz azul, las cepas mutantes se inocularon en cajas Petri (90mmx15mm) con MC, usando 2 μ L de esporas en suspensión y se incubaron a 27°C por 48 h en oscuridad. Posteriormente, en un cuarto oscuro se cortaron discos de micelio, ubicado en la parte más externa, de 5mm de diámetro con un sacabocados estéril y se colocaron el centro de placas Petri (90mmx15mm) con MC. Para obtener diámetros de la colonia similares, el tiempo de crecimiento de dos cepas (49 y 678) fue iniciado 48 horas antes que el resto de las cepas, incluida la WT. Los cultivos se incubaron por 48 h a 27°C en oscuridad. Para las pruebas con luz azul, al término de la incubación se aplicó un pulso de luz azul de 5 min ($145.27 \mu\text{moles}/\text{m}^2$) en condiciones de oscuridad con luz roja y posterior a la fotoinducción se incubaron las cajas durante 48 h a 27°C. Para las pruebas con luz constante, transcurrido el tiempo de incubación en oscuridad, los cultivos se incubaron durante una semana en luz blanca constante ($0.2238 \mu\text{moles m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Los experimentos se realizaron por triplicado. En ciertas cepas, los conidios producidos tras el pulso de luz azul, fueron recuperados en 10 mL de H₂O destilada estéril, y posteriormente se realizó el conteo en cámara de Neubauer con las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , usando un microscopio Leica DM500.

6.14 Ensayo de crecimiento radial

Con la intención de cuantificar el área de crecimiento de aquellas transformantes estables, que en experimentos previos presentaron un crecimiento distinto al de la cepa WT, se realizaron preinóculos con 500 esporas en cajas con PDA y se crecieron a 27°C durante 48 h en oscuridad. Del anterior preinóculo se tomaron discos de micelio (diámetro=5mm) y se inocularon cajas Petri (90x15mm) con los siguientes medios: PDA, MC y MMV. Las cajas se incubaron durante 48 h en condiciones de luz constante a 27°C. Los experimentos se realizaron por triplicado y el cálculo del área se llevó a cabo con el programa ImageJ (NIH).

6.15 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de los insertos clonados

Los oligonucleótidos fueron diseñados de tal modo que el cebador directo se encontró a una distancia de 98bp y el cebador reverso a 26bp con respecto al sitio de restricción reconocido por *Bam*HI. Para verificar las características de los potenciales oligonucleótidos se utilizó el programa OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Las secuencias utilizadas fueron las siguientes: Pim-f (directo), GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG; y Pim-r (reverso) GAA CAA AAG CTG GAG CTC CAC C.

6.16 Identificación de la mutación.

Las mutaciones fueron identificadas mediante PCR punto final utilizando los primers anteriormente descritos y la enzima DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific). El programa utilizado fue el siguiente: 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 62°C y 1 min 45s a 72°C. Las reacciones finalizaron con 5 min 72°C. La visualización de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%) adicionado con bromuro de etidio (10 mg/mL). Los fragmentos se purificaron con el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN). La cuantificación del ADN resultante de la purificación fue obtenida por Nanodrop y la integridad de las muestras fue verificada en gel de agarosa (1%) con bromuro de etidio (10 mg/mL). La secuenciación Sanger de las muestras se realizó en formato placa de 96 pocillos por un servicio externo a la Universidad (Labsergen).

6.17 Análisis bioinformático y anotación de las secuencias.

Con la finalidad de purgar las secuencias recibidas, en las regiones 5' y 3', fueron suprimidas (trimming) las secciones con un bajo valor de calidad (Q<7). La anotación y obtención de las secuencias codificantes (CDS) de los genes interrumpidos, se realizó con las secuencias editadas utilizando la herramienta BlastN en el sitio Joint Genome Institute (JGI) MycoCosm (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/pages/blast-query.jsf?db=Triat2>). La predicción de dominios fue hecha con el programa SMART del European Molecular

Biology Laboratory (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). La predicción de localización celular se realizó por medio del programa PSORT II (<https://psort.hgc.jp/form2.html>).

6.18 Alineamiento de las secuencias

Las secuencias de los genes utilizadas fueron descargadas del sitio del JGI. Se añadieron 1000pb río arriba del inicio de la región codificante y 1000pb río abajo a partir del término de la misma región, con el propósito de cubrir regiones no codificantes durante el alineamiento. Para el alineamiento de las secuencias se empleó el programa MegAlign (DNASTAR) con la herramienta Clustal W.

6.19 Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas y gráficas fueron realizadas con el programa IBM SPSS Statistics 22. Los gráficos de barras consideran la media de 3 experimentos independientes con sus barras de error (IC 95%). Los análisis de varianza (ANOVA) de una vía incluyeron un análisis post-hoc HSD Tukey ($p < 0.05$).

6.20 Disposición de residuos biológicos.

Las transformantes generadas y las cepas silvestres fúngicas o bacterianas destinadas a desecharse fueron inactivadas mediante esterilización por autoclave a 15 psi durante 15 minutos, y los residuos resultantes fueron puestos en bolsa roja para su incineración por parte de servicio externo a la Universidad. Los materiales que entraron en contacto con material biológico, (puntas para micropipeta, superficies, etc.) se limpiaron con hipoclorito de sodio al 10% y etanol al 70%, según correspondió.

6.21 Resumen gráfico de la estrategia de mutagénesis insercional

Los pasos clave de la estrategia de mutagénesis insercional mediada por recombinación homóloga se resumen en la Figura 7. Brevemente, se indica como el ADN_g de *T. atroviride* se fragmentó con la endonucleasa *Sau3AI* para generar extremos cohesivos complementarios a los extremos generados en el vector pCB1004 con la endonucleasa *BamHI* (Figura 7A-B). La biblioteca genómica se construyó ligando el ADN_g fragmentado en el vector pCB1004 (Figura 7C) para transformar protoplastos de *T. atroviride*, con el objetivo de integrar los vectores por recombinación homóloga (Figura 7D). Es ampliamente reconocido que los vectores se integran al menos dos veces en tándem. Esto es importante en nuestra estrategia debido a que los oligonucleótidos quedan en fase, permitiendo la identificación del gen interrumpido por PCR (Figura 7D).

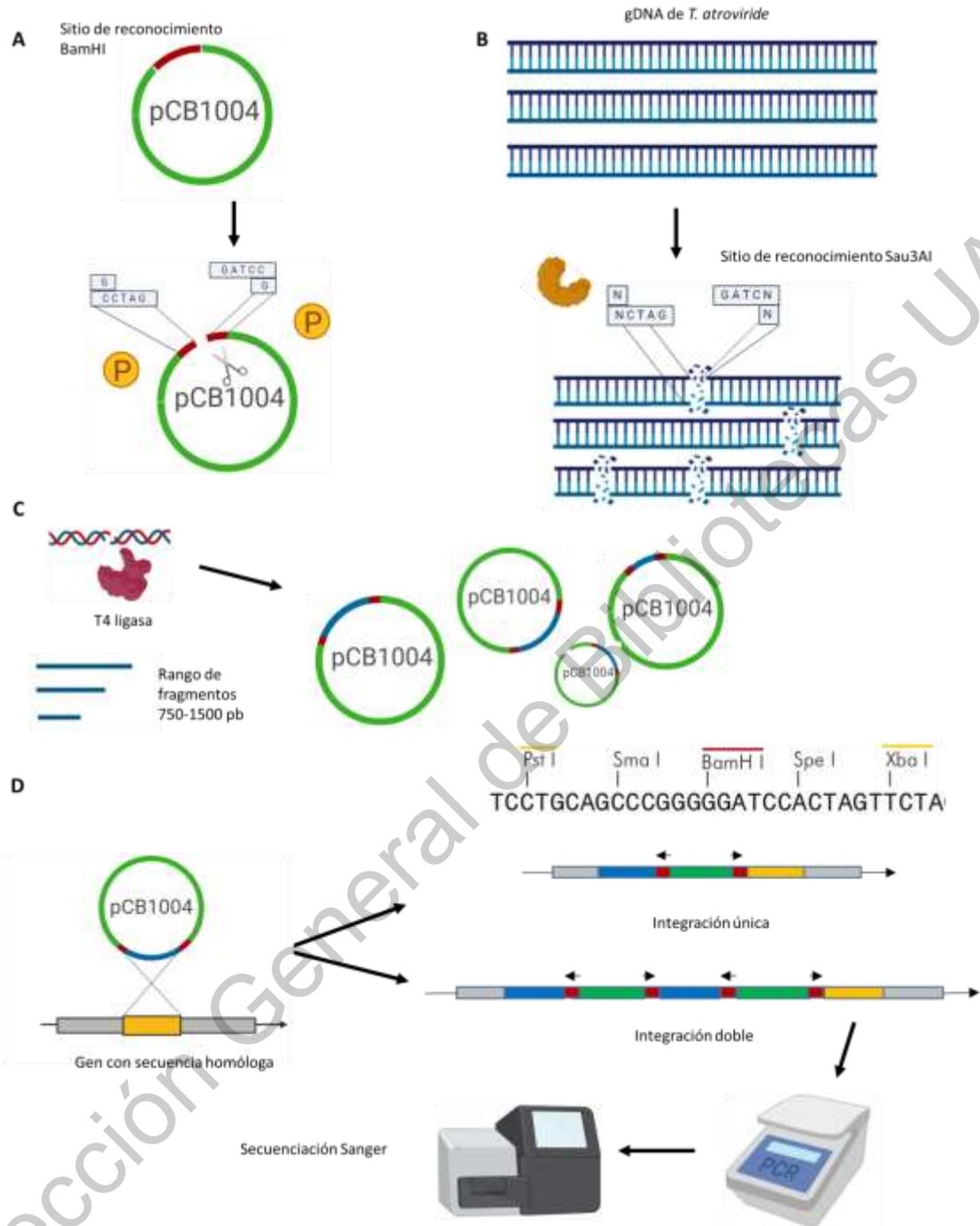


Figura 7. Estrategia de mutagénesis insercional. **A)** El plásmido pCB1004 fue digerido con la enzima de restricción *Bam*HI y desfosforilado con una fosfatasa alcalina. **B)** Digestión del ADNg de *T. atroviride* con la enzima de restricción *Sau*3AI. **C)** Biblioteca de ADN. Se utilizó la ligasa T4 para unir fragmentos entre 750-1500 pb al plásmido pCB1004 linealizado y desfosforilado. **D)** Proceso de mutagénesis insercional mediado por recombinación homóloga e identificación de los *loci*

interrumpidos mediante PCR y secuenciación Sanger. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes afectados están indicados con flechas sobre los rectángulos rojos.

7. Resultados

7.1 Digestión del genoma de *T. atroviride* con la enzima de restricción *Sau3AI*

El ADNg de *T. atroviride* fue digerido con la enzima de restricción *Sau3AI* generando fragmentos de tamaño variable, cuya mayor densidad se observó en el rango de 500-1500 pb. Con la intención de obtener la mayor cantidad de fragmentos dentro del rango 750-1500 pb se realizaron digestiones parciales, disminuyendo el tiempo de incubación de la enzima junto con el ADNg, puesto que se ha observado una mayor eficiencia de integración por recombinación homóloga cuando son utilizados fragmentos de tamaño superior a 500 pb, con una disminución importante en dicha eficiencia cuando se utilizan secuencias con homología por debajo de 500 pb (Esquivel-Naranjo, comunicación personal, octubre 18 de 2018).

Los fragmentos generados en los distintos tiempos de incubación tuvieron un patrón similar (Figura 8A), indicando una alta eficiencia de corte aun en tiempos cortos, probablemente porque la enzima es altamente eficiente para cortar el genoma, incluso en un lapso corto de tiempo. Con el propósito de construir una biblioteca genómica, el ADNg se digirió con la enzima *Sau3AI* y los fragmentos se separaron mediante electroforesis. Posteriormente se cortó la porción del gel comprendiendo tamaños entre 0.75 y 1.5 Kb (Figura 8B) y se purificaron usando columnas QIAGEN como se describe en métodos. El límite superior de corte fue seleccionado para disminuir las probabilidades de que los fragmentos, de integrarse por homología, afectaran dos genes distintos, ya que el tamaño promedio de un gen en *T. atroviride* es de 1800 pb.

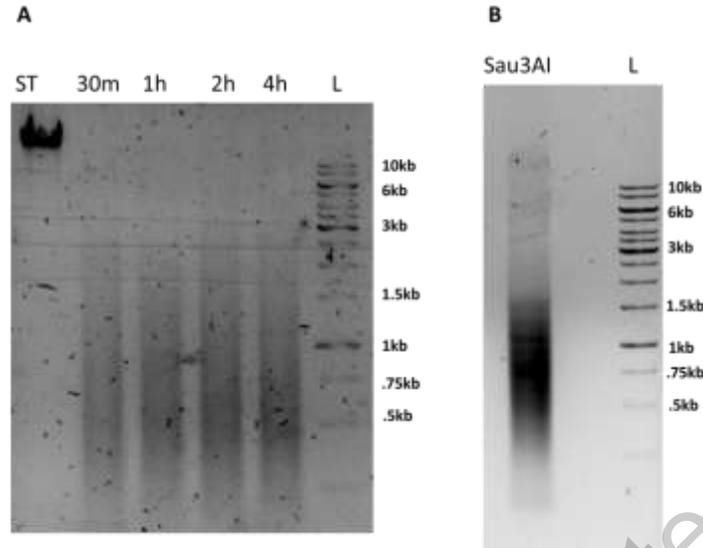


Figura 8. Digestión del ADNg de *T. atroviride*. A) Cinética de restricción incubando a diferentes tiempos. *ST*, sin tratamiento; *L*, marcador de peso molecular de 1 Kb para estimar los tamaños moleculares. B) Digestión del ADNg de *T. atroviride*. *Sau3AI*, ADNg digerido durante 4 h a 37°C.

7.2 Linearización y desfosforilación del plásmido pCB1004

El plásmido pCB1004 es una fusión del plásmido pBC SK, el cual contiene el gen *CmR* que codifica para la cloranfenicol acetiltransferasa que confiere resistencia a cloranfenicol, con el gen *hph* que codifica para la higromicina B fosfotransferasa. Los anteriores genes sirvieron para la selección de las transformantes bacterianas y fúngicas, respectivamente.

Con la finalidad de linearizar el vector de clonación, se utilizó la enzima *Bam*HI para producir extremos cohesivos complementarios a los generados por la enzima *Sau*3AI y se utilizó la fosfatasa alcalina para promover que la única forma de que el vector se recircularizara fuera por la integración de un fragmento de 750 a 1500 pb. Para determinar la integridad al finalizar cada una de las etapas de preparación se corroboró la integridad del ADN plasmídico, revelando que ésta no se vio alterada (Figura 9).

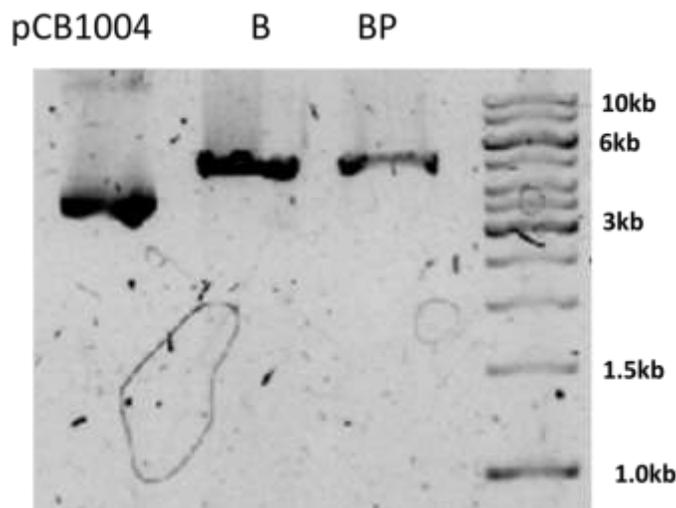


Figura 9. Análisis de integridad del vector pCB1004 linearizado y desfosforilado. Determinación de la integridad del ADN plasmídico en su forma enrollada (*pCB1004*), después del tratamiento con la enzima *Bam*HI (*B*) y al término de la reacción de desfosforilación por tratamiento con la fosfatasa alcalina (*BP*).

7.3 Construcción de la biblioteca de ADNg

Las reacciones de ligación se realizaron en tres diferentes configuraciones de incubación con el objetivo de determinar la condición que genera la mayor eficiencia de clonación. Las incubaciones fueron a 4°C por 22 h, a 16°C durante 12 h, y 3 h a TA. El mayor porcentaje de plásmidos con fragmentos ligados resultó en la incubación a 4°C durante 22 h.

Se usaron dos controles para evitar la presencia de plásmidos sin insertos durante la transformación (Tabla 1), los cuáles presentaron una eficiencia de transformación sumamente baja, que indicaron que el plásmido fue exitosamente linearizado y desfosforilado. La eficiencia de transformación obtenida utilizando el plásmido sin tratamiento fue superior a la conseguida con el plásmido con los fragmentos ligados, lo cual puede ser explicado por la relación inversa entre el tamaño del plásmido y la eficiencia de transformación en *E. coli* (Chan et al., 2002). La relación vector:inserto fue de 1:3 y la temperatura y tiempo de incubación cuya eficiencia de ligación de plásmidos con fragmentos fue la más alta fueron consistentes con lo reportado en la literatura (Topcu, 2000).

Tabla 1. Eficiencia de transformación de la construcción plasmídica en *E.coli*

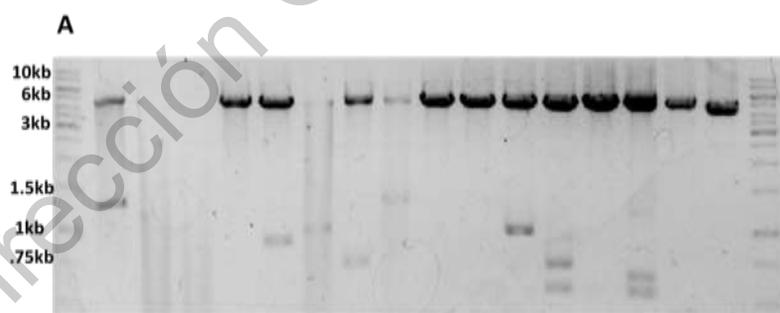
	Control 1 (-) pCB1004 linearizado y desfosforilado	Control 2 (-) pCB1004 linearizado y desfosforilado (tratado con ligasa)	Control 3 (+) pCB1004 (sin tratamiento)	pCB1004+ fragmentos (750-1500pb; tratado con ligasa)
UFC (Dilución)	7(0)	2(0)	58(2)	60(1)
Factor de dilución	1	1	10	3
ng del vector	292	218	1	30.76
Eficiencia de transformación (UFC/ μ g)	119.86	45.87	5.8×10^7	9×10^5

7.4 Análisis por restricción de las bibliotecas genómicas

Los plásmidos generados fueron analizados por medio de una doble digestión y electroforesis en gel de agarosa. Se utilizaron las enzimas de restricción *Pst*I y *Xba*I con el propósito de determinar el porcentaje de transformantes de *E.coli* con pCB1004 que contuvieron fragmentos del ADNg. En total, 8 de los 16 plásmidos (50%) de la reacción de ligación incubada a 4°C durante 22 h presentaban insertos del tamaño esperado (Figura 10A), mientras que en los plásmidos ligados a RT por 3 h y 16°C durante 12h presentaron inserciones en 4 de 16 (25%, figura 10B) y 7 de 20 (35%, figura 10C), respectivamente.

