

MARÍA GUADALUPE HERNÁNDEZ BAJONERO

PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA ADAPTADORA STE50
Y LA MAPKK STE7 EN TRICHODERMA ATROVIRIDE

2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA
ADAPTADORA STE50 Y LA MAPKK STE7
EN *Trichoderma atroviride***

TESIS INDIVIDUAL

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE HERNÁNDEZ
BAJONERO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

Junio, 2020



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales



Participación de la proteína adaptadora *Ste50* y la MAPKK *Ste7* en *Trichoderma atroviride*

Tesis Individual

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

Presenta:

María Guadalupe Hernández Bajonero

Dirigido por:

Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Edgardo Ulises Esquivel Naranjo

Presidente

Firma

Gabriela Calcáneo Hernández

Secretario

Firma

Fidel Landeros Jaime

Vocal

Firma

Fausto Arellano Carbajal

Vocal

Firma

José Antonio Cervantes Chávez

Vocal

Firma

Centro Universitario Querétaro, Qro.

Junio, 2020

México

RESUMEN

Las células eucariotas responden a los estímulos ambientales a través de vías de señalización de la Proteína Quinasas Activadas por Mitógeno (MAPKs) formadas por módulos de al menos tres quinasas de proteínas: la MAP3K, la MAP2K y la MAPK. En *Trichoderma atroviride* se han estudiado las tres MAPKs anotadas en su genoma como Tmk1, Tmk2 y Tmk3. Estas regulan respuestas a estrés celular, metabolismo, crecimiento y reproducción asexual inducida por luz azul y daño mecánico. Sin embargo, en *T. atroviride* aún no se ha determinado los módulos que constituyen las cascadas de señalización río arriba de estas MAPKs (Wang et al., 2013).

En *T. atroviride*, la MAP3K Ste11 regula específicamente las respuestas al estrés, crecimiento y al daño mecánico, sugiriendo que es un componente específico de la vía de señalización de la MAPK Tmk1. Sin embargo, no se ha establecido la participación de la MAP2K Ste7 y la proteína adaptadora Ste50 que interacciona con la MAP3k Ste11 en esta vía de señalización. Con el objetivo de definir más componentes de la MAPK Tmk1, la región codificante de los genes *ste7* y *ste50* fueron reemplazados por el marcador de resistencia a higromicina B, usando la estrategia de PCR doble unión. Transformantes resistentes a higromicina B fueron seleccionados por seis cultivos monospóricos y el reemplazo de los genes fue determinado por PCR. Las mutantes $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ fueron sometidas a diferentes tipos de estrés celular tanto en micelio como en conidio, donde se observó que ambas mutantes fueron tan sensibles como las cepas $\Delta tmk1$ y $\Delta ste11$ al rojo Congo y a diferentes tipos de estrés celular como el osmótico, altas concentraciones de cadmio y estrés oxidativo inducido por menadiona. De igual manera, la reproducción asexual estimulada por daño mecánico fue afectada en las cepas $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ similar a las cepas $\Delta tmk1$ y $\Delta ste11$. Los resultados sugieren que la MAP2K Ste7 y la proteína adaptadora Ste50 pertenecen a la vía de señalización de la MAPK Tmk1, debido a que los fenotipos de las mutantes son idénticos a los descritos para Tmk1 y Ste11. En conclusión, nuestros resultados genéticos nos permiten proponer que, la cascada de señalización está constituida por la MAP3K Ste11, la proteína adaptadora Ste50, la MAP2K Ste7 y la MAPK Tmk1 en *T. atroviride*.

(**Palabras clave:** *Trichoderma atroviride*, MAPK, señalización, estrés, daño)

SUMMARY

Eukaryotic cells respond to environmental stimuli through MAPK signaling which consist of three modules: MAP3K, MAP2K, and MAPK. *Trichoderma atroviride* has three annotated MAPKs named Tmk1, Tmk2 and Tmk3, which regulate cellular stress responses, metabolism, growth, asexual reproduction induced by blue light, and mechanical damage. However, in *T. atroviride* the upstream elements of the three MAPK pathways have not yet been identified.

In *T. atroviride*, MAP3K Ste11 regulates responses to stress, growth, and mechanical damage, suggesting that it is a specific component of the Tmk1 MAPK signaling pathway. However, the involvement of MAP2K Ste7 and the Ste50 adaptor protein which might interact with MAP3k Ste11 in this signaling pathway has not yet been established. In order to identify more elements of the Tmk1 MAPK signaling pathway, the coding region of the *ste7* and *ste50* genes were replaced by the hygromycin B resistance marker, using the double-binding PCR strategy. Hygromycin B-resistant transformants were selected by six monosporic cultures, and the gene replacement was determined by PCR. The $\Delta ste7$ and $\Delta ste50$ mutants were subjected to different types of cellular stress in mycelium and conidia, where it was observed that both mutants were extremely sensitive to Congo red, and to different types of cellular stress such as osmotic, cadmium and menadione-induced oxidative stress, similar to $\Delta tmk1$ and $\Delta ste11$ strains. Likewise, asexual reproduction stimulated by mechanical damage was affected in $\Delta ste7$ and $\Delta ste50$ strains. The results suggest that MAP2K Ste7 and the Ste50 adaptor protein belong to the MAPK Tmk1 signaling pathway, since the phenotypes of the mutants are identical to those described for Tmk1 and Ste11. In conclusion, our genetic results allow us to propose that the Tmk1 MAPK signaling pathway of *T. atroviride* is composed of MAP3K Ste11, the Ste50 adaptor protein, MAP2K Ste7, and MAPK Tmk1

DEDICATORIAS

Principalmente a Dios que me permitió lograr esta meta tan esperada y que siempre me he refugiado en él, en los momentos más difíciles.

También quiero dedicarle esta tesis a mi padre (Francisco Hernández Galindo), que siempre me apoyo durante mi carrera, pero jamás pensé que te perdería tan rápidamente; y todo cambió, tuve que aprender de la forma menos esperada, la vida da muchas vueltas.

Una de ellas es que tu misión a nuestro lado había terminado. Te marchaste dejando muchos pendientes como la próxima comida en la que compartiríamos nuestras charlas, el siguiente abrazo en donde encontraría refugio, el consejo que me ayudaría a continuar mi camino e incluso el último regaño.

Pero, sobre todo, quedó pendiente aquella despedida en donde te daría gracias por cada gesto y cada momento sin importar que tan bueno o amargo fuera, y donde te diría cuánto te amé y te extrañaré siempre.

Por eso hoy escribo esto que tal vez no sirva de mucho pues ya no me acompañas para decírtelo de frente, pero me ayudará a decírtelo a tu alma que siempre me acompaña. Perderte ha sido lo más difícil que me ha pasado; he tenido que aprender a sobrevivir con tu ausencia, sin esperar tu llegada en Navidad o en año nuevo; compartir mis logros con otros; darme cuenta que ser más fuerte cada día no es simple.

No ha sido tarea fácil pero poco a poco lo voy logrando, aunque el camino no parece terminar. En últimas fechas he tenido que hacerme a la idea de que no estarás el día de mi graduación para bailar conmigo, ni caminaré de tu brazo, no te podré invitar a comer a mi nueva casa ni verás crecer a mis hijos.

Aunque todo esto duele, he decidido hacerlo a un lado y recordarte justo como hubieras querido: lleno de alegría y entusiasmo por la vida, pero sobre todo con agradecimiento, porque a pesar de que el tiempo nos ganó, siempre disfruté de tu compañía.

Fuiste un padre único: junto a mamá me enseñaste a crecer; a saber, que quien te ama te respeta y lo demuestra; que la familia es lo más importante en este mundo; que no debo despegar los pies de la tierra y crecer en humildad; y siempre ser una persona íntegra y sobre todo, me enseñaste a vivir.

En verdad son muchas las cosas que tengo que decirte, pero sé muy bien que tú ya las conoces, por lo tanto, sólo me queda agradecerte por convertirme en quien soy, por todo ese amor y seguridad que me brindaste. Siempre te llevaré en mi mente y corazón, te amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo por haberme aceptado en su equipo Trichoderma y apoyado, por su enorme paciencia hacia mi persona y sobre todo por su confianza.

También agradezco a mis asesores, M. en C. Gabriela Calcáneo Hernández, Dr. José Antonio Cervantes Chávez y Dr. Fausto Arellano Carbajal por haber aceptado ser parte de mi comité, por su tiempo, su apoyo y observaciones.

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

A Cecy que durante todo el tiempo siempre me ayudo y por todas las enseñanzas, gracias por tu paciencia, tiempo y observaciones.

A mi familia que me han apoyado tanto, y que siempre me han alentado para seguir con este proyecto, a mi mamá que siempre me ha dado tanto y demostrado que, si se puede, a mis hermanos y a todos y cada uno de los que me han ayudado en esta etapa.

A mis hijos Axel Francesco y Gian Israel que siempre han estado ahí y que por ellos eh luchado por culminar esta etapa.

Gracias a Francisco Hernández Galindo que me apoyo siempre y a todos y cada uno de los que se cruzaron en mi camino durante esta etapa y creyeron en mí.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

“En algún lugar, algo increíble está esperando ser conocido”.
Carl Sagan

“Las grandes mentes discuten las ideas; las mentes promedio discuten los acontecimientos; las mentes pequeñas discuten con las personas”
Eleanor Roosevelt

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	3
SUMMARY	4
DEDICATORIAS	5
AGRADECIMIENTOS	6
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	10
I. INTRODUCCIÓN	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA	12
II.1 EL GÉNERO <i>TRICHODERMA</i>	12
II.2 <i>TRICHODERMA</i> COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO	13
II.3 FACTORES QUE REGULAN LA REPRODUCCIÓN ASEJUAL DE <i>TRICHODERMA</i>	14
II.4 COMPONENTES DE LOS MÓDULOS MAPK	14
II.5 LA VÍA DE LA MAPK KSS1/FUS3 EN HONGOS	16
II.6 LA VÍA DE LA MAPK SLT2 EN HONGOS	18
II.7. LA VÍA DE LA MAPK HOG1 EN HONGOS	18
III. JUSTIFICACION	20
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	20
V.1 OBJETIVO GENERAL	20
V.2 OBJETIVOS PARTICULARES	20
VI. METODOLOGÍA	20
VI.1 CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	20
VI.2 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LA MAP2K STE7 Y LA PROTEÍNA ADAPTADORA STE50 DE <i>T. ATROVIRIDE</i>	21

<u>VI.3 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA ELIMINACIÓN DE LOS GENES STE7 Y STE50.</u>	<u>21</u>
VI.4 EXTRACCIÓN DE ADN.....	23
VI.5 CONSTRUCCIÓN DE UN CASETE PARA LA ELIMINACIÓN DE LOS GENES STE7 Y STE50.....	23
VI.6 TRANSFORMACIÓN DE <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i> MEDIANTE LA TÉCNICA DE POLIETILENGLICOL- CaCl_2	25
VI.7 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS MUTANTES CARENTES DE LOS GENES STE50 Y STE7 EN <i>T. ATROVIRIDE</i>	26
VI.8 ENSAYOS DE TOLERANCIA AL ESTRÉS OSMÓTICO.....	26
VI.9 ANÁLISIS DE TOXICIDAD POR CADMIO.....	27
VI. 10 ENSAYO DE INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR.....	27
VI.11 ANÁLISIS DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	27
VI. 12 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS ESTIMULADA POR UN PULSO DE LUZ AZUL.....	27
VI.13 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS ESTIMULADA POR DAÑO MECÁNICO	28
<u>VII. RESULTADOS.....</u>	<u>28</u>
VII.1 ANÁLISIS IN SILICO DE LA PROTEÍNA STE7 Y STE50 DE LA VÍA MAPK TMK1 DE <i>T. ATROVIRIDE</i>	28
VII.2 GENERACIÓN DE UN CASETE PARA ELIMINAR LOS GENES STE7 Y STE50 DE <i>T. ATROVIRIDE</i>	29
VII.3 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS MUTANTES CARENTES DE LOS GENES STE50 Y STE7 EN <i>T. ATROVIRIDE</i>	30
VII.4 LAS CEPAS MUTANTES CARENTES EN LOS GENES STE7 Y STE50 SON SENSIBLES AL ESTRÉS OSMÓTICO	31
VII.5 ANÁLISIS DE TOXICIDAD POR CADMIO	33
VII.6 ENSAYO DE INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR	34
VII.7 ANÁLISIS DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	35
VII.8 ENSAYOS DE DAÑO MECÁNICO Y PULSO DE LUZ AZUL	36
<u>VIII. DISCUSIÓN.....</u>	<u>37</u>
<u>IX. CONCLUSIONES.....</u>	<u>39</u>
<u>X. PERSPECTIVAS.....</u>	<u>39</u>
<u>XI. BIBLIOGRAFIA</u>	<u>39</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Representación esquemática de una cascada de MAPK.</i>	15
<i>Figura 2. Vías de MAPKs en S. cerevisiae.</i>	17
<i>Figura 3. Mecanismo regulador general de vía de señalización HOG en hongos.</i>	19
<i>Figura 4. Esquema de la técnica de PCR doble unión para crear el casete de eliminación de los genes ste50 y ste7.</i>	25
<i>Figura 5. Análisis in silico de la proteína ste7 y ste50.</i>	29
<i>Figura 6. Identificación del reemplazo del gen ste50 por el marcador de selección.</i>	30
<i>Figura 7. Identificación del reemplazo del gen ste7 por el marcador de selección.</i>	31
<i>Figura 8. Tolerancia a estrés osmótico.</i>	32
<i>Figura 9. Tolerancia a la toxicidad por cadmio.</i>	33
<i>Figura 10. Análisis de la integridad de la pared celular.</i>	35
<i>Figura 11. Análisis de estrés oxidativo provocado con menadiona.</i>	36
<i>Figura 12. Conidación inducida por daño mecánico y luz azul Daño.</i>	37

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ADNc: ADN complementario

h: Horas

l: Litros

μ: Micro

min: Minutos

M: Molar

ORF: Marco de lectura abierto

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

rpm: Revoluciones por minuto

s: Segundos

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. INTRODUCCIÓN

Trichoderma atroviride es un hongo ascomiceto filamentoso, encontrado comúnmente en el suelo y de gran importancia para la biotecnología, ya que es usado para la protección de los sistemas de producción agrícola contra las enfermedades provocadas por los hongos fitopatógenos. Los principales mecanismos para el control de fitopatógenos es mediante la competencia por nutrientes, antibiosis y el micoparasitismo (Estrella and Chet, 1998). Además, *Trichoderma* se establece en el sistema radicular de las plantas, favoreciendo la adquisición de nutrientes, y estimulando sistemas de defensa sistémicos (Harman et al., 2004). Así, las plantas tratadas con *Trichoderma* son menos susceptibles al ataque de patógenos, mejoran los rendimientos de las cosechas y se mejora la calidad de los ecosistemas al reducir la aplicación deliberada de agroquímicos en los sistemas agrícolas.

