

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
ESC. DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGIA

**“EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA CONIDIACION Y LA EXPRESION
DE GENES BRL1 EN TRICHODERMA REESEI Y LA MUTANTE
ENVOY”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

LAURA SALDAÑA VÁZQUEZ

ASESOR:

D,C ALFREDO HERRERA ESTRELLA

D.C CARLOS CORTÉS PENAGOS

MORELIA MICHOACÁN NOVIEMBRE 2006

1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. ANTECEDENTES	7
2.1 RECEPTOR.....	8
2.2 FOTORCEPTORES DE LUZ.....	9
2.3 PERCEPCIÓN DE LUZ EN HONGOS.	13
2.3.1 <i>Aspergillus nidulans</i>	14
2.3.2 <i>Neurospora crassa</i>	15
2.3.3 <i>Trichoderma atroviride</i>	19
2.3.4 <i>Trichoderma reesei</i>	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 OBJETIVOS GENERAL	24
4.2 OBJETIVOS PATICULARES	24
5. MATERIALES Y METODOS	25
5.1 CEPAS	25
5.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	25
5.3 ENSAYOS DE LUZ.....	26
5.3.1 <i>Ensayo de conidiación inducida por un pulso de luz de diferente longitud de onda</i>	26
5.3.2 <i>Ensayo de conidiación inducida por un pulso de luz de diferente longitud de onda</i>	27
5.4 MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CONIDIAS	27
5.5 ENSAYO PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA.	28
5.5.1 <i>Extracción de RNA</i>	28

5.5.2 Análisis tipo Northern Blot.....	29
5.5.3 Aislamiento del Plásmido	30
6. RESULTADOS.....	32
6.2 EFECTO DE LA EXPOSICIÓN CONSTANTE A DIFERENTE LONGITUD DE ONDA SOBRE LA CONIDIACIÓN EN <i>T. REESEI</i> SILVESTRE Y MUTANTE <i>ENVOY</i>	36
6.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>BLU1</i> , <i>BLU2</i> Y <i>ENVOY</i>	39
7. DISCUSIÓN	45
8. CONCLUSIÓN	50
9. BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de conidias por mililitro producidas por un pulso de luz	18
Tabla 2. Número de conidias por mililitro producidas bajo iluminación constante.....	22
--	
Tabla 3. Oligonucleotidos.....	27
--	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Espectro de longitud de onda visible expresada en metros y nanometros. -----	5
Figura 2. Efecto de la luz sobre el crecimiento y conidiación de <i>T. reesei</i> y la mutante <i>envoy</i> -----	22
Figura 3 Comparación del número de conidias promedio producidas por <i>T. reesei</i> y <i>envoy</i> a diferentes longitudes de onda (por efecto de un Pulso de 10 min) -----	
Figura 4 Efecto de la luz sobre el crecimiento y conidiación de <i>T. reesei</i> y la mutante <i>envoy</i> -----	

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
A	Luz azul
AMPc	Adenocina monofosfato cíclico
Cm	Centímetro
Cry	Criptocromo
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FMN	Flavina mononucleótido
H	Hora
LOV	Luz, oxígeno, voltaje
µg	Microgramos

Min	Minutos
Nm	Nanometro
μmol	Micromol
Ng	Nanogramo
PAS	Per, Arnt, Sim
Pb	Pares de bases
PDA	Papa dextrosa agar
PDB	Papa, Dextrosa, Caldo
Phy	Fitocromo
PYP	Photoactive Yellow Protein
RNA	Ácido ribonucleico
Seg	Segundo
UV	Ultravioleta
WCC	White Collar Complex

1. INTRODUCCIÓN

La luz del sol es un factor ambiental dominante para la existencia de la vida en nuestro planeta. Además, es una señal ambiental importante que determina el comportamiento de organismos vivos. Entre la diversidad de las respuestas accionadas por la luz, los esfuerzos se han dirigido a estudiar la fotomorfogenesis, el fototropismo, la pigmentación y ritmo circadiano (Linden et al., 1997; Briggs Y Huala, 1999).

La luz en las plantas es crucial para la conversión fotosintética de energía solar en la energía química. No es por lo tanto sorprendente que las

plantas han desarrollado una percepción compleja de luz y señalan la maquinaria de transducción que facilita el ajuste a condiciones ambientales de luz y también ayuda a evitar los efectos deletéreos de la luz del sol (Neff et al., 2000).

Las plantas son capaces de sentir la calidad, la intensidad y la dirección de luz. La percepción de luz es realizada por moléculas de fotorreceptor que consisten en una proteína con una o con varias mitades de cromóforo conectadas a ello.

La señal de luz percibida por el cromóforo causa los cambios conformacionales del fotorreceptor que inicia la transducción de la luz que señala la cascada, tarde o temprano conduciendo a la respuesta de luz del organismo. Plantas más altas poseen una variedad de fotorreceptores incluyendo para la luz roja /rojo lejano, que absorbe fitocromos y para la absorción de luz azul; criptocromos y fototropina (Batschauer, 1998; Cristianía y Briggs, 2001).

La capacidad de sentir y responder para encender es también extendida en organismos no fotosintéticos como la bacteria y hongos. En hongos, varios procesos del desarrollo y fisiológicos, como se ha mencionado, eran bajo la influencia de la luz (para una revisión mirar Lauter, 1996; Tilo et al., 1997).

2. ANTECEDENTES

La luz es uno de los factores abióticos más importantes e influyentes en el desarrollo de los organismos. Cada tipo de radiación, con su longitud de onda particular, contiene una determinada energía asociada. Cuanto más larga sea la longitud de onda, menor es la energía y viceversa. La luz visible es sólo una parte del inmenso espectro electromagnético. Para el

ojo humano, la radiación visible va de la luz violeta, donde los rayos más cortos son de 400 nanómetros, a la luz roja, donde los rayos más largos son de 700 nanómetros. (H. Curtis, S. Barnes 2002)

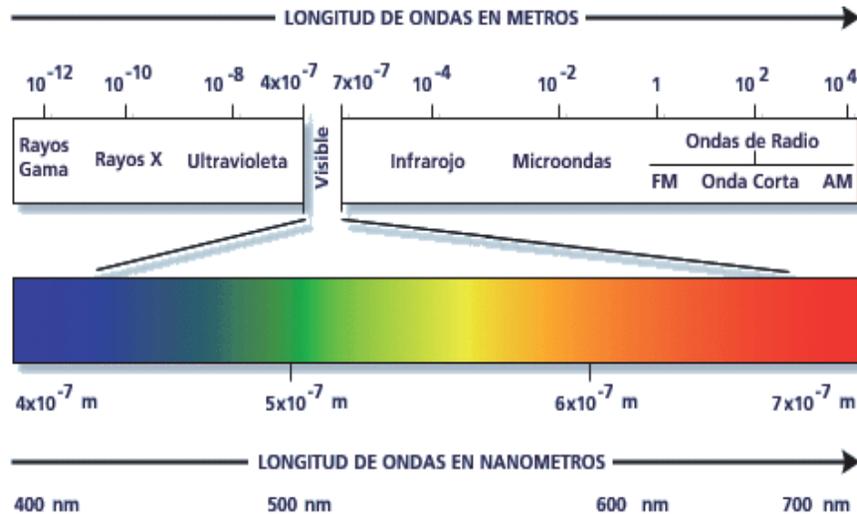


Figura 1 Espectro de longitud de onda visible expresada en metros y nanómetros.

2.1 RECEPTOR

Los receptores son estructuras moleculares dentro de una célula o sobre la superficie mediante los cuales se permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular, los cuales pueden ser proteínas o glicoproteínas presentes en la membrana plasmática, en la membrana de las organelas o en el citosol, a las que se unen específicamente otras sustancias químicas llamadas moléculas señaladoras como; neurotransmisores, fragmentos de complemento e inmunoglobulina y receptores citoplasmico para hormonas de esteroides.

La unión de una molécula señaladora a sus receptores específicos desencadena una serie de reacciones en el interior de las células cuyo

resultado final es un cambio en la actividad metabólica de las células. Un ejemplo de una molécula receptora de luz es la proteína PYP (Photoactive Yellow Protein). PYP es una proteína pequeña de una bacteria fototrófica (*Ectothiorhodospira halophila*), que en su totalidad está conformada por un dominio LOV (Luz, Oxígeno, Voltaje). La proteína PYP une covalentemente el ácido tran-*p*-hidroxinámico como cromóforo, cuando éste absorbe la luz sufre una isomerización tran-cis que posiblemente transmite al polipéptido provocando un cambio conformacional lo que le permite generar una señal afectando a otras moléculas. (Van Aalten *et al.*, 2000)

La luz en efecto regula varios de los procesos fisiológicos que ocurren en los hongos, incluyendo su habilidad de producir conidias y la sincronización de sus relojes biológicos internos. Sin embargo los fotorreceptores, los receptores sensibles a la luz que hacen posible estas funciones, eran hasta ahora desconocidos. (Liu 2003).

Sin embargo en últimos años se ha logrado un gran avance en el conocimiento bioquímico y genético de la percepción luminosa en varios modelos biológicos. Hoy en día se sabe que en eucariotes existen diferentes tipos de fotorreceptores los cuales son capaces de percibir la luz roja, rojo lejano y azul.

Las moléculas responsables de toda respuesta biológica a la luz están acopladas a cromóforos tales como el FMN, FAD, y las porfirinas. La absorción de la luz por estos compuestos es en el rango de la luz visible y debido a esto presenta color, motivo por el cual se les denomina cromóforos (Cashmore *et al.* 1999).

2.2 FOTORCEPTORES DE LUZ

Existen 3 proteínas perceptoras de luz ampliamente conocidas por su importancia en la fisiología de las plantas: criptocromos, fototropinas y fitocromos (Fankhauser, 2002); sin embargo el grupo de fotorreceptores es aún más amplio al incluir a las opsinas y las proteínas BLUF. Todos se caracterizan por un cambio conformacional en la estructura proteica debido a la captación de los electrones así como la capacidad de transmitir esta señal (Van Der Horst, 2003).

Los criptocromos y las fototropinas detectan las longitudes de onda roja primaria (R) y roja lejana (RL). Los criptocromos y fitocromos controlan el crecimiento y el desarrollo, dependiendo de las variaciones de ondas, la intensidad y la duración diurna de la radiación (Cashmore et al., 1999; Smith, 2000), mientras que las fototropinas funcionan principalmente controlando la direccionalidad del crecimiento (fototropismo) en respuesta a la ubicación de la fuente luminosa y/o al movimiento intracelular del cloroplasto en respuesta a la intensidad luminosa (Briggs y Huala, 1999; Kagawa et al., 2001; Sakai et al., 2001; Jarillo et al., 2001).