Es de notar que cuando la temperatura incrementa, el porcentaje de plásmidos con insertos disminuye (Figura 10), a pesar de estar más cerca de la temperatura óptima de actividad enzimática de la ligasa T4 (37°C), lo que se debe al rompimiento térmico de los puentes de hidrógeno y la inestabilidad de la enzima a esta temperatura (Green y Rao, 1998; Suzuki et al., 2016). Regularmente, otras variables se ajustan con el objetivo de obtener mejores resultados en la ligación como la concentración de ADN, la cantidad de la enzima (Topcu, 2000), en algunas ocasiones la adición de PEG (Pheiffer y Zimmerman, 1983) y recientemente se ha implementado el uso de partículas ferromagnéticas con ligasa unida a la superficie (Suzuki et al., 2016).

En todas las condiciones de restricción probadas se obtuvieron plásmidos y fragmentos del tamaño esperado, con algunas excepciones en donde se observan uno o dos fragmentos del ADN de un tamaño inferior a 750 pb. Estos eventos pueden deberse a que los fragmentos contienen en su secuencia sitios de reconocimiento para las enzimas *Pst*I y *Xba*I, dando como resultado un patrón particular, donde al sumar los fragmentos generados se obtienen insertos del tamaño esperado. Asimismo, se obtuvieron plásmidos con un tamaño menor al esperado las cuales probablemente son formas superenrolladas o enrolladas del plásmido. Todos los anteriores topoisómeros no tuvieron más bandas que revelaran la presencia de un fragmento esperado, por lo que es probable que fueran plásmidos vacíos. Una explicación para las distintas movilidades electroforéticas observadas en los plásmidos es que pudieron haber experimentado concatenación (intermolecular) o anudamiento (intramolecular) lo cual se refleja en la disminución de la movilidad (Cebrián et al., 2015).



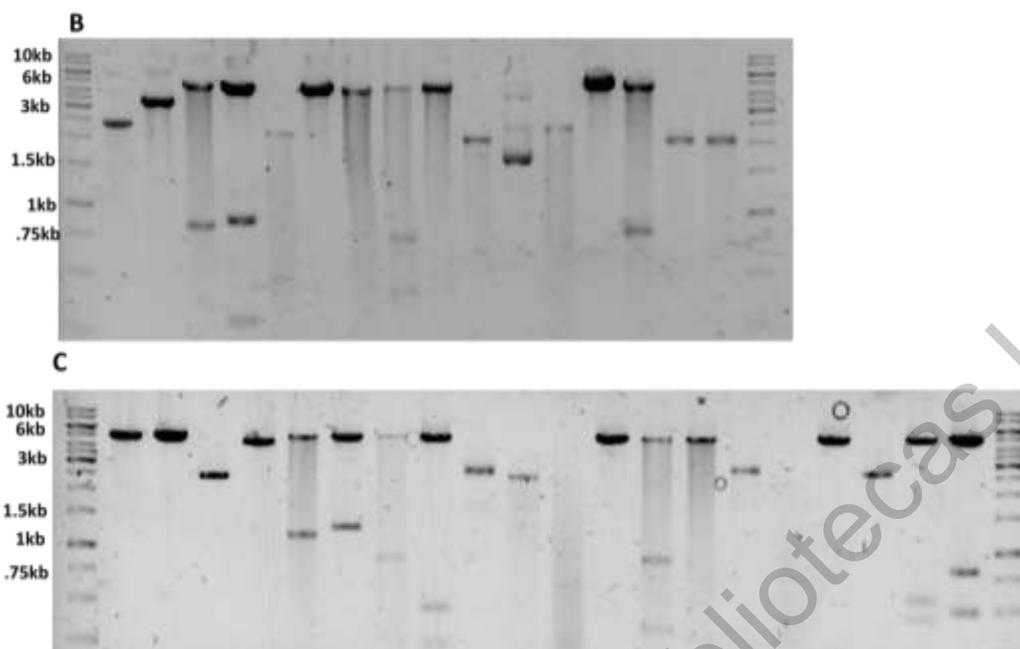


Figura 10. Análisis por restricción de las bibliotecas genómicas. A) pCB1004+insertos ligados a 4°C durante 22 horas, **B)** a TA por 3h y **C)** 16°C por 12h. Cada gel tiene en el primero y último carril el marcador de peso molecular 1 Kb para estimar los tamaños moleculares, el resto de los carriles contiene los plásmidos recuperados digeridos con *Xba*I y *Pst*I.

7.5 Transformación de *T. atroviride* por el método PEG-CaCl₂

Dado que la mejor eficiencia de transformación y el porcentaje más alto de plásmidos con fragmentos con homología fueron obtenidos en las ligaciones realizadas a 4°C durante 22 h, se emplearon dichas construcciones para transformar a *T. atroviride*. Fueron obtenidas 1566 transformantes por placa (31320 en total), de las cuales se seleccionaron aleatoriamente 800 para su posterior análisis de estabilidad. La eficiencia de transformación usando una densidad de protoplastos de 2.34×10^8 células/mL fue de 90 transformantes por μg de ADN. La eficiencia de transformación obtenida es inferior a la reportada en la literatura, si se compara con las eficiencias en *T. reesei* QM 9414 y VTT-D-79125 de 600 transformantes/ μg y 1800-2500 transformantes/ μg , respectivamente (Mach et al., 1994), y es superior al rango obtenido en *T. atroviride* B11 donde se alcanzaron 15-40 transformantes/ μg (Malmierca et al., 2014).

Como era esperado en el control negativo no se obtuvo crecimiento de ninguna transformante y en el control de viabilidad crecieron una cantidad incontable de protoplastos (Figura 11, A y B). Aunado a que las placas de los eventos de transformación con el plásmido tuvieron al menos 1500 transformantes cada una, lo anterior sugiere que dichas transformantes cuentan con el gen de resistencia a higromicina B, y por lo tanto con la construcción plasmídica con el potencial de integrarse por recombinación homóloga.

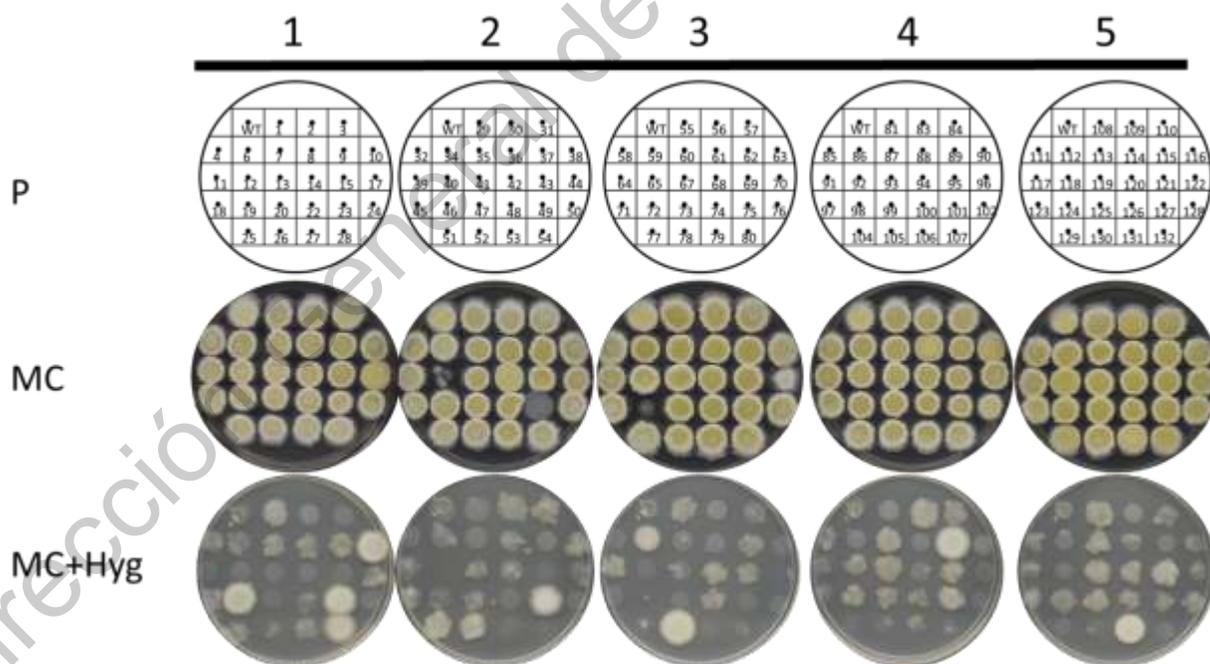
Respecto a otros métodos de transformación, el método PEG-CaCl₂ suele obtener eficiencias menores a estrategias basadas en *A. tumefaciens*, donde se suelen generar 2000-9000 transformantes por cada 10⁷ conidia en *T. reesei* QM 9414 (Li et al., 2017). Aunque no puede aceptarse que al igual que con la anterior especie puedan obtenerse eficiencias similares, puesto que por mecanismos todavía desconocidos las cepas suelen obtener mejores resultados de transformación con alguno de estos dos métodos (Malmierca et al., 2014).

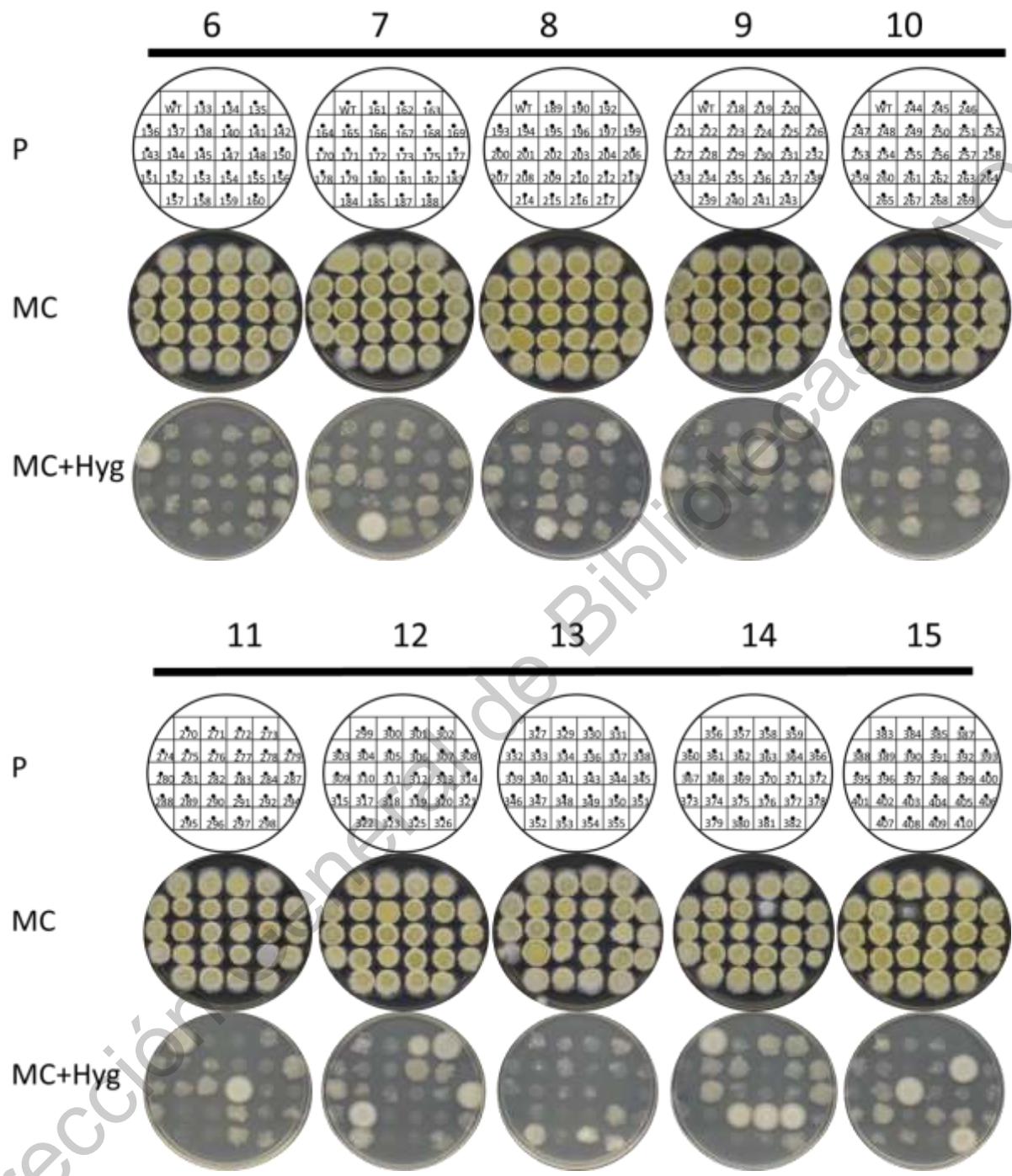


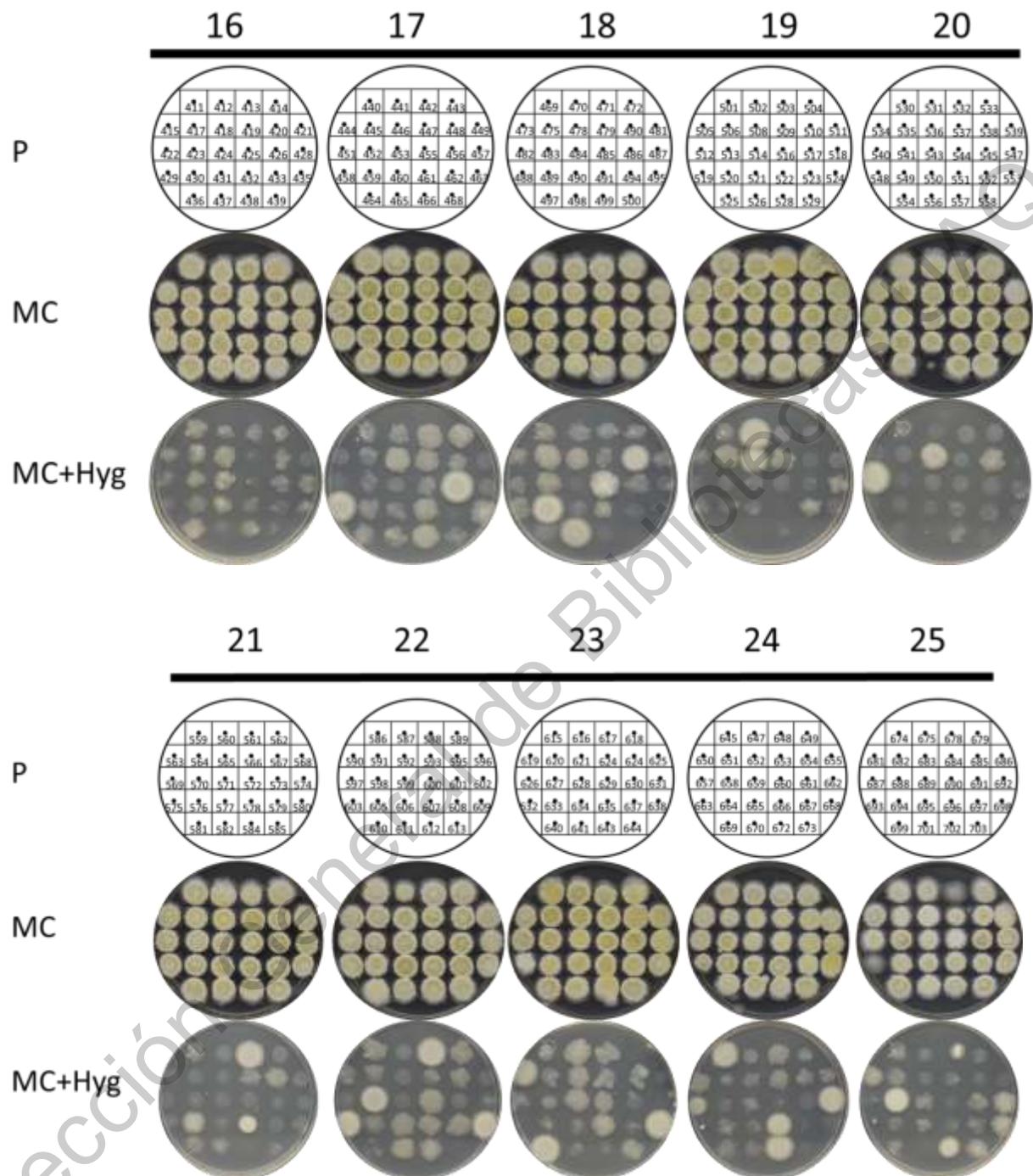
Figura 11. Selección de transformantes potenciales generadas tras el procedimiento por PEG-CaCl₂. **A)** Control negativo, protoplastos sometidos al mismo proceso de transformación sin plásmido, fueron cultivados en medio selectivo (higromicina B). **B)** Control positivo (viabilidad), protoplastos en PDA sin antibiotico. **C y D)** protoplastos transformados con la biblioteca genómica y cultivados en medio selectivo (100 µg de higromicina B por mL de MC).

7.6 Selección de transformantes estables.

En los procesos de transformación de *T. atroviride* se generan transformantes inestables que pierden el vector plasmídico cuando se cultivan en un medio no selectivo y transformantes estables que integran en su genoma el vector plasmídico, manteniendo indefinidamente la resistencia a la higromicina B. Para seleccionar las transformantes estables, las cepas resistentes a higromicina B fueron sometidas a un ensayo de estabilidad con la finalidad de discriminar aquellas cepas con inserciones estables después de un pase monospórico en medio sin presión de selección y nuevamente cultivadas en medio con higromicina B. Se identificaron como estables a 74 cepas transformantes durante las primeras 72 h después del cultivo, y posteriormente 150 cepas se añadieron a la lista tras presentar crecimiento a las 120 h (Figura 12). Para los análisis siguientes se utilizaron 224 cepas en total, que indican que el 28% de las 800 cepas inicialmente aisladas resultaron estables.