La aplicación de *Trichoderma* en campo para el bioncontrol, es a base de esporas asexuales (conidia). La conidación es regulado por factores relacionados con el estrés celular como limitación de nutrientes, pH, estrés oxidativo, luz y daño mecánico, mismas que, a su vez, son reguladas principalmente por las vías de señalización de proteínas Quinasas Activadas por Mitógeno (MAPKs) (Wang et al., 2013; Medina-Castellanos et al., 2014; Esquivel-Naranjo et al., 2016).

En el genoma de *Trichoderma* se han identificado tres MAPK llamadas Tmk1, Tmk2 y Tmk3 y se ha demostrado que participan en regular respuesta a estrés celular, a la luz y a el daño mecánico (Wang et al., 2013; Medina-Castellanos et al., 2014; Calcáneo Hernández, 2016; Esquivel-Naranjo et al., 2016). Sin embargo, se desconoce los elementos que componen las cascadas de señalización río arriba de las MAPKs. En este trabajo determinamos los componentes de señalización de la MAPK Tmk1, el cual regula respuestas al estrés osmótico, oxidativo, a la toxicidad por cadmio, la integridad de la pared celular y el daño mecánico.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1 El género *Trichoderma*

La primera descripción del género *Trichoderma* se remonta a 1794 y en 1865 se sugirió un vínculo con el estado sexual (teleomorfo) de una especie de *Hypocrea*. Las especies del género *Trichoderma* son hongos Ascomicetos encontrados comúnmente en el suelo con distribución cosmopolita. Han sido estudiados con respecto a diversas características y aplicaciones de importancia biotecnológica y son conocidos como colonizadores exitosos de sus hábitats, compitiendo eficientemente contra sus competidores (Schuster and Schmoll, 2010).

Las esporas asexuales (conidia) son comúnmente pigmentadas de color verde, aunque también hay especies que producen conidia albina. Los conidióforos pueden aparecer como ramas emparejadas que asumen un aspecto piramidal, terminando en fialides que producen los conidios en la parte apical. Los conidios de la mayoría de las especies de *Trichoderma* tienen menos de 5 µm de largo y ancho, y pueden ser globosos, subglobosos, elipsoidales u oblongos. La pigmentación conidial varía de verde intenso a casi gris, y la ornamentación puede ser lisa, verrugosa o tuberculosa, y es un criterio de clasificación de especies (Samuels, 1996).

II.2 *Trichoderma* como agente de control biológico.

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso, conocido desde 1930 como agente de control biológico en plantas, ya que, gracias a la combinación sinérgica de diferentes mecanismos tales como la competencia por nutrientes, la formación de estructuras de infección especializadas (enrollamiento), la producción de enzimas hidrolíticas, la secreción de metabolitos antifúngicos y la inducción de respuestas de defensa en las plantas, contribuye al control de las enfermedades vegetales (Reithner et al., 2007).

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso cosmopolita usado comercialmente en la agricultura como agente de control biológico contra una gran variedad de hongos fitopatógenos, por lo que proporciona una alternativa al uso de pesticidas (May, 2019). Los mecanismos que *Trichoderma* usa para antagonizar con los hongos fitopatógenos incluyen la competencia, colonización, antibiosis y micoparasitismo (Waghunde et al., 2016). Además de la actividad de biocontrol de algunas especies de *Trichoderma*, también induce la resistencia sistémica a enfermedades en la planta, a estrés bióticos y abióticos, tales como el déficit de agua, sal y temperatura (Harman, 2011).

El micoparasitismo es un mecanismo directo para el control biológico en el cual *Trichoderma* detecta al fitopatógeno lo coloniza y crece sobre él. La capacidad de micoparasitar a otros hongos ha sido ampliamente utilizada para el control biológico de plagas agrícolas (principalmente contra patógenos y nemátodos parásitos). Los hongos micoparásitos son capaces de matar directamente a los patógenos y otros hongos asociados a las plantas, con un rango de huéspedes más amplio en diversos ecosistemas (Nusaibah and Musa, 2019).

Además, *Trichoderma* tiene un gran potencial para movilizar y utilizar los nutrientes del suelo, haciéndolo más eficiente y competitivo que muchos otros microorganismos del suelo (hongos y bacterias). Este proceso podría estar relacionado con la producción de ácidos inorgánicos, a saber, ácidos cítrico, glucónico y fumárico que disminuyen el pH del suelo y aumentan la solubilización de fosfato y micronutrientes (hierro y manganeso), por lo tanto *Trichoderma* combina diferentes mecanismos para el control de hongos fitopatógenos (Nusaibah and Musa, 2019).

II.3 Factores que regulan la reproducción asexual de *Trichoderma*

Las especies de *Trichoderma* a menudo son un componente predominante de la micoflora en suelos nativos y agrícolas (Herrera-Estrella and Chet, 2003). Su mecanismo principal para la supervivencia y la dispersión es a través de la producción de conidia. Considerando que la comercialización de estos hongos como agentes de control biológico es a base de formulaciones de conidia, es de gran importancia comprender los factores que controlan este cambio morfogénico del crecimiento vegetativo a la reproducción asexual (Carreras-Villaseñor et al., 2012).

En *Trichoderma*, la transición del micelio fúngico a la espora está regulado por diversas señales relacionadas con estrés, las cuales incluyen la limitación de carbono o nitrógeno, estrés oxidativo, pH ambiental, calcio extracelular, daño físico al micelio y la luz (Carreras-Villaseñor et al., 2012).

De manera similar a lo que sucede en la fotoconidiación, se ha demostrado que el daño físico al micelio también induce conidiación en múltiples especies de *Trichoderma*, y se ha observado que, tanto el nitrógeno como el carbono (nutriente), el pH ambiental tiene un efecto sobre la conidicación inducida por la lesión micelial (Steyaert et al., 2010). Cuando se dañan las hifas fúngicas, el poro septal más cercano al punto de la lesión se sella para evitar una fuga citoplasmática excesiva, se generan nuevas puntas hifales a partir de esta posición, lo que resulta en la regeneración, el reinicio del crecimiento y culmina con la producción de conidia (Medina-Castellanos et al., 2018). *Trichoderma atroviride* responde a la lesión micelial regenerando rápidamente sus hifas y desarrollando estructuras reproductivas asexuales (conidios) de una manera dependiente de NADPH oxidasa. Curiosamente, la aplicación de capacidad de detectar ATP extracelular (eATP) también induce conidiación. Al igual que otros eucariotas multicelulares, este hongo parece percibir eATP, a través de un receptor aún no identificado, que desencadena la activación de las MAPK Tmk1 y Tmk3. Tmk1 regula regeneración de hifas por un mecanismo independiente de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la NADPH oxidasa (Medina-Castellanos et al., 2018).

II.4 Componentes de los módulos de MAPK

El desarrollo y la supervivencia de los organismos dependen de su capacidad para percibir estímulos ambientales y transducirlos a través de vías de señalización para generar respuestas específicas, que controlen los procesos celulares necesarios para adaptarse a las condiciones prevalentes. Las cascadas MAPKs son vías de señalización altamente conservadas en animales, plantas y hongos. Están involucradas en la transducción de señales extra e intracelulares. La vía MAPKs comprende una

cascada de transmisión de señales en la que participan tres quinasas: la MAP3K, la MAP2K y MAPK (Fig. 1). La MAPK activa por fosforilación proteínas objetivo involucradas en la regulación de las actividades fisiológicas específicas en respuesta a un estímulo (García and Ruíz, 2005).

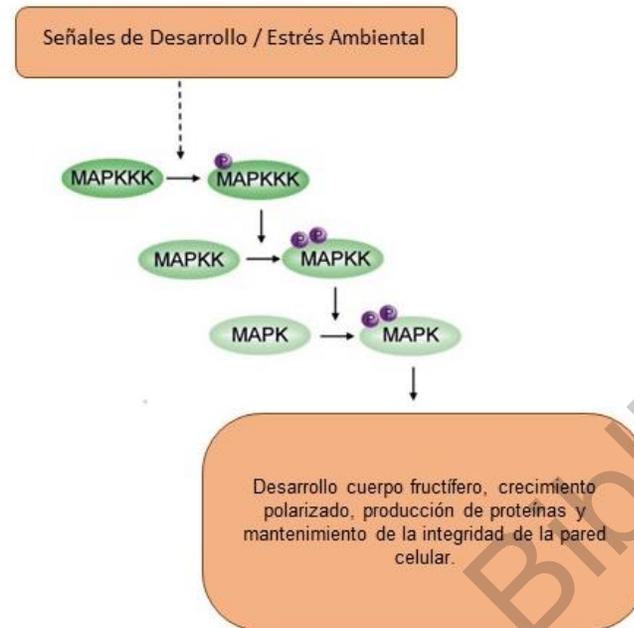


Figura 1. Representación esquemática de una cascada de MAPK.

Las cascadas MAPK está compuesta por tres módulos que involucra tres tipos de quinasas: proteína quinasa quinasa activada por mitógeno (MAP) quinasas quinasas (MAPKKK; también conocidas como MAP3K o MEKK), quinasas quinasas MAP (MKK; también conocidas como MAP2K o MEK) y MAP quinasas (MAPK; también conocido como MPK) y está involucrada en varios procesos (Jagodzik et al., 2018).

La fosforilación de proteínas es un mecanismo general para transducir estímulos y generar respuestas celulares (Laura Kawasaki et al., 2009). Las vías de señalización de MAPKs forma una cascada de eventos de fosforilación para transducir señales, donde una MAPK es activada por otra MAPK quinasa (MAP2K) por medio de una fosforilación dual de los residuos conservados de treonina (Thr) y tirosina (Tyr) en el motivo Thr-Gly-Tyr (TGY) dentro del sitio de activación. Una MAP2K es similarmente activada por una MAPKK quinasa (MAP3K) por fosforilación en los residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) en su sitio de activación (Fig. 1). Este módulo básico que consta de al menos tres proteína quinasas MAP3K, MAP2K y MAPK está altamente conservado entre los eucariotas (Manna and Stocco, 2011).

La investigación más extensa de estas vías se ha realizado en *Saccharomyces cerevisiae*, en la que se han identificado cinco vías MAPK (Fig. 2). Sin embargo, en hongos filamentosos están presentes tres clases principales cascadas de señalización de MAPKs, que son ortólogos a la MAPK Hog1, Slt2

y Kss1/Fus3 de *S. cerevisiae*. Se ha demostrado que estas MAPK funcionan en una variedad de procesos fisiológicos como el desarrollo del cuerpo fructífero, el crecimiento polarizado, la biosíntesis, la conidación, la patogenicidad, la ritmicidad circadiana, respuestas al estrés celular, y mantenimiento de la integridad de la pared celular (Wang et al., 2013).

II.5 La vía de la MAPK Kss1/Fus3 en hongos

La respuesta de apareamiento de la levadura depende de los receptores acoplados a la proteína G (Ste2 y Ste3) que se unen a las feromonas peptídicas afines. Esta unión da como resultado la disociación de la subunidad inhibidora G α Gpa1, de Ste4 y Ste18, que funcionan respectivamente como subunidades estimuladoras G β y G γ . Las subunidades G $\beta\gamma$ liberadas se asocian con la proteína de andamiaje Ste5, y la quinasa activada por p21 (PAK) Ste20, para crear un complejo proteico que activa el Ste11 MAP3K, que es el punto de entrada para activar la cascada de sus objetivos río abajo, la MAP2K Ste7 y las dos MAPK parcialmente redundantes, Kss1 y Fus3. El inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) Far1 y el factor de transcripción (TF) Ste12, que controlan respectivamente la detención del ciclo celular y la expresión de genes necesarios para el apareamiento, son objetivos principales de la vía de respuesta a la feromona (Fig. 2). Muchos componentes de la vía de feromonas, incluidos Ste20, Ste50, Ste11, Ste7, Kss1 y Ste12, también participan en la regulación del crecimiento filamentoso. (Hamel et al., 2012).

