



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



“FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA”

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL FOSFATO SOBRE LA CONIDIACION DE
TRICHODERMA ATROVIRIDE Y MUTANTES AFECTADAS A LA PERCEPCION D E LA
LUZ**

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE: “*QUÍMICO FARMACOBIOLOGO*”

PRESENTA:

p.QFB: MACARIO OSORIO CONCEPCION

ASESOR:

D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

MORELIA, MICHOACAN, A JULIO 2008

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigación en Hongos de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del Dr. Carlos Cortés Penagos.

Para la realización del trabajo, fue Financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A **Dios** principalmente por guiarme durante todo este tiempo, por fortalecerme en los momentos más difíciles y por estar a mi lado a cada instante.

A **mis adorados padres, Miguel Osorio Hernández y Juventina Concepción Magdalena**, por su confianza, comprensión, consejos y apoyo en todo momento al estar lejos de ellos, al permitirme experimentar este momento, y mirar hacia nuevos horizontes.

A **mis queridos hermanos (Rosalba, Adrian y Magdalena)** por sus consejos, apoyo incondicional en los momentos más difíciles en todo este tiempo, alentándome a seguir adelante y aprovechar esta oportunidad brindada.

A **mis sobrinitos(as) Nicolás, Gloria, y Leticia** que quiero mucho, por ser una bendición de dios para la familia.

A **los demás miembros de la familia, a mi tía, primos y cuñados.**

A **un gran y querido amigo Don Ernesto Cortés**, por su confianza y amistad brindada, así como sus valiosos consejos en gran parte de mi formación académica, que han contribuido cada día a hacer de mí un buen ser humano.

A **mis compañeros y amigos de laboratorio Navor, Paco, QFB. Luis, QFB. David**, por su amistad brindada y a la **QFB. Dalia Rubí** por ser una parte fundamental en el desarrollo del presente trabajo, por su apoyo incondicional y sugerencias en todo momento.

A **mi asesor de tesis, el Dr. Carlos Cortés Penagos**, por permitirme formar parte del grupo de trabajo del Laboratorio de Investigación en Hongos, por su confianza y apoyo brindado en este trabajo.

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS	i
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE TABLAS	vii
ABREVIACIONES	viii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. La luz como fuente de energía	2
2.2. Receptores de luz	3
2.3. Conidiación de <i>Trichoderma atroviride</i>	6
2.4. Sistema de percepción de fosfato (P) en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVOS.....	14
4.1. Objetivo general	14
4.2. Objetivos específicos	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1. Microorganismos	15
5.2. Medios de cultivo	15
5.2.1. Soluciones stock	15
5.2.2. Medio PDA	15
5.2.3. Medio Vogel	16
5.2.4. Preparación del Medio Mínimo	16
5.3. Preparación del papel celofán	17
5.4. Condiciones de cultivo	17
5.4.1. Preinóculo	17
5.4.2. Inoculación de cepas	17
5.4.3. Determinación de la velocidad de crecimiento radial/colonial	17
5.4.4 Determinación del crecimiento a partir de la formación de biomasa	17

5.4.5. Cuantificación de conidias	18
5.5. Estadística empleada en los ensayos	18
6. RESULTADOS	20
6.1. CONIDIACIÓN EN LA CEPA IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)	20
6.1.1. Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de P soluble (KH_2PO_4)	20
6.1.2. Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de P insoluble (CaHPO_4)	22
6.2. CRECIMIENTO RADIAL EN LA CEPA IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)	23
6.2.1. Crecimiento radial/colonial de la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de P soluble (KH_2PO_4)	23
6.2.2. Crecimiento radial/colonial en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de P insoluble (CaHPO_4)	24
6.3. BIOMASA GENERADA EN LA CEPA IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)	25
6.3.1. Biomasa generada por limitación de P soluble (KH_2PO_4) en la cepa IMI y mutantes BLR	25
6.3.2. Biomasa generada por limitación de P insoluble (CaHPO_4) en la cepa IMI y mutantes BLR	26
6.4. CONIDIACIÓN DE LAS CEPAS CON SOBRE-EXPRESIÓN EN LOS GENES <i>blr</i> POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)	27
6.4.1. Efecto de la sobre-expresión de genes <i>blr-1</i> y <i>blr-2</i> en la conidiación por limitación de P soluble (KH_2PO_4)	28
6.4.2. El efecto de la sobre-expresión de los genes <i>blr-1</i> y <i>blr-2</i> en la conidiación por limitación de P insoluble (CaHPO_4)	30
6.5. BIOMASA GENERADA EN LAS CEPAS CON SOBRE-EXPRESIÓN EN LOS GENES <i>blr</i> POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)	31
6.5.1. Efecto de la sobre-expresión del gen <i>blr-1</i> y <i>blr-2</i> en la biomasa, por limitación de la fuente P soluble (KH_2PO_4)	31

6.5.2. Efecto de la sobre-expresión del gen <i>blr-1</i> y <i>blr-2</i> en la biomasa, por limitación de la fuente se P insoluble (CaHPO ₄)	32
6.6. CONIDIACIÓN EN LAS CEPAS CON SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN <i>blu</i> POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)	33
6.6.1. Efecto de la sobre-expresión de genes <i>blu7</i> , <i>blu17</i> , en la conidiación por limitación de la fuente de P soluble (KH ₂ PO ₄)	34
6.6.2. El efecto de la sobre-expresión de los genes <i>blu7</i> y <i>blu17</i> en la conidiación por limitación de P insoluble	35
6.7. BIOMASA GENERADA EN LAS CEPAS CON SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN <i>blu</i> POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)	37
6.7.1. Efecto de la sobre-expresión del gen <i>blu7</i> y <i>blu17</i> en la biomasa, por limitación de la fuente se P soluble (KH ₂ PO ₄)	37
6.7.2. Efecto de la sobre-expresión del gen <i>blu7</i> y <i>blu17</i> en la biomasa, por limitación de la fuente de P insoluble (CaHPO ₄)	38
6.8. CONIDIACIÓN EN LAS CEPAS CON EXPRESIÓN CON ANTI-SENTIDO DEL GEN <i>blu</i> POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)	39
6.8.1. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu7</i> y <i>blu5</i> , en la conidiación por limitación de la fuente de P soluble (KH ₂ PO ₄)	39
6.8.2. El efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu7</i> y <i>blu5</i> en la conidiación por limitación de la fuente de P insoluble (CaHPO ₄)	41
6.8.3. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu15</i> y <i>blu22</i> , en la conidiación por limitación de la fuente de P soluble (KH ₂ PO ₄)	42
6.8.4. El efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu15</i> y <i>blu22</i> en la conidiación por limitación de P insoluble	44
6.9. BIOMASA GENERADA EN LAS CEPAS CON EXPRESIÓN CON ANTI-SENTIDO DEL GEN <i>blu</i> POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)	45
6.9.1. Efecto de la expresión con anti-sentido del gen <i>blu7</i> y <i>blu5</i> en la biomasa, por limitación de la fuente de P soluble (KH ₂ PO ₄)	45
6.9.2. Efecto de la expresión con anti-sentido del gen <i>blu7</i> y <i>blu5</i> en la biomasa, por limitación de la fuente de P insoluble (CaHPO ₄)	46

6.9.3. Efecto de la expresión con anti-sentido del gen <i>blu15</i> y <i>blu22</i> en la biomasa, por limitación de la fuente de fosfato soluble (KH_2PO_4)	47
6.9.4. Efecto de la expresión con anti-sentido del gen <i>blu15</i> y <i>blu22</i> en la biomasa, por limitación de la fuente de fosfato insoluble (CaHPO_4)	48
7.- DISCUSIÓN	49
8.- CONCLUSIONES	55
9.- BIBLIOGRAFÍA	56

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.....	3
Figura 2.....	7
Figura 3.....	9
Figura 4.....	10
Figura 5.....	12
Figura 6.....	21
Figura 7.....	22-23
Figura 8.....	24
Figura 9.....	25
Figura 10.....	26
Figura 11.....	27
Figura 12.....	29
Figura 13.....	30-31
Figura 14.....	32
Figura 15.....	33
Figura 16.....	34-35
Figura 17.....	36-37
Figura 18.....	38
Figura 19.....	38
Figura 20.....	39-40
Figura 21.....	41-42
Figura 22.....	43
Figura 23.....	44-45
Figura 24.....	46
Figura 25.....	47
Figura 26.....	48
Figura 27.....	48

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla No. 1.....	15
Tabla No. 2.....	16
Tabla No. 3.....	16
Tabla No.4.....	33

ABREVIACIONES

g	Gramos
mM	Milimolar
h	Horas
ml	Mililitros
L	Litro
S/P	Sin fosfato
mg	Miligramos
μl	Microlitros
P	Fosfato
Pi	Fosfato inorgánico
K_m	Sistema de afinidad sustrato
μM	Micromolar
mm	Milímetros
Ca	Calcio
LOV	Dominio presente en proteínas como sensores de luz, oxígeno y voltaje
PAS	Dominio que se identificó primero en las proteínas Per, Arnt y Sim.
AMPC	Adenosin 3'-5'-monofosfato cíclico
aa	Aminoácidos
UV-A	Luz ultravioleta tipo A