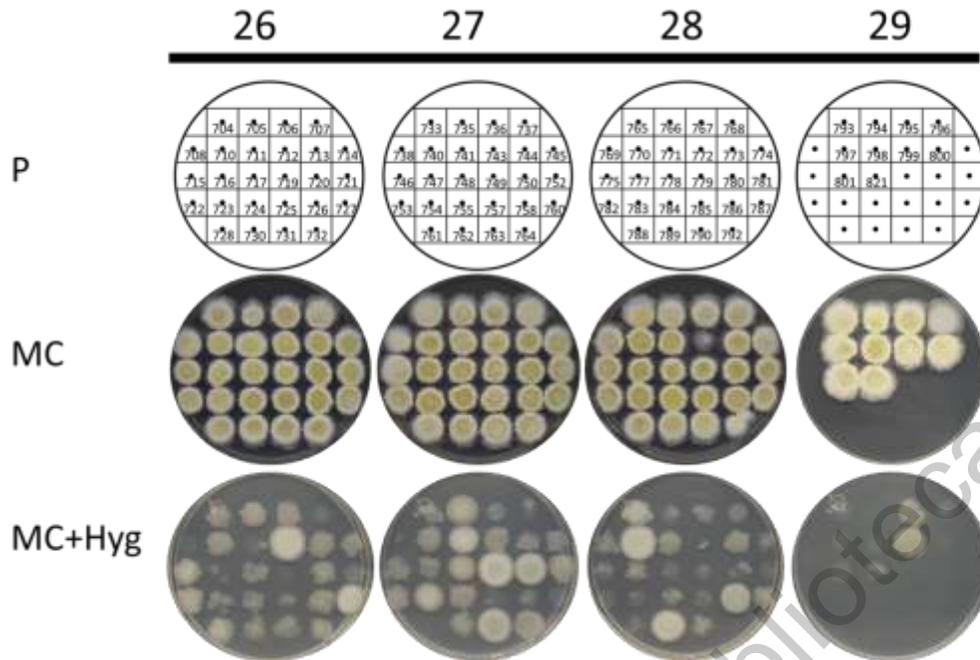


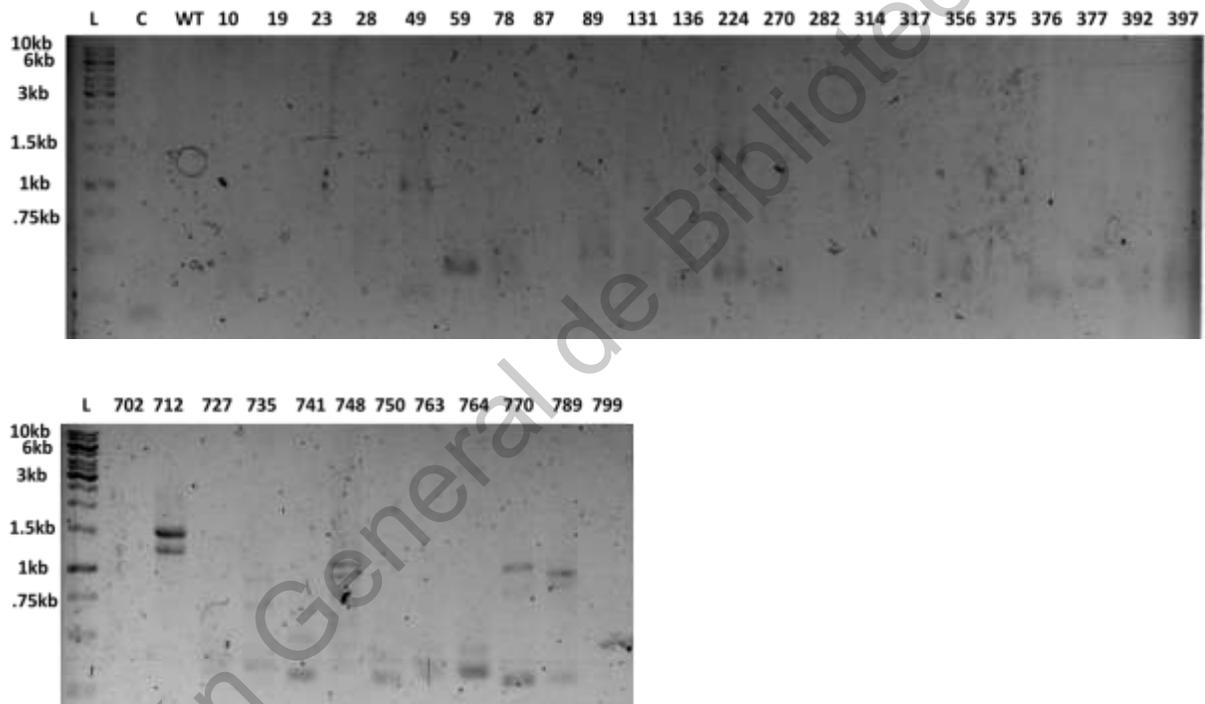
Figura 12. Ensayo de estabilidad de las 800 transformantes generadas. Una gota de esporas en suspensión generadas en MC sin higromicina provenientes del segundo pase monospórico, fueron cultivadas en los medios MC sin antibiótico y MC suplementado con higromicina B, ambos con Tritón X-100 a 27°C durante 72h y 120h, respectivamente. P, plantilla con números de identificación de cepa.

7.7 Integración de las construcciones plasmídicas en el genoma

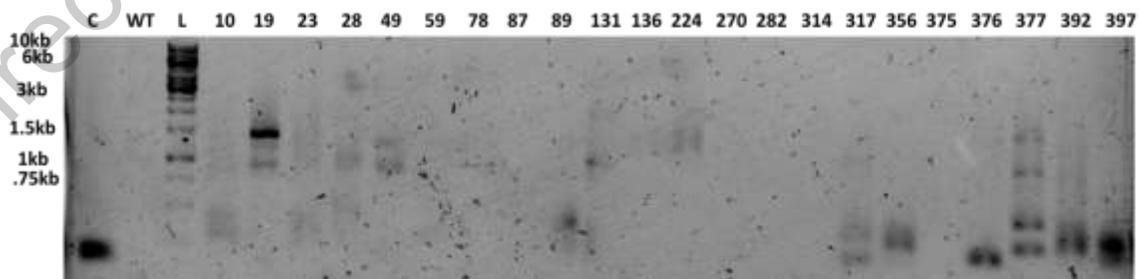
Utilizando ADN_g de cada una de las cepas se amplificó mediante PCR la región contenida entre el sitio de restricción de la enzima *Bam*HI, con el propósito de determinar si las construcciones plasmídicas se integraron en el genoma y si los fragmentos del genoma de *T. atroviride* fueron unidos al plásmido pCB1004. En todas las reacciones de PCR se utilizó como control negativo ADN_g de la cepa silvestre. Como era esperado en estos casos no hubo amplicón, salvo en una excepción (Figura 22). Asimismo, en cada ronda de PCR fue utilizado como control el vector vacío, cuya reacción produjo un amplicón de aproximadamente 150 pb, de tamaño casi igual al que muchas transformantes estables produjeron. No obstante, muchas otras transformantes que sí amplificaron un fragmento del tamaño introducido en el plásmido, no presentaron un amplicón tamaño cercano a 150 pb. En la primera ronda de amplificación (R1, Figura 22A) la mayoría de las cepas

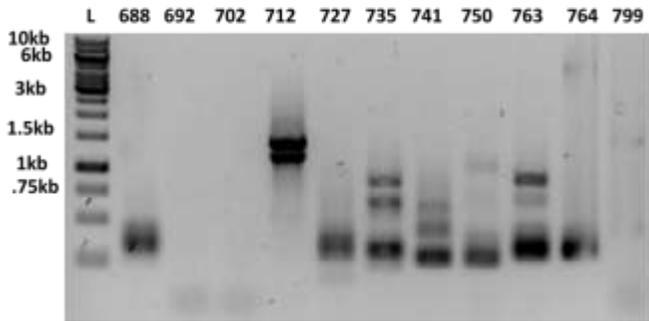
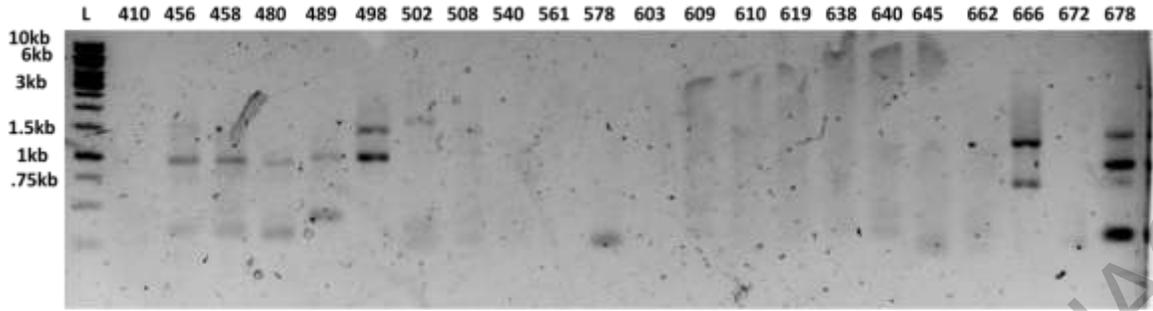
amplificaron productos entre 500 y 1500 pb. En la R2 los amplicones generados fueron más evidentes y estuvieron en el mismo rango que en la anterior ronda. En los geles de las R3 y R4 pueden ser distinguidas las inserciones dobles y triples independientes. En conjunto, lo anterior sugiere que aquellas secuencias amplificadas del tamaño esperado estaban contenidas en el plásmido pCB1004, el cual probablemente fue integrado en el genoma de las células transformantes por recombinación homóloga. Las cepas que no amplificaron y aquellas que lo hicieron en al menos una de las rondas de amplificación están indicadas en la Tabla 2.

A

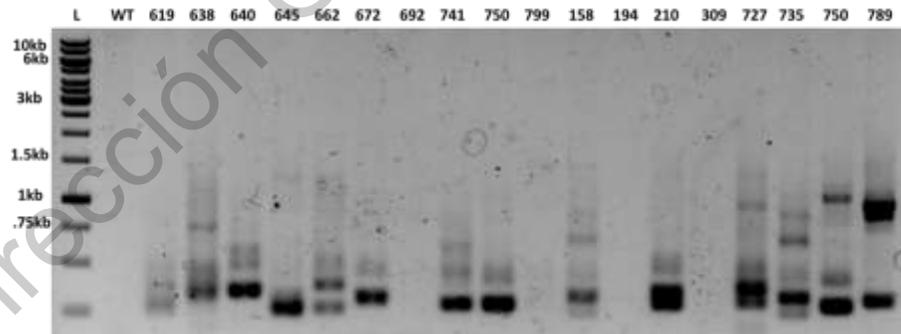
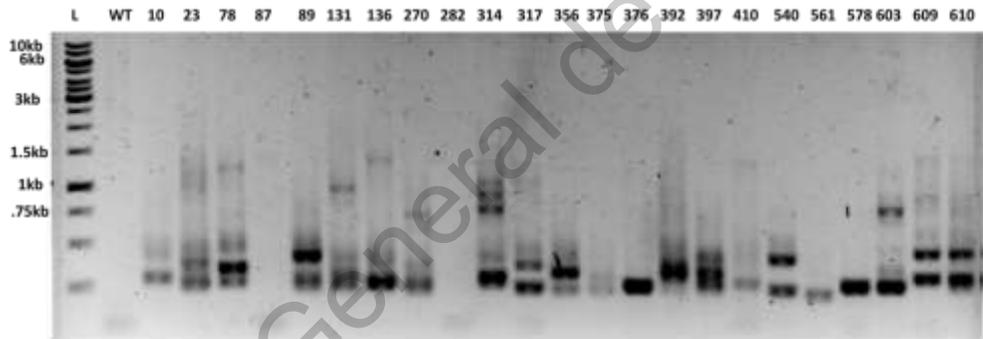


B





C



D

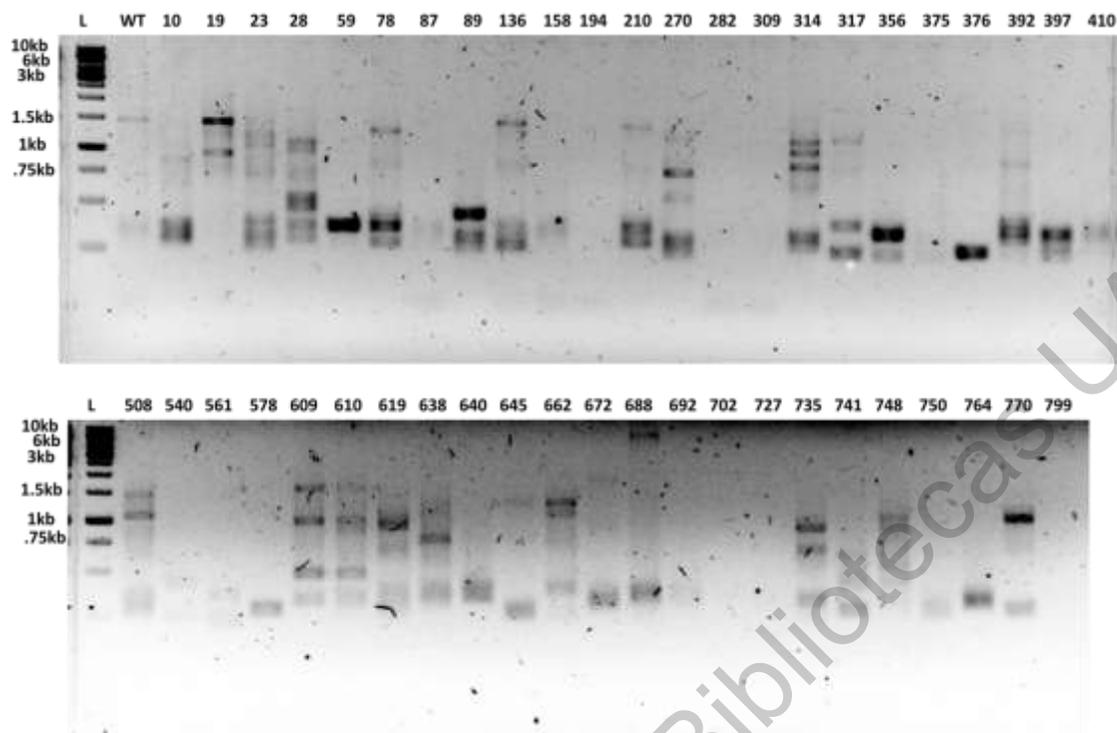


Figura 13. Fragmentos de la biblioteca genómica contenidos en el plásmido pCB1004. A partir de ADNg extraído de las cepas estables se amplificaron los fragmentos del genoma de entre 750 y 1500 pb ligados a los extremos del sitio de reconocimiento de la enzima *Bam*HI en el plásmido PCB1004. **A)** Ronda de amplificación 1(R1), **B)** R2,**C)** R3 y **D)** R4. L, marcador de peso molecular para la estimación del tamaño de los amplicones. C, Plásmido pCB1004 vacío; WT, cepa silvestre. En la parte posterior se indica el número de cepa correspondiente.

En total pudieron amplificarse las inserciones en 42 de las 61 cepas analizadas (68.85%). De estas 42, el 42.85% de las cepas presentaron inserciones únicas, el 50% dos inserciones independientes, el 4.76% tres inserciones y el 2.38% cuatro inserciones. Las cepas que no generaron ningún producto de PCR y que pasaron la prueba de estabilidad del marcador de selección necesitan análisis futuros para entender mejor este tipo de eventos.

7.8 La inserción de los plásmidos por recombinación homóloga ocurre al azar a través del genoma de *T. atroviride*.

Los productos de PCR generados en las rondas de amplificación anteriormente descritas fueron secuenciados para poder conocer su ubicación en el genoma. Por medio de la herramienta BlastN (JGI) se identificaron los genes y las coordenadas exactas de las

inserciones putativas producidas por recombinación homóloga. En total fueron localizadas 64 inserciones en 16 contigs distintos del genoma de *T. atroviride*. Algunas cepas compartieron las mismas inserciones genómicas, lo cual se indica en los números de cepa en la Figura 23. Es necesario notar que los primeros 10 contigs, en los que no hubo inserciones localizadas, tienen un tamaño muy pequeño (<10000 pb), y por probabilidad no es rara la ausencia de una inserción. Por lo tanto, el mapeo de las inserciones reveló que las integraciones de las construcciones plasmídicas en el genoma de *T. atroviride* ocurrieron al azar a lo largo de este.

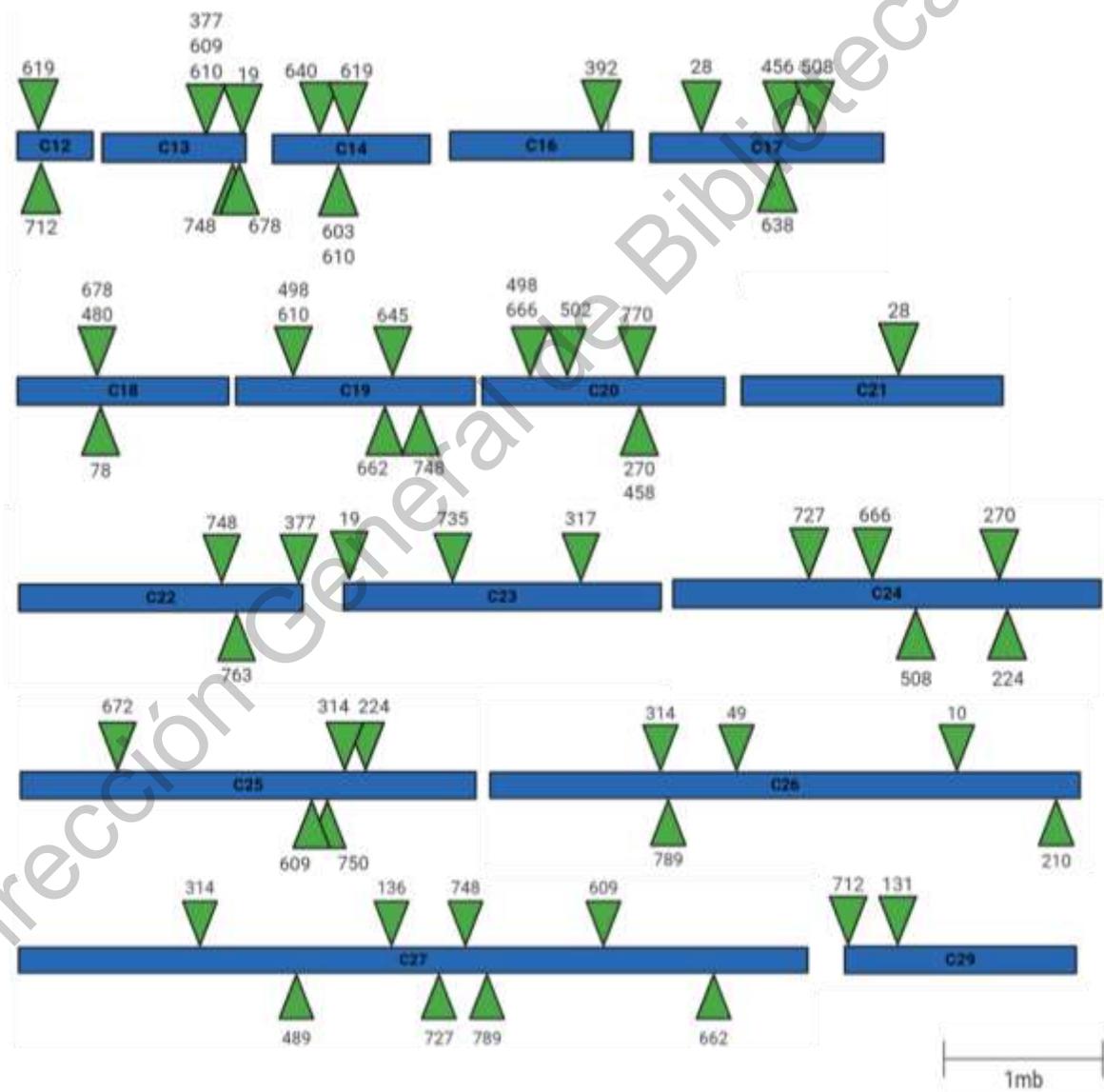


Figura 14. Sitios de inserción localizados en el genoma de *T. atroviride*. Cada rectángulo azul representa un contig a escala de los 29 que constituyen el genoma ensamblado (V2.0). Los triángulos verdes indican las coordenadas de inserción exactas en el contig y los números en las bases especifican la cepas estables que contiene esos loci alterados. Los contigs sin inserción no están representados. Barra de escala= 1mb.