Los **Fitocromos** son moléculas que se describieron originalmente en las plantas debido a sus propiedades fotocromicas permitiendo detectarlos en tejidos y extractos (Lamparter 2004). En plantas los fitocromos son los responsables de muchos procesos fotomorfogenéticos como la inhibición de la elongación del tallo, la expansión foliar y enverdecimiento de las hojas, inducción de la floración, germinación de la semilla y el tropismo negativo a la sombra; entre otros (Van der Horst, 2005, Montgomery 2003, Briggs 2001).

Los fitocromos son proteínas homodiméricas capaces de percibir luz roja (R) y roja lejana (RL) al usar un tetrapirrol lineal como grupo cromofórico (Van Der Horst, 2003; Karniol 2005). La unión del cromóforo se lleva a cabo en el extremo amino en el dominio cGMP fosfodiesterasa/adenil

ciclasa/ FhIA (GAF) a través de la unión autocatalítica de éste en un residuo de Cys altamente conservado. Posterior a éste, un dominio fitocromo (PHY) estabiliza la unión anterior y proporciona las propiedades espectroscópicas de la molécula (Karniol 2005). Hacia el extremo carboxilo se encuentran dominios tipo Per/Arndt/Sim (PAS) que participan en la dimerización, así como un dominio de cinasa con similitud a una histidin cinasa (HK) procariótica del tipo de 2 componentes (Quail, 2002), aunque también se ha reportado actividad de serin-treonin cinasa (ST-K) (Yeh, 1998).

Los **criptocromos** son flavoproteínas que unen 2 cromóforos en su extremo amino terminal, una pterina o deazaflavina y un flavinadenin dinucleótido (FAD). La unión de estos cromóforos proporciona el espectro de acción con máximos en la región UV y el azul. Esta estructura es semejante a la de las fotoliasas procarióticas; sin embargo difieren estructuralmente de éstas por la existencia de una prolongación en su extremo carboxilo terminal, y funcionalmente por carecer de la actividad de las primeras (Quail, 2002). La función del extremo carboxilo terminal, que es variable entre los 2 criptocromos de *Arabidopsis thaliana* no ha sido esclarecida en su totalidad. Investigaciones recientes hacen suponer que estas regiones son importantes en la interacción con otras proteínas.

Investigaciones posteriores han descrito criptocromos en otros organismos fotosintéticos, insectos y en eucariotes, en los cuales desempeñan funciones asociadas al reloj circadiano entre otras (Briggs, 1999). Por lo tanto los criptocromos parecen ser moléculas encargadas de percibir la luz azul , UV y transmitir esta señal por medio de la interacción de su extremo carboxilo con una amplia gama de proteínas

Las **fototropinas** también son flavoproteínas y en *A. thaliana* son los receptores responsables del movimiento de cloroplastos, la apertura de

estomas y el fototropismo del cual obtuvieron su nombre. Las fototropinas en el extremo amino poseen 2 dominios PAS (Per/Arnt-Sim) correspondientes al subdominio LOV (Light-Oxygen-Voltage) los cuales unen flavina mononucleótido (FMN) como cromóforo. Las 2 moléculas de FMN llevan a cabo un fotociclo por absorción de luz azul UV-A al formar un enlace con una cisteína altamente conservada en los dominios LOV de estas proteínas. Hacia el extremo carboxilo poseen un dominio de serina-treonina cinasa cuya actividad está regulada por el extremo amino; dicha actividad provoca la autofosforilación de la proteína (Quail, 2002).

Los dominios PAS están involucrados en la interacción entre proteínas y en el subgrupo LOV se encuentran sensores a luz, oxígeno y canales de potasio regulados por voltaje (Briggs, 1999). La estructura del dominio LOV está altamente conservada, principalmente en las regiones que involucran la formación del espacio físico en el cual se ubica la flavina así como en la presencia del residuo de Cys que participa en el enlace formado tras el fotociclo. Incluso estudios estructurales y de secuencia han logrado mostrar que la unión de FMN, como en el caso de las fototropinas, o de FAD depende de la existencia de una región entre 9-11 aminoácidos; los cuales amplían el espacio de unión al cromóforo permitiendo la entrada del FAD que es una más voluminosa (Crosson, 2000; Cheng, 2003).

A diferencia de muchas otras proteínas PAS tipo LOV; las fototropinas son las únicas dentro de la familia en poseer 2 dominios arreglados en serie. Poco se conocía de la función de cada uno de éstos dominios, más recientemente se ha logrado elucidar que el LOV 2 es el principal responsable de la activación de la cinasa, mientras que el LOV 1 modula la actividad del primero (Matsuoka, 2005). Los autores postulan que la regulación por luz se debe a cambios estructurales. En ausencia de luz la actividad de serina-treonina cinasa estaría reprimida por la conformación

de la molécula; al momento de incidir la luz, la estructura del dominio LOV cambiaría liberando el dominio de la cinasa del impedimento estérico y por lo tanto siendo funcional.

Aunque se había demostrado la autofosforilación de las fototropinas, no se les conocía función sobre otros sustratos generando interrogantes acerca del mecanismo de transmisión de la señal. Recientemente se mostró *in vitro* que éstas moléculas son capaces de fosforilar otras proteínas; sin embargo sigue haciendo falta demostrar esta actividad *in vivo*.

Las **opsinas** son proteínas integrales de membrana distribuidas en todos los reinos que se caracterizan por una estructura terciaria constituida por 7 alfa hélices transmembranales que unen retinaldehído como grupo cromofórico. Son bombas de iones y las que participan en la visión, absorbiendo la luz con lo cual el retinal se isomeriza provocando un cambio en la conformación de la proteína que transduce la señal. (Van der Host, 2004).

Los **dominios BLUF** son otro grupo de receptores distribuidos ampliamente en bacterias y cianobacterias que unen FAD como cromóforo y del cual reciben su nombre (sensors of Blue Light Using FAD). La unión de FAD es no covalente al igual que los dominios LOV con el FMN; pero a diferencia de éstos la predicción de su estructura secundaria parece ser diferente.

2.3 Percepción de luz en hongos.

La respuesta a luz en hongos incluye diversos procesos como cambios en el metabolismo, síntesis de pigmentos, tropismo, morfogénesis y diferenciación (Sulová y farkas, 1991). La respuesta de los hongos a la luz

ha sido mayormente estudiada en los hongos mencionados a continuación: *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*. Lo antes estudiado ha provocado interés en conocer los cambios que la luz puede provocar en *Trichoderma reesei*.

2.3.1 *Aspergillus nidulans*

Este ascomiceto es uno de los organismos modelos para el estudio de la diferenciación y morfogénesis. Presenta una fase asexual en la cual el micelio vegetativo da origen a hifas aéreas que se diferencian a fiálides y posteriormente a conidióforos. Su fase sexual se inicia con la agregación de micelio, algunos agregados se diferencian a células de Hülle y primordios que originan cleistotecios en el cual se forman las ascas (Adams, 1998). *A.nidulans* fue el primer hongo filamentoso en el cual se reportó una respuesta morfológica hacia la luz roja. La cepa silvestre en el gen *velvet* (*veA*⁺) presenta un profuso micelio aéreo y no conidia a menos que sea expuesta a luz roja; mientras que la mutante *veA1* aislada por Käfer en 1965 y empleada como cepa de laboratorio, esporula aún en obscuridad. Money (1990) demostró el requerimiento y la especificidad de la luz roja (680nm) para la inducción de la conidiación. Esta respuesta puede ser únicamente inhibida al exponer el cultivo inducido a la luz roja lejana (730nm) dentro de las primeras 6 horas posteriores al pulso de luz roja. Esto hizo sospechar a los autores de la existencia de un fitocromo y que *veA*⁺ es un represor de la conidiación. En base a la homología de secuencias, Griffith (1994) postuló que *brlA* poseía un dominio N-terminal semejante al de los fitocromos de plantas, aunque nunca se demostró experimentalmente fuera responsable de la respuesta anterior ni que uniera un cromóforo. Posteriormente se confirmó la función de *veA*⁺ como un represor de la conidiación, así como de inductor de la esporulación sexual (Kim, 2002).

Durante la realización de este proyecto por medio de la información obtenida de los genomas, se generaron las primeras mutantes en fitocromos de hongos. Blumenstein (2005) denominó al fitocromo de *A. nidulans* como *fphA*, el cual se encontró localizado en citoplasma, tiene alta homología con los bacteriofitocromos y posee las propiedades espectrales de éstos. El fenotipo observado en la mutante consiste en un incremento en la formación de cleistotecios aun bajo luz roja en comparación con la cepa silvestre; sin embargo es extremadamente sutil debido a que el número de cleistotecios formados en la mutante bajo éstas condiciones es mínimo al compararse con la producción de éstos en obscuridad. Por lo tanto pareciera que esta respuesta no está asociada al fitocromo o bien que existe otro medio de percepción de la luz roja aún desconocido.

2.3.2 *Neurospora crassa*

Es un hongo ascomiceto que hace siglo y medio fue conocido como el hongo anaranjado del pan y fue llevado al laboratorio por Dodge y Lindegren. Con el tiempo se volvió un excelente modelo de estudio de morfogénesis, diferenciación y desarrollo debido a sus 2 estadios reproductivos. En su fase asexual forma micro y macroconidios, los cuales dan origen a nuevas conidias por medio de la formación de fiálides o conidióforos respectivamente. En su fase sexual forma protoperitecios, los cuales al ser fecundados (peritecios) dan lugar a ascas con ascosporas.

N. crassa tiene un micelio profuso de color blanquecino al crecer en obscuridad, mas la exposición a la luz provoca que éste adquiera un color anaranjado. La anterior es una de las tantas respuestas que presenta *N. crassa* hacia la luz. Además de la carotenogénesis del micelio, otros eventos que se presentan única y exclusivamente en respuesta a la luz

azul son: formación de conidias, fototropismo del conidióforo, cambios en el potencial de membrana, sincronización del ritmo circadiano y formación de protoperitecios entre otros (Linden, 1998; Liu, 2003).