1.- RESUMEN

Las respuestas de *T. atroviride* es similar en muchos aspectos a *N.crassa*. Los genes *blr* codifican proteínas homólogas a las proteínas WC de *N. crassa*. La secuencia de aminoácidos de las proteínas BLR indica que son factores de transcripción con dominios de unión a DNA tipo GATA y dominios PAS necesarios para interactuar y formar complejos entre ellas (Casas y col., 2004). *Trichoderma atroviride* se usa como modelo fotomorfogénico debido a su capacidad de conidiar después de ser expuesta a la luz. En condiciones de oscuridad y nutricionales favorables *Trichoderma atroviride* crece indefinidamente como micelio; sin embargo la limitación de nutrientes y la luz disparan el desarrollo de estructuras reproductoras asexuales especializadas (conidias). En *Trichoderma* la conidiación puede ser inducida por 2 vías: estrés nutricional y luz. Las mutantes nulas en los genes *blr-1* y *blr-2* (Δ BLR-1 y Δ BLR-2 respectivamente) no son capaces de conidiar en respuesta a la luz. Las colonias crecidas en luz de las mutantes resulta idéntico a las crecidas en oscuridad de la cepa parenteral (IMI 206040). La conidiación en hongos puede ser estimulada por otros factores, especialmente por aquellos que involucran algún tipo de estrés. En el caso de *Trichoderma*, conidia cuando el crecimiento ha cubierto por completo la caja petri, lo cual es debido posiblemente a la limitación de nutrientes. El metabolismo de los carbohidratos también ha sido relacionado fuertemente con las vías que conducen a la morfogénesis (conidiación).

En este trabajo se presenta la influencia del P en sus formas soluble (KH_2PO_4) e insoluble (CaHPO_4) sobre el crecimiento, biomasa y la formación de conidias de las cepas *T. atroviride* (IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2) y mutantes afectadas en la fotoconidiación. En los ensayos realizados, la limitación de P (1.8mM) de la fuente soluble induce mayor conidiación en la cepa IMI, en tanto en las cepas Δ BLR-1 y Δ BLR-2, esta condición alcanza a inducir la formación de un discreto anillo de conidiación en presencia de luz. Así también incrementando el crecimiento radial colonial independientemente de las condiciones de luz u oscuridad, en la cepa IMI, y mutantes BLR. En este trabajo también se estudio las cepas con sobre-expresión del gen *blr*, donde la cepa sobre-expresante del gen *blr-2* (Seblr2-13) presenta una conidiación mayor cuando se limita la fuente de P soluble, caso contrario en la conidiación de la sobre-expresante del gen *blr-1* (Seblr1-8) que es menor. En lo que respecta, la sobre-expresión y expresión con anti-sentido de los genes *blu* estudiados en el presente



trabajo, solamente la cepa Seblu17-12A, incrementa de forma notoria la conidiación en condiciones limitadas de P soluble, pero disminuye la biomasa, en tanto la expresión en anti-sentido de los genes *blu* reprime ligeramente la conidiación. En la fuente de P insoluble, la limitación (1.8mM) induce de forma evidente la formación de anillos de conidiación con pigmentación amarilla, en todas las cepas utilizadas en este ensayo en presencia de luz solamente, siendo el efecto más relevante en este tipo de P, que en la biomasa. Esto nos indica que algunos genes regulados por la luz son necesarios en la conidiación.





2.- INTRODUCCIÓN

2.1.- La luz como fuente de energía

La supervivencia de los seres vivos depende de su habilidad para detectar y responder apropiadamente a cambios en su ambiente extracelular. La luz es uno de los factores ambientales más importantes para la existencia de vida en nuestro planeta y su apropiada percepción en los seres vivos es por lo tanto de suma importancia (Esquivel., 2007). El sol irradia hacia la tierra una gran cantidad de luz, la cual es utilizada por los organismos para retener la energía que ésta proporciona. La luz es una radiación electromagnética que por sus características particulares, y al igual que toda radiación de este tipo, es una forma de energía. La energía electromagnética se puede concebir como una onda móvil del mismo tipo que las de sonido, de rayos X, de la luz y de otros tipos de radiación. Estas ondas electromagnéticas tienen una frecuencia de oscilación que determina su visibilidad o invisibilidad (Fig.1). Las radiaciones de frecuencias altas son los rayos ultravioleta, los rayos X y los rayos gamma, y las de frecuencias más bajas que la luz visible son las del infrarrojo, las microondas y las ondas de radio. Existen en la naturaleza, y en especial entre los seres vivos, moléculas que pueden absorber o recoger la energía que proporciona la luz o bien energía de otros tipos, y no sólo eso, sino que la transforman además en otro tipo de energía.

La luz puede usarse como fuente de energía y como fuente de información; el uso depende de la interacción que tenga con los sistemas electrónicos moleculares. Toda materia con carga eléctrica puede tomar energía de un campo eléctrico, tales como electrones de los átomos y moléculas al interactuar con la luz, un electrón puede pasar de un estado basal a uno excitado absorbiendo la energía de su entorno y liberándola al regresar al estado basal (Rios., 2004). Las emisiones solares caen en un amplio rango de longitudes de onda, las de menor energía y mayor longitud de onda concuerdan con la energía necesaria para las vibraciones de enlaces moleculares y al ser absorbida se transforma en calor, a estas emisiones se les coloca en el rango de infrarrojo (Fig.1). Las emisiones de mayor energía y menor longitud de onda, son las que dan inicio a las reacciones fotoquímicas en moléculas de importancia biológica, que es en el rango de ultravioleta (Pérez, 2007).

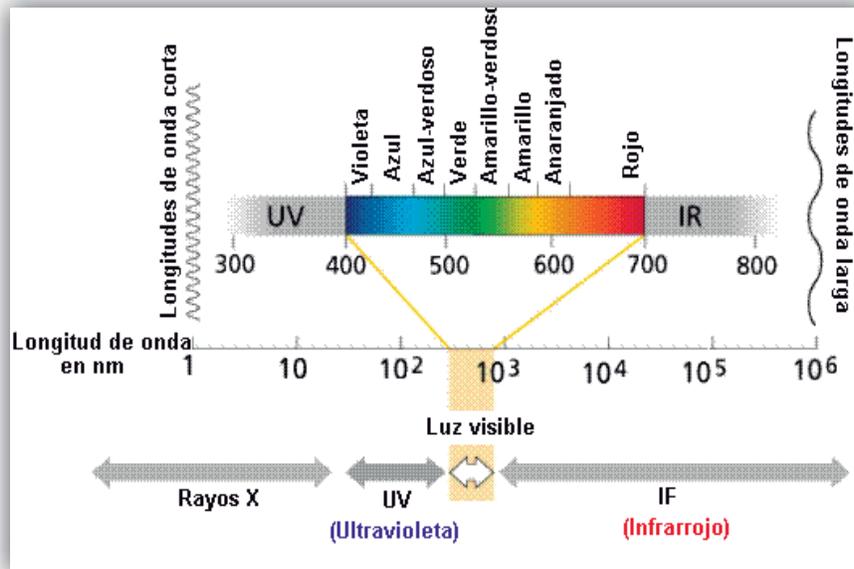


Figura 1. Espectro de la radiación solar. Tomado de:

http://perso.wanadoo.es/frs88/tpn/desc/espectro_archivos/image005.jpg

Entre las moléculas que pueden ser afectadas por la luz ultravioleta el DNA es especialmente destacable ya que un cambio provocado a este por una de estas reacciones puede ser transmitido como mutación a las siguientes generaciones, si no es reparado antes de la siguiente replicación. La radiación ultravioleta también puede causar daño a las moléculas por su capacidad de iniciar reacciones de radicales libres descontroladas. En términos biológicos, la forma más probable en que esto puede ocurrir es cuando participan especies reactivas de oxígeno (Ríos., 2004). El oxígeno molecular puede liberar una gran cantidad de energía durante su reducción. De este modo, el oxígeno molecular es un eficaz, y a veces peligroso, almacén energético. Los metabolitos parcialmente reducidos y altamente reactivos, pueden formarse durante las reacciones de transferencia de electrones, como aquellas en las que interviene la luz y puedan causar daño, las mas peligrosas son el anión superóxido y el radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, conocidas como especies reactivas de oxígeno.

2.2.- Receptores de luz

Los seres vivos cuentan con un arreglo de receptores de luz que los capacita para la percepción de prácticamente todas las longitudes de onda del espectro de la luz visible. Todos los receptores de luz (fotorreceptores) que se han descrito consisten de proteínas asociadas a



moléculas pequeñas sensibles a la luz (cromóforos), tales como el FMN, FAD y las porfirinas, que son activados por el impacto de un fotón (Esquivel., 2007). Capaces de monitorear y responder a fluctuaciones de las condiciones ambientales empleando mecanismos complejos, los cuales transforman el estímulo externo en señales que desencadenan cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula (Casas y col., 2004).

En estudios de la percepción de la señal luminosa emergen dos aspectos cruciales: 1) ¿cómo es percibida la luz? y 2) ¿cómo se transmite la señal para generar la respuesta? En los 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 eucariontes existen diferentes tipos de fotorreceptores, los cuales son capaces de percibir la luz roja/rojo lejano y azul (Cashmore y col., 1999).