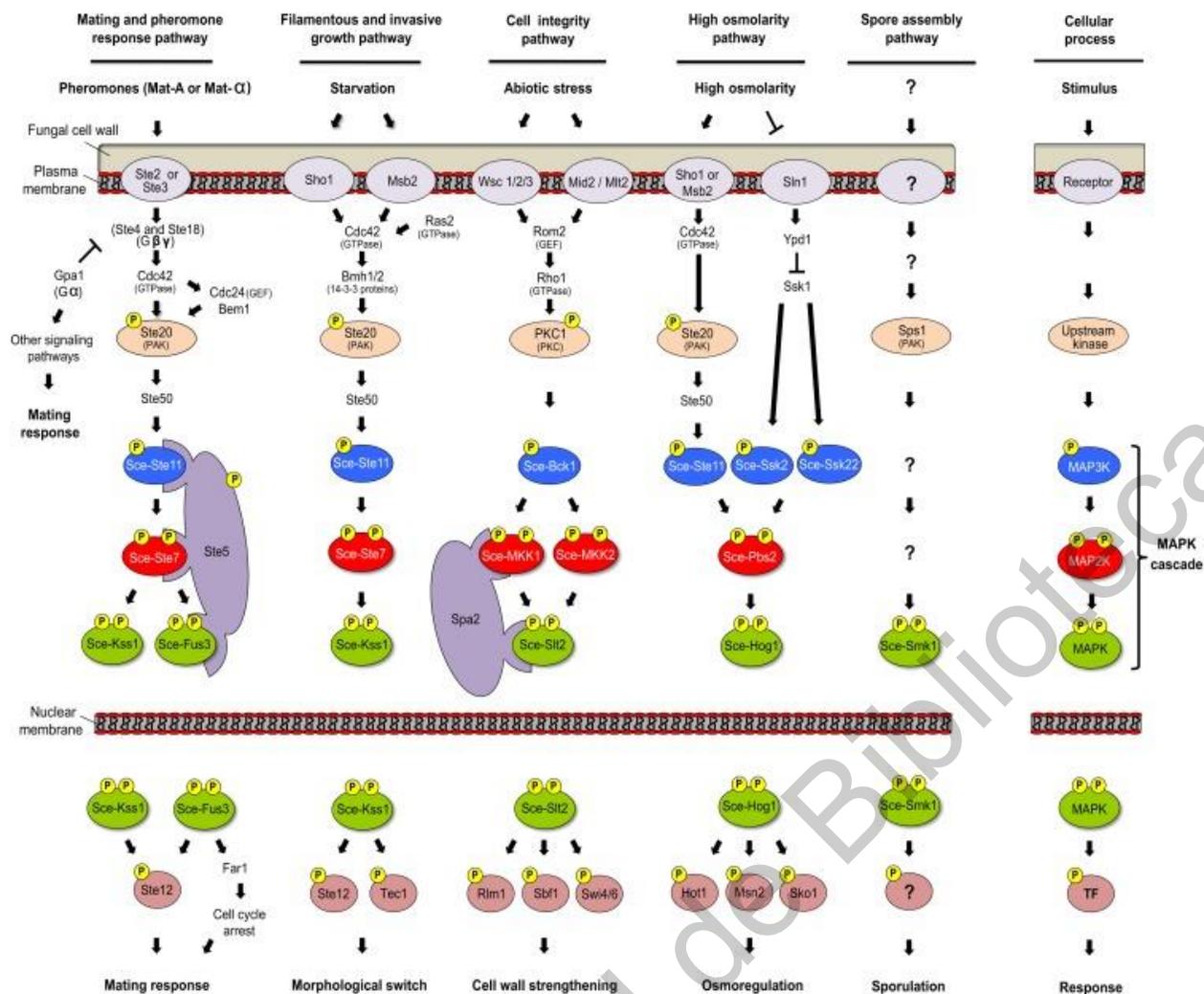


Figura 2. Vías de MAPKs en *S. cerevisiae*.

Las células de levadura dependen de cuatro cascadas MAPK para regular el apareamiento, el crecimiento invasivo, la integridad celular y la alta osmolaridad. La activación de las cascadas de las MAPKs depende de los receptores transmembranales que perciben las señales extracelulares y traducen la información a componentes de señalización intracelular, incluidas las GTPasas, GEFs y PKs. En *S. cerevisiae*, el regulador río arriba pueden compartirse entre distintas vías de señalización, y la activación oportuna de una cascada específica debe estar estrictamente regulada. En algunos casos, la especificidad de señal se logra mediante el uso de proteínas de andamiaje que promueven la interacción entre componentes de señalización de MAPK adecuados (Modificada de Hamel et al., 2012).

En *Saccharomyces cerevisiae* la MAP3K Ste11 sirve como un punto crítico de regulación en la señalización de las MAPKs Fus3, Kss1 y Hog1. Para la activación de la MAP2K por fosforilación, Ste11 debe interactuar con la proteína adaptadora Ste50. Estudios previos han establecido que la interacción del dominio SAM Ste50 con el dominio SAM de Ste11 (MAP3K) es necesaria para la función de Ste11 en tres vías de señalización: respuesta de feromona, regulación del estrés hiperosmótico y crecimiento pseudohifal. La MAP2K Ste7, es específico solo de la vía de Fus3 y Kss1, homólogos a Tmk1. Sin embargo, al igual que otros hongos filamentosos, en *Trichoderma* la MAP3K Ste11 regula respuestas

específicas de la MAPK Tmk1, ortólogo de Kss1 y Fus3 (Calcáneo Hernández, 2016). En este sentido, se ha demostrado que Tmk1 y Ste11 regulan respuestas a estrés osmótico, oxidativo, la toxicidad de metales pesados, sistemas de reparación de ADN y conidiación inducida por daño mecánico (Calcáneo Hernández, 2016). Sin embargo, no se ha determinado la participación de la MAP4K Ste20 y Cla4, la proteína adaptadora Ste50, la MAP2K Ste7 y el factor de transcripción Ste12 en la vía de señalización de la MAPK Tmk1.

II.6 La vía de la MAPK Slt2 en hongos

La vía de señalización de la MAPK Slt2 consta de una cascada de 3 quinasas conformada por la MAP3K Bck1, dos MAP2Ks Mkk1 y Mkk2, y una MAPK Slt2. Esta cascada es parte de la vía de señalización que controla la integridad celular en *S. cerevisiae* mediada por la proteína quinasa C (PKC). Se han identificado varios sensores putativos y elementos río arriba involucrados en la regulación de la actividad PKC1. La vía de la quinasa regula positivamente el crecimiento y la proliferación celular y responde a diferentes señales, incluidas la baja osmolaridad, alta temperatura, feromonas de apareamiento y limitaciones de nutrientes. Levaduras mutantes en la MAPK Slt2 son sensibles a temperaturas elevadas, cafeína y enzimas que degradan la pared celular, además son defectuosas para el crecimiento en medios de baja osmolaridad y pobres en nutrientes (Xu, 2000). En *Alternaria alternata* la vía SLT2 está implicada principalmente en la patogenicidad, invasión, crecimiento vegetativo, conidiación, integridad de la pared celular, anastomosis y respuesta al estrés oxidativo (Yago et al., 2011).

II 7. La vía de la MAPK Hog1 en hongos

La cascada de señalización de la MAPK Hog1 es una ruta bien caracterizada que transmite específicamente señales provocadas por altas concentraciones de osmolitos (Posas and Saito, 1997). La vía del glicerol de alta osmolaridad (HOG) es necesaria para la acumulación de moléculas osmoprotectoras (Dan Yu, 2016), la actividad de la vía HOG regula los canales iónicos, la exportación de glicerol, la progresión del ciclo celular y la maquinaria biosintética de proteínas, al tiempo que induce la transcripción de genes cuyos productos están involucrados en la síntesis de glicerol (Shock et al., 2009).

En levaduras, la vía de Hog1 se compone de dos ramificaciones distintas entre sí; la rama del sistema de fosforrelevo de dos componentes, donde interviene la MAP3K Ssk2 (Suppressor of Sensor Kinase 2) y su parólogo, la MAP3K Ssk22, y la rama de la MAP3K Ste11 (Sterile 11), la cual es activada por el osmosensor Sho1 (Synthetic High Osmolarity-sensitive 1). Ambas ramificaciones convergen en una

sola MAP2K, Pbs2 (Polymyxin B Sensitivity 2), la cual es el activador específico de la MAPK Hog1 (Hernández, 2016).

El mecanismo regulador general de la vía HOG se ilustra en la Fig. 2 y 3 basado principalmente en datos de *S. cerevisiae* (Hohmann, 2002). En hongos, las MAP3K (Ssk2 y Ssk22 en *S. cerevisiae*) en el módulo Hog1 MAPK son activados por el sistema de dos componentes, que incluyen sensores histidina quinasas híbridas, la proteína HPt y reguladores de respuesta (Bahn, 2008).

Los reguladores de respuesta activados (fosforilados o desfosforilados) pueden interactuar con el dominio autoinhibidor (AID) de los MAP3K Ssk2 o Ssk22, que libera y expone el Ser / Thr KD para la autofosforilación del residuo Thr conservado en el MAP3K. Posteriormente, una MAP3K similar a Ssk2 activada fosforila los residuos Ser y Thr conservados de la MAPKK similar a Pbs2 mediante la unión al dominio de unión Ssk2 / Ssk22 (SBD). La MAPKK similar a Pbs2 activada, a su vez, fosforila doblemente los residuos Thr y Tyr en el motivo TGY de la MAPK similar a Hog1, que se conserva evolutivamente de las levaduras a los humanos. En el caso del estrés hiperosmótico, los genes que codifican enzimas que juegan un papel clave en la producción de glicerol, como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Gpd1 y Gpd2) y la glicerol-3-fosfatasa (Gpp1 y Gpp2), se regulan transcripcionalmente para mantener el balance hídrico intracelular. Para la regulación de retroalimentación negativa de la vía HOG tras la adaptación al estrés, MAPKK similar a Hog1 y / o MAPKK similar a Pbs2 se desfosforilan mediante fosfatasas específicas y se exportan fuera del núcleo (Fig. 2 y 3) (Bahn, 2008).

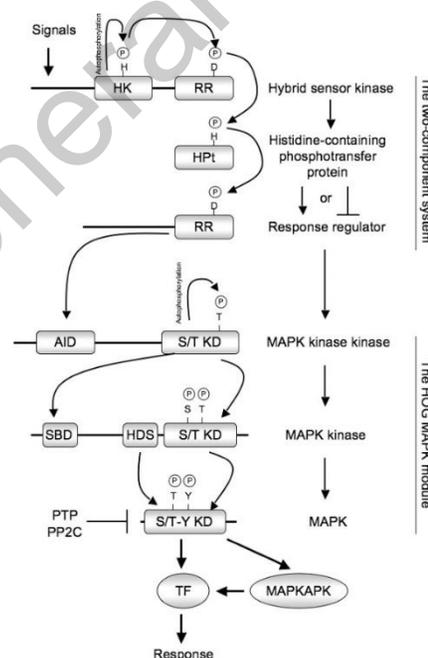


Figura 3. Mecanismo regulador general de vía de señalización HOG en hongos.

Mecanismo regulador general de la vía de señalización HOG en hongos. Abreviaturas: HK, histidina KD; RR, dominio

receptor del regulador de respuesta; S / T quinasa, proteína Ser / Thr KD; SBD, dominio de unión Ssk2 / Ssk22; HDS, sitio de acoplamiento Hog1; S / TY KD, Ser / Thr y Tyr KD de doble proteína (Bahn, 2008).

III. JUSTIFICACION

El estudio de la transducción de señales río arriba de la vía MAPK Tmk1 de *T. atroviride* no se encuentra definida, por lo tanto, es necesario analizar la participación de la proteína adaptadora Ste50 y la MAPKK Ste7 ya que regula la respuesta a apareamiento, el crecimiento invasivo / filamentoso y la osmotolerancia en las respuestas a estrés reguladas por la MAPK Tmk1.

IV. HIPÓTESIS

La MAP2K Ste7 y la proteína adaptadora Ste50 forman parte de la cascada de señalización de la vía de la MAPK Tmk1 en *Trichoderma atroviride*.

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación de la proteína adaptadora Ste50 y la MAP2K Ste7 en las respuestas a estrés reguladas por la MAPK Tmk1 en *T.atroviride*.

V.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener transformantes carentes de los genes *ste50* y *ste7* en *T. atroviride*.
2. Comprobar el reemplazo de los genes *ste50* y *ste7* por el marcador de selección del gen *hph*.
3. Determinar la relación genética en respuesta al estrés (osmótico, cadmio, oxidativo, integridad de la pared celular, daño mecánico y fotoconidación) en las mutantes carentes de los genes *ste50* y *ste7*, y su relación con *tmk1* y *ste11*.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Cepas y condiciones de cultivo

En este trabajo se utilizó la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride* (IMI206040) y las cepas mutantes carentes de los genes *tmk1* y *ste11*(Medina-Castellanos et al., 2014; Calcáneo Hernández, 2016). Las

cepas se propagaron en medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA; DIFCO) y los cultivos se incubaron a 27 °C. Las transformantes se seleccionaron en PDA suplementado con higromicina (100 µg/ml), se cultivaron por seis pases monospóricos y la identificación de mutantes carentes de los genes *ste50* y *ste7* se realizó por PCR.