La búsqueda del receptor hacia luz azul de *N. crassa* se realizó intensamente; sin embargo y a pesar del exhaustivo trabajo de mutagénesis (Degli-Innocenti, 1984) no fue sino hasta el 2002 (He 2002; Froehlich 2002) que se pudo establecer que los genes correspondientes a la proteínas *white collar* 1 y 2 (*wc-1* y *wc-2*) forman el fotorreceptor por medio de un heterodímero.

Tanto *WC1* como *WC2* se ubican en el núcleo y son factores de transcripción, poseen un dominio de dedo de zinc en el extremo carbono terminal que reconoce secuencias GATA y un dominio de activación en el extremo N terminal. *WC1* es una proteína de 1167 aa, posee tres dominios PAS, de los cuales el correspondiente al extremo amino es del tipo LOV. Es en éste que la molécula une FAD como cromóforo y por lo tanto el dominio responsable de la percepción de la luz (He, 2002). A diferencia de los dominios LOV de las fototropinas, *WC1* une FAD; más los 11 residuos que participan en la unión no covalente del FMN en las fototropinas también están conservados en éste. En cambio *WC2* es una proteína de solo 530 aa y tiene un solo dominio PAS. Por medio de su dominio PAS interactúa con el PAS C de *WC1* formando el complejo white collar (*WCC*; White Collar Complex). Este complejo es el responsable de la percepción de la luz azul y la señalización de dicho estímulo; por lo tanto aunque *WC2* no participa directamente en la captación de la luz es esencial para la formación del receptor.

Por lo tanto el complejo *WC* funciona como receptor y factor de transcripción siendo responsable de la activación de los genes de respuesta temprano de *N. crassa*, los cuales se inducen entre los

primeros 30 minutos después del estímulo con un máximo alrededor de los 15 minutos. Dentro de este grupo de genes se encuentran los genes *albino* (*al-1*, *al-2* y *al-3*), *frecuency* (*frq*), *vivid* (*vvd*), genes de conidiación (*con-6*, *con 10*) y genes bajo el control del reloj (*clock control genes*; *ccg-4*, *ccg-6*). Se han descrito regiones en los promotores en las cuales se une WCC denominadas LREs (Light Responsive Elements) en diversos genes como *frq*, (Froehlich, 2002), *vvd* y *al-3* (He, 2005). La respuesta fisiológica de la inducción de estos genes se produce entre 1 a 6 horas después del estímulo luminoso; además los productos de esta inducción son probablemente los responsables de la activación de genes de respuesta tardía (definidos como aquellos en los que sus niveles de expresión alcanzan su máximo entre los 45 min a 2 horas después del estímulo) (Linden, 1998).

La regulación por la luz también se lleva a cabo a nivel post-traducciona. Se ha demostrado que el WCC existe en oscuridad, pero solamente una vez que es activado por la luz es capaz de llevar a cabo su función de factor de transcripción. Se consideró por mucho tiempo que la activación se correlacionaba con la fosforilación del complejo, la cual es concomitante con la inducción de genes (Linden, 1998; Froehlich 2002); sin embargo recientemente se demostró que la activación de los genes de respuesta temprana es anterior a la fosforilación de WCC (He 2005); además los autores demuestran que la hiperfosforilación de WCC impide la actividad de éste. Este dato se relaciona con el hecho de que WC1 es inestable en su forma fosforilada (Liu 2003).

La regulación de *N. crassa* es compleja pues involucra la respuesta a luz con la operación de su reloj circadiano. En esta regulación hay redes de regulación en la cual los diversos componentes de la señal luminosa y el reloj interno interactúan en retroalimentación negativa. Así WCC induce genes de respuesta temprana como *frq* y *vvd*, los cuales sintetizan

proteínas que inhiben la actividad del primero; aunque FRQ induce a su vez a *wc-2* y estabiliza a WC1.

Un evento muy importante en *N. crassa* es la fotoadaptación y la pérdida de la sensibilidad hacia la luz. La cepa silvestre es incapaz de responder a un segundo estímulo luminoso dentro de las primeras 2 horas, tiempo en el cual los niveles de expresión vuelven a su estado basal. Sin embargo responde ante un segundo pulso de luz de mayor intensidad; por lo tanto es apta de distinguir entre intensidades luminosas. VVD es la proteína responsable de estos eventos pues se ha demostrado que la mutante en ésta presenta niveles de inducción de genes más elevados y prolongados; es incapaz de distinguir entre 2 estímulos de diferente intensidad; además la fosforilación de WC1 se encuentra prolongada (Schwerdtfeger, 2001; Schwerdtfeger, 2003) lo cual explica el característico fenotipo de color anaranjado intenso, vívido, del cual recibió su nombre. Por lo tanto VVD funciona como un represor y modulador de la señal luminosa.

VVD es una proteína muy pequeña con un tamaño de 186 ó 177 aa pues posee 2 codones de inicio. Presenta una alta homología a WC1 lo cual se debe a que en casi toda su extensión, VVD es un dominio LOV (Heintzen, 2001), e incluso puede ser intercambiado con el de WC1 siendo esta última funcional. Se demostró que el dominio LOV de VVD posee los 11 residuos de unión a flavina. Se ha postulado que VVD interacciona con el WCC reprimiendo su actividad; sin embargo este evento, de existir, debe ser indirecto pues la ubicación de VVD es citoplásmica (Schwerdtfeger, 2003).

Hasta hace unos meses se consideraba a VVD como el responsable de la fotoadaptación en *N. crassa* debido a lo anteriormente descrito, así como a su papel en el establecimiento del ritmo circadiano (Heintzen, 2001). Sin embargo se evidenció que la fosforilación de WCC vuelve inactivo al complejo, y que éste lleva a cabo un fotociclo muy largo (a diferencia de las fototropinas en las cuales toma minutos volver a su estado original),

impidiendo que sea capaz de percibir un segundo estímulo; por lo tanto este mecanismo también participa en la fotoadaptación (He, 2006).

Todo lo hasta ahora citado se relaciona con respuestas hacia la luz azul por medio de los *wc-1* y *2*. Debido a que toda la fotobiología de *N. crassa* se relaciona únicamente con luz azul, fue sorpresiva hallar durante la secuenciación de su genoma secuencias correspondientes a un criptocromo, 2 fitocromos y *velvet* (Galagan 2003; Borkovich 2004). La presencia de un criptocromo es de llamar la atención pues en la búsqueda de mutantes en respuesta a luz azul, éstas siempre recayeron en los *wc*, sugiriendo que la función de éste dependa del WCC.

Durante la realización de este trabajo de investigación se generaron las mutantes en los 2 fitocromos de *N. crassa* así como la doble mutante (Froehlich, 2005). En un extenso y exhaustivo trabajo lograron demostrar que los genes se transcriben, que unen biliverdina o fitocromobilina *in vitro* y que las proteínas tienen las propiedades espectrales correspondientes a los fitocromos, con la diferencia de que con uno de ellos adquiere una conformación Pfr en oscuridad. Sin embargo a pesar de los análisis fisiológicos, el comportamiento de las mutantes siempre fue idéntico al de la cepa silvestre.

2.3.3 *Trichoderma atroviride*

Es un hongo deuteromiceto, aunque debido a que se conoce su telemorfo, *Hypocrea*, algunos autores lo consideran un basidiomiceto (Corrochano, 2005). El micelio es blanquecino en oscuridad y se forma de reproducción asexual formando conidias de color verde oscuro por exposición a la luz o estrés nutricional (Betina 1984). *T. atroviride* es un hongo micoparasítico, el cual produce una extensa gama de enzimas hidrolíticas entre ellas glucanasas y quitinasas, por lo cual ha sido empleado como agente de biocontrol.

En *T. atroviride* se conocía el efecto de la luz azul como inductor de la esporulación, evento que se inicia con la formación de hifas aéreas y posteriormente de fiálides y conidióforos maduros. En un cultivo crecido en obscuridad, un pulso de luz azul provoca la formación de un anillo de conidias entre las 24 a 48 hrs en lo que fuera el frente de crecimiento al momento de la iluminación. En 1969 Kumagi determinó el espectro de acción de la esporulación, el cual presenta máximos a los 380, 430 y 490 nm, lo cual sugirió la presencia de un receptor tipo flavina o carotenos. Lo anterior volvió a este organismo un interesante modelo de estudio morfogenético así como uno fotobiológico en el cual también se dio la búsqueda del criptocromo, el receptor de luz azul (Betina, 1984; Horwitz 1984).

Un pulso de luz no sólo provoca la esporulación de *T. atroviride*; sino que también se producen cambios en la polarización de la membrana y aumento intracelular en los niveles de ATP (Tamova, 1995).

En estudios de expresión genética se describió que la fotoliasa (*phr1*) se induce de forma rápida y transitoria en respuesta a un pulso de luz (Berrocal-Tito, 1999). La expresión de este gen es semejante a la expresión de los genes tempranos de respuesta a luz azul en *N. crassa* (Linden 1997). Se demostró que la fotoinducción de *phr1* es independiente de la fotoconidiación pues la cinética de expresión del primero no se altera con la aplicación de cAMP o atropina. La aplicación de cAMP al medio promueve la conidiación aun en obscuridad mientras que el uso de atropina, compuesto que reduce los niveles de cAMP en hongos, impide la esporulación aun después de la inducción con luz. Lo anterior sugiere que existen por lo menos 2 vías de transducción de la señal luminosa (Berrocal-Tito, 1999; Berrocal-Tito, 2000).

Casas-Flores mediante PCR obtuvo los receptores a luz azul de *T. atroviride*, generando posteriormente las respectivas mutantes que fueron denominadas blr (Blue Light Regulator) las cuales no responden a luz azul (2004). BLR 1 y BLR 2 son ortólogos de los WC 1 y WC 2 de *N. crassa* respectivamente. Aunque estructuralmente semejantes pues están presentes 3 dominios PAS siendo el del extremo amino tipo LOV; *blr1* no posee señal de localización nuclear ni una extensión rica en ácido glutámico. La semejanza entre *blr2* y *wc2* es mayor pues ambos contienen en su secuencia un dominio PAS y un dominio de unión a DNA tipo GATA.

Estudios posteriores demostraron que la luz azul induce genes con una cinética similar a la de *phr* los cuales se denominaron *blu*. De estos genes algunos son dependientes de los blrs y por lo tanto en las mutantes no se expresan en respuesta a la luz; mientras que otros son independientes y siguen respondiendo al estímulo (en preparación). Asimismo se describió por primera vez la represión de genes por efecto de la luz azul.