Los fotorreceptores son proteínas o complejo de proteínas que son capaces de captar luz, generando una señal, que es propagada dentro de la célula para estimular una respuesta celular. Los cofactores absorben luz, conocidos como cromóforos, son típicamente moléculas pequeñas (Herrera-Estrella y Horwitz., 2007). Las plantas presentan una compleja red de percepción de luz y la transducción de señales que permiten detectarla y responder a los cambios, los cambios que se detectan son: la intensidad, dirección, duración y la calidad de luz. Las plantas emplean tres tipos de fotorreceptores: los criptocromos, las fototropinas, y los fitocromos (Froehlich y col., 2005). La energía captada provoca cambios conformacionales en el cofactor, y posteriormente en la proteína induciendo su activación (Cheng y col., 2004; Ko y col., 2007). El fotorreceptor activado transmite la señal regulando la expresión de genes necesarios para las respuestas fisiológicas específicas en la célula (Froehlich y col., 2002; Cheng y col., 2004; Ko y col., 2007).

Los fotorreceptores presentan un dominio de unión al cromóforo, así como un dominio efector interaccionando con proteínas para la transducción de la señal luminosa. En trabajos anteriores se ha establecido que los fotorreceptores en condiciones de oscuridad tienden a una conformación cerrada, debido a la interacción entre el dominio de unión al cromóforo y el dominio efector, bloqueando toda actividad; en condiciones de luz, los fotorreceptores experimentan cambios estructurales, permitiendo la liberación de las proteínas, que conllevan a generar respuestas a los estímulos extracelulares (Cheng y col., 2004; Ko y col., 2007). Un ejemplo de molécula receptora de luz es la proteína PYP (Photoactive Yellow Protein). PYP



es una proteína pequeña de una bacteria fototrópica (*Ectothiorhodospira halophila*), conformada por un dominio LOV (Luz, Oxígeno ó Voltaje) (Van Aalten y col., 2000). Los dominios LOV se les ha involucrado en la percepción de la luz, el oxígeno ó el voltaje, en todas las proteínas que lo presentan (Crosson y col., 2003).

La luz como un factor ambiental importante para la existencia, permanencia y evolución de la biosfera terrestre, ejerce un control sobre el comportamiento de prácticamente todos los seres vivos. Estos detectan y responden a los cambios en las condiciones de su entorno y para ello se valen de diversos y complejos mecanismos, los cuales transforman el estímulo recibido en señales provocando cambios bioquímicos y fisiológicos (Briggs y Huala., 1999). La luz azul y ultravioleta del tipo A (UV-A), con una longitud de onda cercana al espectro más dañino y foto-reactivo contra componentes vitales para la célula como lo es el DNA, entre otros, es percibida en los organismos como una señal de alerta que activa mecanismos de protección (producción de pigmentos), defensa (síntesis de enzimas que brindan protección) y formación de estructuras de resistencia para la perpetuación de la especie (formación de conidias) (Linden y col., 1997; Ma y col., 2001; Rosales y col., 2006; Berrocal y col., 2007).

En hongos, la luz azul-UVA regula el fototropismo, la carotenogénesis, el crecimiento, la reproducción y los ritmos circadianos (Linden y col., 1997; Casas y col., 2004; Schmolli y col., 2005; Silva y col., 2006; Idnurm y col., 2006). En el modelo de estudio *N. crassa*, mediante un rastreo exhaustivo de mutantes “ciegas a la luz” se identificaron dos proteínas, WC-1 y WC-2 (White Collar-1 y White Collar-2), con dominios PAS y un dominio de unión a DNA tipo GATA, que regulan todas las respuestas a la luz azul descritas en este hongo (Ballario y col., 1996; Linden y Macino., 1997). *Neurospora crassa*, "el moho naranja del pan", es un hongo ascomiceto que responde de muchas maneras a la luz azul (Linden y col., 1997). Su color naranja es debido a la síntesis de grandes cantidades de β -caroteno en las conidias asexuales y en las hifas. La producción de caroteno esta controlada estrictamente por la luz UV-A / Azul, la que induce la activación transcripcional rápida (5 minutos) de genes clave de la ruta de síntesis de carotenos, como el de la fitoeno sintasa, primera enzima de la ruta, y de la fitoeno desaturasa, paso limitante de la vía (Ríos., 2004)



2.3.- Conidiación de *Trichoderma atroviride*

Trichoderma hongo ascomiceto que se caracteriza por poseer hifas ramificadas, tabicadas. Los conidios son hialinos, ovoides, de color verde y se forman sobre estructuras ramificadas llamadas conidióforos que se sitúan sobre células denominadas fialidas (Domsch y col., 1993; Hidalgo., 1989). En *Trichoderma*, se han identificado dos genes (*blr-1* y *blr-2*) que son esenciales para la fotoconidiación y la expresión de genes regulados por luz azul (Casas y col., 2004). Los genes *blr* codifican proteínas homólogas a las proteínas WC de *N. crassa*. La secuencia de aminoácidos de las proteínas BLR indica que son factores de transcripción con dominios de unión a DNA tipo GATA y dominios PAS necesarios para interactuar y formar complejos entre ellas (Casas y col., 2004). *Trichoderma atroviride* se usa como modelo fotomorfogénico debido a su capacidad de conidiar después de ser expuesta a la luz. En condiciones de oscuridad y nutricionales favorables *Trichoderma atroviride* crece indefinidamente como micelio; sin embargo la limitación de nutrientes y la luz disparan el desarrollo de estructuras reproductoras asexuales especializadas (conidias). En *Trichoderma* la conidiación puede ser inducida por 2 vías: estrés nutricional y luz. Cuando la conidiación es inducida por estrés nutricional la formación de conidias tiene lugar principalmente en la parte central de la colonia (Horwitz y col., 1985), donde los nutrientes se han agotado. En tanto un pulso breve de luz azul a una colonia en crecimiento induce la conidiación sincronizada, a través de la formación de un anillo de conidias de color verde (Horwitz y col., 1984).

Los cambios morfológicos de la fotoconidiación en este organismo se han estudiado en detalle. Estos inician a las 4h después de haber dado el estímulo luminoso, durante este tiempo se observa la emergencia de hifas aéreas y la estabilización de las mismas. Entre las 8h y 9h las hifas aéreas se ramifican. La formación de las fialides inicia a las 12h, y a las 16h se inicia la formación de las conidias para finalmente a las 24h observar conidias maduras (Fig. 2) (Betina., 1984).

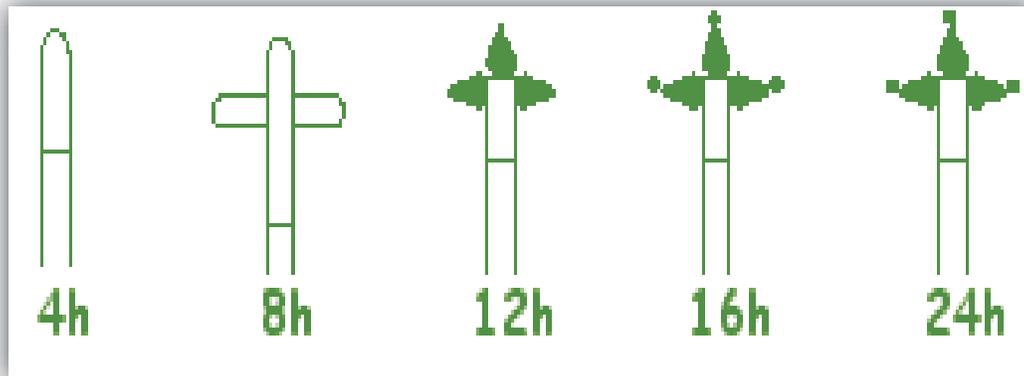


Figura 2. Cambios morfológicos observados durante la fotoconidiación de *Trichoderma*. Tomado de Betina (1984).