7.9 Identificación de los genes interrumpidos en las transformantes estables.

Las secuencias de los productos de PCR introducidas a BlastN fueron anotadas de acuerdo con la información de la base de datos de MycoCosm (JGI). De las 64 inserciones localizadas en 40 cepas, se identificaron 37 asociadas a genes que codifican para proteínas con funciones conocidas (Tabla 2). Las funciones conocidas con mayor representación en los genes interrumpidos son de actividad de transporte y actividad ubiquitina thiolesterasa, actividad oxidoreductasa y modificaciones postraduccionales.

Tabla 2. Transformantes estables analizadas. Se muestran los resultados del BlastN para cada secuencia de los productos de PCR y su localización en el genoma anotado (V2.0), en las transformantes que sí amplificaron (verde). Las cepas en rojo indican aquellas transformantes que no amplificaron ningún producto mediante PCR. RI, región intergénica. NE, secuencia que no se localizó en ninguna región del genoma.

Cepa	ID	Función	Contig	Coordenadas
10	RI	Desconocida	26	3250992-3251609
19	52977	Desconocida	13	894232-895202
19	197115	GTPasa de unión al ribosoma 50S	23	30906-31913
23				
28	143930	Modificación y procesamiento de ARN	17	1037562-1038279
28	317064	Actividad de transporte	21	996414-996735
49	33929	Remodelación de la cromatina	26	1730008-1730799
49	33929	Remodelación de la cromatina	26	1730008-1730799
59				
78	255346	Desconocida	18	555591-556428
87				
89				
131	48079	Desconocida	29	355640-358363
136	301919	Transducción de señales	27	2648405-2650315
224	257920	Modificación postraducciona, recambio de proteínas, chaperona	25	2301304-2303501
224	318832	Desconocida	24	2165569-2166130
270	316697	Replicación, recombinación y reparación	20	1025077-1032304
270	284255	Unión a GTP	24	2116197-2118338
282				

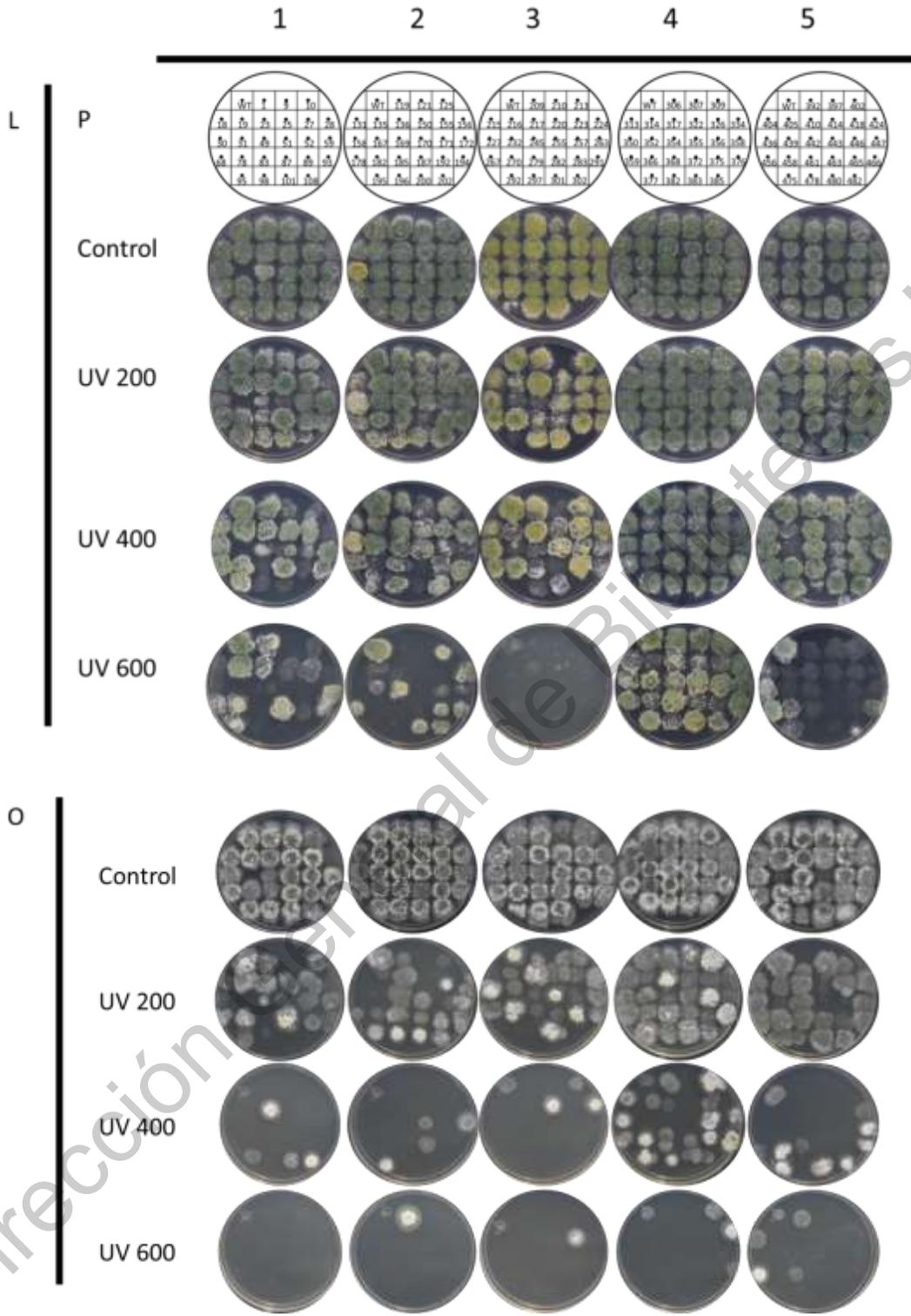
314	RI	Desconocida	25	2174797-2175629
314	RI	Desconocida	27	1299376-1300192
314	RI	Desconocida	26	1188858-1189512
317	318120	Actividad GTPasa	23	1577673-1583513
356				
375				
376				
377	317706	Amidofosforribosil transferasa	22	1868845-1870457
377	288941	Actividad ubiquitina thiolesterasa	13	660700-663662
392	RI	Desconocida	16	962079-962244
392	NE			
397				
410	RI			
456	255140	Desconocida	17	803099-803622
		Replicación, recombinación y		
458	316697	reparación	20	1025077-1032304
480	298021	Desconocida	18	554940-557639
489	85052	Desconocida	27	1978517-1979182
		Modificación postraducciona,		
498	298587	recambio de proteínas, chaperona	20	308782-309812
		Dinámica y estructura de la		
498	316121	cromatina	19	385826-387790
502	RI	Desconocida	20	549516-550104
508	129373	Actividad monooxigenasa	17	833593-835641
508	16265	Beta-1,3-endoglucanasa	24	1581717-1582847
540				
561				
578				
603	45374	Actividad de transporte	14	410342-412212
609	RI			
609	288941	Actividad ubiquitina thiolesterasa	13	660700-663662
609	161203	Transporte vesicular	27	4162252-4166677
609	300525	Actividad oxidorreductasa	25	1944020-1945873
		Dinámica y estructura de la		
610	316121	cromatina	19	385826-387790
610	288941	Actividad ubiquitina thiolesterasa	13	660700-663662
610	45374	Actividad de transporte	14	410342-412212
619	RI	Desconocida	12	137116-137935
619	81281	Actividad oxidorreductasa	14	472872-474145
638	297716	Biosíntesis de novo de pirimidinas	17	319391-321532
640	81320	Actividad catalítica	14	294584-295564
640	RI			
640	RI			
645	RI	Desconocida	19	1019083-1019644
662	287437	Desconocida	27	4949769-4952894
		Transportador de sustrato de unión		
662	155097	mitocondrial	19	986097-987594
		Modificación postraducciona,		
666	298587	recambio de proteínas, chaperona	20	308782-309812
666	39829	Proteína 5 de autofagia	24	1303141-1304061
672	RI	Desconocida	25	649677-649999

678	298021	Desconocida	18	554940-557639
678	233373	Actividad de transporte	13	881473-882882
688				
692				
702				
712	92009	Desconocida	29	17785-22824
712	158454	Actividad reguladora de respuesta del sistema de dos componentes	12	145121-148706
727	39327	Actividad de transporte	24	901931-902955
727	173440	Plegamiento de proteínas	27	3002472-3004679
735	RI	Desconocida	23	728697-728756
735	RI			
741				
748	53153	Desconocida	13	827151-828116
748	RI	Ribulosa bifsosfato carboxilasa	22	1350529-1351401
748	302018	Actividad de transporte	27	3159736-3161845
748	298410	Actividad activador de transcripción	19	1213016-1215195
750	RI	Desconocida	25	2057592-2057674
763	307447	Actividad ubiquitina ligasa	22	1451466-1453186
764				
770	RI	Desconocida	20	1012649-1013493
789	29454	Actividad oxidorreductasa	27	3354572-3356092
789	293951	Actividad de transporte	26	1241516-1243341
799				
158				
194				
210	127437	Desconocida	26	3972858-3973788

7.10 Ensayos de estrés

7.10.1 Susceptibilidad a radiación UV-C

En total 224 cepas fueron sometidas a pruebas con distintos tipos de estrés en un primer escrutinio utilizando 5 μL de solución de esporas (100 esporas/ μL) en placas Petri (90x15mm). En este análisis se identificaron 13 cepas con una mayor sensibilidad a radiación UV-C comparada con la cepa WT (Figura 13; no. de cepa 9, 10, 83, 98, 101, 182, 187, 245, 282, 478, 605, 678 y 752), puesto que la proporción de esporas viables disminuyó en las primeras. El criterio de discriminación de sensibilidad a radiación fue basado en la capacidad de crecimiento de las cepas, gradualmente disminuida conforme la cantidad de energía aumentaba. No se consideraron como aparentemente distintas a la silvestre aquellas cepas que presentaron un comportamiento abruptamente distinto al disminuir o incrementar la energía 200 J/Cm^2 , por lo que quedaron fuera varias cepas. Además, debido a la alta variabilidad obtenida en los experimentos realizados en condiciones de oscuridad, no se tomaron en cuenta las cepas puestas a prueba en dichas condiciones.



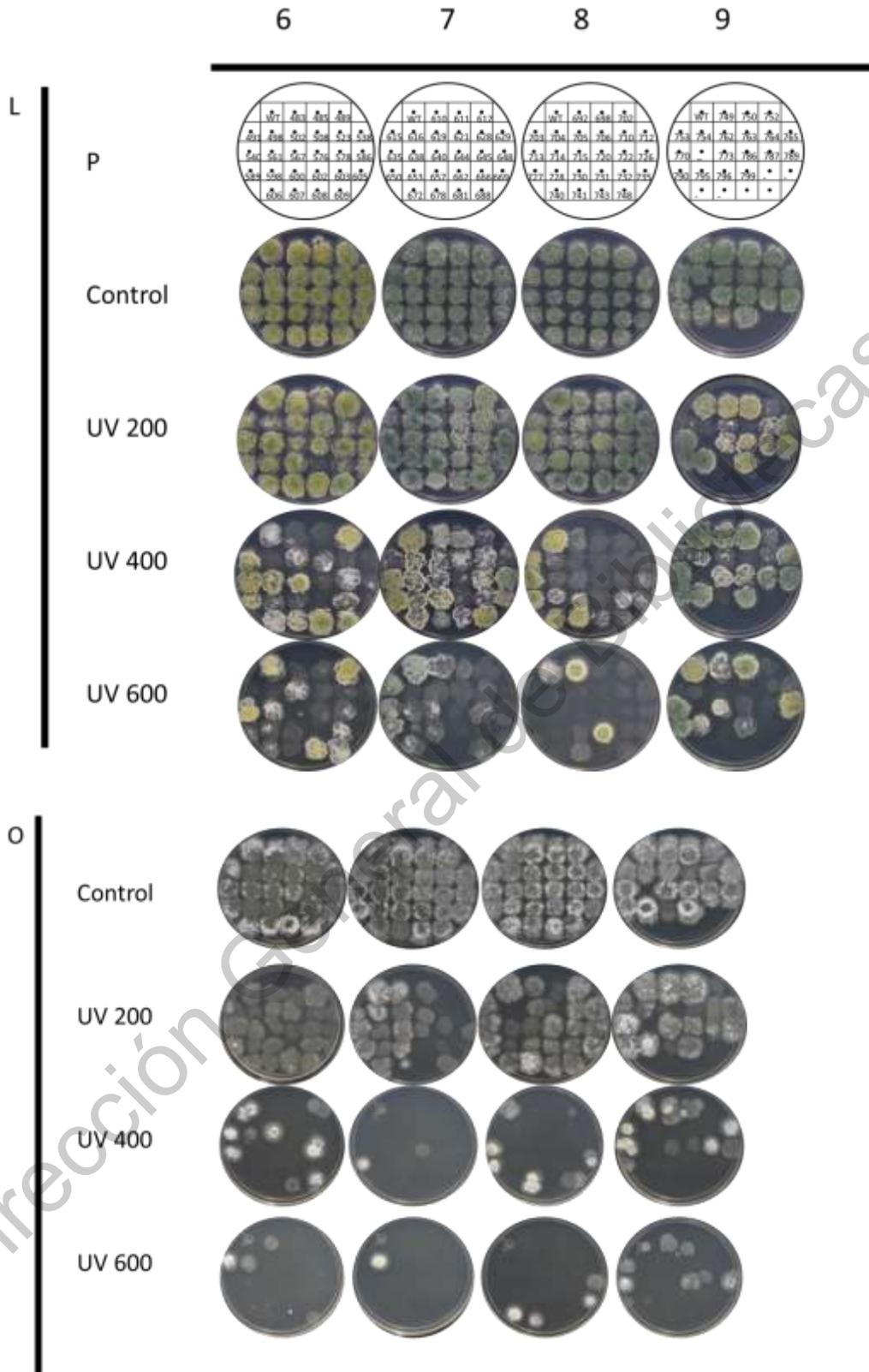
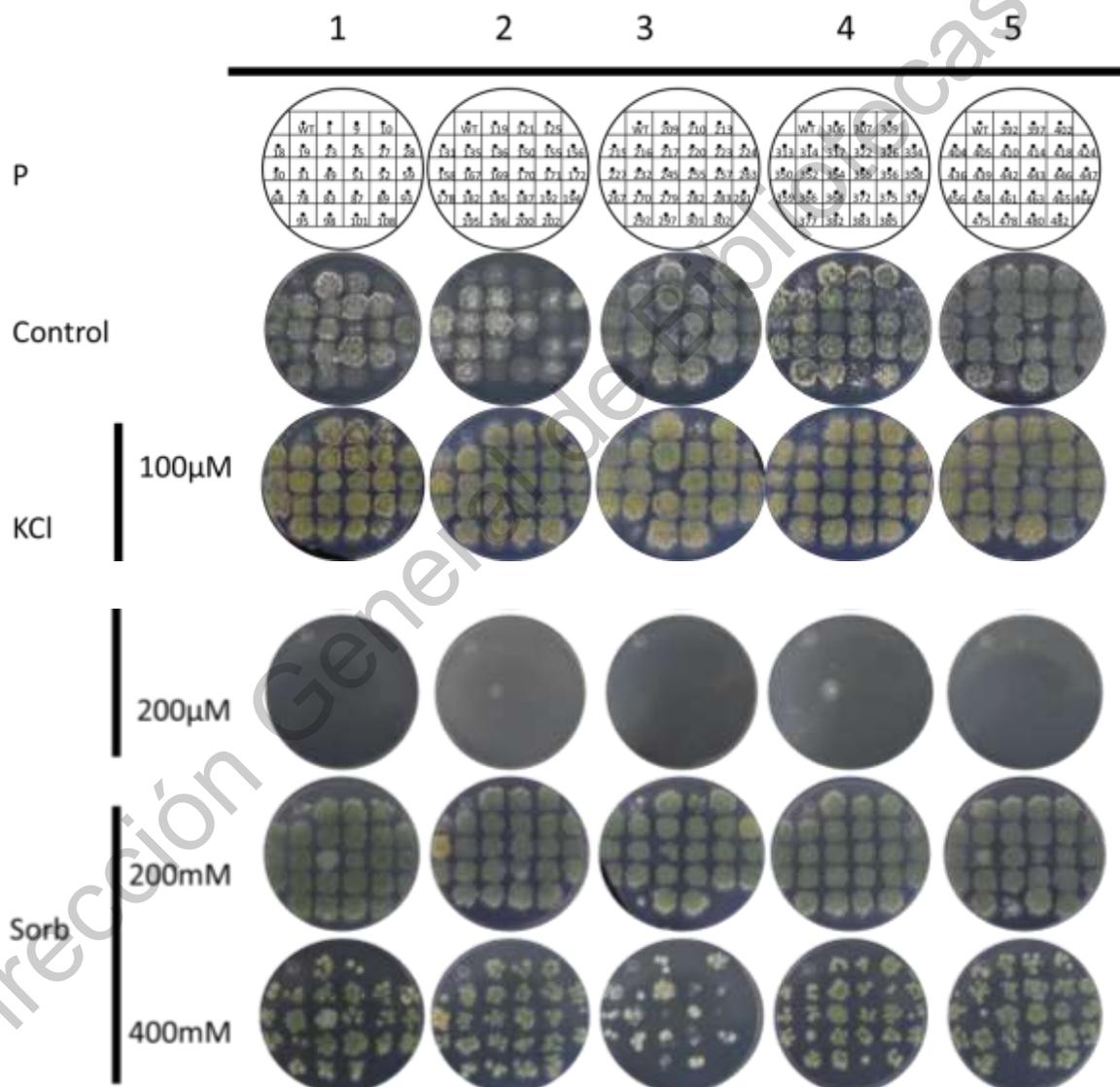


Figura 15. Ensayos de estrés por daño UV-C. Gotas con 500 esporas en suspensión se inocularon en PDA con Tritón X-100 y fueron expuestas a diferentes dosis indicadas de UV-C. Los cultivos se incubaron a 27°C durante 6 días en presencia o ausencia de luz blanca. L, luz blanca constante, O, oscuridad. Cepas no sembradas: 31, 302

7.10.2 Estrés osmótico

En los ensayos de estrés osmótico se identificaron 5 cepas con una mayor susceptibilidad a KCl y sorbitol comparadas con la cepa WT (Figura 14; cepas 10, 392, 741, 748 y 764).