Se comprobó que la vía de conidiación está intacta en las mutantes blr, pues aunque éstas no esporulan en respuesta a la luz, una acción que genere daño mecánico en el micelio dispara la conidiación (Casas-Flores, 2004). En las mismas mutantes se describió una respuesta a luz roja en *T. atroviride*, la cual consistía en la formación de un anillo de hifas aéreas en el frente de crecimiento al momento del pulso (Casas-Flores, 2004b). La luz roja también generaba una disminución en el crecimiento aunque con menor eficiencia que la luz azul. El efecto en la reducción del crecimiento no se presentaba en la cepa silvestre bajo ningún tipo de luz ni en las mutantes si éstas eran iluminadas con luz blanca. Por lo tanto el efecto sobre el crecimiento era longitud de onda específico sugiriendo la presencia de otros fotorreceptores.

Debido a que se ha sugerido que los niveles de cAMP en *T. atroviride* intervienen en la conidiación, se estudiaron los niveles de actividad de la PKA la cual se eleva ante un pulso de luz tanto en la cepa silvestre como en las mutantes *blr* (Casas-Flores, 2005). La sobreexpresión de la unidad regulatoria de la PKA provoca conidiación aún en obscuridad aunque la actividad de la enzima es nula tras un pulso de luz; mientras que una mutante por antisentido no esporula ante la inducción con luz y presenta actividad de PKA constitutiva. Por medio de estas mutantes se determinó que los genes de respuesta a luz azul (*blu*) no son necesarios ni suficientes para la conidiación pues en la sobreexpresante no se inducen mientras que en la antisentido si lo hacen.

2.3.4 *Trichoderma reesei*

Trichoderma reesei es un hongo ascomiceto biotecnológicamente importante. En luz tiene la capacidad de secretar cantidades importantes de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas y también tiene el potencial para la producción de proteínas heterólogas conducidas por algunos promotores de celulasa. A diferencia otras especies de *Trichoderma* en *T. reesei* no se ha estudiado la respuesta a la luz. Sin embargo durante la búsqueda de genes inducidos por celulosa mediante el uso de la hibridación substractiva se encontraron 20 genes dentro de lo cuales aparecieron fragmentos de un gen que codifica para un dominio PAS con alta similitud a *vivid* de *N. crassa* (Schmoll, 2004). En un estudio posterior se demostró la semejanza entre *vivid* y este gen, que se denominó *envoy* (Schmoll, 2005). En dicho trabajo se generó una mutante por inserción en el dominio PAS de *envoy* y se evaluaron algunas características mostrando que este gen es inducido por luz y es necesario para el desarrollo normal de *T. reesei* bajo un regimen de luz. También se

describió que la luz aumenta la expresión de celulasas, mas este estímulo no tiene ningún efecto en la expresión de éstas si no se encuentra presente el inductor, la celulosa.

3. JUSTIFICACIÓN

La respuestas a luz que se han descrito hasta ahora en *Trichoderma reesei* se han observado en luz blanca la cual provoca un efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo colonial. El saber que la luz blanca se descompone en diferentes longitudes de onda se decidio probar algunas de ellas, como luz azul, rojo, rojo lejano y la luz blanca como tal para ver el efecto que esta pueda provocar sobre la conidiación y crecimiento de *T. reesei* y la mutante *envoy*, asi como la expresión de algunos genes de respuesta a luz azul.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos general

Evaluar el efecto de la luz sobre la conidación de *Trichoderma reesei* y la mutante *envoy*

4.2 Objetivos particulares

- 1) Determinar el efecto de las diferentes longitudes de ondas sobre la formación de conidias en *Trichoderma reesei* y la mutante *envoy* .
- 2) Análizar la expresión de los genes *blu1, blu2*, y *envoy* en *Trichoderma reesei* y la mutante *envoy* en respuesta a luz azul.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Cepas

Las cepas empleadas en el presente estudio fueron *Trichoderma reesei* QM9414 y la mutante *envoy* (Schmoll, 2005).

5.2 Medios y condiciones de crecimiento

Los medios de cultivo utilizados fueron PDA (Agar, Papa, Dextrosa, DIFCO) y PDAH (Agar, Papa, Dextrosa, DIFCO adicionado con 50 μ g/ml de higromicina).

5.3 Ensayos de luz

Para todos los ensayos de luz se prepararon preinóculos de *Trichoderma* colocando un bloque de micelio en PDA e incubando en oscuridad durante 48 h. A partir de este cultivo se cortaron bloques de la periferia de la colonia con ayuda de un sacabocados y de un bisturí esterilizados. El bloque se transfirió a medio PDA y se incubó por 48 h a 28°C. Las colonias así obtenidas se sometieron a los diferentes estímulos luminosos que se describirán a continuación. El manejo de todos los cultivos se llevó a cabo en un cuarto oscuro con luz roja de seguridad ($0.1\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{ s}$).

La irradiación se realizó en cajas negras con lámparas fluorescentes con o sin un filtro para obtener la longitud de onda (λ) deseada. Se emplearon los filtros LEE 183 Moonlight Blue para luz azul, LEE 182 Light Red y LEE 106 Primary Red para luz roja y la sobreposición del 183 con el 182 ó 106 para rojo lejano. Así los espectros de transmisión fueron: luz azul, entre 380 a 550 con máximo en 450 nm; luz roja desde los 600 hasta 800 nm; y luz rojo lejano de los 700 a los 800 nm.

5.3.1 Ensayo de conidiación inducida por un pulso de luz de diferente longitud de onda

Las colonias de *T. reesei* y la mutante *envoy* fueron crecidas durante 48 h en oscuridad antes de recibir un pulso de 10 min correspondiente a las diferentes longitudes de onda; azul (Az), roja (R), rojo lejano (RL), o blanca (B) (5.0, 4.5, 0.02 y $12\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{ s}$ respectivamente). Después del pulso los cultivos se mantuvieron en oscuridad durante 48 h a una temperatura de 28°C antes de la evaluación del crecimiento y la conidiación.

5.3.2 Ensayo de conidiación inducida por un pulso de luz de diferente longitud de onda.

Las colonias *T. reesei* y la mutante *envoy* fueron crecidas 24h en oscuridad después se sometieron a iluminación continua durante 5 días (fluencias de 0.36, 0.40, 0.01 y 2.10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ s de luz Az, R, RL y B respectivamente). Para lograr esta afluencia de diferentes tipos de luz usamos los filtros antes mencionados sobre cada una de las cajas petri, cubriendo el resto de ellas con papel aluminio para evitar el paso de otro tipo de luz. Después de 5 días las colonias fueron evaluadas en crecimiento y producción de conidias.

5.4 Método para la cuantificación del número de conidias

La cuantificación del número de conidias se realizó de la siguiente manera: a cada una de las colonias expuestas a las diferentes condiciones se les agregó 5ml de agua destilada esteril, posteriormente se raspó la superficie de la colonia con una espátula de vidrio esteril arrastrando así las conidias. Después del raspado suave se filtró la suspensión para eliminar el micelio presente. El número de conidias se cuantificó en una cámara Neubauer (Bright Line).

5.5 Ensayo para el análisis de la expresión genética.

Las colonias *T.reesei* y la mutante *envoy* se incubaron 48h en oscuridad antes de ser sometidas a la exposición continua de luz, los cultivos se sometieron a dos pulsos de luz azul con duración de 4h cada uno ($1 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$ y $5 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}$) la colecta del material biológico (micelio) se realizó 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240, 245, 250, 255, 270, 300, 360 y 480 minutos de iniciado el primer estímulo.

5.5.1 Extracción de RNA

Se pesaron 4g de micelio congelado y se molió con nitrógeno líquido, utilizando un mortero previamente enfriado. Al micelio molido se le adicionó 500 μl de NETS (NaCl 2.5 mM, SDS 5 mM, Tris- HCl pH 8.0 1M, EDTA pH 8.0 0.5M) mas 500 μl de fenol- cloroformo- isoamilico (24-25-1), se mezcló por inversión y agitó 10 min en vórtex. La mezcla fue centrifugada 10 min a 8000 rpm para recuperar la fase acuosa adicionandole 500 μl de fenol-cloroformo- isoamilico. Esta mezcla se agitó 10 min en vortex, se centrifugó 10 min a 8000 rpm y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo adicionando 1/10 del volumen de acetato de Na ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \text{ Na } 2\text{M}$) más dos volúmenes de etanol absoluto. Las muestras se colocaron a -20°C durante 20 minutos. El ácido nucleico se recuperó por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min y disolvió en 300 μl de agua- DEPC. Una vez disuelto se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 250 μl de acetatao de litio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O Li}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O } 4\text{M}$), incubando toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 8000rpm durante 10 min. La pastilla obtenida se disolvió en 300 μl de agua- DEPC adicionandole 30 μl de acetato de Na ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2 \text{ Na } 2\text{M}$) y dos volúmenes de etanol absoluto

incubando a -20°C durante 2 horas. El RNA se recuperó por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se deja secar a TA para finalmente resuspenderla en un volumen de 35-50 μl de agua DEPC.

5.5.2 Análisis tipo Northern Blot

Veinte microgramos de cada muestra de RNA cuantificado en un espectrofotómetro (ND-1000 Nanodrop) se separaron a través de una electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturizantes (Agarosa 1.5g, MOPS 10X 10 ml, agua-DEPC 75ml y 17ml de formaldehído). El gel se corrió a 80 voltios durante dos horas para posteriormente ser transferido por capilaridad a una membrana de Nylon (Amersham Hybond-N+, Membrane optimized for nucleic acid transfer) (BIOSCIENCES) durante 16h con una solución desnaturizante (SSC 6X). La membrana se dejó secar a temperatura ambiente y el RNA se fijó a la membrana usando un entrecruzador (UV stratalinker 2400) (STRATAGENE). La hibridación se realizó como se describe a continuación: 1) Prehibridación, las membranas se incubaron a 65°C durante 6h con una solución de prehibridación (NaHPO_2 250mM, SDS 350mM, EDTA 2mM, H_2O 398ml, Albúmina 10mM). 2) La hibridación se realizó toda una noche agregando a la membrana las sondas de marcaje en solución de hibridación (NaHPO_2 250mM, SDS 350mM, EDTA 2mM, H_2O 398ml, Albúmina 10mM). 3). Los lavados se realizaron con las soluciones I y II (Solución I Na_2HPO 100Mm , SDS 12.5mM, EDTA 1Mm y Solución II Na_2HPO 40Mm , SDS 12.5mM, EDTA 1mM) incubando la membrana en la solución I y II a 65°C . Finalmente se realizó la captura de la radiación ionizante por una emulsión fotográfica (Sambrook, 1989). Las sondas marcadas con ^{32}P se generaron usando el método de "Random Priming" siguiendo el protocolo del proveedor (Amersham Biosciences).