Las respuestas de *T. atroviride* es similar en muchos aspectos a *N.crassa*. Los genes *blr-1* y *blr-2* están presentes en una sola copia en el genoma de *T. atroviride*. BLR-1 tiene 1020 aa y muestra 53% de identidad a WC-1, mientras que BLR-2 tiene 484 aa y es 52% idéntico a WC-2 (Casas., y col., 2004). Ambas proteínas BLR poseen dominios de unión a DNA tipo GATA-dedo de zinc y BLR-1 tiene señales de localización nuclear en la misma posición que WC-1. Se sugiere que las proteínas BLR funcionan como factores de transcripción (Casas y col., 2004). El primer dominio PAS de BLR-1 pertenece al subgrupo llamado dominio LOV, unen a cromóforos de flavina y detectan la luz azul (Cheng y col., 2003; Crosson y col., 2003). El dominio PAS presente en BLR-2 se requiere para la interacción proteína–proteína. Las mutantes nulas en los genes *blr-1* y *blr-2* (Δ BLR-1 y Δ BLR-2 respectivamente) no son capaces de conidiar en respuesta a la luz. Las colonias crecidas en luz de las mutantes fue idéntico a las crecidas en oscuridad de la cepa parenteral (IMI 206040) (Casas y col., 2004). El análisis genético de las mutantes BLR (secuencia de aminoácidos y secuencia de DNA del promotor *phr-1*) indican que BLR-1 y BLR-2 podrían funcionar como un complejo e inducir la expresión de genes regulados por la luz (Pérez., 2007). La conidiación en hongos puede ser estimulada por otros factores, especialmente por aquellos que involucran algún tipo de estrés. En el caso de *Trichoderma*, conidia cuando el crecimiento ha cubierto por completo la caja petri, lo cual es debido posiblemente a la limitación de nutrientes. El metabolismo de los carbohidratos también ha sido relacionado fuertemente con las vías que conducen a la



morfogénesis (conidiación). Se ha observado que la limitación de carbono en el medio de cultivo provoca la conidiación de *Trichoderma* y otros hongos (Casas y col., 2004). Además de los carbohidratos y el nitrógeno, otro elemento primordial asimilado por los organismos, que pudiese tener una participación importante en la inducción de la formación de conidias de *Trichoderma atroviride* y que actualmente se encuentra en estudio, es el metabolismo del P, bioelemento importante como componente celular, componente esencial de la membrana lipídica, forma complejos con proteínas, carbohidratos, lipopolisacáridos y además juega un papel clave en la bioenergética al ser el componente fundamental del grupo químico depositario de la energía de enlace que genera y consume el metabolismo celular. El P se encuentra en la naturaleza en su forma más oxidada de ortofosfato (Pi), la mayor parte no está disponible para los microorganismos, ya que en presencia de cationes (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) abundantes en la corteza terrestre, se convierten en sales de P insolubles. Muchos microorganismos han desarrollado enzimas extracelulares, para degradar los ésteres orgánicos de P de origen biológico.

La cepa $\Delta\text{BLR-2}$ conidia cuando se limita el nitrógeno al igual que la cepa IMI, pero no en la limitación de carbono. Por ello se planteó la posibilidad de que BLR-2 mantuviera alguna relación con los componentes de las vías que sensan y transportan este azúcar o bien que forme parte de la vía y como resultado no se presente la conidiación por limitación de carbono en la mutante. Es posible que los genes de conidiación no se expresen en la mutante por la falta de BLR-2, donde posiblemente esté interrumpida la señal que debería darse por la ausencia de carbono en el medio (Casas y col., 2004). Por otra parte se ha sugerido que BLR-1 podría tener la función de unir uno o varios ligandos diferentes y responder a la presencia o ausencia de fuentes de carbono. De forma alternativa, cualquiera de los dominios PAS de BLR-1 ó BLR-2 podrían tener capacidades duales de detección, integración redox (limitación de carbono) y luz (Fig. 3) (Pérez., 2007).

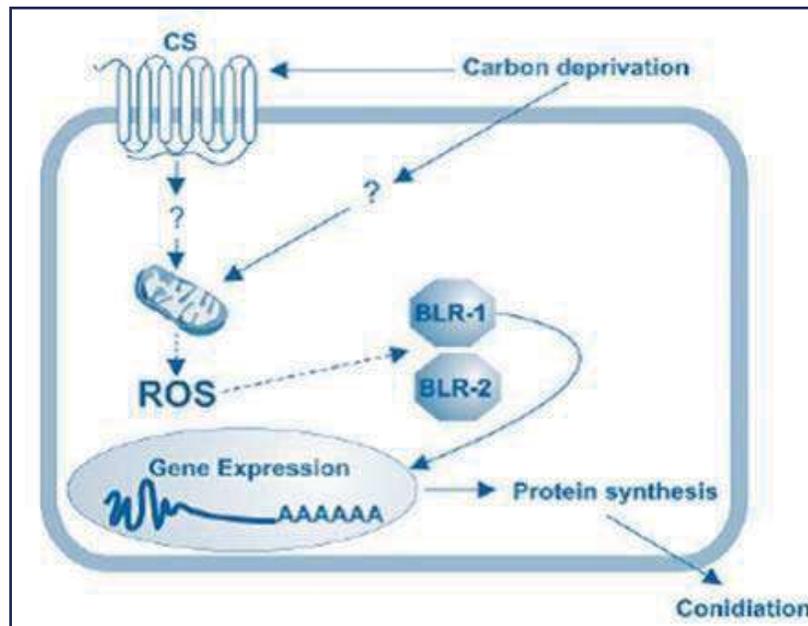


Figura 3.- Modelo hipotético mostrando la función del complejo BLR en sensibilidad a carbono. La BLR-1 y/o BLR-2 podrían percibir o transducir la señal originada de la falta de glucosa detectada por un sensor/receptor (CS) o debido a la falta de la capacidad reductiva en la célula, vía especies reactivas de oxígeno (ROS) originada de la mitocondria resultante en la inducción de la expresión génica. Líneas continuas indican pasos hipotéticos. Tomado de Casas y col., 2006.

Por otra parte a través del uso de las mutantes Δ BLR-1 y Δ BLR-2 se han identificado genes que responden a la luz de forma independiente de las proteínas BLR, evidencia que apoya la existencia de una vía alterna de detección de luz (Rosales y col., 2006). Los primeros cambios bioquímicos detectables después de la inducción con luz están asociados con la activación de una vía de señalización a través de AMPc, como son incrementos transitorios en los niveles de AMPc (Gresik y col., 1988), en la actividad de la adenilato ciclasa (Kolarova y col., 1992), y cambios en el patrón de fosforilación de proteínas (Fig. 4). De hecho, la adición de un análogo del AMPc (dibutilil AMPc) a una colonia creciendo en la oscuridad, es capaz de inducir la conidiación, y un inhibidor de la actividad de la adenilato ciclasa (atropina) bloquea la conidiación inducida con luz azul (Berrocal y col., 2000). En otros trabajos se observaron un incremento en la actividad de una cinasa de proteínas dependiente del AMPc (PKA) después de un pulso de luz azul. Esta activación ocurría aún en las cepas Δ BLR-1 y Δ BLR-2,





confirmando la existencia de un sistema de percepción de luz que actúa a través de la vía del AMPc (Esquivel., 2007).

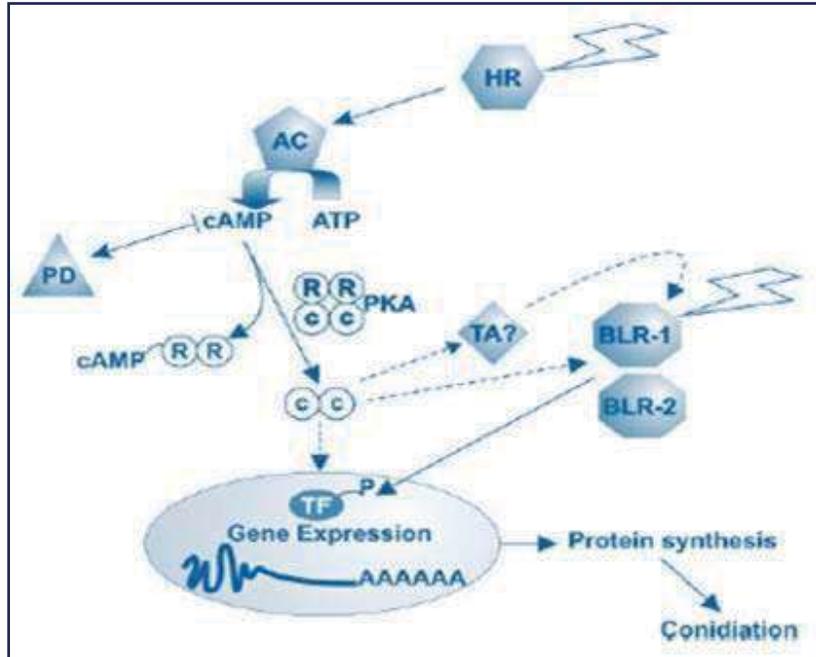


Figura 4. Modelo hipotético integrando distintos elementos que participan en la percepción de luz azul en *Trichoderma atroviride*. Dos estímulos independientes de la luz son necesarias para inducir la conidiación. La vía independiente BLR podría activar la Adenilil Ciclasa (AC) conduciendo a la producción de AMPc, lo que a su vez se une a la subunidad reguladora PKA (R), resultando en la activación de la subunidad catalítica (C). La fosfodiesterasa (PD) podría regular los niveles de AMPc, ejerciendo un control negativo en la fotoconidiación. El incremento en la actividad de PKA podría activar el complejo BLR, desencadenando la expresión de los genes en respuesta a la luz azul, una función de este tipo puede implicar la fosforilación directa de cualquiera de las proteínas BLR o la fosforilación de un regulador aún no identificado (TA), o bien PKA puede fosforilar un factor de transcripción putativo (TF), cuya modificación es para la activación génica. Líneas continuas indican pasos hipotéticos. Tomado de Casas y col., 2006.

Mediante microarreglos de cDNA, se han identificado 40 genes regulados por la luz blanca (el 2.8% de los genes impresos en el arreglo); de esos, 30 genes fueron inducidos (2%) y 10 fueron reprimidos (0.8%). Todos los genes regulados a través de las proteínas BLR requieren estrictamente de ambas proteínas funcionales, sugiriendo que BLR-1 y BLR-2 actúan como un complejo, muy probablemente interactuando a través de sus dominios PAS, al igual que en el caso de *N. crassa* (Casas y col., 2004; Rosales y col., 2006). Al identificarse los genes





reprimidos por la luz azul y su análisis de expresión en la cepa IMI y las cepas Δ BLR-1 y Δ BLR-2, se demostró que las proteínas BLR actúan tanto en la activación como en la represión de la transcripción de los genes regulados por la luz azul, una función dual que aún no se ha descrito en proteínas homólogas de otros hongos (Rosales y col., 2006).