VI.2 Análisis *in silico* de la MAP2K Ste7 y la proteína adaptadora Ste50 de *T. atroviride*

Para investigar el posible componente de la vía de la MAPK Tmk1 de *T. atroviride*, de la base de datos Protein del NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/protein) se obtuvieron las secuencias de las proteínas Ste50 y Ste7 de *S. cerevisiae* para posteriormente, realizar un BLASTp contra la base de datos del genoma de *T. atroviride* (<http://genome.jgi.doe.gov/Triat2/Triat2.home.html>), siguiendo los siguientes parámetros: Expect Value = 1.0E-5 y usando el filtro de regiones de baja complejidad.

Para conocer los dominios presentes en la secuencia de aminoácidos de las proteínas identificadas, se utilizó el programa SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>), el cual identifica y compara los dominios descritos en otros organismos. Se usaron los siguientes parámetros de búsqueda durante el análisis: homólogos atípicos, dominios PFAM, péptidos señales y repeticiones internas.

Se determinó el peso molecular de cada proteína de *T. atroviride* con el programa EditSeq (DNASTAR, Inc.). Finalmente, se comparó el número de aminoácidos y el peso molecular de las proteínas identificadas de *T. atroviride* con las proteínas que integran las vías de MAPKs de *S. cerevisiae*, tomando la información de cada proteína de la base de datos de *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>).

VI.3 Diseño de oligonucleótidos para la eliminación de los genes *ste7* y *ste50*.

Posterior a la identificación de los genes *ste7* y *ste50* de *T. atroviride*, se obtuvieron las secuencias de nucleótidos de la base de datos del genoma de *T. atroviride*, incluyendo 2000 pares de bases (pb) de las secuencias río arriba y río abajo del marco de lectura.

Se utilizó el programa bioinformático Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) para diseñar cuatro pares de oligonucleótidos (Tabla 1 y 2) con base en la secuencia de nucleótidos obtenida de los genes *ste7* y *ste50* de *T. atroviride*. Además, se usó un par de oligonucleótidos para amplificar el marcador de resistencia a higromicina B, el gen *hph* (Tabla 3).

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos usados para eliminar el gen *ste7*

Pareja	Oligonucleótidos	Secuencia de Nucleótidos 5' - 3'	Secuencia blanco
1	Pste7-F	GGGCACTGGAGCATATAGTCAG	Promotor de ste7
1	PQste7-R	CTCACCTGTTTGCATCTCTACCT GATCGACGTAACTGATATTGAAGGAGCA	Promotor de ste7
2	TQste7-F	CCCAGCACTCGTCCGAGGGCAA GGAATAGATAAGGGAGAATAGCCAAGGGAA	Terminador de ste7
2	Tste7-R	CGAGGCTTCAGACCAAGTGTC	Terminador de ste7
3	N5ste7-F	CATGGATGCACGCTTGTAGAG	Promotor ste7 anidado
3	N3ste7-R	GGCACACTACGAGAAGATCAATC	Promotor ste7 anidado
4	Ste7-F	AGTCATGGCCCGCAAGGTG	ORF de ste7
4	Ste7-R	GTGTCTTTGGCCCGATCCGT	ORF de ste7

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos usados para eliminar el gen *ste50*

Pareja	Oligonucleótidos	Secuencia de Nucleótidos 5' - 3'	Secuencia blanco
1	Pste50-F	GACCGAGGCAAGGGAGAG	Promotor de ste50
1	PQste50-R	CCTGCACGAGAGAACGAACACT GATCGACGTAACTGATATTGAAGGAGC	Promotor de ste50
2	TQste50-F	CCCAGCACTCGTCCGAGGGCAA AGGAATAGAGGCTTCTCAGGAGCCAGAG	Terminador de ste50
2	Tste50-R	GATGTTTGGCTGGCGTCGAG	Terminador de ste50
3	N5ste50-F	GACATGGCCTGCCGCCTG	Promotor ste50 anidado
3	N3ste50-R	CGAGTTACGGAAATGCGGTTC	Promotor ste50 anidado
4	Ste50-F	GACCATCGTCACCGAGTGGAC	ORF de ste50
4	Ste50-R	GCCTCAGAGAAGATATGCTGC	ORF de ste50

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos usados para amplificar el gen *hph*.

Pareja	Oligonucleótidos	Secuencia de Nucleótidos 5' - 3'	Secuencia blanco
1	Hph-F	CAAATCGCCCGCAGAAGCG	Gen <i>hph</i>
2	Hph-R	ACCGCCTGGACGACTAAACC	Gen <i>hph</i>
1	Hyg-F	GATCGACGTTAAGTATGATATTGAAGGAGCA	Gen <i>hph</i>
2	Hyg-R	CCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAG	Gen <i>hph</i>

VI.4 Extracción de ADN

Para extraer el ADN, las cepas se inocularon en medio de cultivo PDA cubiertas con una membrana de celofán y se incubaron 3 días en oscuridad. El micelio se recolectó con la ayuda de una espátula estéril y se depositó en un mortero con nitrógeno líquido (N₂) el cual se utilizó para moler el micelio hasta la obtención de un polvo fino. En un tubo de plástico de 1.5 ml se colocaron 500 µl de micelio al cual se le adicionó 600 µl de solución de extracción con urea. Los tubos se mezclaron en vortex durante 1 min y posteriormente se dejaron incubar durante 30 min a temperatura ambiente, se adicionaron 600 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló en vortex por 10 min. Posteriormente se centrifugó 15 min a 10,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en otro tubo de plástico de 1.5 ml al cual se le adicionaron nuevamente 600 µl de la mezcla de fenol-cloroformo- alcohol isoamílico, y se repitieron los pasos posteriores hasta recuperar el sobrenadante el cual se colocó en un nuevo tubo de plástico. Se precipitó el ADN con la adición de un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión suave hasta la formación de hebras blancas, las cuales se formaron por el ADN genómico. La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante. Para la eliminación de sales se agregaron 500 µl de etanol al 70%, se mezcló en vortex y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla de ácidos nucleicos se dejó secar boca abajo sobre una hoja de papel. Posteriormente, se resuspendió la pastilla de ADN en 80 µl de agua HPLC estéril. Se agregó 1 µl de RNAasa y se incubó durante 20 min a 37 °C. Se analizó la calidad del ADN mediante su separación por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %.

VI.5 Construcción de un casete para la eliminación de los genes *ste7* y *ste50*.

Los genes *ste50* y *ste11* de *T. atroviride* fueron eliminados in vitro de manera independiente por medio de la técnica de PCR de doble unión como se ha descrito previamente (Castellanos et al., 2010)

(Figura 4). Usando oligonucleótidos específicos se amplificaron los extremos 5' (Pste50-f y PQste50-r y Pste7-f y PQste7-r) y 3' (TQste50-f y Tste50-r y TQste7-f y Tste7-r) de los genes *ste50* y *ste7*, respectivamente, excluyendo completamente todo el marco de lectura abierto de cada uno (Tabla 1 y 2). Además, también se amplificó el marcador de selección *hph* usando los oligonucleótidos Hyg-F y Hyg-R (tabla 3), el cual codifica para la higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina.

En un segundo PCR, las regiones 5' y 3' de los genes *ste50* y *ste7* se fusionaron al marcador de selección de resistencia a higromicina, eliminando toda la región codificante de cada gen. Con este propósito, al diseño de los oligonucleótidos quiméricos PQste50-R y TQste50-F así como PQste7-R y TQste7-F, se les adicionó una secuencia complementaria a los extremos 5' y 3' del marcador de selección *hph* (Tabla 3).

Se realizó un tercer PCR usando oligonucleótidos anidados para obtener una mayor especificidad y concentración del producto que se obtuvo al fusionar los fragmentos de ADN en el PCR 2. En las tres reacciones de PCR se utilizó la enzima Taq ADN Polimerasa High Fidelity (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Las condiciones de las reacciones en cadena de la polimerasa fueron: 3 min a 95 °C, 35 ciclos comprendiendo tres pasos de 95 °C por 30 seg, 60 °C por 20 seg y 68 °C durante 1 min/Kb. Las reacciones de PCR se finalizaron a 68 °C por 5 min.

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

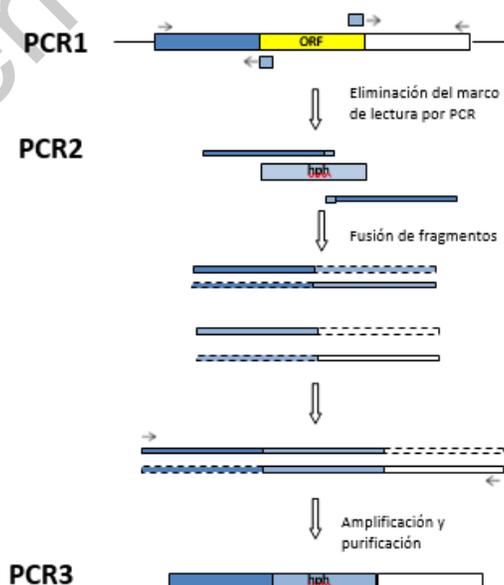


Figura 4. Esquema de la técnica de PCR doble unión para crear el casete de eliminación de los genes *ste50* y *ste7*.

PCR1, se amplificaron los extremos 5' y 3' del gen a interrumpir, así como el gen marcador de selección *hph*. **PCR 2**, se fusionan los fragmentos 5' y 3' con el marcador de selección usando las secuencias de empalme incluidas en los oligonucleótidos quiméricos. **PCR 3**, amplificación del casete para la eliminación del gen de interés, usando los oligonucleótidos anidados.

VI.6 Transformación de *Trichoderma atroviride* mediante la técnica de Polietilenglicol- CaCl_2

Las cepas mutantes carentes de los genes *ste7* y *ste50*, se generaron empleando la técnica de polietilenglicol- CaCl_2 . La transformación se llevó a cabo usando protoplastos obtenidos de germínulas de la cepa WT de *T. atroviride* y la construcción del casete obtenido por PCR para eliminar cada uno de los respectivos genes.

Para obtener las germínulas, se inocularon 1×10^8 conidia de la cepa WT en 100 ml de medio estéril GEYEC (1.5% glucosa, 0.3% extracto de levadura y 0.5% hidrolizado de caseína), incubado a 27°C por 16 horas en agitación orbital constante. Posteriormente se filtraron las germínulas con ayuda de un embudo y tela magitel estéril, se recuperó con una espátula metálica estéril y se pesó 0.2 g, el cual fue colocado en un tubo de plástico estéril de 50 ml con 7 ml de solución osmótica (50 mM CaCl_2 , 0.5 M Manitol y 50 mM MES, con pH 5.5 ajustado con KOH) y 0.1 g de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich). Se agitó vigorosamente en vórtex y se incubó a temperatura ambiente en agitación orbital constante a 120 rpm, hasta observar la formación de protoplastos en el microscopio. Los protoplastos obtenidos fueron filtrados con tela magitel estéril, se lavaron con 3 ml de solución osmótica y se centrifugaron a 8,000 rpm por 10 minutos para su recolección. A continuación, se resuspendieron en un volumen mínimo de solución osmótica y se distribuyeron en tres tubos estériles de 1.5 ml (300 μl en cada tubo). Los tubos 1 y 2 fueron empleados para la transformación de los genes *ste7* y *ste50*, respectivamente y el número 3 fue empleado como control. A los tubos 1 y 2 se les añadió 29.5 μl de solución osmótica, y en seguida 29.5 μl de la construcción del casete para la eliminación de la región codificante del gen correspondiente. Al tercer tubo se le adicionó 59 μl de solución osmótica. Los tres tubos se incubaron por 20 min en hielo y posteriormente se les añadió 359 μl de PEG-8000 (Thermo Scientific) al 40% estéril y precalentado a 42°C. Se mezclaron suavemente por inversión y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, la mezcla de cada uno de los tubos se vertió en tubos de plástico de 15 ml estéril con 10 ml de top agar (PDB, 1 M sorbitol, 0.7% agar bacteriológico), y se mezclaron por inversión suavemente. A continuación, el top agar de los tubos 1 y 2 se vertieron en cajas Petri con medio selectivo (PDA, 100 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina y 1 M de sorbitol). El top agar del tercer tubo Falcón, se vertió

en dos diferentes cajas Petri: en una primera caja con PDA-1 M de sorbitol sin higromicina, como control positivo (para visualizar la viabilidad de los protoplastos) y en una segunda caja con medio selectivo, como control negativo. Finalmente, los cultivos se dejaron incubando a 27°C de 4 a 6 días hasta observar el crecimiento de transformantes.