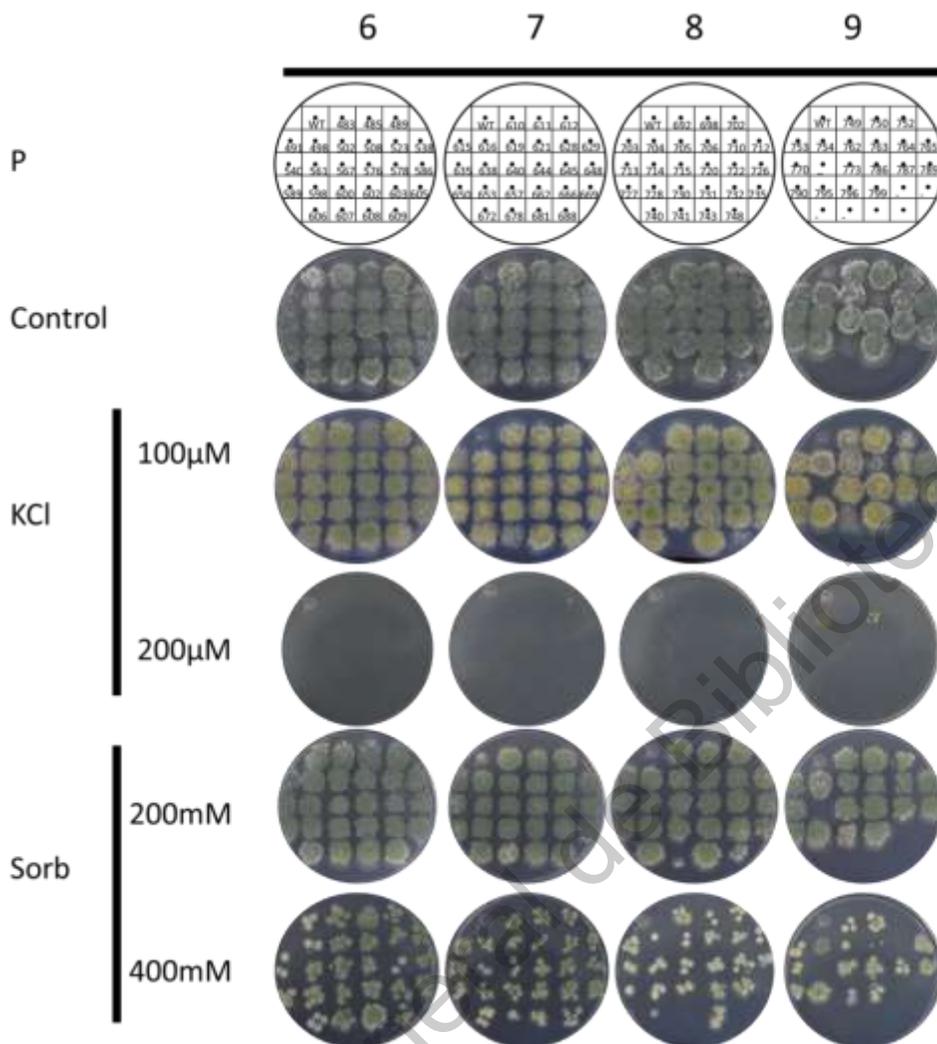
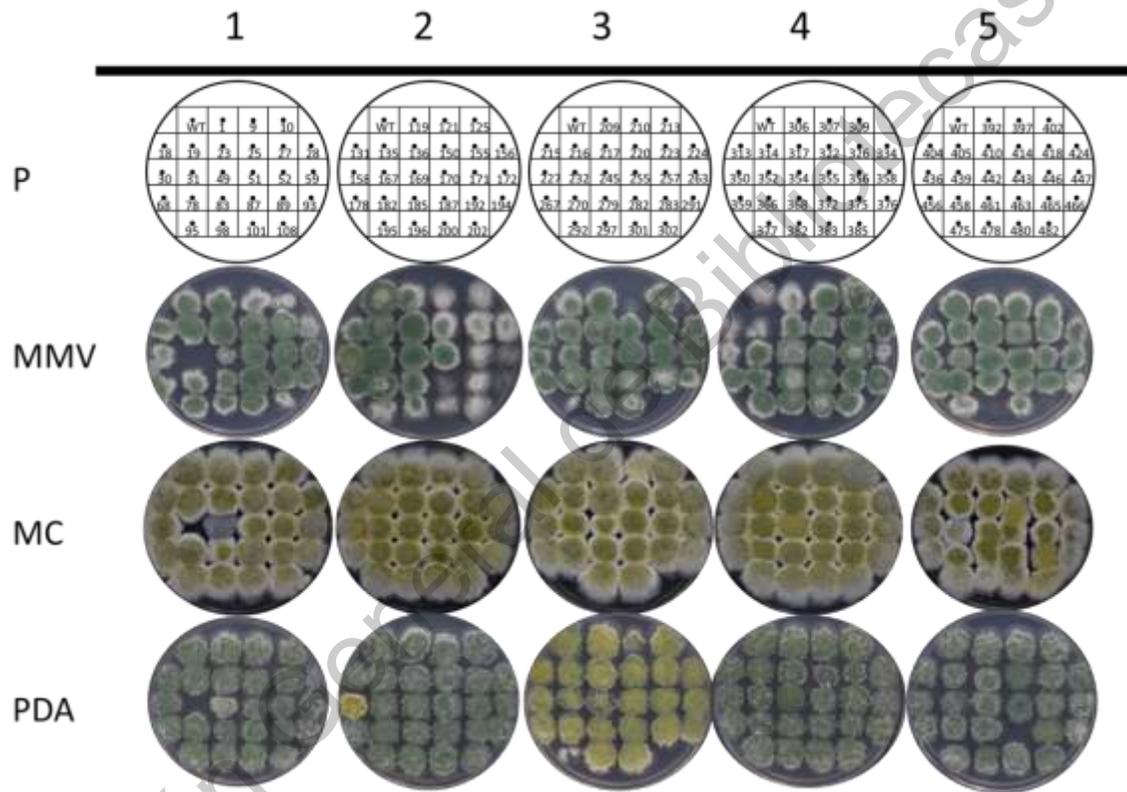


Figura 16. Ensayo de estrés osmótico. Se cultivaron 224 transformantes estables con un inóculo con 500 esporas en PDA suplementado con Tritón X-100 con diferentes concentraciones de KCl y sorbitol. La incubación se realizó a 27°C durante 4 días.

7.11 Ensayos de metabolismo

En un primer escrutinio fueron cultivadas 224 cepas en los medios PDA, MC y MMV, con el objetivo de discriminar aquellas con un crecimiento distinto al de la cepa WT. Se identificaron 18 cepas con un crecimiento disminuido al ser cultivadas en MMV (Figura 15; no. de cepa 10, 28, 49, 108, 172, 187, 194, 210, 314, 358, 478, 482, 540, 678, 727, 735, 752 y 753). No se consideraron como cepas con un crecimiento distinto al de la cepa WT a aquellas que en un área considerable de la caja de cultivo presentaron un crecimiento

disminuido junto con un gran número de cepas vecinas (Figura 15, plantillas 6-8), salvo que la diferencia de crecimiento fuese muy notoria, puesto que en el resto de los medios no se observó un patrón similar. Además, en el medio MC se identificaron cinco cepas con un crecimiento reducido comparado con el de la cepa WT (Figura 15; no. de cepa 49, 210, 478, 678 y 763) y en el medio PDA se encontraron tres cepas con crecimiento disminuido comparado con el de la cepa WT (Figura 15; no. de cepa 49, 210 y 678).



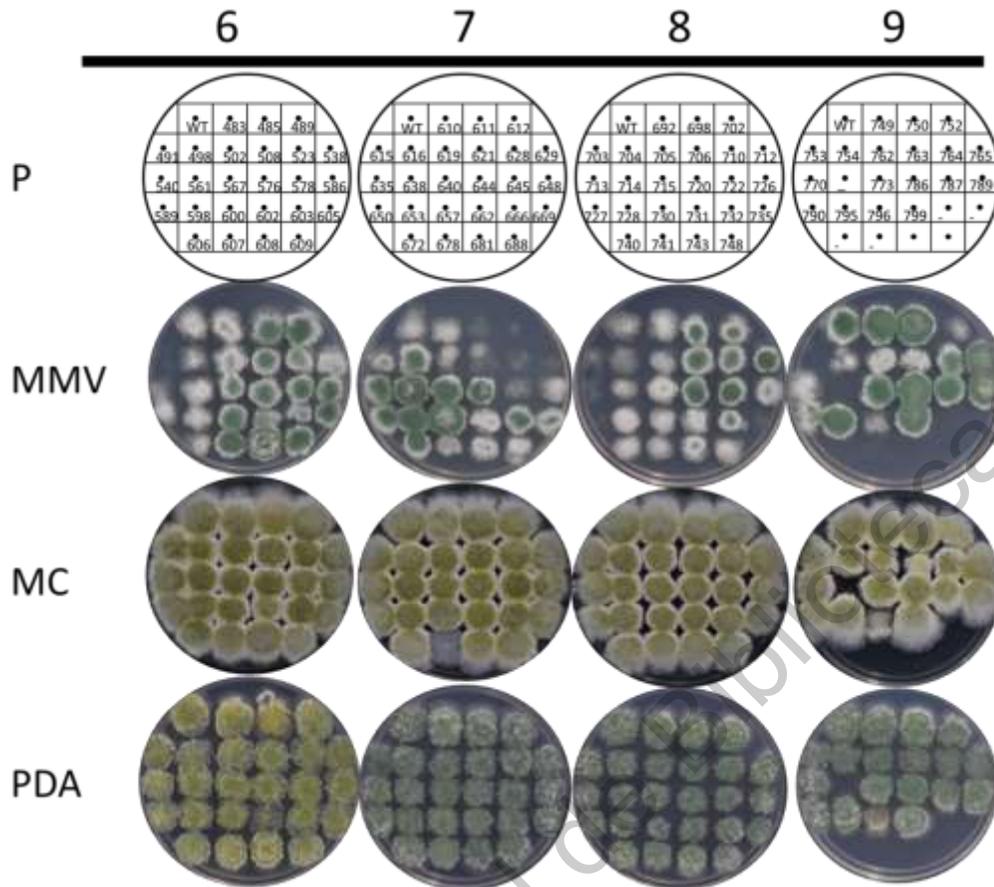


Figura 17. Ensayos de metabolismo. Se inocularon 224 cepas estables utilizando inóculos de 500 esporas en PDA, MC y MMV con Tritón X-100 y se incubaron a 27°C por 48h.

Se evaluó la capacidad metabólica de 15 cepas seleccionadas en el primer escrutinio, con el propósito de identificar a las diferentes estadísticamente significativas, por lo que fueron seleccionados los medios PDA, MC y MMV (Figura 16). En medio PDA las cepas 28, 210 y 224 tuvieron un crecimiento estadísticamente superior al de la cepa silvestre, mientras que las cepas 49 y 678 mostraron un crecimiento considerablemente atenuado (Figura 16 y 17, $p < 0.05$). Con respecto al crecimiento en medio MC, las cepas 10, 49 y 678 presentaron un crecimiento disminuido al compararse con la WT ($p < 0.05$), aunque la diferencia es mucho más marcada en las últimas dos cepas (Figura 16 y 18). Finalmente en el medio MMV fueron estadísticamente inferiores en crecimiento las cepas 28, 49 y 678 (Figura 16 y 19, $p < 0.05$).

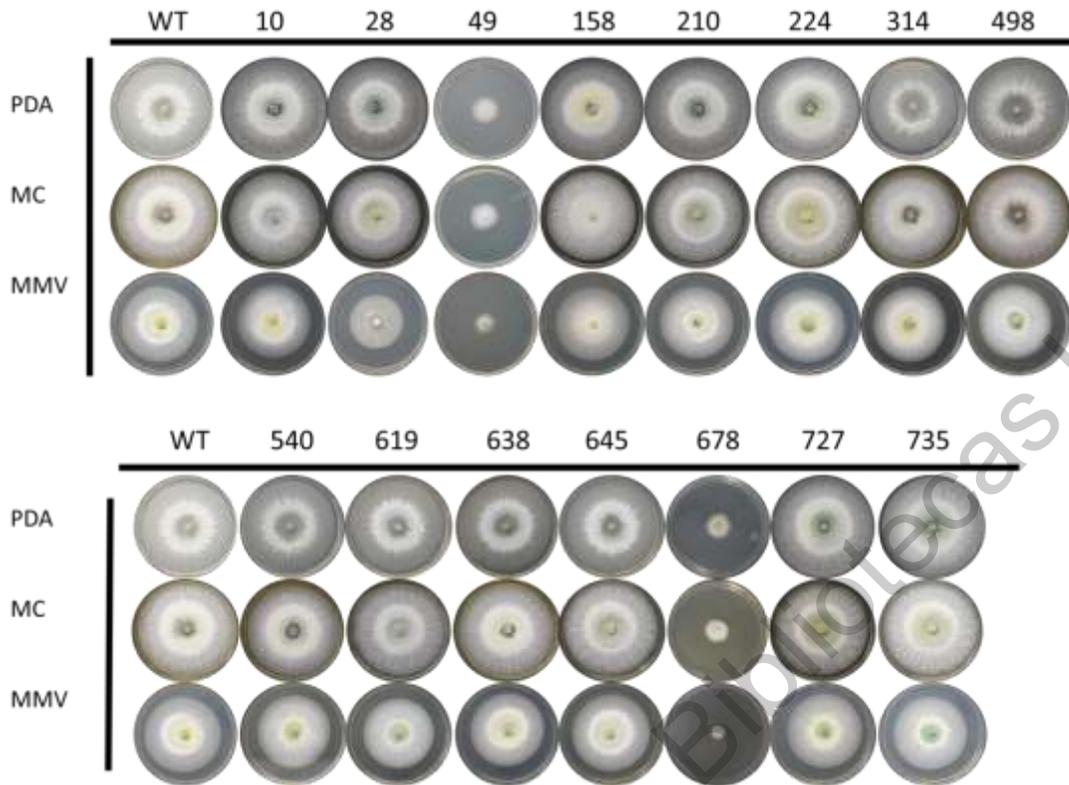


Figura 18. Efecto de los medios de cultivo en el crecimiento radial de transformantes estables. Se utilizaron 15 cepas distintas para evaluar el crecimiento radial a partir de un inóculo de micelio joven en los medio PDA, MC y MMV. Se incubaron durante 48 h a 27°C en condiciones de luz constante.

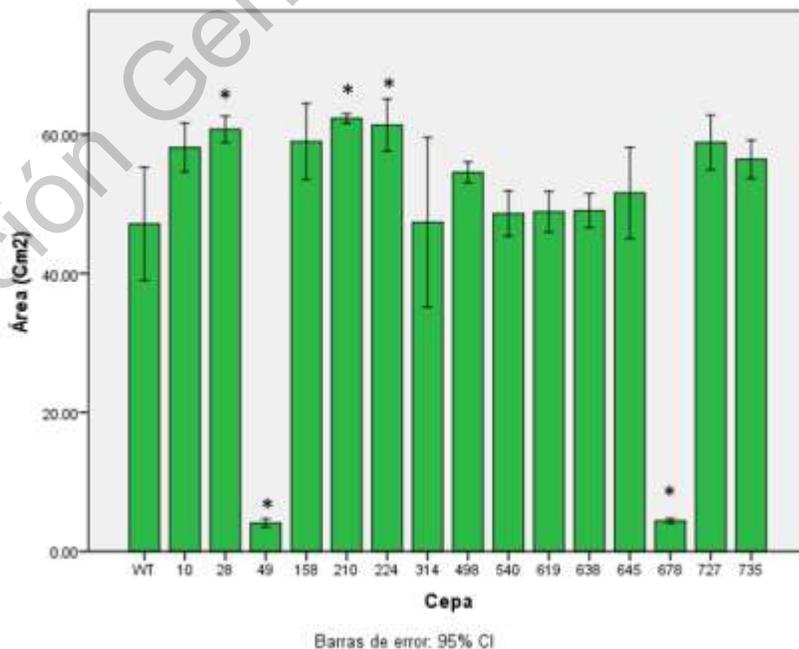


Figura 19. Crecimiento radial en medio PDA. Se promediaron las áreas de tres experimentos independientes con sus respectivas barras de error (IC 95%). Se realizó un ANOVA de una vía con análisis post-hoc HSD Tukey (* $p < 0.05$).

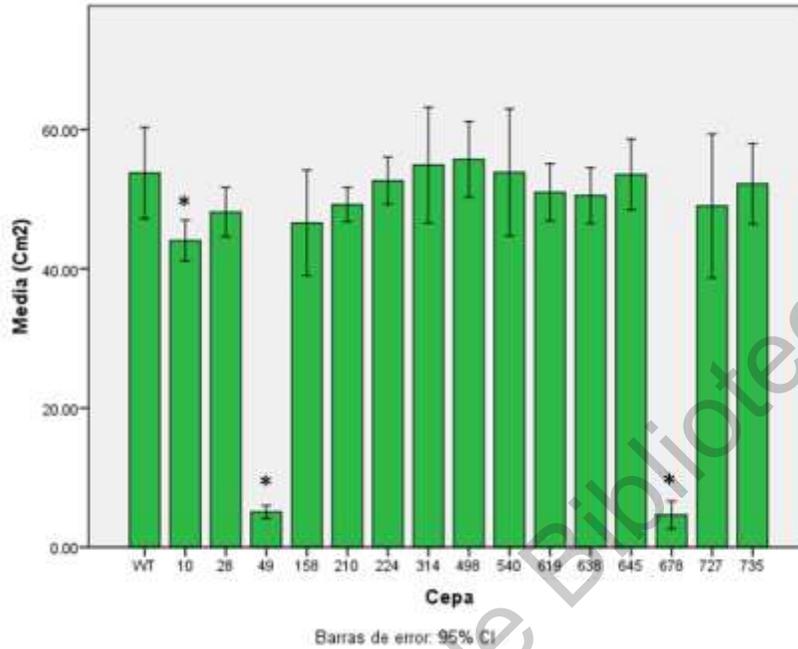


Figura 20. Crecimiento radial en medio MC. Se promediaron las áreas de tres experimentos independientes con sus respectivas barras de error (IC 95%). Se realizó un ANOVA de una vía con análisis post-hoc HSD Tukey (* $p < 0.05$).