Obtención de las sondas para marcaje.

Las sondas empleadas fueron los productos obtenidos por PCR correspondientes a los genes homólogos de *T. atroviride*: *blu-1*, *blu-2*. Adicionalmente se utilizó el gen *envoy*, el cual se obtuvo a partir del vector pENV-HPH.

Obtención de sondas por PCR

Tabla 3 Oligonucleótidos y Condiciones de PCR empleados

Organismo	Gen	Oligonucleótido 5'- 3'	Oligonucleótido 3'- 5'
<i>T. reesei</i>	Blu1	CTTGTTGGATGGCATCTGTGTG	CCCAAAGTGGCGAAGTCCCGC
<i>T. reesei</i>	Blu2	ATGCCTTTCAAAGGTGCAAAGAG	CTACTTTCCACTCTCGATGCCTTC

Condiciones del PCR

1 ciclo: 94 °C / 5 min; 30 ciclos: 94 °C / 30 s, 65 °C / 30s, 72 °C 90s; 72 °C / 10min

5.5.3 Aislamiento del Plásmido

Método Birboin para Minipreparaciones de DNA plásmidico (MP)

Apartir del cultivo bacteriano (*E. coli*) crecido durante 14 h se transfirieron 1.5 ml a un microtubo y se centrifugó durante 20 seg a 12000 rpm. El sobrenadante se decantó y la pastilla de resuspendió en 200 µl de solución I (Tris-Hcl 25Mm pH 8.0, EDTA 10Mm, Glucosa 50Mm) manteniendo la muestra en hielo. Se adicionaron 400 µl de la solución II, preparada en el momento (NaOH 0.2N, SDS 1%) y se mezcló por inversión. La mezcla se incubó por 5min en hielo y se adicionaron 300 µl

de la solución III [Acetato de potasio 26.62g, Ácido acético glacial 11.5 ml, agua destilada estéril para preparar 100 ml ajustar pH 4.8 y 5 μ l de RNAasa (1 μ g/ μ l)]. La mezcla se agitó en el vortex, se incubó durante 15 min en hielo y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min para elimimnar restos celulares y DNA cromosómico. El sobrenadante se rescató y se adicionó un volumen igual de isopropanol mezclandó por inversión e incubando a -20 °C durante 15 min. Se centrifugó 15 min a 12000 rpm para precipitar el DNA plasmídicoy se eliminó el sobrenadante lavando la pastilla con 500 μ l de etanol al 70%. Finalmente se centrifugó 10min a 12000rp, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendio en un volumen conocido de agua estéril.

Digestión del DNA plasmídico y separación del fragmento por electroforesis.

Digestión del plásmido

La digestión vector pENV-HPH se llevo a cabo con las enzimas de restricción *XhoI* y *PstI* según las especificaciones del porvedor (*INVITROGEN*).

Electroforesis en geles de agarosa

Para realizar el análisis de la calidad del DNA extraído, separar fragmentos y verificar las restricciones realizadas, el DNA se corrió en geles de agarosa al 1% (Sambrook, y col 1989), disuelta en un amortiguador TAE 1X (Tris 40Mm, pH 8) con bromuro de etidio (1µg por cada 2 ml de agarosa). El DNA se mezcló con 1/6 de volumen de buffer de carga y se colocó en los posillos del gel. Los geles se corrieron utilizando como buffer TAE 1X (GIBCO BLR Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus) a un voltaje constante de 75 voltios. El DNA se obsevó utilizando un transluminador de luz UV (BIO- RAD UV Transilluminator 2000).

Purificación del plásmido mediante columna de QIAGEN

El DNA separado en geles de agarosa se recuperó pasando la muestra a través de columnas QIAGEN Plasmid Midi Kit (100) siguiendo las intrucciones del proveedor (QIAGEN).

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de un pulso de luz de diferente longitud de onda sobre la conidiación en *T. reesei* silvestre y mutante *envoy*.

En el reporte original de la mutante *envoy* de *T. ressei* se describió que la exposición de las colonias a luz blanca tenia un efecto negativo sobre el crecimiento, esto es, una disminución considerable del desarrollo colonial. Este efecto era nulo cuando la mutante era crecida en oscuridad, donde el crecimiento era similar al de la cepa silvestre (Schhmoll, 2005). Con el fin de determinar con mayor claridad el efecto del espectro luminoso sobre

el desarrollo y diferenciación de la mutante *envoy*, se analizó el crecimiento y la producción de conidias por efecto de 3 longitudes de onda (azul, rojo y rojo lejano).

Inicialmente se consideró la respuesta a un solo pulso de luz de 10 min. sobre una colonia crecida en oscuridad. La respuesta de *T. reesei* y la mutante *envoy* al pulso de luz después de 48 h de haberlo recibido se observa en la figura 2. El crecimiento de ambas cepas es muy similar en cuanto a diámetro y aspecto colonial bajo las diferentes longitudes de onda probadas. Sin embargo, resulta interesante la formación más pronunciada de un anillo de conidias maduras en la mutante *envoy* bajo la afluencia de luz azul y blanca en comparación con las otras longitudes de onda e incluso con la respuesta de la cepa silvestre *T. reesei* (figura 2).

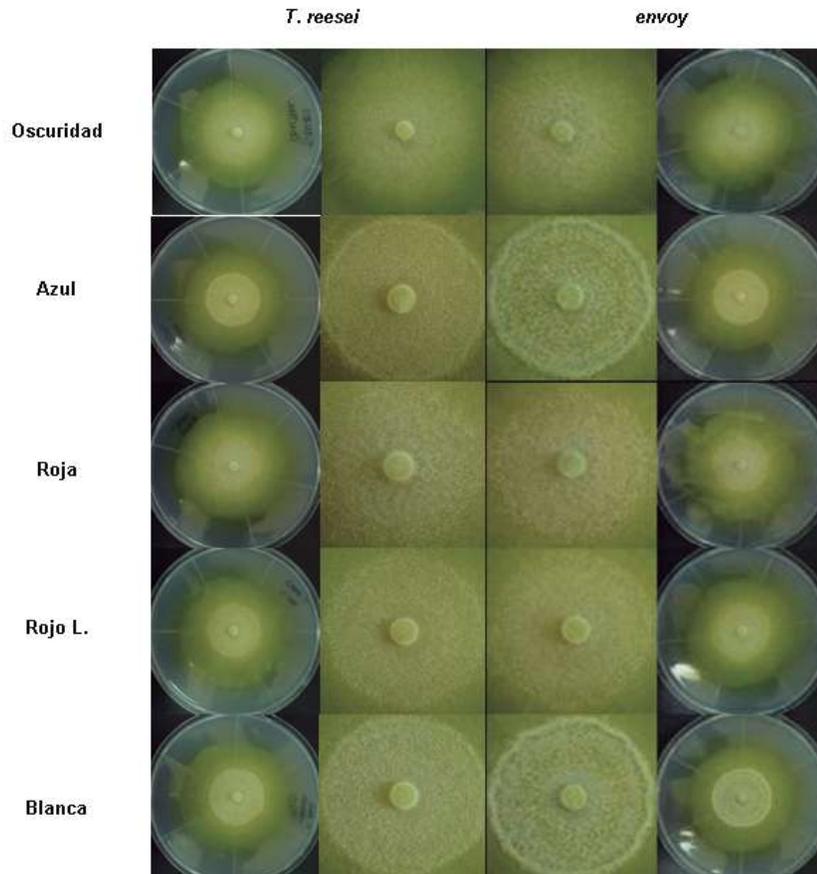


Figura 2. Efecto de la luz sobre el crecimiento y conidiación de *T. reesei* y la mutante *envoy*. Colonias de 48 h de *T. reesei* (izquierda) y *envoy* (derecha) recibieron un pulso de luz de 10 min de las diferentes longitudes de onda (Rojo = $0.40 \mu\text{mol} / \text{m s}^2$, Rojo lejano = $0.01 \mu\text{mol} / \text{m s}^2$, Azul = $0.38 \mu\text{mol} / \text{m s}^2$, Blanca = $1.95 \mu\text{mol} / \text{m s}^2$). y se incubaron 48 h en oscuridad.

Siendo evidente la diferencia en la formación de estructuras reproductivas asexuales entre las cepas *T. reesei* y mutante *envoy*, así como entre las diferentes longitudes de onda se procedió a determinar el número de conidias producidas en cada condición (Tabla 1). La producción de conidias fue en todos los casos mayor en la mutante *envoy* comparada con la cepa silvestre en las diferentes longitudes de onda, esto es un 44%, 21%, 13.9%, 27.2% mayor en las longitudes de onda Azul, Roja, Rojo L, Blanca, respectivamente (Tabla1). Para el caso especial de la mutante *envoy*, la producción de conidias se ve incrementada bajo afluencia de luz azul y blanca respecto a las otras longitudes de onda, siendo la luz blanca la más eficiente induciendo la producción de conidias (Figura 3). La producción de conidias en oscuridad constante además de ser 10 veces menor que el valor mas alto obtenido en luz blanca, no resulta diferente entre las cepas. (Tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación del número de conidias producidas por *T. reesei* y la mutante *envoy* en respuesta a diferentes longitudes de ondas.

Condición	N ° de conidias ($\times 10^6$) / ml	
	<i>T. reesei</i>	<i>Envoy</i>
Oscuridad	1.0	0.75
	0.75	1.0
	0.75	0.50
	0.75	0.75
	4.75	7.5
	4.75	7.25

Azul	5.0	6.5
	4.5	7.5
Roja	3.0	4.0
	3.25	4.0
	3.25	4.0
	3.25	4.25
Rojo lejano.	4.75	5.75
	5.0	5.75
	5.23	6.0
	5.0	5.75
Blanca.	8.0	11.5
	8.25	10.5
	8.25	11.04
	7.53	11.04

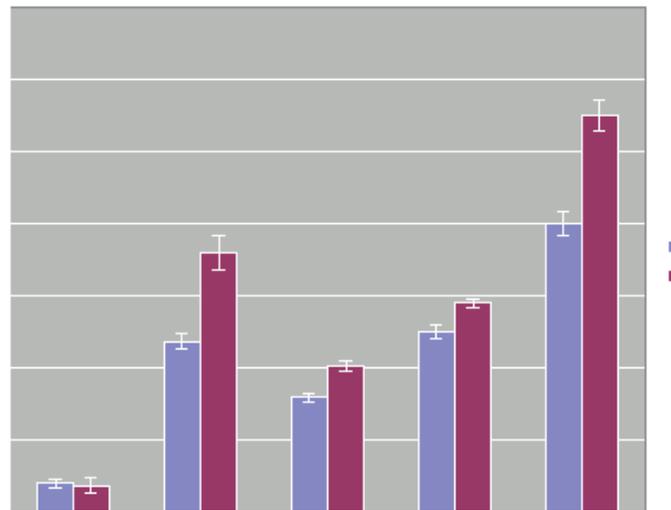


Figura 3. Comparación del número de conidias promedio producidas por *T. reesei* y *envoy* a diferentes longitudes de onda (por efecto de un Pulso de 10 min).