VI.7 Identificación de cepas mutantes carentes de los genes *ste50* y *ste7* en *T. atroviride*

Las transformantes resistentes a higromicina fueron seleccionadas por seis cultivos monospóricos y las mutantes con reemplazo de los genes *ste50* y *ste7* por doble recombinación homóloga se identificaron por PCR, usando oligonucleótidos específicos para detectar los reemplazos de las regiones codificantes por el marcador de selección *hph*. De forma general, la estrategia consiste en usar oligonucleótidos que flanquean los genes *ste50* y *ste7*, que se combinan con oligonucleótidos específicos para el gen de resistencia a higromicina B, de tal forma que cuando ocurre el reemplazo génico, los oligonucleótidos quedan en fase y amplifican un fragmento del ADN, lo cual no ocurre en la cepa silvestre dado que su genoma no contiene el gen de resistencia a higromicina B. Finalmente, se realizó un PCR usando oligonucleótidos específicos para la región codificante de los genes *ste50* y *ste7*, con el cual se determinó a nivel molecular la carencia de los genes. Las condiciones que se utilizaron son las siguientes por 40 ciclos:

Etapas	Tiempo	Temperatura
1	3min	95°C
2	15seg	95°C
3	15seg	58°C
4	1.8min	68°C
5	3min	68°C
6	∞	4°C

VI.8 Ensayos de tolerancia al estrés osmótico

Para analizar la tolerancia al estrés osmótico en las cepas mutantes y silvestre (WT), gotas con 500 conidios de cada cepa se inocularon sobre PDA adicionado con 0.5% de Tritón para la obtención de colonias compactas y los siguientes osmolitos: KCl (0 y 100 mM) y sorbitol (0 y 200mM). Para probar la tolerancia al estrés osmótico en micelio, discos de micelio de 0.5 cm se inocularon en el centro de placas de PDA con KCl (0, 200, 400 mM) o sorbitol (0, 400 y 600 mM). Posteriormente, los cultivos se incubaron a 27 °C bajo luz blanca constante durante 4 días para el ensayo con micelio y 6 días para

el ensayo en conidia. Los ensayos se realizaron por triplicado.

VI.9 Análisis de toxicidad por cadmio

Para analizar la tolerancia a cadmio se prepararon placas de PDA suplementadas con diferentes concentraciones de CdCl_2 (0, 500 y 1000 μM) más 0.5% Tritón para la obtención de colonias compactas. Los medios fueron inoculados colocando gotas de 5 μl con 500 conidia de cada una de las transformantes. Posteriormente, los cultivos se incubaron durante 6 días a 27°C.

La toxicidad de cadmio en micelio se probó usando discos de micelio de 0.5 cm, los cuales se inocularon en el centro de placas de PDA con cadmio (0, 200, 400 mM). Posteriormente, los cultivos se incubaron a 27 °C bajo luz blanca constante durante 4 días. Los ensayos se realizaron por triplicado.

VI. 10 Ensayo de integridad de la pared celular

Para el análisis de la integridad de la pared celular, gotas con 500 conidia se inocularon en PDA suplementado con 0.5% de Tritón para la obtención de colonias compactas y diferentes concentraciones de Rojo Congo (0, 50, 100, 200, 400 μM). La mitad de los cultivos se incubaron bajo luz blanca y la otra mitad se incubó en obscuridad durante 6 días a 27°C.

Para el ensayo en micelio, discos de micelio de 0.5 cm se inocularon en el centro de placas de PDA con rojo congo (0, 200, 400 mM). Los cultivos se incubaron a 27 °C en una cámara iluminada con luz blanca constante (Luz) u oscuridad (Obs) durante cuatro días. Los ensayos se realizaron por triplicado.

VI.11 Análisis de estrés oxidativo

La tolerancia al estrés oxidativo se analizó en las cepas transformantes inoculando gotas con 500 esporas en PDA suplementado con 0.5% de Tritón para la obtención de colonias compactas y con diferentes concentraciones de menadiona (0, 400, 600, 800 μM). Los cultivos se incubaron durante 6 días a 27°C.

Para analizar el efecto del estrés oxidativo en micelio, discos de micelio de 0.5 cm se inocularon en el centro de placas de PDA con menadiona (0, 400, 800 mM). Los cultivos se incubaron a 27 °C en una cámara iluminada con luz blanca durante cuatro días. Los ensayos se realizaron por triplicado.

VI. 12 Determinación de la producción de conidia estimulada por un pulso de luz azul

Para los ensayos de inducción con luz azul se inocularon placas de PDA con 2 μl de una suspensión de esporas de la cepa WT y las mutantes Δtmk1 , Δste11 , Δste7 y Δste50 . Los cultivos se incubaron a 27 °C por 48 horas en oscuridad. En un cuarto oscuro con luz roja de seguridad se cortaron del frente discos de micelio de 5 mm de diámetro con un sacabocados estéril y se colocaron en la parte central

de las placas de PDA por triplicado, con una diferencia de 8 h entre las cepas $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$, $\Delta ste50$ y la cepa silvestre, para igualar el diámetro de la colonia de todas las cepas. Se dejaron incubando a 27 °C en oscuridad por 38 h. Transcurrido este período, en el cuarto oscuro con luz roja de seguridad, se procedió a aplicar un pulso de luz azul de 5 min ($145.27 \mu\text{moles}\cdot\text{m}^{-2}$) y se incubaron nuevamente por 48 h a 27 °C en oscuridad.

VI.13 Determinación de la producción de conidios estimulada por daño mecánico

A partir de preinóculos de la cepa WT, $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$, $\Delta ste50$, crecidos en placas de PDA a 27 °C por 48 h en oscuridad, se cortaron del frente del crecimiento discos de micelio de 5 mm de diámetro, en un cuarto oscuro con luz roja de seguridad, y se colocaron en la parte central de placas de PDA por triplicado, con una diferencia de 8 h entre las cepas $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$, $\Delta ste50$, y la cepa silvestre. Se incubaron a 27 °C por 38 h en oscuridad. A continuación, en el cuarto oscuro con luz roja de seguridad, se procedió a realizar un corte en el micelio con un molde (para hacer galletas) estéril y se incubaron nuevamente a 27 °C por 48 h en oscuridad para observar la producción de conidios inducida por el daño mecánico.

VII. RESULTADOS

VII.1 Análisis *in silico* de la proteína Ste7 y Ste50 de la vía MAPK Tmk1 de *T. atroviride*

Los módulos de las MAP3K Ste11, MAPKK Ste7 y MAPK Tmk1 son muy conservados en hongos al igual que otros componentes río arriba como Ste50, Ste20, Bem1, Cla4, Cdc42, Cdc24 y Ras1 (Saito and Posas, 2012; Calcáneo-Hernández, 2016). Por homología identificamos los genes que codifican la proteína adaptadora Ste50 (IdV2: 89923) y la MAP2K Ste7 (IdV2: 147751) en el genoma de *T. atroviride*. La proteína Ste7 está constituida por 498 aminoácidos y tiene una identidad del 55.1% con *Neurospora crassa*, 53.1% con *Aspergillus nidulans*, 43.37% con *Saccharomyces cerevisiae*. La MAP2K Ste7 tiene un dominio catalítico S_TKc (Fig. 5), característico de serina/treonina quinasas de proteínas ortólogas que son enzimas que pertenecen a una familia muy extensa que comparten un catalizador conservado serina / treonina y tirosina. La proteína Ste50 está constituida por 488 aminoácidos y tiene una identidad del 63.29% con *Neurospora crassa*, 49.12% con *Aspergillus nidulans*, 43.90% con *Saccharomyces cerevisiae*. La proteína Ste50 tiene el motivo alfa estéril (SAM), que es un módulo de interacción de proteínas putativo presente en una amplia variedad de proteínas y se sugiere que podría tener un papel principal en la unión de ARN y el dominio de asociación con proteínas Ras (RA), que son GTPasas transductoras de señales que alternan entre las formas inactivas unidas a GDP y activas unidas a GTP (Figura 5)

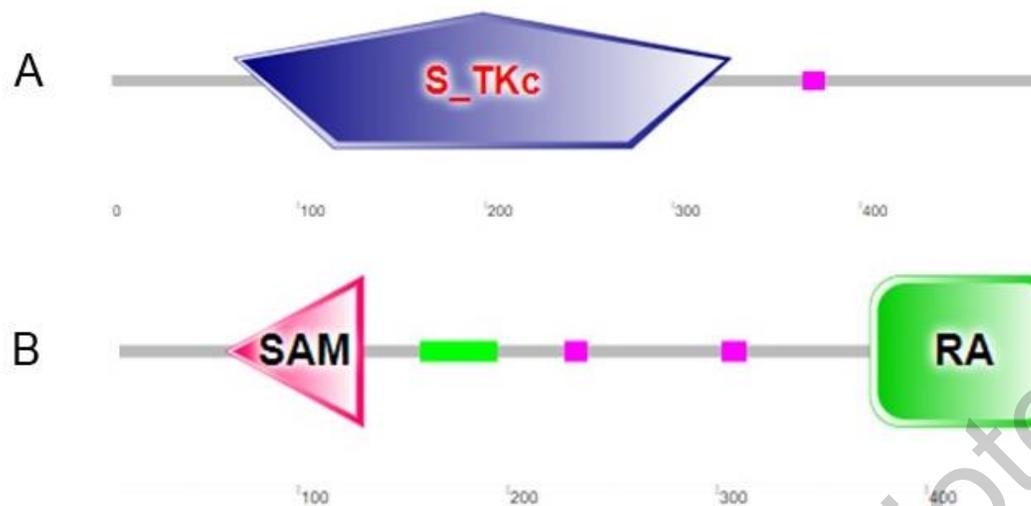


Figura 5. Análisis *in silico* de la proteína *ste7* y *ste50*.

Por medio del programa SMART se identificaron los dominios de aminoácidos que componen a:

(A) la proteína *Ste7*, con un dominio de serina / treonina (S_TKc) proteína quinasa ; (B) *Ste50*, con un motivo alfa estéril (SAM) y el dominio asociación con Ras (RA).

VII.2 Generación de un casete para eliminar los genes *ste7* y *ste50* de *T. atroviride*.

Este trabajo de tesis es una continuación de un trabajo previo de la M. en C. Gabriela Calcáneo Hernández, donde solo se generaron transformantes de los genes *ste7* y *ste50*, pero carecía de la identificación de mutantes y su caracterización por lo tanto, solo se describirá brevemente como se generó el casete usado para transformar *T. atroviride* y provocar los reemplazos génicos. El casete se construyó por PCR como se indica en Metodología. En el PCR-1, los extremos 5' y 3' se amplificaron usando oligonucleótidos específicos para *ste7* (Pste7-F - PQste7-R y TQste7-F – Tste7-R), *ste50* (Pste50-F - PQste50-R y TQste50-F – Tste50-R) y *hph* (Hyg-F y Hyg-R). Todos los amplicones mostraron los tamaños moleculares esperados de 1335 pb y 1198 pb para los extremos 5' y 3' del gen *ste7*, 1277 pb y 1193 pb para los extremos 5' y 3' del gen *ste50*. En el PCR-2, los fragmentos 5' y 3' de los genes *ste7* y *ste50* se fusionaron al marcador de selección *hph* por PCR, funcionando como oligos secuencias de empalme con el gen *hph* adicionadas en los oligonucleótidos quiméricos (PQste7-R - TQste7-F para *ste7* y PQste50-R – Tqste50-F para *ste50*). En el PCR-3, el casete producto de la fusión de las 3 moléculas (5'-hph-3') se amplificó usando oligonucleótidos anidados para *ste7* (N5-ste7-F y N3-ste7-R) y *ste50* (N5-ste50-F y N3-ste50-R). El análisis electroforético de los amplicones

confirmó el tamaño teórico esperado de 3602 pb para el casete $\Delta ste7: hph$ y 3577 pb para $\Delta ste50: hph$ (Datos no mostrados). Con ambos constructos se transformaron protoplastos de *T. atroviride* y los transformantes fueron seleccionados por resistencia a higromicina B.

VII.3 Identificación de cepas mutantes carentes de los genes *ste50* y *ste7* en *T. atroviride*

Las cepas mutantes se identificaron por PCR usando dos pares de oligonucleótidos específicos para detectar el correcto reemplazo de los genes por el marcador de selección. Las transformantes resistentes a higromicina fueron seleccionadas después de 6 pases monospóricos.

VII.3.1 *ste50*

Para identificar las mutantes carentes del gen *ste50* se usaron oligonucleótidos que amplifican el extremo 5' del gen *ste50* más el marcador de selección *hph* (Pste50-f y Hph-r), generando sólo en las cepas mutantes amplificación de una banda de 1377pb (Fig. 6A) y oligonucleótidos que amplifican el extremo 3' más el gen *hph* (Tste50-r y Hph-f) generando un amplicón de 1298 pb (Fig. 6B). Asimismo, se utilizó un tercer par de oligonucleótidos que amplificó un fragmento de 562 pb del marco de lectura abierto (ORF) del gen *ste50* en la cepa silvestre pero no en las cepas mutantes (Figura 6C). Los resultados indicaron que se obtuvo una cepa mutante con el gen *ste50* reemplazado por el marcador de selección *hph*.