Para abordar la hipótesis de que BLR-2 es un factor limitante en el sistema de percepción de luz azul a través de las proteínas BLR, se realizó la sobre-expresión de *blr-2* en *T. atroviride* (IMI). En los resultados se observaron que la sobre-expresión aumenta la fotosensibilidad, la conidiación fue exacerbada, indicando de forma clara que la expresión de *blr-2* es un factor limitante en la transducción de luz azul a través del complejo BLR. Caso contrario a la sobre-expresión de *blr-1*, con una disminución en la fotoconidiación. Estos resultados sugieren un delicado balance en los niveles de BLR-1/BLR-2 es un factor importante para la apropiada percepción y transducción de la señal luminosa en *T. atroviride*. Algunos genes regulados por la luz siguen siendo inducidos en las cepas Δ BLR y se ha considerado que su regulación ocurre por un sistema de percepción alternativo a las BLR (Rosales y col., 2006). Adicionalmente a las mutantes Δ BLR se inició un análisis funcional masivo para identificar genes que regulan la conidiación, mediante la generación de mutantes que portan vectores para la expresión en anti-sentido de un grupo de genes regulados por la luz, y otras que portan vectores para la sobre-expresión sólo de algunos de esos genes. Análisis preliminares de la fotoconidiación en algunas mutantes sólo muestran fenotipos sutiles o ningún aparente defecto en la formación del anillo de conidiación. Esto se puede deber a que algunos genes sean indispensables para la fotoconidiación ó que niveles bajos de expresión de estos genes sean suficientes para sostener la formación del anillo de conidiación.

2.4.- Sistema de percepción de fosfato (P) en *Saccharomyces cerevisiae*

El fosfato (P) es considerado como un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de muchos microorganismos, incluyendo a los hongos, interviniendo en muchas funciones celulares tanto estructurales como metabólicas. La forma en que la célula detecta la concentración extracelular de P es no obstante desconocida (Persson y col., 1999).

Una gran variedad de organismos, como *S. cerevisiae*, contienen sistemas de percepción y transporte de nutrientes, entre los que se incluye el P, bioelemento primordial para el desarrollo de los organismos (López y col., 2001). Estos sistemas de percepción permiten a la



célula adaptarse a diferentes concentraciones de sustrato (P) controlando la entrada y salida de moléculas (Fig. 5).

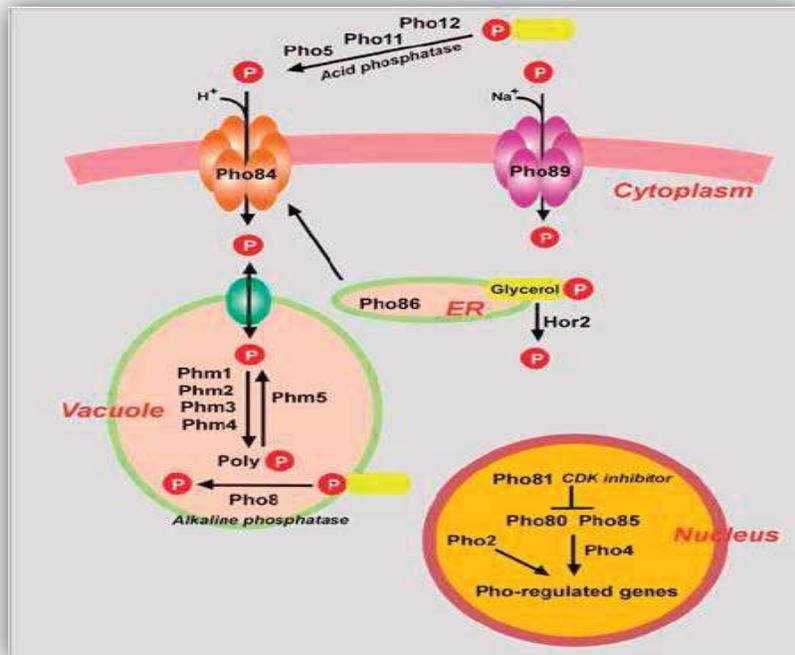


Figura 5. Modelo de Sistema de percepción de fosfato (P). Un simplificado esquemático del mecanismo de percepción de P, mostrando principalmente las fosfatasas ácidas (Pho5, Pho11 y Pho12) que secreta *S. cerevisiae* que transforman el P para que pueda importarse en la célula por medio de proteínas transportadoras de alta afinidad localizados en el citoplasma (Pho84 y Pho89) acoplado a iones H^+ y Na^+ respectivamente. Tomado de: http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/03%20Yeast%20Metabolism.pdf





3.- JUSTIFICACIÓN

Los esfuerzos por entender el fenómeno de conidiación y la percepción de luz en *Trichoderma atroviride* se han enfocado en estudios fotobiológicos, bioquímicos (Pérez., 2007) y actualmente en el proceso de conidiación por limitación de nutrientes. En *Trichoderma atroviride* el complejo formado por las proteínas BLR-1 y BLR-2 parecen ser esenciales como fotorreceptores y como factor transcripcional durante la fotoconidiación.

En trabajos recientes se ha demostrado que el complejo BLR es necesario para la inducción de conidiación por limitación de carbono aun en ausencia de luz. Indicando la existencia de vías alternas de señalización de luz y la percepción de carbono. Adicionalmente se sabe que la limitación de fuentes nutricionales tales como el nitrógeno induce la formación de conidias en las cepas con interrupción de las proteínas BLR. Sabiendo que la fuente de P es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo de muchos microorganismos, a pesar de la abundancia en el medio ambiente en forma insoluble, se planteó un estudio detallado sobre la influencia de este bioelemento sobre la conidiación inducida por su limitación en las mutantes (Δ BLR-1 y Δ BLR-2) a fin de establecer la relación de estos dos elementos en el metabolismo del P.





4.- OBJETIVOS

4.1.-Objetivo general:

4.1.1.- Establecer el efecto de la limitación del bioelemento P sobre la conidiación y el crecimiento de *Trichoderma atroviride* y mutantes afectadas en la fotoconidiación

4.2.-Objetivos específicos:

4.2.1.- Comparar el efecto de la utilización de una fuente de P soluble y una insoluble sobre la conidiación y el crecimiento de *Trichoderma atroviride* y las mutantes afectadas en fotoconidiación.

4.2.2- Estudiar la participación de las proteínas BLR-1 y BLR-2 en la percepción de la limitación de P y su efecto en el crecimiento.





5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Microorganismos

Se utilizaron cepas del hongo ascomiceto de la especie *Trichoderma atroviride* (Tabla No.1) proporcionadas por el CINVESTAV Unidad Irapuato.

Tabla No.1. Cepas de *Trichoderma atroviride* utilizadas

Grupo 1

IMI-206040, Δ BLR-1, Δ BLR-2

Grupo 2

IMI-206040, Seblu17-6, Seblu17-12A, Seblu7-10, Seblr2-13, Seblr1-8, Asblu7-1, Asblu7-7, Asblu5-5, Asblu5-2, Asblu22-1, Asblu22-10, Asblu15-8

16

5.2.- Medios de cultivo

Medio Vogel (H. J. Vogel. Microbial Genetics Bulletin 13:42-43, 1956) sin la adición de la fuente de P, C y N. Se utilizó KH_2PO_4 soluble (136.09g/L) (MERCK) y CaHPO_4 insoluble (136.06g/L) (MERCK) como fuente de P; Dextrosa (BD Bioxon) (180.16g/L) como fuente de C, NH_4NO_3 (J.T. Baker) (80.04g/L) como fuente de N. PDA (Papa, Dextrosa, Agar, BD DIFCO).

5.2.1.- Soluciones stock

Las sales de fosfato tanto soluble e insoluble, así como la dextrosa se prepararon como soluciones stock (1M). El NH_4NO_3 se preparó como una solución stock 2M. Estas soluciones stock se esterilizaron por calor húmedo.

5.2.2.- Medio PDA

El medio Papa Dextrosa Agar (PDA, BD DIFCO) (39 g/L) se preparó siguiendo las instrucciones del proveedor y se esterilizó por calor húmedo.



5.2.3.- Medio Vogel

El Medio Vogel fue preparado como un stock 50X según un protocolo estándar, brevemente: en 750 ml de agua destilada, disolver sucesivamente cada uno de los elementos (Tabla No.2) a temperatura ambiente. Al volumen final (1L), se le adicionan 2 ml de cloroformo para su conservación. El medio fue utilizado a una concentración 1X y las fuentes de P, C y N se adicionaron a partir de las soluciones stock.