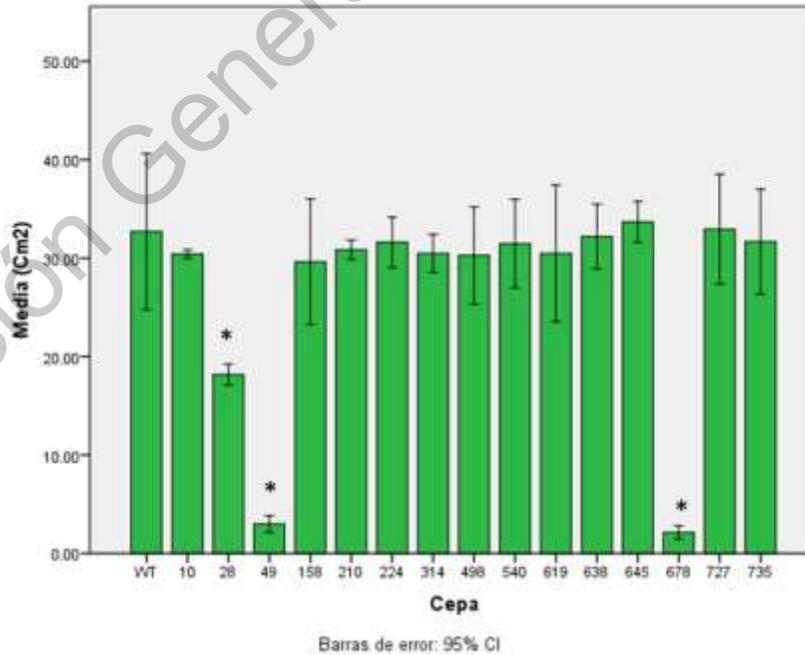


Figura 21. Crecimiento radial en medio MMV. Se promediaron las áreas de tres experimentos independientes con sus respectivas barras de error (IC 95%). Se realizó un ANOVA de una vía con análisis post-hoc HSD Tukey (* $p < 0.05$).

7.12 Conidiación inducida por luz en las cepas transformantes estables.

Se evaluó la capacidad de producción de conidios en 57 de las cepas estables (resultados no mostrados) y se encontró que 4 cepas (no. de cepa 131, 640, 727 y 763) fueron incapaces de esporular tras recibir un pulso de luz azul (Figura 20). Notoriamente, las cepas 640, 727 y 763 presentaban una esporulación normal cuando eran sometidas a luz constante mientras que la cepa 131 solo mostró una reducción en la producción de conidios, por lo que probablemente el cambio en el fenotipo tras el pulso de luz azul sea debido a la inserción del plásmido por recombinación homóloga.

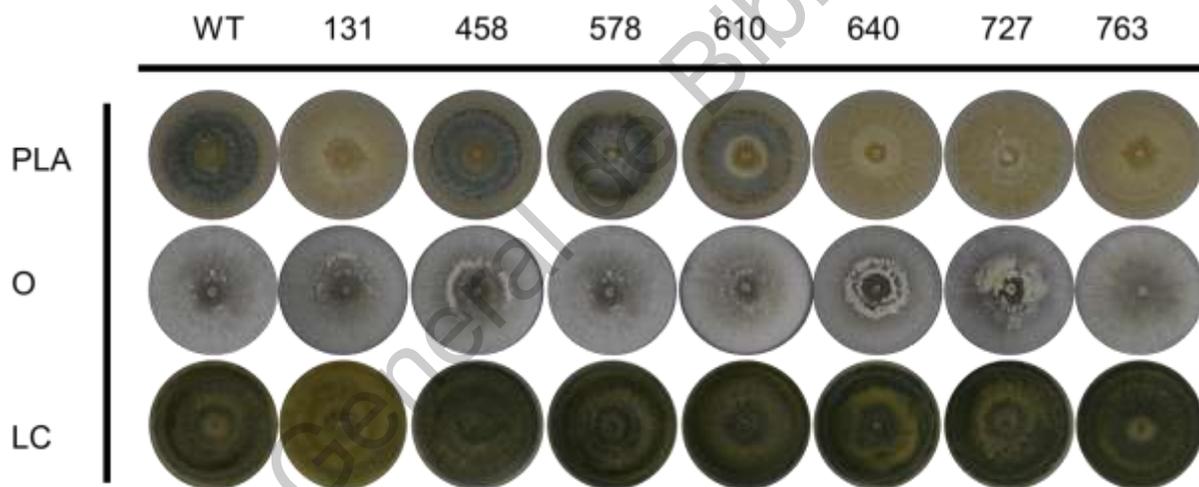


Figura 22. Conidiación inducida por luz en las transformantes estables. Se inocularon discos de micelio en medio PDA y se crecieron por 48h a 27°C en condiciones de oscuridad. Los cultivos resultantes fueron sometidos a un pulso de luz (PLA) o incubados en oscuridad (O) durante 48h a 27°C, mientras que otros cultivos fueron expuestos a luz constante (LC) durante 7 días a 27°C.

Adicionalmente, fueron comparados los promedios de conteos de esporas en las 8 cepas previamente analizadas. De esto, resultaron diferencias estadísticamente significativas en las cepas 131, 640, 727 y 763, con una importante disminución en la producción de conidia (Figura 21).

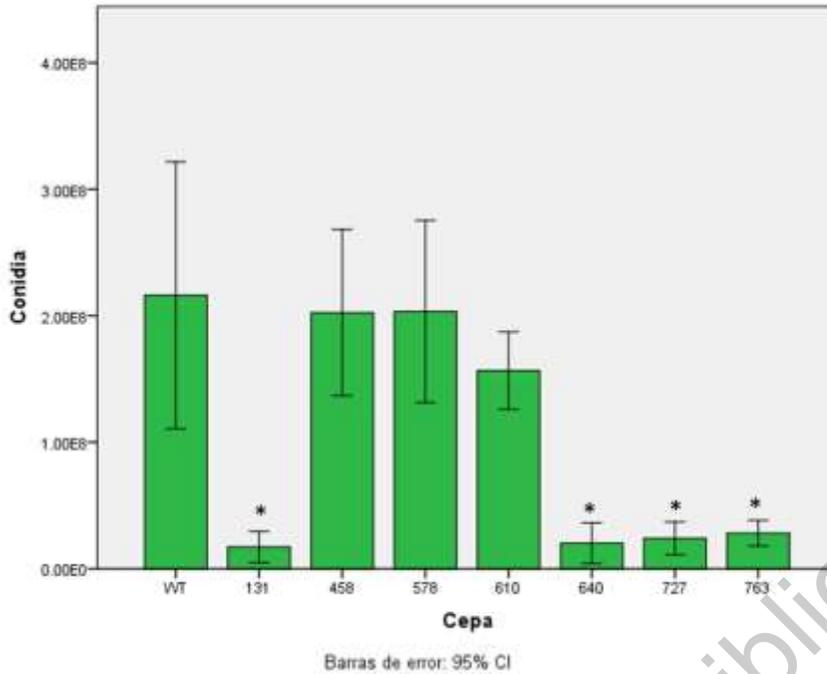
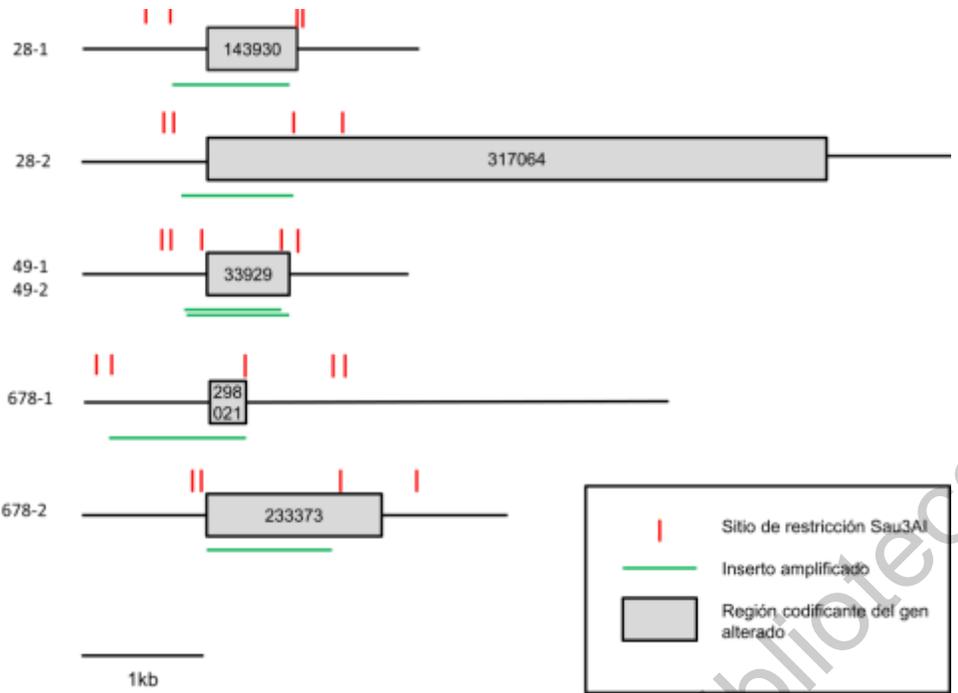


Figura 23. Producción de esporas inducida por un pulso de luz azul. Se promediaron los conteos de esporas asexuales de tres experimentos independientes con sus respectivas barras de error (IC 95%). Se realizó un ANOVA de una vía con análisis post-hoc HSD Tukey (* $p < 0.05$).

7.13 Los fragmentos genómicos en las construcciones plasmídicas empalman con regiones codificantes en genes relacionados con metabolismo y fotoconidiación.

Con el propósito de identificar las regiones de los genes en las que potencialmente se integraron las construcciones plasmídicas, se realizaron alineamientos de los productos de PCR obtenidos en cada una de las cepas que presentó un crecimiento disminuido con respecto al de la silvestre, o una menor producción de conidia estimulada por luz azul. El 100% de los genes empalmó con las regiones codificantes (Figura 22), lo cual sugiere que los cambios en los fenotipos sean debidos a una alteración en los genes intrínsecos de las cepas, teniendo como resultado una probable modificación en la expresión génica.



B

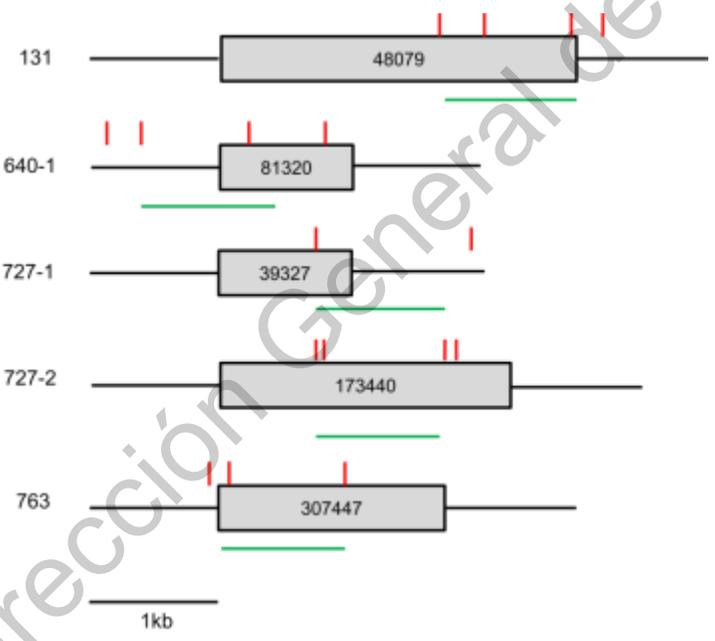


Figura 24. Mapa génico de las regiones alteradas con las inserciones plasmídicas. Los genes alterados de las cepas con un comportamiento diferente estadísticamente significativo en ensayos de crecimiento radial (A) y fotoconidiación (B) se representan con cajas grises. Los insertos amplificados en cada una de las cepas se representan con una línea verde en la parte inferior de

cada gen. Los sitios potenciales de restricción *Sau3AI* para producir los anteriores fragmentos se muestran con líneas rojas en la parte superior de las secuencias

8. Discusión

8.1 Inserciones aleatorias de los plásmidos a través del genoma.

En *T. atroviride* la introducción de DNA plasmídico con secuencias heterólogas, por medio de electroporación o métodos biolísticos, se pensaba que resultaba en integraciones en regiones altamente recombinogénicas, con la consecuente aparición de transformantes inestables que perdían la resistencia a higromicina B al retirarse la presión de selección (Herrera-Estrella, 1990). Otros reportan integraciones ectópicas en todo el genoma con ADN heterólogo transformado por el método PEG-CaCl₂ (Cardoza et al., 2006). Actualmente, es sabido que *T. atroviride* puede integrar ADN plasmídico con una secuencia clonada de su propio genoma preferentemente por recombinación homóloga, generando transformantes estables (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, en preparación). En este trabajo se presenta evidencia que sugiere integraciones por recombinación homóloga, de diferentes secuencias del genoma de *T. atroviride* clonadas en un vector plasmídico, en 16 diferentes contigs del ensamblaje del genoma del mismo. Es de destacar que no se aprecian claramente regiones con preferencia a experimentar gran cantidad de eventos de recombinación, sino un patrón aleatorio correspondiente con la índole aleatoria de la generación de fragmentos a partir de la digestión total del genoma.

8.2 Estabilidad mitótica

Previamente se ha reportado que tras introducir ADN plasmídico con un marcador de selección, a células de *Trichoderma* spp. resulta en un número alto de transformantes que pierden la resistencia a la higromicina B o la capacidad de crecer en acetamida cuando se retira la presión de selección, por lo que se catalogan como inestables (Penttilä et al., 1987; Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007). Tomando en cuenta lo anterior, fueron consideradas como transformantes estables aquellas cepas que tras el ensayo de estabilidad (tres pases monospóricos en medio selectivo, un pase en medio sin antibiótico) crecieron en medio con higromicina B. En total fueron obtenidas 224 cepas, de las que 74 crecieron rápidamente en las primeras 72h y las restantes presentaron una

tasa de crecimiento disminuida, probablemente por la proporción entre núcleos transformantes y núcleos silvestres, aunque deben de realizarse experimentos futuros para explicar este fenómeno. Algunas de las cepas presentaron cambios en la morfología de la colonia y en la pigmentación de las esporas, como se tiene reportado en eventos de transformación en *T. atroviride* (Lorito et al., 1993).

En hongos filamentosos la estabilidad mitótica tiende a ser alta cuando se utilizan sistemas basados en *A. tumefaciens*, como ejemplos se tienen trabajos realizados en *Aspergillus terreus* (Wang et al., 2014), *T. reesei* (Zhong et al., 2017) y *Beauveria bassiana* (Dos Reis et al., 2004), aunque siguen habiendo excepciones (Mora-Lugo et al., 2014). Adicionalmente, con los métodos biolísticos se obtienen porcentajes altos de transformantes estables con respecto a la transformación por PEG-CaCl₂, como se ha identificado en *T. reesei* (Hazell et al., 2001), *A. nidulans* (Herzog et al., 1996), *M. anisopliae* (Bogo et al., 1996) y *Verticillium lecanii* (Hasan et al., 2011).

Las explicaciones que se han propuesto para este problema de estabilidad están basadas en la cantidad de núcleos de las células usadas en el procedimiento de transformación y la eficiencia del método para integrar secuencias transformantes en dichos núcleos (Lorito et al., 1993; Mora-Lugo et al., 2014). De acuerdo con lo anterior, los métodos mediados por *Agrobacterium* y por microbombardeo presentan mejores porcentajes de estabilidad mitótica debido a que la cantidad de núcleos por espора es baja, en contraposición con los protoplastos usados en el método PEG-CaCl₂. Sin embargo, parece ser que el principal determinante es la eficiencia de integración del método, puesto que en *T. reesei* se demostró que incluso utilizando una cantidad menor de protoplastos, se obtuvo una eficiencia superior a la conseguida con conidia (Zhong et al., 2007). Las diferencias en la estabilidad mitótica presentadas en los anteriores métodos y las transformantes abortivas en el presente trabajo requieren ser estudiadas de manera exhaustiva para entender mejor este tipo de fenómenos. A pesar de que un gran número de cepas transformantes perdieron la resistencia a la higromicina B, la eficiencia de integración de 28% es un buen número.

8.3 Identificación de genes interrumpidos.

En los últimos años se han realizado estudios de mutagénesis de diverso tipo en *Trichoderma spp.*, cuya identificación y/o caracterización se ha realizado por medio de diferentes medios. Por ejemplo, para estrategias de mutagénesis basadas en radiación gamma para identificar loci polimórficos se han utilizado técnicas de ADN amplificado polimórfico aleatorio (RAPD), secuencias de regiones caracterizadas amplificadas (SCAR), métodos de patrones genómicos basados en el uso de oligonucleótidos que amplifican elementos repetidos interespaciados (Rep-PCR), y secuenciación total del genoma (Shafique et al., 2011; Abbasi et al., 2016). Por otro lado, los enfoques AMT identifican los sitios de inserción de T-DNA mediante la amplificación de las regiones que flanquean el inserto por TAIL-PCR, con nueve oligonucleótidos necesarios y secuenciación del producto terciario de la TAIL-PCR (Zhong et al., 2017).

En comparación con los anteriores métodos, la localización e identidad de los fragmentos del genoma clonados en el vector pCB1004 fue realizada por medio de PCR punto final, secuenciación y BlastN (JGI), utilizando un solo par de oligonucleótidos. Una de las desventajas del método presentado en este trabajo es que se produjeron un gran número de inserciones dobles en una misma cepa, e incluso con menos frecuencia pueden ocurrir hasta 3 inserciones independientes, por lo que puede resultar complicado asociar un fenotipo particular producido a una de las inserciones. Otro inconveniente es que se generaron cepas transformantes con las mismas inserciones, por lo que es probable que surjan varias cepas que compartan integraciones en los mismos genes, pues es un riesgo evidente cuando se propagan y reproducen una gran cantidad de copias de plásmidos distintos.

8.4 Genes implicados en crecimiento.

Los ensayos de metabolismo a los cuáles fueron sometidos algunas de las transformantes estables revelaron 6 cepas con diferencias estadísticamente significativas respecto a la cepa silvestre. Aunque de estas últimas fueron solamente las cepas 49 y 678 (Figura 16-19) las que presentaron una disminución abrupta en el crecimiento radial del micelio.

La cepa 49 presentó dos inserciones de fragmentos de un mismo gen (ID proteína: 33929). Este gen codifica para una proteína que participa en el complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF. En eucariotas, el complejo de remodelación dependiente de

ATP SWI/SNF se necesita para la regulación de la expresión génica (Jansen et al., 2011) y presenta modularidad estructural para regular distintos grupos de genes (Dutta et al., 2017). La subunidad catalítica Snf2 es responsable del reposicionamiento del nucleosoma por desplazamiento del mismo o removiendo histonas (Jansen et al., 2011). En el hongo patógeno *C. albicans*, las subunidades Snf2 y Swi1 son indispensables para la diferenciación de la forma invasiva de la hifa, así como la virulencia en modelo de ratón de infección sistémica (Mao et al., 2006).