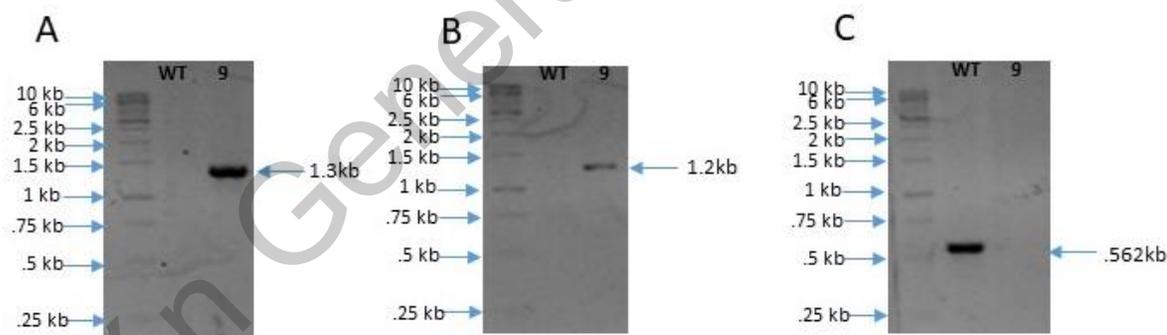


Figura 6. Identificación del reemplazo del gen *ste50* por el marcador de selección.

Reacciones de PCR para determinar la carencia de la región codificante gen *ste50*. PCR para detectar el reemplazo génico usando los pares de oligonucleótidos Pste50-F con Hph-R (A) y Hph-F con Tste50-R (B) en las transformantes resistentes a higromicina (C). El ADN genómico de la cepa silvestre se empleó como control en las tres reacciones de PCR. El marcador de peso molecular de 1 kb se utilizó como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos.

VII.3.2 *ste7*

Para identificar las cepas mutantes carentes del gen *ste7* se analizó una transformante resistente a higromicina que fueron seleccionadas durante seis pases monospóricos. Se usaron dos pares de oligonucleótidos específicos para detectar el reemplazo del gen *ste7* por el marcador de selección *hph*, generando en las cepas mutantes amplificación de una banda de 2732 pb en la región promotora (Fig. 7A). y un amplicón 2595 pb en la región terminadora (Fig. 7B). Asimismo, se utilizó un tercer par de oligonucleótidos que amplificó un fragmento de 416pb del marco de lectura abierto (ORF) del gen *ste7* en la cepa silvestre, pero carente en las cepas mutantes que llevaron a cabo el reemplazo génico por doble recombinación homóloga (Fig. 7C). Los resultados indicaron que se obtuvo una transformante que reemplazaron el gen *ste7* por el marcador de selección.

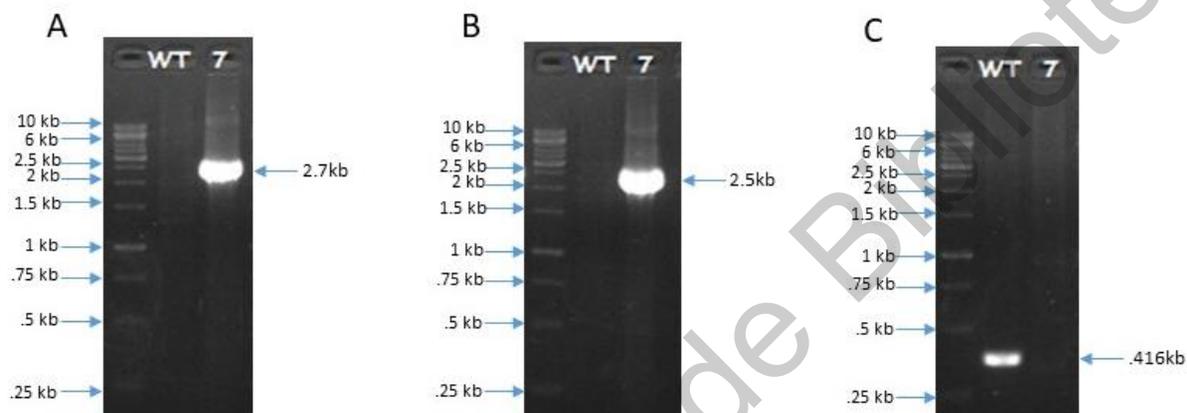


Figura 7. Identificación del reemplazo del gen *ste7* por el marcador de selección.

Reacciones de PCR para detectar el reemplazo génico usando los pares de oligonucleótidos *Pste7-F* con *Hyg-R* (A) y *Hyg-F* con *Tste7-R* (B) en las transformantes resistentes a higromicina B. (C). El ADN genómico de la cepa silvestre se empleó como control en las tres reacciones de PCR. El marcador de peso molecular de 1 kb se utilizó como referencia para estimar el tamaño de los fragmentos.

VII.4 Las cepas mutantes carentes en los genes *ste7* y *ste50* son sensibles al estrés osmótico

Las cepas WT, $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste50$ y $\Delta ste7$ se sometieron a condiciones de estrés osmótico usando KCl y sorbitol. En los ensayos con conidia, las cepas, $\Delta ste50$ y $\Delta ste7$ mostraron letalidad a la concentración de 100 mM de KCl y 200 mM de sorbitol, igual que las cepas $\Delta tmk1$ y $\Delta ste11$ como previamente se ha descrito (Calcáneo Hernández, 2016), mientras que la cepa WT fue capaz de crecer a esas concentraciones (Figura 8A). Este resultado sugiere que *T. atroviride* requiere de las proteínas *Ste11*, *Ste50*, *Ste7* y *Tmk1* para tolerar el estrés osmótico impuesto por altas concentraciones de

osmolitos.

En los ensayos de estrés con micelio, las cepas mutantes de $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ mostraron tolerancia al estrés osmótico al comparar el diámetro de la colonia con la cepa silvestre a la concentración de 200mM de KCl y 400mM, 600mM de sorbitol (Figura 8B). Las cepas de $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ mostraron una fuerte reducción en su crecimiento a la concentración de 400 mM de KCl o sorbitol, mientras que la cepa WT no mostró un efecto tan severo en su crecimiento (Figura 8B).

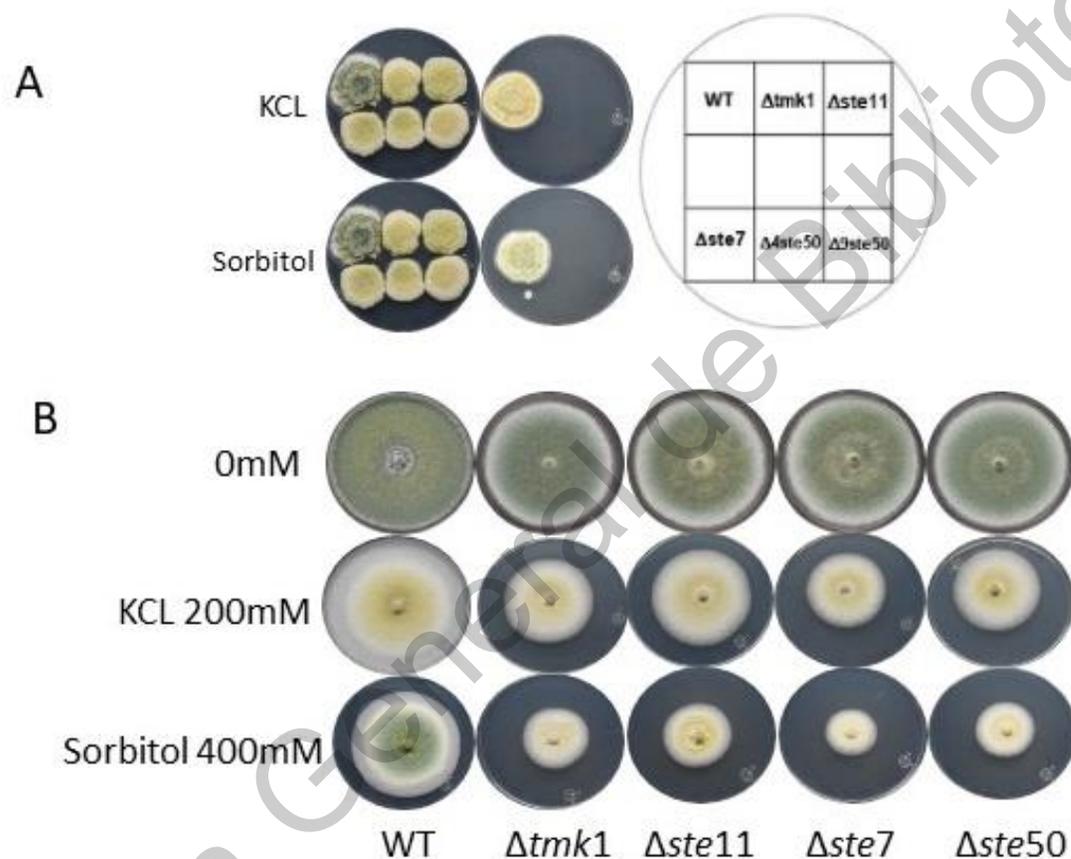


Figura 8. Crecimiento de *T. atroviridae* en respuesta a estrés osmótico.

(A) Tolerancia al estrés osmótico en conidia de *Trichoderma*. En placas de PDA adicionada con 0.5% de Tritón X-100 y las concentraciones mencionadas de KCl y sorbitol, se inocularon 500 conidia de las cepas, los cultivos se incubaron a 27 °C por seis días en una cámara iluminada con luz blanca constante. (B) Tolerancia al estrés osmótico en micelio de *Trichoderma*. Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en placas de PDA con diferentes concentraciones de KCl y sorbitol. Los cultivos se incubaron a 27 °C por cuatro días en una cámara iluminada con luz blanca constante.

VII.5 Análisis de Toxicidad por cadmio

El cadmio es un metal pesado muy tóxico aún en concentraciones pequeñas; su mayor efecto está asociado a la generación de estrés oxidativo, el cual genera radicales hidroxilos altamente reactivos (Vido et al., 2001).

Para analizar la respuesta de Ste50 y Ste7 ante este estrés, las mutantes se sometieron a diferentes concentraciones de CdCl₂. En el ensayo con conidia, todas las cepas fueron capaces de crecer hasta 750 μM de CdCl₂ pero se apreció afectación en el crecimiento de las cepas Δ*tmk1*, Δ*ste11*, Δ*ste7*, Δ*4ste50* y Δ*9ste50*, observándose una ligera disminución en el tamaño de la colonia comparada con la cepa WT. Sin embargo, en CdCl₂ 1000 μM solo la cepa WT creció, siendo letal para las cepas Δ*tmk1*, Δ*ste11*, Δ*ste7*, Δ*4ste50* y Δ*9ste50* (Figura 9A). Por otra parte, el crecimiento del micelio de las cepas mutantes Δ*tmk1*, Δ*ste11*, Δ*ste7* y Δ*ste50* se redujo en la concentración 400 μM de CdCl₂ en comparación con la cepa silvestre (Figura 9B), esto quiere decir que las cepas mutantes son más sensibles al estrés provocado por cadmio. Estos resultados se suman a los de estrés osmótico indicando que las proteínas son componentes de una misma vía de señalización a través de la MAPK Tmk1.

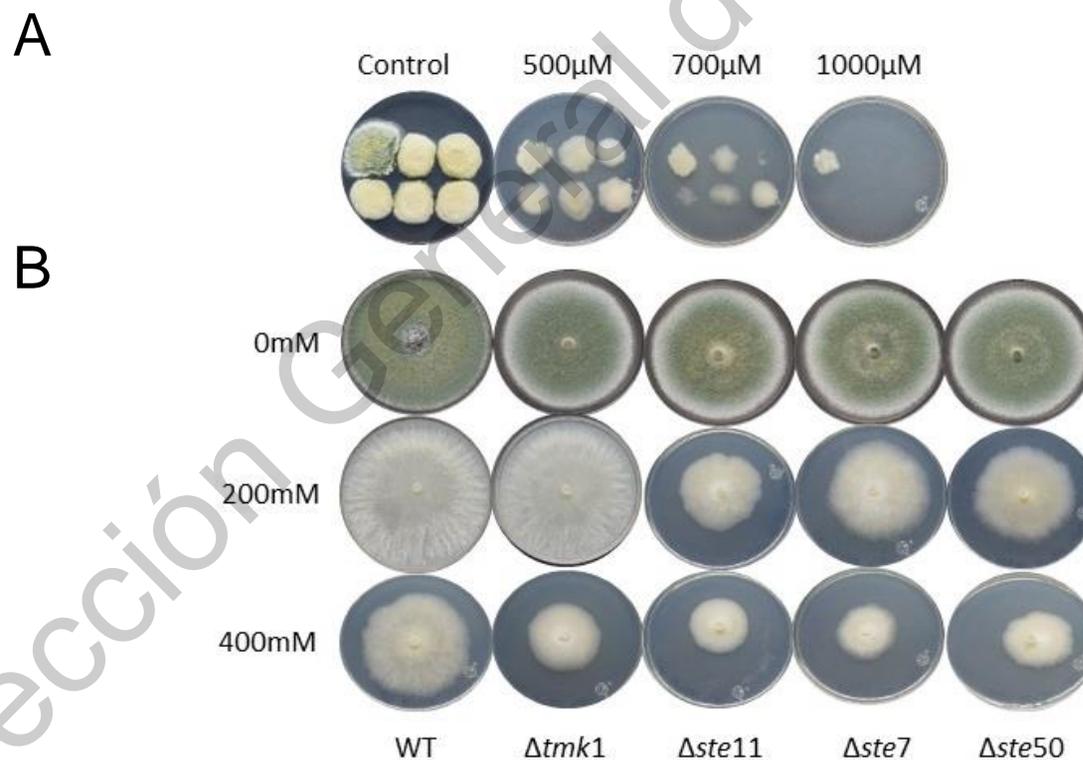


Figura 9. Tolerancia a la toxicidad por cadmio.