Tabla No.2. Elementos del Medio Vogel, a una concentración de 50X

Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	150 g
KH_2PO_4, Anhidro	250 g
NH_4NO_3, Anhidro	100 g
MgSO_4, $7\text{H}_2\text{O}$	10 g
CaCl_2, $2\text{H}_2\text{O}$	5 g
SOLUCION DE ELEMENTOS TRAZA	5ml
SOLUCION DE BIOTINA	2.5ml

5.2.4.- Preparación del Medio Mínimo

El Medio Mínimo Vogel utilizado para los ensayos se preparó agregando Vogel 50X sin P, N y C; agar bacteriológico, y agua destilada, de acuerdo a la Tabla No.3. Este medio se esterilizó y posteriormente se agregó las soluciones stock de Dextrosa, Nitrato de amonio, y la fuente de fosfato, KH_2PO_4 o CaHPO_4 , según sea el caso. Todos los medios se esterilizaron a 115-120 °C durante 15-20 minutos.

Tabla No.3. Cantidades empleados para la preparación de 1L de Medio Mínimo Vogel

CONCENTRACION	KH_2PO_4		CaHPO_4	
	36.7 mM	1.8 mM	36.7 mM	1.8 mM
Vogel S/P	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
Stock KH_2PO_4 CaHPO_4	36.7 ml	1.84 ml	36.7 ml	1.84 ml
Stock dextrosa	83.3 ml	83.3 ml	83.3 ml	83.3 ml
Agua destilada	860 ml	894.86 ml	860 ml	894.86 ml
Agar	15 g	15 g	15 g	15 g



5.3.- Preparación de papel celofán

El papel celofán cristal dulce se cortan de forma circular del diámetro de una caja Petri (8cm), se lava con agua destilada caliente dos veces. Cada hoja de celofán húmeda se extiende una a una sobre servitoallas y se esteriliza por calor húmedo. Una vez esterilizado el papel celofán se coloca sobre la superficie del Medio Mínimo.

5.4.- Condiciones de cultivo

5.4.1.- Preinóculo

Para los ensayos se prepararon preinóculos de las diferentes cepas pertenecientes a la especie *Trichoderma atroviride* (Tabla No.1), para lo cual se colocó un bloque de micelio de cada cepa en medio PDA, incubándolas en oscuridad por un periodo de 48 h a temperatura ambiente.

5.4.2.- Inoculación de cepas

Bloques circulares extraídos de los preinóculos, se transfirieron al centro de las cajas de Petri que contenían los diferentes Medios Mínimos (Tabla No.3). La inoculación de los preinóculos en el medio mínimo se realizó en total oscuridad (cuarto oscuro con luz roja). Finalmente se incubaron a temperatura ambiente en condiciones de luz y oscuridad.

5.4.3.-Determinación de la velocidad de crecimiento radial/colonial

La velocidad de crecimiento fue calculada a partir de la medición del diámetro de la colonia cada 12h hasta por 60h (solo para las cepas IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2), esto a partir del momento de la inoculación en medio mínimo. Con las medidas obtenidas de cada 12h, se calcula la pendiente que corresponde a la velocidad de extensión radial en mm/h.

5.4.4.-Determinación del crecimiento a partir de la formación de Biomasa

La determinación de la biomasa se llevó a cabo por el método de peso seco utilizando para ello las placas de Medio Mínimo que contenían el papel celofán. La colonia formada de cada 12 h (grupo 1) o la correspondiente a las 96 h (grupo 2) de acuerdo a la Tabla No. 1, se



raspó y el micelio colectado se colocó en un papel filtro a peso constante. El papel filtro con el micelio del hongo se secó a 80 °C por 48h o hasta peso constante. Los valores en mg/h o mg según sea el caso se obtienen por diferencia entre el peso del papel con muestra y el peso del papel sin muestra a peso constante.

5.4.5.- Cuantificación de conidias

La cuantificación del número de conidias totales, se llevó a cabo a los 7 días (para las cepas del grupo 1) y a los 5 días (para las cepas del grupo 2). Para cosechar las conidias, a cada colonia se le agregó 5 ml de agua destilada estéril, posteriormente se raspó el micelio con la ayuda de una espátula estéril, se filtra el raspado/suspensión, permitiendo recolectar el concentrado de conidias, dependiendo de la concentración del filtrado se realiza diluciones 1:10, para su posterior conteo, de no ser así, se realiza de forma directa. La lectura de conidias se llevó a cabo en una cámara de Neubauer utilizando 10 µl de la suspensión de conidias, mismos que se colocan al margen del cubreobjetos de la cámara. Se deja reposar 1-2 minutos para que las conidias se asienten y distribuyan uniformemente en las cuadrículas de la cámara. El conteo se realizó en las cuatro cuadrículas correspondientes a las esquinas y la cuadrícula central; se sumó el total de conidias de las 5 cuadrículas. La concentración final se calculó utilizando la siguiente formula: (No. Conidias) (10) (5) (10000) = No. Total de conidias/ml.

5.5.- Estadística empleada en los ensayos

Todas las cepas cultivadas (Tabla No.1) se realizaron por duplicado en los ensayos por limitación de la fuente de P tanto en condiciones de luz y de oscuridad. Además de la utilización de medio control como referencia y ver efecto que presentan las cepas cuando se limita el P soluble e insoluble.

Para calcular la media o promedio aritmético de los datos obtenidos en la velocidad de crecimiento se calculo sumando el valor menor con el valor mayor de los datos obtenidos en la medición de crecimiento.

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$





Para la desviación estándar, que es la medida de variabilidad utilizada con más frecuencia en la investigación por ser la más estable de todas y se basa en los desvíos de los datos originales con respecto a la media \bar{x} . Se calculo usando la siguiente formula.

$$S = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n}}$$

Finalmente la pendiente del crecimiento radial se calculó empleando la siguiente formula:

$$m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$





6.- RESULTADOS

6.1.- CONIDIACIÓN EN LA CEPA IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)

Las cepas mutantes con interrupción en los genes *blr-1* y *blr-2* muestran un fenotipo caracterizado por la pérdida de la actividad sensorial y regulador transcripcional en la fotoconidiación en condiciones nutricionales favorables y de iluminación constante. Se sabe que la deficiencia de nutrientes es considerada como un mecanismo que induce la formación de conidias en hongos. Para el caso de algunas especies de *Trichoderma* una repentina privación de carbono simula el efecto de luz por el desarrollo de un discreto anillo de conidias en la orilla de crecimiento de la colonia. Nosotros decidimos verificar si las proteínas BLR juegan un papel importante en la inducción de conidias por déficit de nutrientes, particularmente el P, para ello utilizamos a las cepas Δ BLR-1 y Δ BLR-2, mismas que fueron sometidas a limitación de la fuente de P a partir de una fuente soluble (KH_2PO_4) y una insoluble (CaHPO_4).

21

6.1.1 Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de P soluble (KH_2PO_4).

La formación de conidias de la cepa IMI, incrementó ligeramente en un 6.8% cuando se limita el P ($3.11\text{E}+08$ conidias/ml), en relación a las condiciones favorables de P ($2.91\text{E}+08$ conidias/ml), esto en condiciones de luz. La diferencia con relación a las cepas Δ BLR-1 ($2.45\text{E}+06$ conidias/ml) y Δ BLR-2 ($2.30\text{E}+06$ conidias/ml) (Fig.6 A) fue del 99.1% menos para Δ BLR-1 y 99.2% menos para Δ BLR-2 en relación a la IMI, cuando se limitó el P. Cuando la cepa IMI fue crecida en oscuridad, no se observó la formación de conidias (Fig.6A, B).

Las cepas mutantes al crecer bajo condiciones limitadas de P (1.8mM) mostraron una ligera inducción de anillo de conidiación (Δ BLR-1 y Δ BLR-2) en presencia de luz (Fig. 6 C). En tanto en condiciones de oscuridad, no presentaron ningún indicio de la formación de conidias (Fig.6 D). Este efecto fue similar al observado en condiciones normales de P (36.7mM).