6.2 Efecto de la exposición constante a diferente longitud de onda sobre la conidiación en *T. reesei* silvestre y mutante *envoy*.

Habiendo establecido la respuesta a un pulso de luz de diferentes longitudes de onda sobre el crecimiento y desarrollo de *T. reesei* y la mutante *envoy*, se procedió a evaluar el efecto de la exposición a un estímulo luminoso constante similar al previamente descrito por Schmol y col (2004). La luz constante correspondiente a las longitudes de onda blanca y azul provoca una respuesta diferente en la cepa mutante *envoy* respecto a lo observado cuando se dio solo un pulso, esto es pérdida del crecimiento radial y producción de un pigmento amarillo (figura 4). Este efecto no se observó en la cepa parental cuyo crecimiento resultó normal en cualquiera de las condiciones probadas (figura 4).

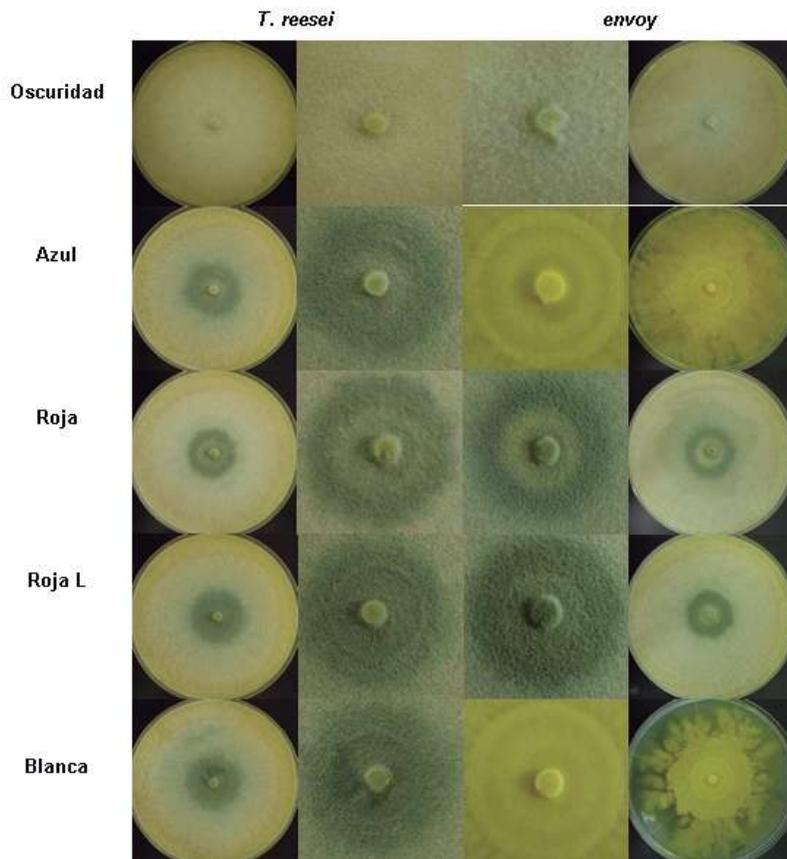


Figura 4. Efecto de la luz sobre el crecimiento y conidiación de *T. reesei* y la mutante *envoy*. Las cepas se incubaron en oscuridad durante 24h antes de ser expuestas a iluminación constante por 5 días bajo diferentes longitudes de ondas (Rojo = 0.40 mol / m s^2 , Rojo lejano = 0.01 mol / m s^2 , Azul = 0.38 mol / m s^2 , Blanca = 1.95 mol / m s^2), las columnas centrales muestran un acercamiento de cada una de las cepas.

Tabla 2. Cuantificación del número de conidias producidas por el efecto de las diferentes longitudes de ondas de luz constante.

Condición	N ° de conidias(x10 ⁹) / ml	
	<i>T. reesei</i>	<i>Envoy</i>
Oscuridad	0.00175	0.00275
	0.002	0.00225
	0.002	0.00275
	0.002	0.003
Azul	7.50	0
	7.25	0
	7.25	0
	6.75	0
Roja	3.50	1.5
	4.0	1.75
	3.25	1.5
	3.25	1.25
Rojo I	4.50	1.0
	4.0	1.5
	4.50	1.0
	4.0	1.0
Blanca	7.5	0
	8.0	0
	9.0	0
	7.5	0

La iluminación constante provoca una respuesta diferencial en *T. reesei* reflejada en la producción de conidias bajo todas las condiciones

probadas, observándose un producción mayor en un 10% que Azul, 56.25% que roja, 46.87% que rojo lejano, bajo el efecto de luz blanca (tabla 2). Por otra parte, la iluminación constante sobre la mutante *envoy* induce la conidiación solo bajo las longitudes de ondas roja y rojo lejano (tabla 2). La luz azul y blanca al inducir un cambio morfológico tan severo no condujo a la producción de conidias. En oscuridad constante el comportamiento las cepas *T. reesei* y la mutante *envoy* es similar en su crecimiento siendo indistinguible ambas cepas bajo esta condición, sin embargo difieren en la producción de conidias, existiendo un mayor número de conidias mutante *envoy* aproximadamente de un 10% (fig 5) como se habia descrito anteriormente.

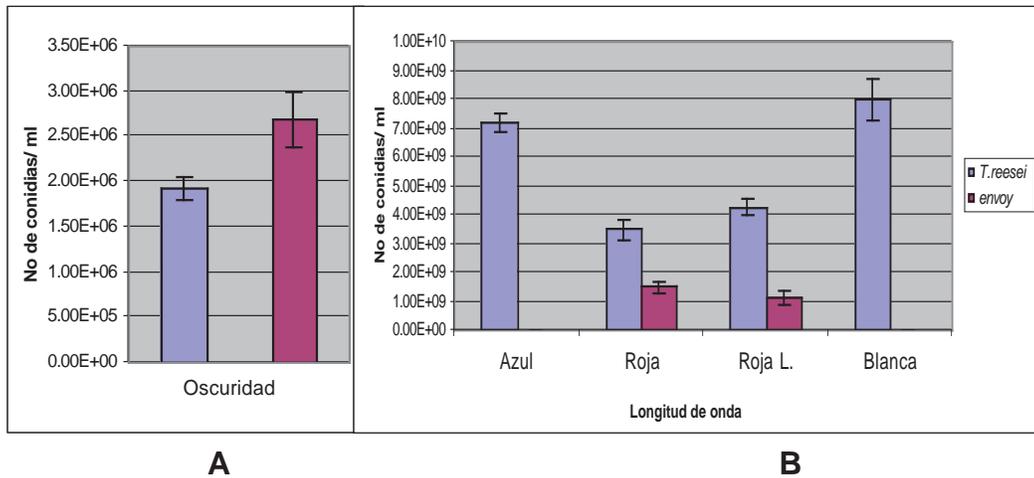


Figura 5. Comparación del número de conidias producidas por *T.reesei* y *envoy* a diferentes longitudes de onda (iluminación constante durante 5 días).

6.3 Análisis de la expresión de los genes *blu1*, *blu2* y *envoy*

Los resultados de los ensayos de exposición a las diferentes longitudes de onda definieron una respuesta diferencial a la luz azul en la mutante *envoy*, donde se observó un efecto negativo sobre el crecimiento y la reproducción asexual (conidiación). Previamente en *Trichoderma*

atroviride se había descrito la participación de las proteínas Brl1 y Brl2 en la regulación de la expresión de genes de respuesta a luz azul. Los genes *blu1* y *blu2* que codifican para una proteína del metabolismo de la glucosa y para la fotoliasa respectivamente responden a un pulso de luz azul en *T. atroviride* pero no en las mutantes *brl1* y *brl2* (Rosales y col., 2006). Con el fin de determinar el papel del gen *envoy* en la regulación de estos genes en *T. reesei* bajo condiciones de exposición constante al estímulo luminoso, se llevó a cabo un análisis de expresión genética en un ensayo de fotoadaptación (ver materiales y métodos). En *T. reesei* el gen *blu1* comienza a expresarse 30 min después de ser expuesta la cepa a iluminación constante a una intensidad de $1.0 \mu\text{mol} / \text{m} \text{ s}^2$ alcanzado su nivel máximo de expresión a los 60 min. Este nivel de expresión se mantuvo durante los siguientes 180 min que la cepa estuvo expuesta a una afluencia de $1.0 \mu\text{mol} / \text{m} \text{ s}^2$. Cuando la intensidad de luz se incrementó a $5.0 \mu\text{mol} / \text{m} \text{ s}^2$ su nivel de expresión permaneció sin cambio, la señal comienza de nuestro gen comienza a disminuir a los 250 min de estar la cepa bajo iluminación constante aun cuando nunc resgrasa a su estado basal podemos ver que su expresión si disminuye, es interesante notar que este se recupera nuevamente a los 360 de iniciado el estímulo luminoso y permaneció esta señal hasta el término del ensayo. (Figura 7 A).

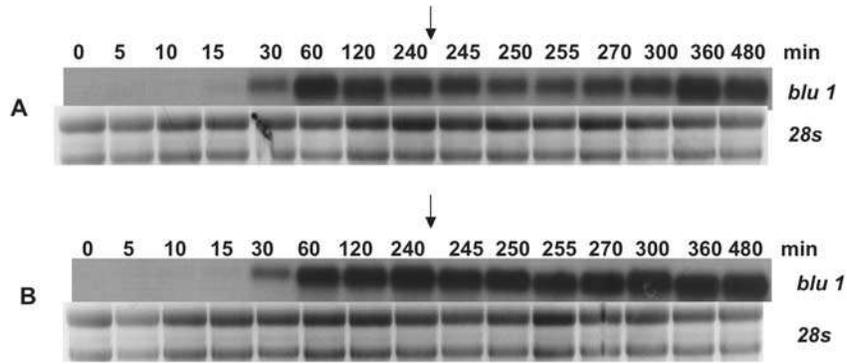


Figura 7. Análisis tipo Northern de la expresión de los genes *blu1*. Las cepas *T. reesei* (A) y *envoy* (B) fueron sometidas a iluminación constante durante 8 horas. El carril cero es el control que se mantuvo en oscuridad durante el ensayo. Los carriles 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 min. corresponden a los tiempos de colecta bajo intensidad de 1.0 mol /m s^2 , los carriles 245, 250, 255, 270, 300, 360, 480 min. correspondientes tiempos de colecta después de aumentar la intensidad de la iluminación 5.0 mol /m s^2 . La sonda utilizada para la hibridación se indican al lado derecho de la figura.