A) Ensayo con conidia. Placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y CdCl₂ a las concentraciones indicadas, se

inocularon 500 conidia de las cepas mencionadas **B) Ensayo con micelio.** Discos de micelio de las cepas indicadas se inocularon en PDA con las concentraciones indicadas de CdCl₂. Los cultivos se incubaron a 27 °C por seis días en condiciones de luz blanca constante.

VII.6 Ensayo de integridad de la pared celular

Las cepas WT, $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ se inocularon en placas de PDA con 0.5% de Triton X-100 y diferentes concentraciones de rojo Congo para observar su tolerancia a este colorante con el objetivo de analizar si existen alteraciones en la integridad de la pared celular del hongo. En el ensayo con conidia se observó que las mutantes de $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ fueron incapaces de crecer en 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M y 400 μ M de rojo Congo en presencia de luz, mientras que la WT si hubo crecimiento en 50 μ M apreciándose escasa inhibición en su crecimiento. (Figura 10A).

Por otra parte, se ha reportado que la luz es un factor que acentúa la sensibilidad al rojo Congo en las cepas carentes en *tmk3* (Medina-Castellanos et al., 2014; Esquivel-Naranjo et al., 2016), por tal razón se realizó el ensayo con conidia en oscuridad, y se observó que todas las cepas fueron capaces de crecer aún a la concentración más alta de rojo Congo mostrando escasa inhibición en su crecimiento, mientras que ninguna presentó crecimiento en luz constante (Figura 10A).

En micelio crecido en luz blanca constante, las cepas mutantes $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ no mostraron alta sensibilidad al colorante, sugiriendo que no presentan alteraciones en su pared celular en comparación con la cepa silvestre (Figura 10B) lo cual sugiere que la MAPK *Tmk1* no está involucrada en mantener la integridad de la pared celular en la fase vegetativa, pero es indispensable en espora bajo estrés por Rojo Congo y es dependiente de la vía de la MAP3K *Ste11* y la MAPKK *ste7*.

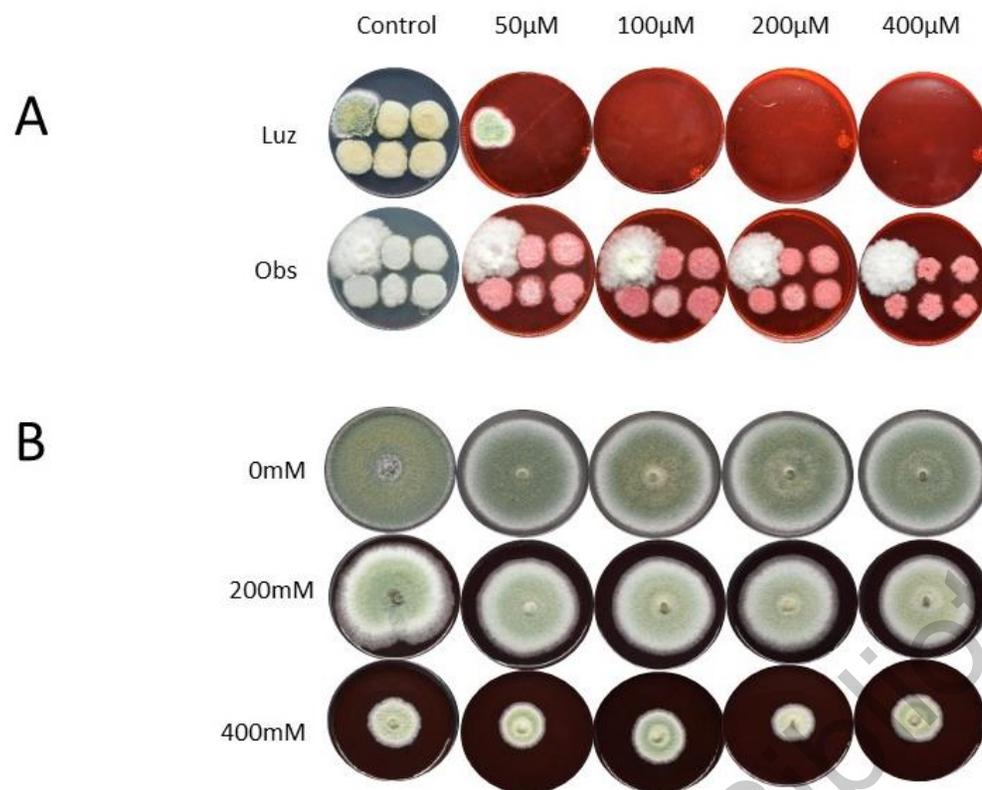


Figura 10. Análisis de la integridad de la pared celular.

A) Ensayo en conidia. En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de rojo Congo mencionadas, se inocularon 500 conidia de las cepas los cultivos se incubaron a 27 °C en una cámara iluminada con luz blanca constante (Luz) u oscuridad (Obs) durante seis días. **B) Ensayo en micelio.** Discos de micelio de las cepas indicadas fueron inoculados en PDA más Rojo Congo a las concentraciones indicadas durante cuatro días.

VII.7 Análisis de estrés oxidativo

En conidia, la MAP3K Ste11 y la MAPK Tmk1 también regulan la respuesta al estrés oxidativo por menadiona, debido a que se observó que a concentraciones de 600 y 800 μM este compuesto fue letal para las mutantes $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$, $\Delta 4ste50$ y $\Delta 9ste50$. (Figura 11A).

Las cepas mutantes $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ en micelio se vieron afectadas cuando fueron expuestas a menadiona, ya que el crecimiento de la colonia de las mutantes analizadas fue menor en comparación con la cepa silvestre, mientras que el crecimiento de la cepa silvestre no fue tan afectado, aún a una concentración de 800 μM de menadiona (Figura 11B). Caso contrario al estrés por H₂O₂, las cepas mutantes $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ su crecimiento no se vio afectado en comparación con la cepa silvestre (Datos no mostrados), indicando una participación específica al estrés oxidativo provocado por menadiona.

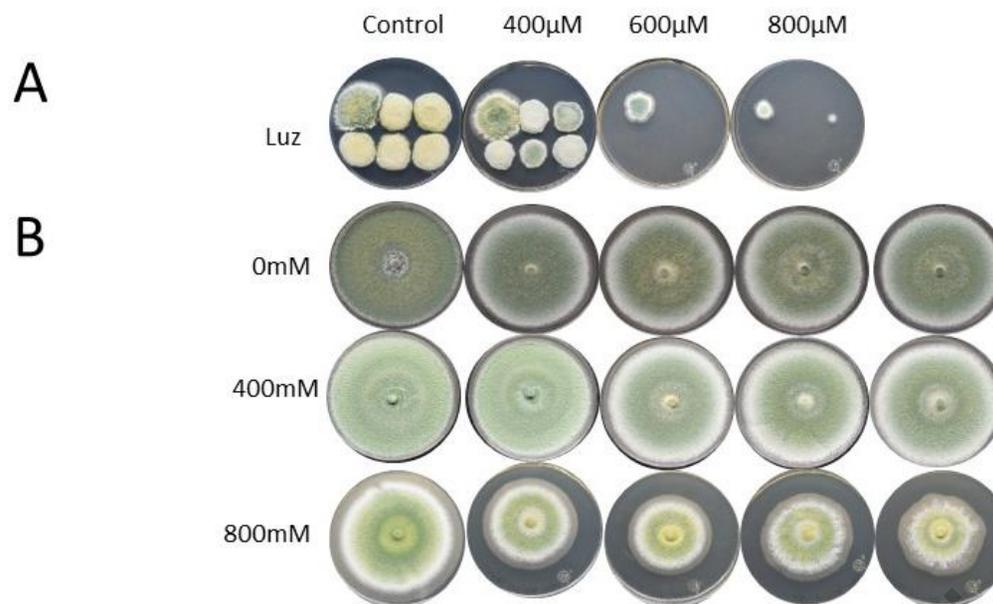


Figura 11. Análisis de estrés oxidativo provocado con menadiona.

A) Ensayo en conidia: En placas de PDA adicionada con Tritón X-100 al 0.5% y las concentraciones de menadiona indicadas, se inocularon 500 conidia de las cepas indicadas siguiendo el orden indicado en la Figura 10. los cultivos se incubaron a 27 °C en una cámara iluminada con luz blanca constante durante 6 días en ensayos con conidia **B) Ensayo discos de micelio** de la cepa silvestre (WT) y cepas mutantes $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ fueron inoculados en PDA con menadiona a las concentraciones indicadas durante cuatro días.

VII.8 Ensayos de daño mecánico y pulso de luz azul

Dado que se conoce que la MAPK Tmk1 y la MAP3K Ste11 son esenciales para la respuesta a daño mecánico en *T. atroviride* (Medina-Castellanos et al., 2014; Calcáneo Hernández, 2016), se analizó la participación de Ste50 y Ste7 en la formación de conidia provocada por daño mecánico (corte del tejido filamentoso con un bisturí). En la Figura 12 se observa que las mutantes $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$ y $\Delta ste7$ no hubo una respuesta ante el daño mecánico, a excepción de daño mecánico en la Ste50 ya que si respondió al daño y eso sugiere que tal vez no participa directamente en respuesta al daño mecánico. y en la mutante $\Delta ste7$ hubo una disminución severa en la producción de conidia en comparación con la cepa silvestre.

Además, se analizó su participación de Ste50 Y Ste7 en la reproducción asexual inducida por luz. La cepa WT y las mutantes $\Delta tmk1$, $\Delta ste11$, $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ después de ser incubadas en oscuridad durante 38 h, se les aplicó un pulso de luz azul. Se observó que la pigmentación de la conidia de las 4 mutantes era de un color verde intenso que el observado de la conidia de la cepa WT (Figura 14), esto nos sugiere que siguen la misma cascada de señalización a través de componentes Ste11, Ste7 y Tmk1 ya que el fenotipo de estas mutantes es similar.

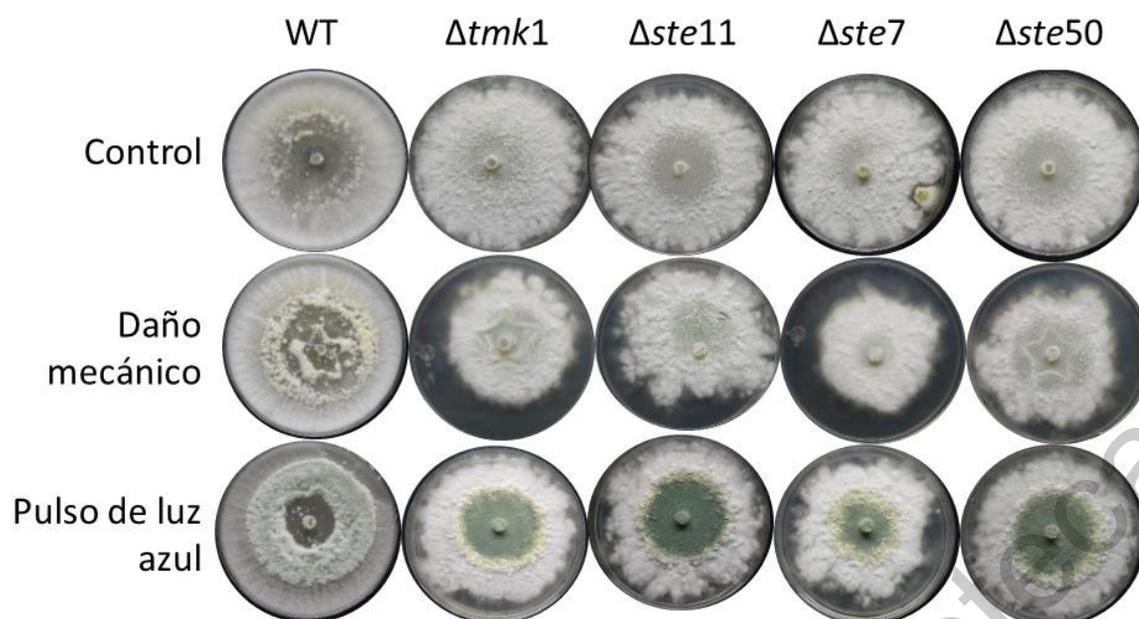


Figura 12. Conidiación inducida por daño mecánico y luz azul

Control. Las cepas se crecieron en oscuridad por 4 días sin aplicar ningún estímulo. **Daño mecánico** se realizó inoculando placas de PDA con discos de micelio de las cepas indicadas, transcurrido 36 h de incubación a 27°C en oscuridad se realizó cortes en el micelio con un molde y se volvieron a incubaron por 48 h a 27 °C en oscuridad. **Fotoconidiación.** Placas de PDA se inocularon con discos de micelio de las cepas indicadas y se incubaron 38 h en oscuridad a 27 °C, las colonias fueron expuestas a un pulso de luz azul.

VIII. DISCUSIÓN

En *Trichoderma atroviride* se han identificado tres vías de MAPKs Tmk1, Tmk2 y Tmk3 y sus respectivos ortólogos en *S. cerevisiae* son Kss1/Fus3, Slt2 y Hog1. En este trabajo se analizó la participación de las proteínas Ste7 y la proteína adaptadora Ste50 en la vía de señalización de Tmk1. Las mutantes $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ son fenotípicamente muy parecidas a las mutantes $\Delta tmk1$ y $\Delta ste11$ por lo que se sugiere que la vía es “canónica”, estas proteínas solo regulan a Tmk1 en *Trichoderma*.