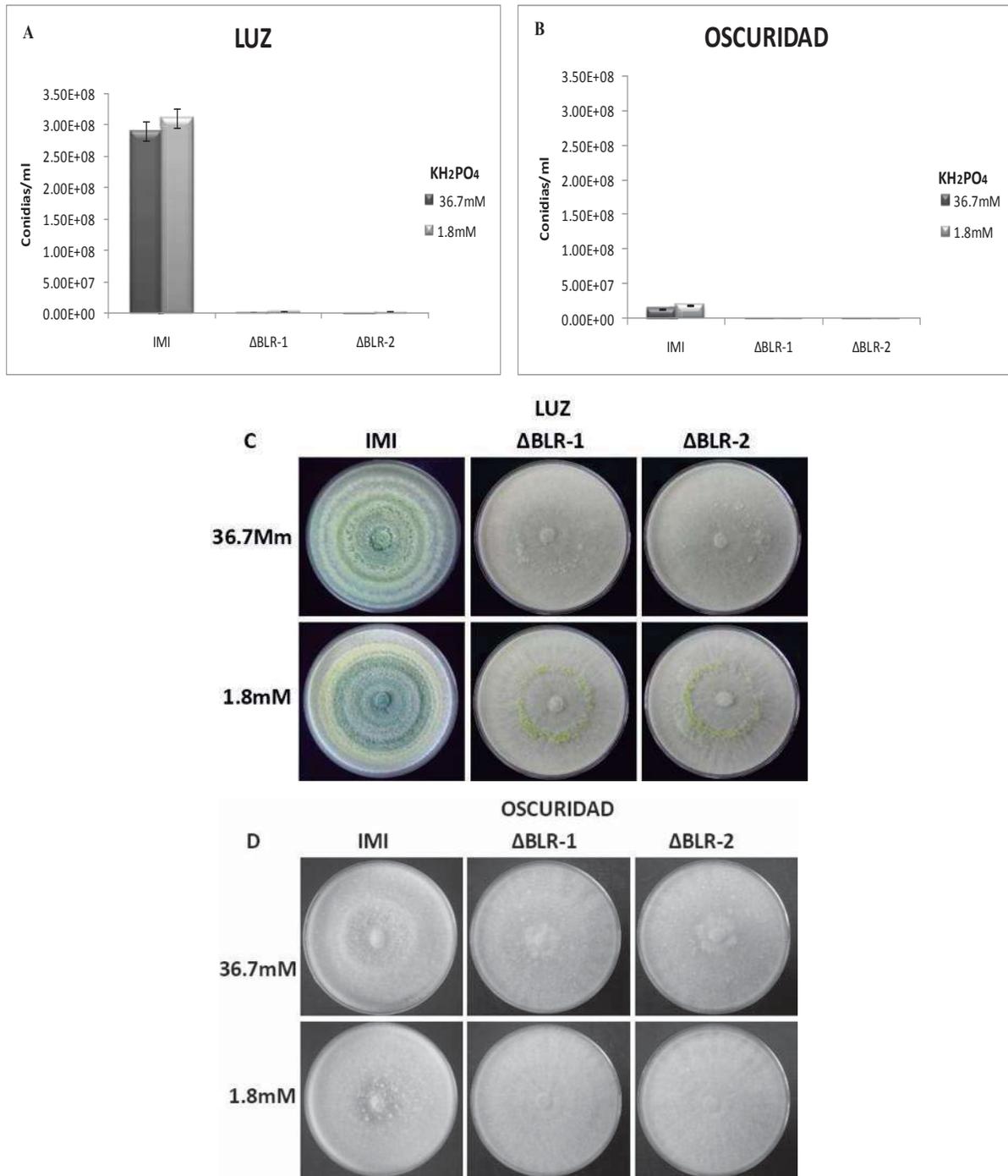


Figura 6. Análisis de la conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH₂PO₄) en las cepas IMI, ΔBLR-1 y ΔBLR-2 en presencia de luz (Izquierda) o en oscuridad (Derecha). (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, ΔBLR-1, ΔBLR-2. (C) colonias crecidas en condiciones de luz, (D) colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 7 días a temperatura ambiente.

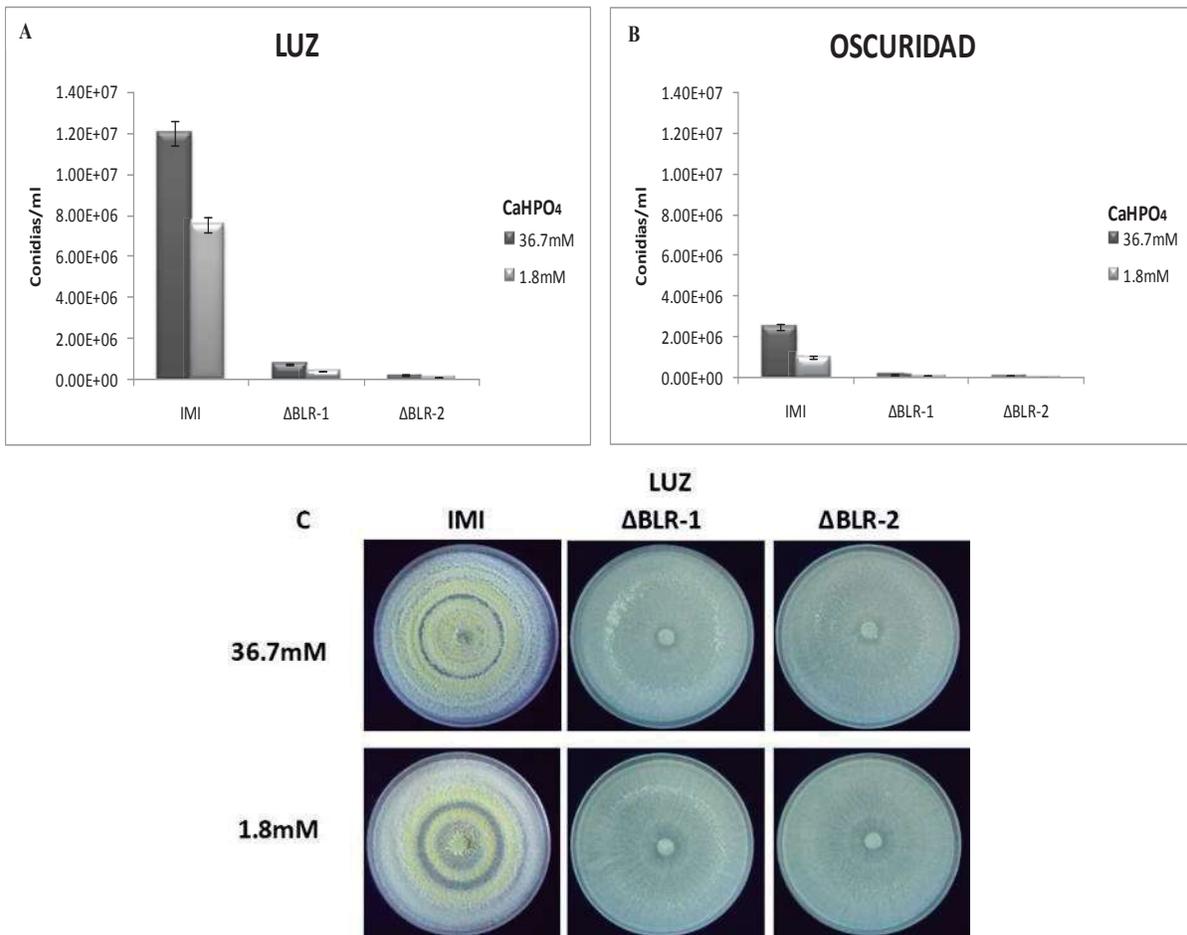




6.1.2 Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de P insoluble (CaHPO_4)

En la concentración estándar de P la cepa IMI presentó mayor conidiación, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad, pero se observó de forma notable la formación de anillos circadianos en la concentración limitada, independientemente de las condiciones de luz y oscuridad, caracterizado por un pigmento amarillo (Fig.7 C, D).

En la cuantificación de conidias de la cepa IMI, se observó un ligero decremento en un 37.5% del número de conidias cuando se limitó el P insoluble ($7.50\text{E}+06$ conidias/ml), en relación a la concentración normal, en presencia de luz ($1.20\text{E}+07$ conidias/ml) (Fig.7 A). En tanto las cepas Δ BLR-1 y Δ BLR-2 en este medio no se observó conidiación alguna, independientemente de la concentración, y de las condiciones de incubación (luz y oscuridad), (Fig.7 C, D).



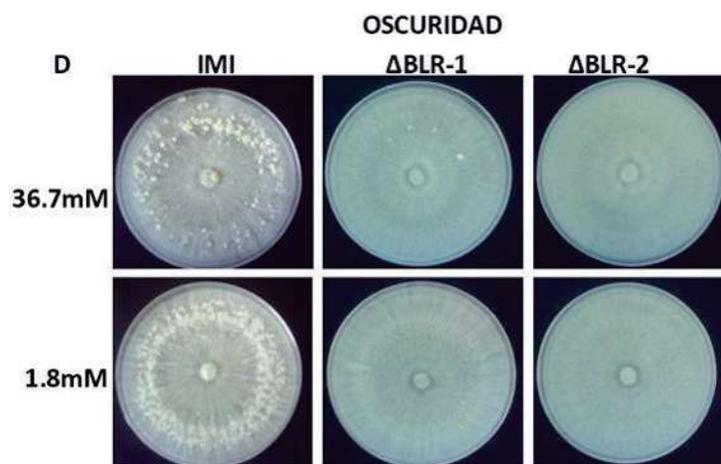


Figura 7. Análisis de la conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO_4) en las cepas IMI, $\Delta\text{BLR-1}$ y $\Delta\text{BLR-2}$, en presencia de luz (Izquierda) o en oscuridad (Derecha). (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, $\Delta\text{BLR-1}$, $\Delta\text{BLR-2}$. (C) colonias crecidas en condiciones de luz, (D) colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 7 días a temperatura ambiente.

6.2.- CRECIMIENTO RADIAL EN LA CEPA IMI, $\Delta\text{BLR-1}$, $\Delta\text{BLR-2}$ POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)

6.2.1.- Crecimiento radial/colonial de la cepa IMI, $\Delta\text{BLR-1}$, $\Delta\text{BLR-2}$ por limitación de P soluble (KH_2PO_4)

El comportamiento que se observó en el crecimiento radial/colonial de la cepa IMI fue de manera similar, esto fue mejor cuando se limitó el P (1.8mM) con un valor 0.83 mm/h, en relación a la concentración normal (36.7mM) con un valor 0.78 mm /h, en presencia de luz. En oscuridad el crecimiento no presentó ningún cambio (Fig.8 A, B).