La cepa 678 presentó dos inserciones independientes en genes distintos (ID proteínas: 298021 y 233373). Una de estas inserciones fue ubicada en el genoma de *T. atroviride*; sin embargo, los análisis bioinformáticos no lo asociaron a una proteína anotada. La otra inserción identificada correspondió a un gen relacionado con actividad de transporte de la superfamilia facilitadora principal (MFS). En hongos los transportadores MFS pueden participar en la multidrogorresistencia (dos Santos et al., 2014), pues fungen como antiporter transportando moléculas pequeñas ante gradientes iónicos. Adicionalmente estos transportadores pueden controlar indirectamente el potencial de membrana a través del cambio en la homeostasis de lípidos membranales, regular el pH interno y la maquinaria de respuesta frente a condiciones de estrés (dos Santos et al., 2014). Lo anterior es consistente con la mayor susceptibilidad de esta cepa ante condiciones de estrés oxidativo (Figura 14), no obstante no puede dejarse a un lado la supuesta participación de la otra inserción en el fenotipo.

Finalmente, la cepa 28 mostró un crecimiento disminuido estadísticamente significativo en MMV comparado con el de la cepa WT y, sorpresivamente, en el medio PDA la cepa superó significativamente el crecimiento radial de la cepa WT. La cepa 28 presentó dos inserciones en genes distintos que codifican para una ribonucleoproteína pequeña nuclear (snRNP) SmF que participa en el procesamiento y modificación de ARN (ID proteína: 143930) y una proteína lipocalina (317064). Las lipocalinas son proteínas pequeñas, en su mayoría extracelulares, con la capacidad de unirse a moléculas hidrofóbicas pequeñas (Åkerstrom et al., 2000). Las funciones de este grupo de proteínas son pleiotrópicas e incluyen la modulación del crecimiento celular y metabolismo en plantas, bacterias y animales (Åkerstrom et al., 2000), por lo que probablemente tengan un efecto en la disminución del crecimiento radial observada. En el caso de la otra mutación, es probable que la inserción no sea responsable del efecto en el crecimiento observado, puesto que se ha demostrado, mediante mutagénesis de los sitios de unión de RNA, que el snRNP

SmF de *S. cerevisiae* no es esencial para el crecimiento de la levadura, salvo en un sitio específico Arg74 (Schwer et al., 2016), aunque es necesario realizar un análisis de estructura función en *T. atroviride* para poder excluir el efecto de esta snRNP en el crecimiento.

8.5 Identificación de nuevos genes implicados en fotoconidiación.

Las fotoinducciones a las cuáles fueron sometidas las transformantes estables mostraron cuatro cepas con una producción de esporas disminuida significativamente tras un pulso de luz azul (cepas: 131, 640, 727 y 763). La cepa 131 presentó integración en un gen que codifica para un péptido sintetasa no ribosomal (NRPSs) *T. atroviride* (ID proteína 48079). Los NPRSs se consideran parte del metabolismo secundario, aunque tienen participación en el metabolismo primario y algunas de sus funciones conocidas incluyen desarrollo morfológico y celular, respuestas a estrés y patogenicidad (Keller et al., 2005). En *A. brassicola* la delección de uno de los genes NPRS, AbNPS2, resultó en una morfología anormal de la pared celular de las esporas y una tasa de germinación de esporas disminuida (Kim et al., 2007), tal como se observa en la cepa 131 (Figura 20).

La cepa 640 tuvo dos eventos de inserción independientes, con una inserción que no dio resultados de empalme tras el BlastN en el genoma y una inserción que corresponde a una proteína hipotética con unión a NADP perteneciente a la superfamilia alcohol deshidrogenasa (ADH). En *S. cerevisiae* se conocen cinco clases de ADH, donde dos clases (I y II) son proteínas citoplasmáticas expresadas en condiciones de respiración y fermentación (Thompson et al., 2018), mientras que el resto de las clases (III, IV y V) presentan ADHs con funciones que no son completamente entendidas (Thomson et al., 2005).

La cepa 727 presentó tres inserciones independientes, una de éstas (ID proteína 39327) en un gen que corresponde a una acuaporina de la familia de proteínas intrínsecas principal (MIP). La MIP contiene proteínas involucradas en el transporte de agua y otros solutos neutrales (Gomes et al., 2009). Mientras que la otra inserción pertenece a un gen que codifica para una chaperona que participa en modificaciones postraduccionales de la superfamilia DnaJ/Hsp40.

Por último, la cepa 763 presento una única integración en un gen que codifica una proteína U-box (ID proteína 307447) vinculada con una actividad ubiquitina ligasa y como

factor de corte y empalme del ARN mensajero. En levaduras, el prototipo de proteína U-box Ufd2 funge como un factor de ensamblaje que coopera con las enzimas E1, E2 y E3 (Hatakeyama et al., 2001). Recientemente, un estudio demostró que un componente de la ubiquitina ligasa E3 es fundamental para el crecimiento y esporulación en el patógeno del arroz *M. oryzae* (Prakash et al., 2016).

Aquí se reporta la participación de nuevos genes en la producción de esporas tras un pulso de luz azul en *T. atroviride*. Para validar este nuevo aporte, se requieren análisis futuros de supresión génica con el fin de demostrar que la poca producción de conidia estimulada por luz es debida a los genes aquí reportados.

8.6 Nueva estrategia de mutagénesis insercional

En hongos filamentosos se han desarrollado métodos como mutagénesis química y por radiación UV, REMI, AMT, TAGKO, que se valen de diferentes estrategias y facilidades para mutagenizar el genoma aleatoriamente con la finalidad de descifrar funciones génicas. Las eficiencias producidas por los anteriores métodos suelen variar de acuerdo con el género que se pretenda transformar, con resultados que van de excelentes hasta insuficientes. Además, otras desventajas son la gran demanda en tiempo y esfuerzo por optimizar una gran cantidad de variables para obtener una buena eficiencia de transformación y una laboriosa tarea de identificación de los sitios de inserción.

En este trabajo fue desarrollada una nueva estrategia de mutagénesis insercional basada en la integración por recombinación homóloga del plásmido pCB1004 con insertos del genoma de *T. atroviride*. Con una eficiencia de integraciones estables del 28% y una fácil identificación del gen alterado mediante PCR punto final. Esta nueva aproximación representa una nueva alternativa para ser probada en otros hongos filamentosos cuya eficiencia sea baja con otros métodos, o bien cuya identificación de los genes alterados sea complicada.

9. Conclusiones.

-La mutagénesis insercional mediada por recombinación homóloga, utilizando fragmentos del genoma de *T. atroviride* clonados en el vector pCB1004, resulta en una buena eficiencia de integraciones estables (28%).

-La identificación de las inserciones en el genoma de las cepas mitóticamente estables se realizaron mediante PCR y secuenciación.

-Las integraciones de las construcciones plasmídicas en el genoma ocurrieron en tándem, principalmente en eventos únicos y dobles.

-La identificación de las inserciones sugiere que las construcciones plasmídicas fueron integradas al azar a lo largo del genoma, sin preferencia por regiones altamente recombinogénicas.

10. Perspectivas.

-Realizar la técnica southern blot para verificar que las integraciones en los genes mutados ocurrieron por homología.

-Complementar las cepas transformantes, con un fenotipo distinto al de la cepa silvestre, con los respectivos genes putativamente mutados para restaurar el fenotipo.

-Mejorar la eficiencia de transformación por medio de: el uso de ARNi transitorio del gen *mus53*, para evitar la vía de integración no homóloga; y con el aumento de la eficiencia de ligación al añadir PEG o mediante partículas ferromagnéticas.

11 Bibliografía

Abbasi, S., Safaie, N., Shams-Bakhsh, M., & Shahbazi, S. (2016). Biocontrol Activities of Gamma Induced Mutants of *Trichoderma harzianum* against some Soilborne Fungal Pathogens and their DNA Fingerprinting. *Iranian J. Biotechnol.* 14(4), 260–269. doi:10.15171/ijb.1224

Adachi, K., Nelson, G.H., Peoples, K.A., Frank, S.A., Montenegro-Chamorro, M.V., DeZwaan, T.M., Ramamurthy, L., Shuster, J.R., Hamer, L., & Tanzer, M.M. (2002). Efficient gene identification and targeted gene disruption in the wheat blotch fungus *Mycosphaerella graminicola* using TAGKO. *Curr Genet*, 42(2), 123–127.

Ahmad, J.S. & Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77, 182–189.

Åkerstrom, B., Flower, D. R., & Salier, J.P. (2000). Lipocalins: unity in diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1-2), 1–8. doi:10.1016/s0167-4838(00)00137-0

Arazoe, T., Miyoshi, K., Yamato, T., Ogawa, T., Ohsato, S., Arie, T. & Kuwata, S. (2015). Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnol Bioeng*, 112(12), 2543–2549.

Attri, C., Swati & Kulshrestha, S. (2017). Restriction enzyme-mediated insertional mutagenesis: an efficient method of *Rosellinia necatrix* transformation. *Archives of Microbiology*, 200(1), 189–194.

Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S.H., Strem, M.D., Melnick, R.L. & Bailey, B.A. (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J Exp Bot*, 60, 3279–3295.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. & Codón, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*, 7, 249–60.

Bloemendal, S., Löper, D., Terfehr, D., Kopke, K., Kluge, J., Teichert, I. & Kück, U. (2014). Tools for advanced and targeted genetic manipulation of the β -lactam antibiotic producer *Acremonium chrysogenum*. *J Biotech*, 169, 51– 62.

Bogo, M.R., Vainstein, M.H., Araagao, F.J.L., Rech, E. & Schrank, A. (1996). High frequency gene conversion among benomyl resistant transformants in the entomopathogenic fungus *M. anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett*, 142, 123–127.

Bose, J.L. (2014). Chemical and UV Mutagenesis. *The Genetic Manipulation of Staphylococci*, 111–115. doi:10.1007/7651_2014_190

Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A. & Chet, I. (2008). Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol*, 147, 779–789.

Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S.L., Lorito, M., Kubicek, C.P. & Mach, R.L. (2005). Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3959–3965. doi:10.1128/aem.71.7.3959-3965.2005

Burlacu, A., Israel-Roming, F. & Cornea, C.P. (2017). Fungal strains improvement for xylanase over production through physical and chemical mutagenesis. *AgroLife Scientific Journal*, 6(1), 40-47.

Cardoza R.E., Vizcaino J.A., Hermosa M.R., Monte E., Gutierrez S. (2006). A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation. *J Microbiol*, 44, 383-395.

Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P. & Herrera-Estrella, A. (2004). BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, 150, 3561–3569.

Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Rosales-Saavedra, T., Martinez-Hernandez, 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.

Catalano, V., Vergara, M., Hauzenberger, J.R., Seiboth, B., Sarrocco, S., Vannacci, G., Kubicek, C.P. & Seidl-Seiboth, V. (2011). *Curr Genet*, 57(1), 13-23.

Cebrián, J., Kadomatsu-Hermosa, M.J., Castán, A., Martínez, V., Parra, C., Fernández-Nestosa, M.J., Schaerer, C., Martínez-Robles, M.L., Hernández, P., Krimer, D.B., Stasiak, A. & Schwartzman, J.B. (2015). Electrophoretic mobility of supercoiled, catenated and knotted DNA molecules. *Nucleic acids research*, 43(4). doi:10.1093/nar/gku1255

Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J. & Voytas, D.F. (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research*, 39(12). doi:10.1093/nar/gkr218

Chan, V.W., Dreolini, L.F., Flintoff, K.A., Lloyd, S.J. & Mattenley, A.A. (2002). The effect of increasing plasmid size on transformation efficiency in *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 2, 207-223.

Chand P., Aruna A., Maqsood A.M., Rao L.V. (2005). Novel mutation method for increased cellulase production. *J Appl Microbiol* 98, 318–323
Chaverri, P. & Samuels, G.J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud. Mycol*, 48, 1–116.

Chen, X., Stone, M., Schlaghauser, C. & Romaine, C.P. (2000). A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4510–4513.

Chum, P.Y., Schmidt, G., Saloheimo, M. & Landowski, C.P. (2017). Transient silencing of DNA repair genes improves targeted gene integration in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and environmental microbiology*, 83(15). doi:10.1128/AEM.00535-17

Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 149, 1579–92.

Cuervo-Parra, J.A., Sánchez-Lpez, V., Romero-Cortes, T. & Ramírez-Lepe, M. (2014). *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici*. *African Journal of Microbiology Research*, 8, 1704-1712.

Davis, A.J. & Chen, D.J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*, 2, 130–143.

De Queiroz, M.V. & Daboussi, M.J. (2003). Impala, a transposon from *Fusarium oxysporum*, is active in the genome of *Penicillium griseoroseum*. *FEMS Microbiol Lett*, 218, 317–321.

Djonovic, S., Pozo, M.J., Dangott, L.J., Howell, C.R. & Kenerley, C.M. (2006). Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 838–853.

Dos Santos, S.C., Teixeira, M. C., Dias, P. J., & Sá-Correia, I. (2014). MFS transporters required for multidrug/multixenobiotic (MD/MX) resistance in the model yeast: understanding their physiological function through post-genomic approaches. *Front. Physiol.* 5:180. doi:10.3389/fphys.2014.00180

Dutta A., Sardu M., Gogol M., Gilmore J., Zhang D., Florens L., Abmayr S.M., Washburn M.P., Workman J.L. (2017). Composition and function of mutant Swi/Snf complexes. *Cell Rep* 18:2124–2134. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.058.

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

Esquivel-Naranjo, E.U. & Herrera-Estrella, A. Strong preference for integration of transforming DNA via homologous recombination in *Trichoderma atroviride*. Manuscrito en preparación.

Firon, A., Villalba, F., Beffa, R. & d'Enfert, C. (2003). Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. *Eukaryot Cell*, 2(2), 245–253.

Fisher, T.S. & Zakian, V.A. (2005). Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance. *DNA Repair*, 4, 1215–1226.

Florea, S., Andreeva, K., Machado, C., Mirabito, P.M. & Schardl, C.L. (2009). Elimination of marker genes from transformed filamentous fungi by unselected transient transfection with a Cre-expressing plasmid. *Fungal Genet Biol*, 46, 721-730.

Forment, J.V., Ramón, D. & MacCabe, A.P. (2006). Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans*: application of the Cre/loxP system. *Curr Genet*, 50, 217–224. doi: 10.1007/s00294-006-0081-2

Foster, A.J., Martin-Urdiroz, M., Yan, X., Wright, H.S., Soanes, D.M. & Talbot, N.J. (2018). CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein-mediated co-editing and counterselection in the rice blast fungus. *Sci Rep*, 8 (1), 14355.

Fries, E.M. (1825). *Systema orbis vegetabilis. Primas lineas novae constructionis periclitatur Elias Fries. Pars I.* Lund: Plantae Homonemae.

Gaj, T., Gersbach, C.A. & Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Casbased methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 31(7), 397–405.

Goins, C.L., Gerik, K.J. & Lodge, J.K. (2006). Improvements to gene deletion in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*: absence of Ku proteins increases homologous recombination, and cotransformation of independent DNA molecules allows rapid complementation of deletion phenotypes. *Fungal Genetics and Biology*, 43, 531–544.

Gouka, R.J., Gerk, C., Hooykaas, P.J., Bundock, P., Musters, W., Verrips, C.T. & Groot, M.J. (1999). Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated homologous recombination. *Nat Biotechnol*, 17, 598–601.

Green, J.J. & Rao, V.B. (1998). *Recombinant DNA principles and methodologies.* Marcel Dekker Inc. Nueva York, EUA.

Groot, M.J., Bundock, P., Hooykaas, P.J. & Beijersbergen, A.G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol*, 16, 839–842.

Gutter, Y. (1957). Effect of light in sporulation of *Trichoderma viride*. *Bull Res Council Israel Sect*, 5, 273–286.

Guzmán-Guzmán, P., Alemán-Duarte, M.I., Delaye, L., & Herrera-Estrella, A. (2017). Identification of effector-like proteins in *Trichoderma spp.* and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC Genet*, 18(16), 1–20.

Haber, J.E. (1999). DNA repair – Gatekeepers of recombination. *Nature*, 398, 665–667.

Hamer, L., Adachi, K., Montenegro-Chamorro, M.V., Tanzer, M.M., Mahanty, S.K., Lo, C., Tarpey, R.W., Skalchunes, A.R., Heiniger, R.W., Frank, S.A., Darveaux, B.A., Lampe, D.J., Slater, T.M., Ramamurthy, L., DeZwaan, T.D., Nelson, G.H., Shuster, J.R., Woessner, J. & Hamer, J.E. (2001). Gene discovery and gene function assignment in filamentous fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(9), 5110–5115.

Harman, G.E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol – changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Dis*, 84, 377–393.

Harman, G.E., (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology*, 96, 190-194.

Hazell, B., Te'O, V., Bradner, J., Bergquist, P. & Nevalainen, K. (2000). Rapid transformation of high cellulase-producing mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 282-286. doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00715.x

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I. & Monte, E. (2011). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17–25. doi:10.1099/mic.0.052274-0

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

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

Herrera-Estrella, A., Goldman, G. H. & Montagu, M. V. (1990). Notes High-efficiency transformation system for the biocontrol agents *Trichoderma spp.* *Molecular Microbiology*, 4(5), 839–843. doi:10.1111/j.1365-2958.1990.tb00654.x

Herzog, R.W., Daniell, H., Singh, N.K., & Lemke, P.A. (1996). A comparative study on the transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment of conidia and a more conventional procedure using protoplasts treated with polyethyleneglycol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(3), 333–337. doi:10.1007/s002530050692

Hihlal, E., Braumann, I., Van den Berg, M. & Kempken, F. (2011). Suitability of vader for transposon-mediated mutagenesis in *Aspergillus niger*. *Appl and Environ Microbiol*, 77(7), 2332–2335.

Horta, M., Filho, J., Murad, N.F., De Oliveira Santos, E., Dos Santos, C.A., Mendes, J.S. & De Souza, A.P. (2018). Network of proteins, enzymes and genes linked to biomass degradation shared by *Trichoderma* species. *Scientific reports*, 8(1), 1341. doi:10.1038/s41598-018-19671-w

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G. & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*, 31, 827–832.

Hua, S.B., Qiu, M., Chan, E., Zhu, L. & Luo, Y. (1997). Minimum length of sequence homology required for in vivo cloning by homologous recombination in yeast. *Plasmid*, 38(2), 91–96.

Ikehata, H. & Ono, T. (2011). The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res*, 52, 115–125.

Imazaki, I., Kurahashi, M., Iida, Y. & Tsuge, T. (2007). Fow2, a Zn(II)₂Cys₆-type transcription regulator, controls plant infection of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol*, 63(3), 737–753.

Ishibashi, K., Suzuki, K., Ando, Y., Takakura, C. & Inoue, H. (2006). Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 14871–14876.

Jaklitsch, W.M. (2009). European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species. *Stud Mycol*, 63, 1–91.

Jansen A., Verstrepen K.J. (2011). Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:301–320. doi:10.1128/MMBR.00046-10.

Jiang, B., Zhang, R., Feng, D., Wang, F., Liu, K., Jiang, Y., Niu, K., Yuan, Q., Wang, H., Zhang, Y. & Fang, X. (2016). A Tet-on and Cre-loxP based genetic engineering system for convenient recycling of selection markers in *Penicillium oxalicum*. *Front Microbiol*, 7, 485.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.