Con el fin de establecer la función de Ste7 y Ste50 en *T. atroviride*, se caracterizaron mutantes carentes del gen *ste7* y *ste50* para conocer su participación en conidiación y estrés celular, respuestas que son reguladas por la vía de la MAPK Tmk1.

Se analizó la participación de Ste7 y Ste50 en las respuestas a estrés osmótico en *T. atroviride* y los resultados apuntan que juegan un papel importante en la osmoregulación. En los ensayos en micelio en las mutantes se ve una reducción del crecimiento tanto en KCl como en sorbitol comprado con la cepa WT y en conidia, las cantidades de 100 mM KCl y 200 mM sorbitol fueron letales para las mutantes $\Delta ste11$, $\Delta tmk1$, $\Delta ste50$ y $\Delta ste7$ por lo que se sugiere que *T. atroviride* requiere de las

proteínas Ste11, Ste50, Ste7 y Tmk1 para una respuesta a estrés osmótico y estas proteínas en conjunto siguen la misma vía de señalización.

El cadmio es un metal tóxico que causa daño al ADN, estrés oxidativo y apoptosis (Gardarin et al., 2010; Calcáneo Hernández, 2016). El CdCl₂ afectó el crecimiento de las mutantes $\Delta ste11$, $\Delta tmk1$, $\Delta ste50$ y $\Delta ste7$, tanto en conidia como en micelio, por lo que se sugiere y se vuelve a comprobar que esta vía de la MAPK Tmk1 sigue una sola vía y que las proteínas Ste7 y Ste50 si participan en esa vía.

En *T. virens*, la MAPK Tvk1 ortóloga a Tmk1 de *T. atroviride* está implicada en la activación de genes que codifican para proteínas de la pared celular, se analizó la integridad de la pared celular sometiendo a las mutantes a estrés por Rojo Congo, este compuesto interfiere en la integridad de la pared celular, por lo tanto los resultados obtenidos indican que la MAPK Tmk1 está involucrada en mantener la integridad de la pared celular en la fase vegetativa, pero es indispensable en espora bajo estrés por Rojo Congo es dependiente de la vía de la MAP3K Ste11 y la MAPKK ste7.

El estrés oxidativo ocasionado por menadiona afecta la viabilidad celular e incrementa el daño oxidativo a proteínas y la peroxidación de lípidos. En *S. cerevisiae*, los niveles de trehalosa aumentan cuando la levadura se expone a menadiona (Kim et al., 2011), indicando que al menos dos mecanismos pueden utilizar los seres vivos para proteger del daño oxidativo: uno a base de generar sistemas antioxidantes (Superoxido dismutasas, catalasas, glutatión) y otro a base de moléculas protectoras de los agentes oxidantes (trehalosa) (Esquivel- Naranjo et al., 2016). La Tmk1 está involucrada en mantener la integridad de la pared celular, pero en la fase vegetativa, pero es indispensable en espora bajo estrés por rojo congo. La menadiona genera el anión superóxido (O⁻) (Thorpe et al., 2013) que es dismutado a peróxido de hidrógeno por acción de las enzimas superóxido dismutasas. En el genoma de *T. atroviride* hay dos genes que codifican superóxido dismutasas (sod1 y sod2). Los resultados sugieren que la cascada de señalización constituida por Ste11-Ste50-Ste7-Tmk1 regulan mecanismos antioxidantes que le permiten a las células tolerar el estrés provocado por la menadiona.

La vía de Ste11 y Tmk1 regulan las respuestas al daño mecánico (Medina-Castellanos et al., 2014; Calcáneo Hernández, 2016), esporulación, metabolismo secundario y micoparasitismo. Se analizó la respuesta a daño mecánico con la finalidad de saber si participan Ste7 y Ste50 en la vía, los resultados sugieren que efectivamente la vía de señalización está compuesta por Ste11, Ste7 y Tmk1, y Ste50 es una proteína adaptadora y trabaja en conjunto con Ste11 por lo tanto las cepas mutantes fueron incapaces de responder al daño mecánico, con la excepción de que la cepa $\Delta ste50$ si respondió al daño mecánico, considerando que Ste50 es una proteína adaptadora de ste11, sugiere que tal vez esta interacción y por lo tanto su participación es dispensable en la respuesta al daño. Estos datos son

consistentes con los descritos previamente por (Medina-Castellanos et al., 2014) y sugieren que la activación de la MAPK Tmk1 ante una señal relacionada con el daño es a través de la MAP3K Ste11-Ste50 y la MAP2K Ste7. Sin embargo, en la respuesta a pulso de luz todas las mutantes $\Delta ste11$, $\Delta tmk1$, $\Delta ste50$ y $\Delta ste7$ respondieron de la misma manera al pulso de luz azul teniendo un color verde intenso que la WT, por lo tanto, las proteínas de Ste50 como Ste7 sí participan en la vía de señalización de la MAPK Tmk1.

IX. CONCLUSIONES

- El MAPKK Ste7 y la proteína adaptadora Ste50 forman parte de la misma vía de señalización ya que regula diferentes tipos de estrés a través de la MAPK Tmk1 en *T. atroviride*.
- Ste7 y Ste50 son fundamentales para tolerar el estrés osmótico en conidia y en micelio.
- Ste7 y ste50 regula la respuesta al estrés oxidativo inducido por menadiona a través de la MAPK Tmk1.
- Ste7 y Ste50 tienen una relación importante en la tolerancia a la toxicidad provocada por metales pesados.
- En pigmentación en conidia la MAPKK ste7 y la proteína adaptadora ste50 pertenecen a la misma vía y siguen la misma cascada de señalización a través de componentes ya que los fenotipos son similares.
- La MAPKK Ste7 y la proteína adaptadora Ste50 pertenecen a la vía de la MAPK tmk1 ya que los fenotipos de las mutantes son parecidos a la tmk1 y ste11 por lo tanto trabajan en conjunto en la vía de señalización.

X. PERSPECTIVAS.

- Confirmar por Southern-Blot el reemplazo de los genes *ste7* y *ste50*
- Analizar la activación por fosforilación de la MAPK Tmk1 en las mutantes $\Delta ste7$ y $\Delta ste50$ en las diferentes condiciones de estrés osmótico, oxidativo, cadmio etc.

XI. BIBLIOGRAFIA

Bahn, Y.-S. 2008. Master and Commander in Fungal Pathogens: the Two-Component System and the HOG Signaling Pathway. *Eukaryotic Cell*. 7:2017–2036. doi:10.1128/EC.00323-08. Available from: <https://ec.asm.org/content/7/12/2017>

Calcáneo Hernández, G. 2016. Papel de la hk OS-1 y la MAPKKK STE11 en las respuestas a estrés y la luz en *Trichoderma atroviride*. Autónoma de Querétaro, Querétaro.

Carreras-Villaseñor, N., J. A. Sánchez-Arreguín, and A. H. Herrera-Estrella. 2012. Trichoderma: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*. 158:3–16.

Esquivel-Naranjo, E. U., M. García-Esquivel, E. Medina-Castellanos, V. A. Correa-Pérez, J. L. Parra-Arriaga, F. Landeros-Jaime, J. A. Cervantes-Chávez, and A. Herrera-Estrella. 2016. AT richoderma atroviride stress-activated MAPK pathway integrates stress and light signals. *Molecular microbiology*. 100:860–876.

Esquivel- Naranjo, E. U., M. García- Esquivel, E. Medina- Castellanos, V. A. Correa- Pérez, J. L. Parra- Arriaga, F. Landeros- Jaime, J. A. Cervantes- Chávez, and A. Herrera- Estrella. 2016. A Trichoderma atroviride stress-activated MAPK pathway integrates stress and light signals. *Molecular Microbiology*. 100:860–876. doi:10.1111/mmi.13355. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mmi.13355>

Estrella, A. H., and I. Chet. 1998. Biocontrol of bacteria and phytopathogenic fungi. *Agricultural Biotechnology*. 263–282.

Gardarin, A., S. Chédin, G. Lagniel, J.-C. Aude, E. Godat, P. Catty, and J. Labarre. 2010. Endoplasmic reticulum is a major target of cadmium toxicity in yeast. *Molecular microbiology*. 76:1034–1048.

Hamel, L.-P., M.-C. Nicole, S. Duplessis, and B. E. Ellis. 2012. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *The Plant Cell*. 24:1327–1351.

Harman, G. E. 2011. Trichoderma—not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*. 39:103–108.

Harman, G. E., C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito. 2004. Trichoderma species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol*. 2:43–56. doi:10.1038/nrmicro797.

Herrera-Estrella, A., and I. Chet. 2003. The biological control agent Trichoderma: from fundamentals to applications. *Handbook of Fungal Biotechnology*. 2:147–156.

Hohmann, S. 2002. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *MMBR*. 66:300–372. doi:10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002. Available from: <https://MMBR.asm.org/content/66/2/300>

Jagodzik, P., M. Tajdel-Zielinska, A. Ciesla, M. Marczak, and A. Ludwikow. 2018. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in plant science*. 9:1387.

Kim, I.-S., H.-Y. Sohn, and I. Jin. 2011. Adaptive stress response to menadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *The Journal of Microbiology*. 49:816–823.

Laura Kawasaki, Laura Ongay-Larios, and Roberto Coria. 2009. Cascadas de map cinasas en apareamiento y estrés en levaduras. *studylib.es*. Available from: <https://studylib.es/doc/4808938/cascadas-de-map-cinasas-en-apareamiento-y-estrés-en>

Manna, P. R., and D. M. Stocco. 2011. The Role of Specific Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Cascades in the Regulation of Steroidogenesis. *J Signal Transduct*. 2011. doi:10.1155/2011/821615. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3100650/>

May, R. C. G. 2019. Participación de la MAPKKK Ssk2 y los reguladores de respuesta Ssk1 y Snk7 en las respuestas al estrés regulado a través de la MAPK Tmk3 en *Trichoderma atroviride*.

Medina-Castellanos, E., E. U. Esquivel-Naranjo, M. Heil, and A. Herrera-Estrella. 2014. Extracellular ATP activates MAPK and ROS signaling during injury response in the fungus *Trichoderma atroviride*. *Front Plant Sci.* 5. doi:10.3389/fpls.2014.00659. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4240048/>

Medina-Castellanos, E., J. M. Villalobos-Escobedo, M. Riquelme, N. D. Read, C. Abreu-Goodger, and A. Herrera-Estrella. 2018. Danger signals activate a putative innate immune system during regeneration in a filamentous fungus. *PLOS Genetics.* 14:e1007390. doi:10.1371/journal.pgen.1007390. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1007390>

Nusaibah, S. A., and H. Musa. 2019. A Review Report on the Mechanism of *Trichoderma* spp. as Biological Control Agent of the Basal Stem Rot (BSR) Disease of *Elaeis guineensis*. In: *Trichoderma-The Most Widely Used Fungicide*. IntechOpen.

Posas, F., and H. Saito. 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science.* 276:1702–1705.

Reithner, B., R. Schuhmacher, N. Stoppacher, M. Pucher, K. Brunner, and S. Zeilinger. 2007. Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk1 differentially affects mycoparasitism and plant protection. *Fungal Genetics and Biology.* 44:1123–1133.

Saito, H., and F. Posas. 2012. Response to hyperosmotic stress. *Genetics.* 192:289–318.

Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological research.* 100:923–935.

Schuster, A., and M. Schmoll. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology.* 87:787–799.

Shock, T. R., J. Thompson, J. R. Yates, and H. D. Madhani. 2009. Hog1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) interrupts signal transduction between the Kss1 MAPK and the Tec1 transcription factor to maintain pathway specificity. *Eukaryotic cell.* 8:606–616.

Thorpe, G. W., M. Reodica, M. J. Davies, G. Heeren, S. Jarolim, B. Pillay, M. Breitenbach, V. J. Higgins, and I. W. Dawes. 2013. Superoxide radicals have a protective role during H₂O₂ stress. *Mol Biol Cell.* 24:2876–2884. doi:10.1091/mbc.E13-01-0052. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771949/>

Vido, K., D. Spector, G. Lagniel, S. Lopez, M. B. Toledano, and J. Labarre. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry.* 276:8469–8474.

Waghunde, R. R., R. M. Shelake, and A. N. Sabalpara. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African journal of agricultural research.* 11:1952–1965.

Wang, M., Q. Zhao, J. Yang, B. Jiang, F. Wang, K. Liu, and X. Fang. 2013. A mitogen-activated protein kinase Tmk3 participates in high osmolarity resistance, cell wall integrity maintenance and cellulase production regulation in *Trichoderma reesei*. *PLoS One.* 8.

Xu, J.-R. 2000. MAP kinases in fungal pathogens. *Fungal Genetics and Biology.* 31:137–152.

Yago, J. I., C.-H. Lin, and K.-R. Chung. 2011. The SLT2 mitogen-activated protein kinase-mediated

signalling pathway governs conidiation, morphogenesis, fungal virulence and production of toxin and melanin in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Pathology*. 12:653–665. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00701.x. Available from: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1364-3703.2010.00701.x>

Dirección General de Bibliotecas UAQ