El comportamiento *blu1* en la mutante *envoy* tiene una expresión similar a la cepa silvestre ya que su expresión inicia a los 30 min posteriores a la exposición alcanzando su nivel máximo a los 240 min. Cuando se hizo a una intensidad de $5.0 \text{ } \mu\text{mol /m s}^2$ se observa una disminución de la expresión del gen siendo esta más notoria a los 255 min (figura 7B).

El gen *blu2*, el cual codifica para una fotoliasa. La cepa silvestre *T. reesei* comienza a expresarse a partir de los 30 min de ser expuesta a luz azul $1.0 \text{ } \mu\text{mol /m s}^2$ y alcanzan su expresión máxima a los 60 min. Este gen permanece encendido hasta los 240 min que dura la exposición a iluminación constante a una longitud de onda azul de intensidad de $1.0 \text{ } \mu\text{mol /m s}^2$. El cambio en la intensidad de la luz a $5.0 \text{ } \mu\text{mol /m s}^2$ no promueve ningún cambio en la expresión del gen (figura 8A). Un ligero decremento en la expresión se observa en los minutos al cambio de intensidad el cual se recupera al final el ensayo (tiempos de 360 min y

480 min). siguientes La cepa mutante *envoy* se expresa de manera similar que en nuestra cepa silvestre ya que comienza la expresion del gen *blu2* a los 30 min de inciado el ensayo y alcanza su expresión maxima a los 60 min

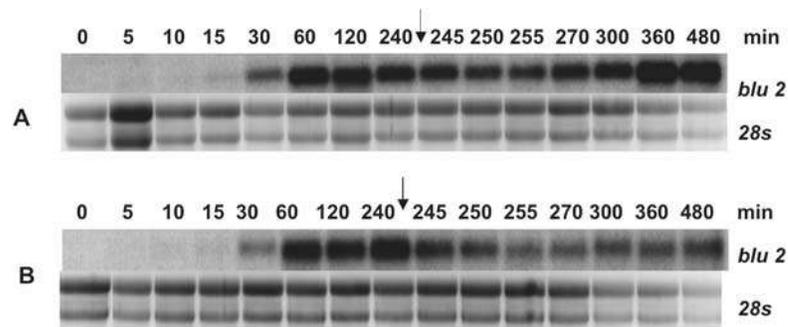


Figura 8. Análisis tipo Northern de la expresión de los genes *blu2*. Las cepas *T. reesei* (A) y *envoy* (B) fueron sometidas a iluminación constante durante 8 horas. El carril cero es el control que se mantuvo en oscuridad durante el ensayo. Los carriles 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 min. Corresponden a los tiempos de colecta bajo intensidad de $1.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, los carriles 245, 250, 255, 270, 300, 360, 480 min. correspondientes tiempos de colecta después de aumentar la intensidad de la iluminación $5.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. La sonda utilizada para la hibridación se indican al lado derecho de la figura.

permaneciendo esta los siguientes 180 min. El cambio en la intensidad luminosa no promueve una mayor expresión y y como en la cepa silvestre se observa una disminución de la expresión resultados del cambio de intensidad mimo que se recupera al final del ensayo (figura 8B).

El análisis tipo Northern para el gen *envoy* en la cepa silvestre y mutante se muestra en la figuras 9. En el se observa que para *T. reesei* el gen *envoy* comienza a expresarse a los 15 min de ser expuesta la cepa a

iluminación constante a una intensidad de $1.0 \mu\text{mol /m s}^2$, alcanzando *envoy* su expresión máxima a los 30 min, resgresando a su estado basal a los 210 min despues de alcanzar su expresión máxima. Despues de mantener nuestra cepa 4 h bajo iluminación constante a una intensidad de $1.0 \mu\text{mol /m s}^2$ cambiamos la intensidad de la luz a una de mayor afluencia de $5.0 \mu\text{mol /m s}^2$. Dicho cambio de intensidad es percibido de manera inmediata por nuestro gen provocando nuevamente su expresión máxima, el tiempo en el que este responde es de 5 min (fig 6 A). Esta señal permanece constante durante los proximos 15 min (245, 250, 255 min) al termino de los cuales la señal comienza a decaer a los 270 y 300 min de estar sometidos a iluminación constante despues de esta caída en la expresión el RNA correspondiente puede detectarse claramente a los 115 min de ser expuesto a la intensidad de $5.0 \mu\text{mol /m s}^2$. Por otra parte en la cepa mutante el gen *envoy* se expresa de manera singular mostrando la presencia de tres transcritos que no corresponde al peso del RNAm, la señal los posibles trascritos truncados se obsevan a los 15 min de ser expuestos a luz constante $1.0 \mu\text{mol /m s}^2$ dicha señal permace constante durante todo el ensayo no presentando ningun cambio en la expresión aun cuando cambiamos la intensidad de la luz. Finalmente y para evaluar el papel del gen *envoy* en las respuestas antes descritas se estudio la expresión del mimo (figura 9B).

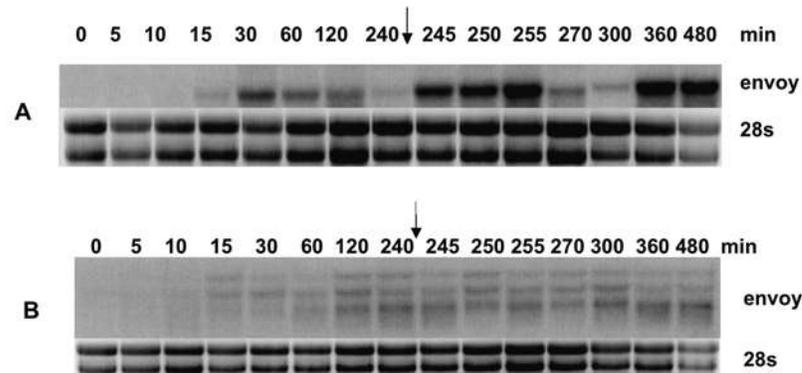


Figura 9. Análisis tipo Northern de la expresión del gene *envoy*. Las cepas *T. reesei* (A) y *envoy* (B) fueron sometidas a iluminación constante durante 8 horas. El carril cero es el control que se mantuvo en oscuridad durante el ensayo. Los carriles 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 min. Corresponden a los tiempos de colecta bajo intensidad de $1.0 \mu\text{mol} / \text{m s}^2$, los carriles 245, 250, 255, 270, 300, 360, 480 min. Correspondientes tiempos de colecta después de aumentar la intensidad de la iluminación $5.0 \mu\text{mol} / \text{m s}^2$. La sonda utilizada para la hibridación se indica al lado derecho de la figura.

7. DISCUSIÓN

En *N. crassa* se han estudiado los eventos morfogenéticos causados por luz. Algunos de ellos incluyen la carotenogénesis del micelio, formación de conidias, fototropismo del conidióforo, cambios en el potencial de membrana, sincronización del ritmo circadiano y formación de protoperitecios entre otros (Linden, 1998; Liu, 2003). En 2002 He y Froehlich (2002) establecieron que los genes correspondientes a las proteínas *white collar 1* y *2* (*wc-1* y *wc-2*) forman el fotorreceptor por medio de un heterodímero. Este complejo es el responsable de la percepción de la luz azul y la señalización de dicho estímulo, otro evento muy importante en *N. crassa* es la fotoadaptación y la pérdida de la sensibilidad hacia la luz. La cepa silvestre es incapaz de responder a un segundo estímulo luminoso dentro de las primeras 2 horas, tiempo en el cual los niveles de expresión vuelven a su estado basal. Sin embargo responde ante un segundo pulso de luz de mayor intensidad; por lo tanto es apta de distinguir entre intensidades luminosas. VVD es la proteína responsable de estos eventos pues se ha demostrado que la mutante en ésta presenta niveles de inducción de genes más elevados y prolongados; es incapaz de distinguir entre 2 estímulos de diferente intensidad (Schwerdtfeger, 2001; Schwerdtfeger, 2003) lo cual explica el característico fenotipo de color anaranjado intenso, vívido, del cual recibió su nombre. Por lo tanto VVD funciona como un represor y modulador de la señal luminosa.

En los ensayos que se realizaron en el desarrollo de este trabajo observamos el efecto de las diferentes longitudes de ondas sobre *T. reesei* y la mutante *envoy* las cuales presentaron fotoconidación. Los resultados presentados fueron los obtenidos en ensayos realizados con un pulso de luz con duración de 10 min bajo y otros de ensayos de luz

constante durante 5 días en ambos ensayos se probaron las diferentes longitudes de onda (figuras 3 y 4). La respuesta de conidiación inducida por un pulso de luz de diferente longitud de onda, se aprecia un crecimiento en ambas cepas similar en cuanto a diámetro y aspecto colonial bajo las diferentes longitudes de onda probadas. Además que la cantidad de conidias producidas se incrementa indistintamente de la longitud de onda incidente en comparación con la obscuridad. Las implicaciones de lo anterior son interesantes porque la luz roja es capaz de estimular la conidiación y por lo tanto debe de existir un receptor a esta longitud de onda. La luz roja estimula la reproducción asexual en *A. nidulans* (Money, 1990), pero tanto en *T. atroviride* como en *N. crassa* ésta no tiene efecto en la conidiación. De confirmarse este efecto sería la primera vez que se reportaría que la luz roja estimula la conidiación en *Trichoderma* sp., mas no así en hongos. Sánchez Murillo (2004) describió el efecto de la luz en la conidiación de *Paecilomyces fumosoroseus*. Resultó interesante la formación más pronunciada de un anillo de conidias maduras en la mutante *envoy* bajo la afluencia de luz azul y blanca en comparación con las otras longitudes de onda e incluso con la respuesta de la cepa silvestre *T. reesei*. La respuesta a un pulso de luz sobre las dos cepas usadas en este ensayo inducen la conidiación independientemente cual sea la longitud de onda usada, sin embargo existe mayor eficiencia en la producción del número de conidias en la mutante *envoy* bajo cualquier condiciones estos resultados cambian cuando nosotros exponemos la cepa a iluminación constante durante 5 días ya que a las longitudes de onda azul y blanca la producción de conidias es nula incluso su crecimiento de ve afectado en presencia de estas longitudes, no obstante para la cepa silvestre la luz constante incrementa la producción del número de conidias bajo cualquier longitud de onda y su crecimiento es normal. Esto hace suponer que *envoy* es un modulador de la luz , represor de la conidiación que a su vez regula el crecimiento normal de la *T. reesei* (fig 3). Por ello es importante mencionar

que la cepa silvestre y la mutante *envoy* presentan fotoconidiación por luz roja en los diferentes ensayos lo que podía hacernos creer que *T. reesei* presenta un fotoreceptor a esta longitud de onda podría ser un fitocromos que es una proteínas homodiméricas capaces de percibir luz roja (R) y roja lejana (RL) al usar un tetrapirrol lineal como grupo cromofórico.