Joung, J.K. & Sander, J.D. (2012). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cel Biol*, 14(1), 49–55.

Kahmann, R. & Basse, C. (1999). REMI (restriction enzyme mediated integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. *Eur J Plant Pathol*, 105, 221–229.

Kamala, T. & Devi, S.I. (2012). Biocontrol properties of indigenous *Trichoderma* isolates from North-East India against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology*, 11, 8491-8499.

Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W. (2005). Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nat.Rev. Microbiol.* 3, 937–947.

Khrunyk, Y., Munch, K., Schipper, K., Lupas, A.N. & Kahmann, R. The use of FLP-mediated recombination for the functional analysis of an effector gene family in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis*. *New Phytol*, 187, 957–968.

Kim K.H., Cho Y., La Rota M., Cramer R.A., Lawrence C.B. (2007). Functional analysis of the *Alternaria brassicicola* non-ribosomal peptide synthetase gene AbNPS2 reveals a role in conidial cell wall construction. *Mol Plant Microbe Interact.* 13, 23–39

Klein, D. & Eveleigh, E. (1998). Ecology of *Trichoderma*. En: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium. Basic Biology, Taxonomy and Genetics.* Taylor & Francis Ltd., Londres, Reino Unido, 57-74.

Kopke, K., Hoff, B. & Kück, U. (2010). Application of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP/FRT recombination system in filamentous fungi for marker recycling and construction of knockout strains devoid of heterologous genes. *Applied and environmental microbiology*, 76(14), 4664–4674. doi:10.1128/AEM.00670-10

Krappmann, S. (2007). Gene targeting in filamentous fungi: the benefits of impaired repair. *Fungal Biology Reviews*, 21(1), 25–29. doi:10.1016/j.fbr.2007.02.004

Kubicek, C.P. & Druzhinina, I.S. (2013). *Trichoderma*: Genomic aspects of mycoparasitism and biomass degradation. Springer Berlin Heidelberg.

Kubicek, C.P., Komon-Zelazowska, M. & Druzhinina, I.S. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ Sci B*, 9, 753–763.

Kunamneni, A., Plou, F. J., Alcalde, M. & Ballesteros, A. (2014). *Trichoderma* enzymes for food industries. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, 339–344. doi:10.1016/b978-0-444-59576-8.00024-2

Li, D., Tang, Y., Lin, J. & Cai, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial cell factories*, 16(1), 168. doi:10.1186/s12934-017-0785-7

Li, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Yu, P.L., Pan, H. & Rollins, J.A. (2018). Introduction of large sequence inserts by CRISPR-Cas9 to create pathogenicity mutants in the multinucleate filamentous pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *MBio*, 9 (3).

Liu, R., Chen, L., Jiang, Y.P., Zhou, Z.H. & Zou, G. (2015). Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. *Cell Discov*, 1, 15007.

Liu, Y., He, Q. & Cheng, P. (2003). Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell Mol Life Sci*, 60, 2131–2138.

Liu, Y.G. & Chen, Y. (2007). High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Bio Techniques*, 43, 649–656.

Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A. & Harman, G.E. (1993). Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Current Genetics*, 24(4), 349–356. doi:10.1007/bf00336788

Lu, Z., Tombolini, R., Woo, S., Zeilinger, S., Lorito, M., & Jansson, J. K. (2004). In vivo study of trichoderma-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and environmental microbiology*, 70(5), 3073–3081. doi:10.1128/aem.70.5.3073-3081.2004

Mach, R.L., Schindler, M. & Kubicek, C.P. (1994). Transformation of *Trichoderma-Reesei* based on hygromycin-B resistance using homologous expression signals. *Curr Genet*, 25, 567–70.

Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., Oost, J.V.D. & Koonin, E.V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 9, 467–477.

Malmierca, M.G., Cardoza, R.E. & Gutiérrez, S. (2014). *Trichoderma* transformation methods. *Genetic Transformation Systems in Fungi*, 1, 41–48. doi:10.1007/978-3-319-10142-2_3

Mao X., Cao F., Nie X., Liu H., Chen J. (2006). The Swi/Snf chromatin remodeling complex is essential for hyphal development in *Candida albicans*. *FEBS Lett* 580:2615–2622. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.009.

Martínez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M. & Baccou, J.C. (2001). Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heatdenatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol*, 127, 334–344.

Matsuura, T., Baek, M., Kwon, J. & Hong, C. (2015). Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology. *Fungal Biol Biotechnol*, 2(4), 1–7.

Miao, J., Chi, Y., Lin, D., Tyler, B.M. & Liu, X. (2018). Mutations in ORP1 conferring oxathiapiprolin resistance confirmed by genome editing using CRISPR/Cas9 in *Phytophthora capsici* and *P. sojae*. *Phytopathology*, 108 (12), 1412–1419.

Michielse, C.B., Hooykaas, P.J., Van den Hondel, C.A. & Ram, A.F. (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet*, 48(1), 1–17.

Miller, J.H. (1972), *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, EUA.

Mora-Lugo, R., Zimmermann, J., Rizk, A.M. & Fernandez-Lahore, M. (2014). Development of a transformation system for *Aspergillus sojae* based on the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated approach. *BMC Microbiol*, 14, 247.

Morán-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., Lorito, M. & Monte, E. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*–plant beneficial interaction. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 1021–1031.

Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M. & Kenerley, C.M. (2013). *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 105–129. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102353

Mullins, E.D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D.M. & Kang, S. (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. *Phytopathology*, 91, 173–180.

Nevalainen, H., Suominen, P. & Taimisto, K. (1994). On the safety of *Trichoderma reesei*. *J Biotechnol*, 37, 193–200.

Nevalainen, K.M., Téó, V.S. & Bergquist, P.L. (2005). Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends Biotechnol*, 23, 468–474.

Nielsen, J.B., Nielsen, M.L. & Mortensen, U.H. (2008). Transient disruption of non-homologous end-joining facilitates targeted genome manipulations in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(3), 165–170. doi:10.1016/j.fgb.2007.07.003

Ninomiya Y., Suzuki K., Ishii C., Inoue H. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(33), 12248–53.

Nødvig, C.S., Nielsen, J.B., Kogle, M.E. & Mortensen, U.H. (2015). A CRISPRCas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One*, 10(7), 18.

Noh, W., Kim, S.W., Dong-Won, B., Kim, J.Y. & Ro, H.S. (2010). Genetic introduction of foreign genes to *Pleurotus eryngii* by restriction enzymemediated integration. *J Microbiol*, 48(2), 253–256.

Omann, M. & Zeilinger, S. (2010). How a mycoparasite employs G-protein signaling: using the example of *Trichoderma*. *Journal of Signal Transduction*. doi:10.1155/2010/123126.

Park, J. & Lee, Y.H. (2013), Dual-purpose mutagenesis strategy for bidirectional-genetics platform, a filamentous fungi. *Eukaryot Cell*, 12(11), 1547–1553.

Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E. & Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61(2), 155–164. doi:10.1016/0378-1119(87)90110-7

Pheiffer, B.H. & Zimmerman, S.B. (1983). Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions. *Nucleic acids research*, 11(22), 7853–7871. doi:10.1093/nar/11.22.7853

Piers, K.L., Heath, J.D., Liang, X., Stephens, K.M. & Nester, E.W. (1996). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(4), 1613–1618.

Pinkney, J.N., Zawadzki, P., Mazuryk, J., Arciszewska, L.K., Sherratt, D.J. & Kapanidis, A.N. (2012). Capturing reaction paths and intermediates in Cre-loxP recombination using single-molecule fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 109, 20871–20876. doi:10.1073/pnas.1211922109

Pohl, C., Kiel, J.A., Driessen, A.J., Bovenberg, R.A. & Nygard, Y. (2016). CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*. *ACS Synth Biol*, 5(7), 754–764.

Qualhato, T.F., Lopes, F.A.C., Steindorff, A.S., Brandão, R.S., Jesuino, R.S.A. & Ulhoa, C.J. (2013). Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 35, 1461-1468.

Rashmi, S., Maurya, S. & Upadhyay, R.S. (2016). The improvement of competitive saprophytic capabilities of *Trichoderma* species through the use of chemical mutagens. *Brazilian journal of microbiology*, 47(1), 10–17. doi:10.1016/j.bjm.2015.11.003

Reithner, B., Ibarra-Laclette, E., Mach, R. L. & Herrera-Estrella, A. (2011). Identification of Mycoparasitism-Related Genes in *Trichoderma atroviride*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4361–4370. doi:10.1128/aem.00129-11

Rogers, C.W., Challen, M.P., Green, J.R. & Whipps, J.M. (2004). Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants for the biocontrol fungus *Coniothyrium minitans*. *FEMS Microbiol Lett*, 241, 207–214.

Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E.U., Casas-Flores, S., Martinez-Hernandez, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C. & Herrera-Estrella, A. (2006). Novel lightregulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology*, 152, 3305–3317.

Rossmann, A.Y., Samuels, G.J., Rogerson, C.T. & Lowen, R. (1999). Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). *Studies in Mycology*, 42, 1–248.

Rotblat, B., Enshell-Seiffers, D., Gershoni, J.M., Schuster, S. & Avni, A. (2002). Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J* 32, 1049–1055.

Sakuma, T., Ochiai, H., Kaneko, T., Mashimo, T., Tokumatsu, D., Sakane, Y., Suzuki, K., Miyamoto, T., Sakamoto, N., Matsuura, S. & Yamamoto, T. (2013). Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci Rep*, 3, 3379.

Salas-Marina, M.A., Isordia-Jasso, M.I., Islas-Osuna, M.A., Delgado-Sánchez, P., Jiménez-Bremont, J.F., Rodríguez-Kessler, M., Rosales-Saavedra, M.T., Herrera-Estrella, A. & Casas-Flores, S. (2015). The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. *Frontiers in plant science*, 6, 77. doi:10.3389/fpls.2015.00077

Salas-Marina, M.A., Silva-Flores, M.A., Uresti-Rivera, E.E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A. & Casas-Flores, S. (2011). Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *Eur J Plant Pathol*, 131, 15–26.

Samuels, G.J., Pardo-Schultheis, R., Hebbar, K.P., Lumsden, R.D., Bastos, C.N., Costa, J.C. & Bezerra, J.L. (2000). *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research*, 104, 760–764.

Schiestl, R.H. & Petes, T.D. (1991). Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 7585–7589.

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.

Schuster, A. & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 787–799. doi:10.1007/s00253-010-2632-1

Schuster, M. & Kahmann, R. (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 130, 43–53.

Schuster, M., Schweizer, G., Reissmann, S. & Kahmann, R. (2016). Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genet Biol*, 89, 3–9.

Schwer, B., Kruchten, J., & Shuman, S. (2016). Structure-function analysis and genetic interactions of the SmG, SmE, and SmF subunits of the yeast Sm protein ring. *RNA* 22(9), 1320–1328. doi:10.1261/rna.057448.116

Shafique, S., Bajwa, R. and Shafique, S. (2011). Strain improvement in *Trichoderma viride* through mutation for overexpression of cellulase and characterization of mutants using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *African Journal of Biotechnology* 10, 19590-19597.

Sharma, R.C. & Schimke, R.T. (1996). Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques*, 20(1), 42–44. doi:10.2144/96201bm08

Shi, T.Q., Liu, G.N., Ji, R.Y., Shi, Y., Song, P., Ren, L.J., Huang, H. & Ji, X.J. (2017). CRISPR/Cas9-based genome editing of the filamentous fungi: the state of the art. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 101, 7435–7443.

Shi, Z. & Leung, H. (1995). Genetic analysis of sporulation in *Magnaporthe grisea* sporulation by chemical and insertional mutagenesis. *Mol Plant-Microbe Inter*, 8(6), 949–958.

Shoresh, M., Harman, G.E. & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 21–43.

Steiger, M.G., Vitikainen, M., Uskonen, P., Brunner, K., Adam, G., Pakula, T., Penttilä, M., Markku, Saloheimo, Mach, R.L. & Mach-Aigner, A.R. (2011). Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Applied and environmental microbiology*, 77(1), 114–121. doi:10.1128/AEM.02100-10

Suzuki, M., Hayashi, H., Mizuki, T., Maekawa, T. & Morimoto, H. (2016). Efficient DNA ligation by selective heating of DNA ligase with a radio frequency alternating magnetic field. *Biochemistry and biophysics reports*, 8, 360–364. doi:10.1016/j.bbrep.2016.10.006

Symington, L.S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(4), 630–670. doi:10.1128/mmr.66.4.630-670.2002

Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R., Bauer, C. & Gasser, S.M. (2004). Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *The EMBO Journal*, 23, 1301–1312.

Thompson, C. E., Freitas, L. B., & Salzano, F. M. (2018). Molecular evolution and functional divergence of alcohol dehydrogenases in animals, fungi and plants. *Genet. Mol. Biol.* 41:341–354. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2017-0047

Thomson J.M., Gaucher E.A., Burgan M.F., De Kee D.W., Li T., Aris J.P., Benner S.A. (2005). Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast. *Nat Genet.* 37:630–635.

Tisch, D. & Schmol, M. (2009). Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 1259–1277.

Topcu, Z. (2000). An optimized recipe for cloning of the polymerase chain reaction-amplified DNA inserts into plasmid vectors. *Acta Biochimica Polonica*, 47, 841-846.

Van den Bosch, R., P.S. Messenger, & A.P. Gutierrez. 1982. An introduction to biological control. Plenum Press, New York and London. 247.

Van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991). En Peberdy, J.F., Caten, C.E., Ogden, J.E. & Bennett, J.W. (eds), *Applied Molecular Genetics of Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1–28.

Vargas, W.A., Mandawe, J.C. & Kenerley, C.M. (2009). Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiol*, 151, 792–808.

Verma, M., Brar, S.K., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. & Valéro, J.R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma spp.*: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 1-20.

Viterbo, A. & Horwitz, B. A. (2010). Mycoparasitism. *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, 42, 676–693.

Wang, D., He, D., Li, G., Gao, S., Lv, H., Shan, Q. & Wang, L. (2014). An efficient tool for random insertional mutagenesis: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus*. *Journal of Microbiological Methods*, 98, 114–118.

Wang, J.Y. & Li, H.Y. (2008). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 9(10), 823–828.

Wang, Q., Cobine, P.A. & Coleman, J.J. (2018). Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Fungal Genet Biol*, 117, 21–29.

Wang, S., Chen, H., Tang, X., Zhang, H., Chen, W. & Chen, Y.Q. (2017). Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(22), 8063–8075. doi:10.1007/s00253-017-8486-z

Weindling, R. (1932). *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22, 837-845.

Wenderoth, M., Pinecker, C., Voss, B. & Fischer, R. (2017). Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genet Biol*, 101, 55–60.

Wu, C. J., Li, C. W., and Cui, C. B. (2014) Seven new and two known lipopeptides as well as five known polyketides: the activated production of silent metabolites in a marine-derived fungus by chemical mutagenesis strategy using diethyl sulphate, *Mar. Drugs* 12, 1815-1838.

Xu, C., Zhang, X., Qian, Y., Chen, X., Liu, R., Zeng, G., Zhao, H. & Fang, W. (2014). A high-throughput gene disruption methodology for the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. PloS one, 9(9). doi:10.1371/journal.pone.0107657

Xu, J., He, M.M., Mo, M.H., Huang, X.W. & Zhang, K.Q. (2005). Transformation and mutagenesis of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium sphaeroides* by restriction enzyme mediated integration (REMI). J Microbiol, 43(5), 417–423.

Yamagishi, K., Sugiyama M., Kaneko Y., Nishizawa M. & Harashima S. (2008). Construction and characterization of single-gene chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biosci Bioeng, 106, 563–567.

Yedidia, I., Benhamou, N. & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Appl Environ Microbiol, 65, 1061–1070.

Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y. & Chet, I., (2003). Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. Applied and Environmental Microbiology, 69, 7343-7353.

Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y. & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant Soil, 235, 235–242.

Zhang, J., Mao, Z., Xue, W., Li, Y., Tang, G., Wang, A., Zhang, Y. & Wang, H. (2011). Ku80 gene is related to non-homologous end-joining and genome stability in *Aspergillus niger*. Curr Microbiol, 62, 1342–1346. doi:10.1007/s00284-010-9853-5.

Zhang, Y., Hefferin, M.L., Chen, L., Shim, E.Y., Tseng, H.M., Kwon, Y., Sung, P., Lee, S.E. & Tomkinson, A.E. (2007). Role of Dnl4-Lif1 in nonhomologous end-joining repair complex assembly and suppression of homologous recombination. Nat Struct Mol Biol, 14, 639–646. doi:10.1038/nsmb1261.

Zhong, Y.H., Wang, X.L., Wang, T.H. & Jiang, Q. (2007). Agrobacterium-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. Appl Microbiol Biotechnol, 73, 1348–1354.

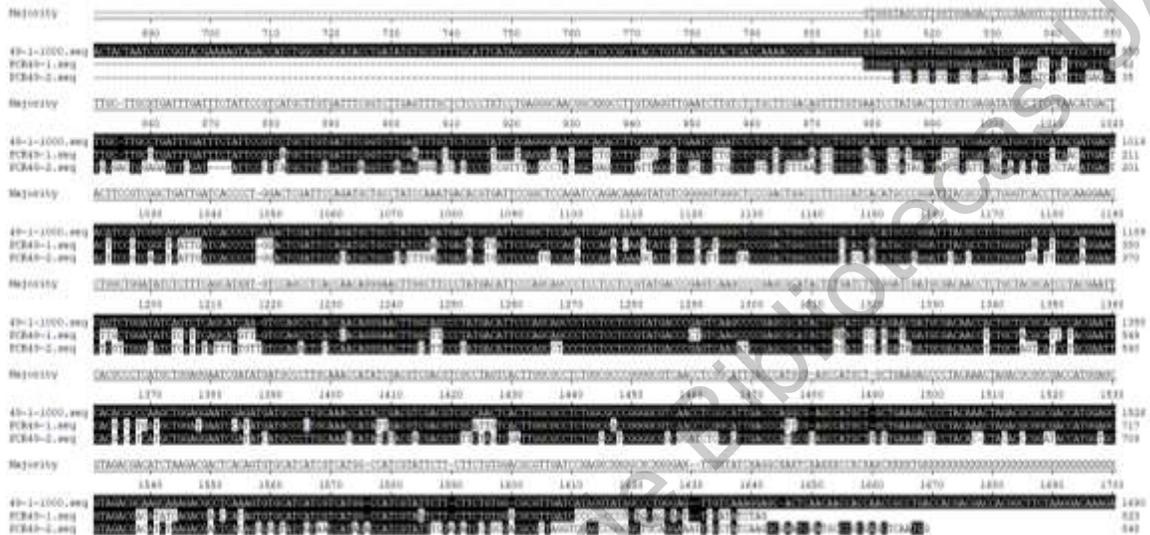
Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J., Farrand, S.K. & Winans, S.C. (2000). The bases of crown gall tumorigenesis. *J Bacteriol*, 182, 3885–3895.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

12. Anexo

Alineamientos

49-2



640-1