Los resultados obtenidos en los ensayos de fotoinducción se decidió ver si *envoy* funciona como modulador de la respuesta a luz, principalmente la azul, los resultados nos muestran que en presencia del gen *envoy* o sea una cepa silvestre tiene un crecimiento normal, mientras que en ausencia del gen *envoy* la cepa se vuelve tan sensible que su crecimiento se ve disminuido e irregular observado esta respuesta hacia la luz azul así como los datos preliminares existentes esto hace suponer que las vías de conidiación en el género *Trichoderma* están conservadas y que ninguno de los genes *blu* analizados se relaciona con ésta. Las cepas *T. reesei* y la mutante *envoy* fueron expuestas a luz azul durante 8h para analizar si el gen *envoy* se involucra en la respuesta luz azul.

Los genes analizados que se encuentran inducidos en *T. atroviride* ante un pulso de luz azul, se encontramos en *T. reesei* a la fotoliasa (*blu 2*), y una proteína del metabolismo de la glucosa, *grg-1*(*blu 1*). El patrón de la expresión observado en estos genes indica que la transcripción correspondiente comienza a acumular 5 minutos después del pulso ligero, alcanzando la inducción máxima en 30 minutos y disminuyendo por 120 minutos después de la exposición a la luz. (Rosales,2006). Los cambios transitorios similares en la expresión del gene se han descrito para los genes causados por la luz tempranos en *N. crassa* (Sommer; 1989).

Los ensayos realizados en este trabajo fueron hechos bajo luz azul constante donde probamos los genes *blu1*, *blu2* y *envoy* como sondas , los cuales muestran un pronto de expresión particular, las cepas que se

mantienen en obscurida no presentan expresión de ninguno de los genes tanto en la cepa silvestre como en la mutante *envoy* probandose asi que estos genes necesitan de luz para poder expresarse. Los genes *blu1* y *blu2* probados en este ensayo de fotoadaptación comienzan a expresarse a los 30 min de iniciado el ensayo, alcanzando su nivel máximo de expresión a los 60 min estos genes permanecen encendidos durante todo el ensayo, la señal decae pero en ningún momento regresan a su estado basal estos resultados se observaron en la cepa silvestre, por otra parte nuestro gen *envoy* se expresa a los 30 min y regresa a su estado basal a los 240min de estar expuesto a luz constante. Cuando se hizo el cambio de intensidad $5.0 \mu\text{mol /m}^2 \text{ s}^{-2}$ se observa una disminución de la expresión de estos genes *blu1* y *blu2* pero al final del ensayo ambos genes vuelven a expresarse. La sonda correspondiente al gen *envoy* si percibe el cambio rápidamente a los 5 min a este tiempo alcanza nuevamente su expresión máxima.

La mutante *envoy* la expresión de los genes *blu* no se ven regulados por el gen *envoy* ya que estos se expresan en desarrollo de todo el ensayo pero no perciben el cambio de intensidad de la luz, a diferencia de estos genes el gen *envoy* presenta tres posibles transcritos que no corresponden al rRNA los cuales se expresan durante el ensayo pero al igual que los genes *blu* no perciben el cambio de intensidad.

Lo anterior hace suponer que *envoy* es un regulador de la luz azul, encargándose de apagar los genes inducidos por la luz azul y permitiendo de esta forma hacer competente al organismo a responder ante un segundo estímulo o un cambio en la intensidad de luz. Estos mecanismos de regulación ya han sido descritos para *Neurospora crassa* (Schwerdtfeger, 2001; Schwerdtfeger, 2003). Sin embargo esto no implica que *envoy* tenga la misma función que su homólogo en *N. crassa*. Además de su relación con la expresión de celulasas (Schmoll, 2005), el daño ocasionado en el

desarrollo del hongo no se ha descrito con anterioridad para ningún fotorreceptor a luz azul en hongos.

8. CONCLUSIÓN

La pérdida de función de *envoy* causa una inhibición de crecimiento bajo la intensida luz azul y blanca .

9.BIBLIOGRAFÍA

Adams, T.H., Wieser, J.K., y Yu, J.-H. (1998) Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 35-54.

Ahmad, M., Jarillo, J.A., Smirnova, O. y Cashmore, A.R. (1998) Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in Phototropism. *Nature* **392**: 720–723.

Berrocal-Tito, G. (1999b) Caracterización del gen *phr1*, que codifica a la CPD-fotoliasa del hongo del suelo *Trichoderma harzianum*, y su papel en las respuestas a luz azul. Tesis para el grado de doctorado en ciencias. CINVESTAV-Irapuato, México.

Betina, V. (1984) Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Int. J. Microbiol.* **2**:55-68.

Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. y Fischer, R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol.* **15**:1833–1838.

Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden O., Freitag, M., Turner E.G., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, Dunlap, J.E., Loros, J.J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D.J., Zelter, A., Kalkman, E.R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., Pratt, R. (2004) Lessons from the Genome Sequence of

Neurospora crassa: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism. *Micribiol. Mol. Biol. Rev.* **68** (1): 1-108

Briggs, W.R. y Huala, E. (1999) Blue light photoreceptors in higher plants *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**:33–62

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

Cashmore A.R., Jarillo J.A., Wu Y.J. y Liu D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**:760-765.

Cerda-Olmedo, E. (2001) *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 503-512.

Cheng, P., He, Q., Yang, Y., Wang, L., y Liu, Y. (2003) Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 5938-5943.

Crosson, S., Rajagopal, S., and Moffat, K. (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**: 2-10.

Degli-Innocenti F. y Russo V. E. (1984) Isolation of new white collar mutants *Neurospora crassa* and studies on their behavior in the blue light-induced formation of protoperithecia. *J. Bacteriol.* **159**: 757–761

Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J. y Dunlap, J. C. (2002) White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* **297**: 815–819

Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C.P., Kinsey, J.A., Braun, E.L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G.O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R.L., Perkins, D.D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R.J., Osmani, S.A., DeSouza, C.P., Glass, L., Orbach, M.J., Berglund, J.A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J.C., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D.O., Alex, L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D.J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M.S., Lander, E.S., Nusbaum, C., and Birren, B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**: 859-868.

Griffith, G.W.; Jenkins G.I.; Milner-White, E.J.; Clutterbuck, A.J. (1994) Homology at the amino acid level between plant phytochromes and a regulator of asexual sporulation in *Emericilla nidulans* *Photochem. Photobiol.* **59**: 252-256

He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H. y Liu, Y. (2002) White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* **297**: 840–843

H. Curtis, S. Barnes. Fotosíntesis, luz, vida. Invitación a la Biología. Editorial Médica Panamericana. Quinta Edición: 162-163

He, Q. y Lui, Y. (2005) Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation *Genes & Dev.* **19**:2888-2899.

Heintzen, C., Loros, L.L. y Dunlap, J.C. (2001) The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating and regulates clock resetting. *Cell* **104**: 453–464

Horwitz, B.A. (1984) The Sensory Pathway for Photomorphogenesis in *Trichoderma* and its mutants. Tesis para el grado de PhD, Weizmann Institute of Science, Israel.

Horwitz, B.A., Gressel, J. y Malkin, S. (1984) The Quest of *Trichoderma* Cryptochrome. En: *Blue Light Effects on Biological Systems*, H. Senger (editor). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 237 – 249

Kim, H-S., Han, K-Y., Kim, K-J., Han, D-M., Jahng, K-Y. y Chae, K-S. (2002) The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Gen. Biol.* **37**: 72-80

Linden, H., Ballario, P. y Macino, G. (1997b) Blue Light Regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Gen. Biol.* **22**: 141–150.

Linden, H., Rodriguez-Franco, M. y Macino G. (1997c) Mutants of *Neurospora crassa* defective in regulation of blue light perception. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 111–118.

Liu, Y., He, Q., y Cheng Photoreception in *Neurospora*: a tale of two white collar proteins Cell Mol. Life Sci. **60**: 2131-2138

Matsuoka, D. y Tokutomi, S. (2005) Blue light-regulated molecular switch of Ser-Thr kinase in phototropin Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102** (37): 13337-13342

Mooney, J.L., y Yager, L.N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans* Genes Dev. **4**: 1473–1482.

Quail, P.H. (2002) Photosensory perception and signaling in plant cells: new paradigms? Curr. Op. Cell Biol. **14**: 180-188

Schmoll, M., Zeilinger, S., Mach, R.L. y Kubicek C. (2004) Cloning of genes expressed early during cellulose induction in *Hypocrea jecorina* by a rapid subtraction hybridization approach Fungal Gen. Biol. **41**: 877-887

Schmoll, M., Franchi, L. y Kubicek, C. (2005) Envoy, a PAS/LOV Domain Protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), Modulates Cellulase Gene Transcription in Response to Light Euk. Cell **4** (12): 1-10

Schwerdtfeger C. y Linden H. (2003) vivid is flavoprotein and serves as fungal *blu* light photoreceptor for photoadaptation. EMBO J. **22**: 4846-4855.

Schwerdtfeger C. y Linden H. (2001) Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. Mol. Microbiol. **39**: 1080–1087.

Támova, G., Farkas. V. y Betina, V. (1995) Relationship Between Light Intensity and the Changes in the Intracellular Level of ATP During Photoinduction in *Trichoderma viride*. Folia Microbiol. 40: 516 – 518.