En lo que respecta al crecimiento radial colonial, las cepas ΔBLR , mostraron una mayor rapidez de crecimiento radial del 5% en concentraciones limitadas de P soluble ($\Delta\text{BLR-1}$ de 1.11 mm/h y $\Delta\text{BLR-2}$ de 1.11 mm/h). Para las concentraciones normales $\Delta\text{BLR-1}$ tiene un crecimiento de 1.05 mm/h y $\Delta\text{BLR-2}$ de 1.06mm/h en presencia de luz. En oscuridad el crecimiento es idéntico entre las cepas (Fig.8 A, B).



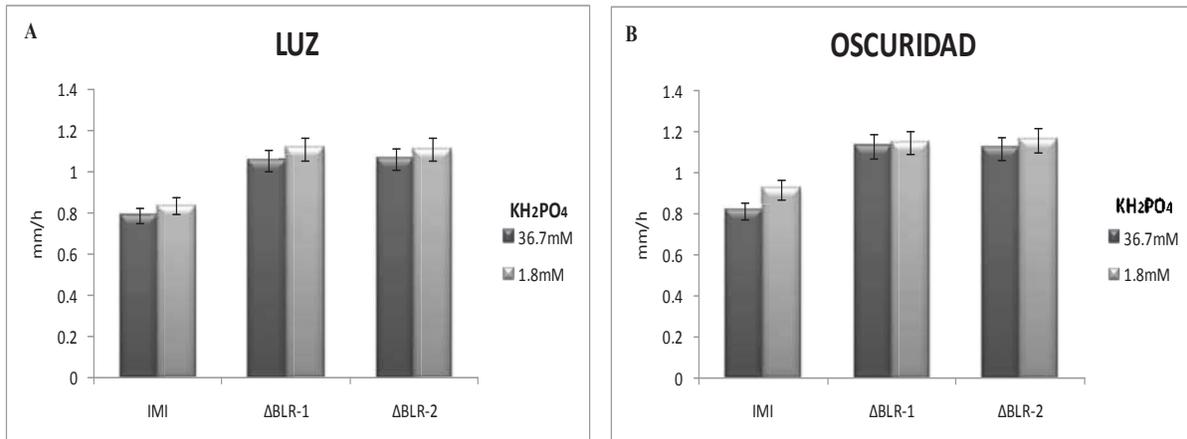


Figura 8. Análisis del crecimiento inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH₂PO₄) en las cepas IMI, ΔBLR-1 y ΔBLR-2 en presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 7 días a temperatura ambiente.

Al establecer la comparación entre las cepas ΔBLR y la cepa IMI, se observó que las mutantes presentan mayor crecimiento 32% durante el periodo de incubación de 96 h, en relación a la cepa IMI, independientemente de la concentración y de las condiciones de incubación (Fig.8 A, B).

6.2.2.- Crecimiento radial/colonial en la cepa IMI, ΔBLR-1, ΔBLR-2 por limitación de P insoluble (CaHPO₄)

Los resultados de la cepa IMI presentó un ligero decremento del 2.5 % en el crecimiento cuando se limitó la fuente de P insoluble (1.8mM) independientemente de las condiciones de luz u oscuridad (Fig.9 A, B). En la fuente de P insoluble el crecimiento radial colonial inducida por la limitación nutricional en las cepas ΔBLR presentó un crecimiento similar en las condiciones de luz (ΔBLR-1 de 0.98 mm/h y ΔBLR-2 de 0.97 mm/h) y en condiciones de oscuridad (ΔBLR-1 de 1.0 mm/h y ΔBLR-2 de 0.99 mm/h). No habiendo cambio importante en el crecimiento radial colonial.

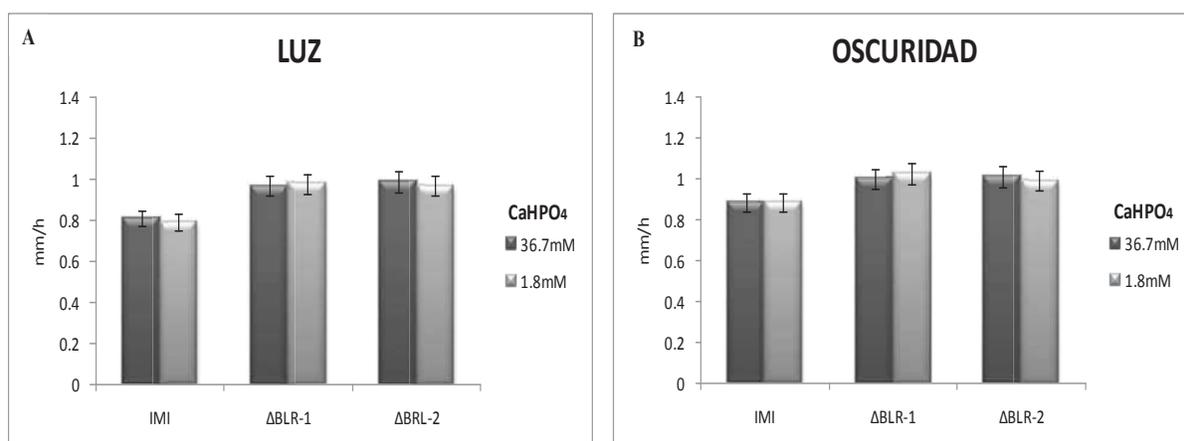


Figura 9. Análisis del crecimiento inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO₄) en las cepas IMI, ΔBLR-1 y ΔBLR-2 en presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 7 días a temperatura ambiente.

Al realizar la comparación entre las cepas ΔBLR y la cepa IMI, se observó un ligero incremento en el crecimiento radial/colonial del 22%, en las cepas ΔBLR-1 y ΔBLR-2 en ambas concentraciones de P (Fig.9 A, B).

6.3.- BIOMASA GENERADA EN LA CEPA IMI, ΔBLR-1, ΔBLR-2 POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)

6.3.1.- Biomasa generada por limitación de P soluble (KH₂PO₄) en la cepa IMI y mutantes BLR

La cantidad de biomasa generada por la cepa ΔBLR-1 fue favorecida en un 20% en condiciones estándar de P, sin importar la presencia de luz (128.7 mg/h) u oscuridad (120.6 mg/h), en tanto la cepa ΔBLR-2 respondió en la condición limitada de P (1.8mM) incrementando un 16%, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad.

La cepa IMI produjo una mayor cantidad de biomasa en la condición limitada de P (1.8mM) en un 8%, en relación a la condición normal, en presencia de luz (62.2 mg/h) y oscuridad (56.2 mg/h) (Fig. 10A, B).

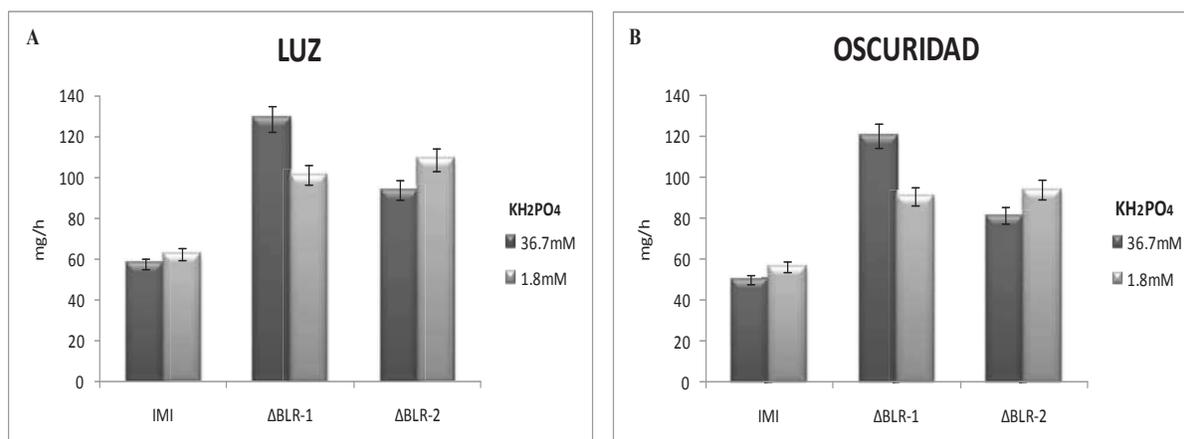


Figura 10. Análisis de la biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH_2PO_4) en las cepas IMI, $\Delta\text{BLR-1}$ y $\Delta\text{BLR-2}$ en presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 7 días a temperatura ambiente

Comparando las dos cepas ΔBLR , con la cepa IMI se observó que las mutantes generaron mayor cantidad de biomasa tanto en la concentración normal de P, como en la concentración limitada, en presencia de luz en un 70% y en oscuridad en un 65% (Fig.10).

6.3.2.- Biomasa generada por limitación de P insoluble (CaHPO_4) en la cepa IMI y mutantes BLR

Con la fuente de P insoluble, las mutantes BLR generaron ligeramente mayor cantidad de biomasa $\Delta\text{BLR-1}$ del 25% (32.7 mg/h) y $\Delta\text{BLR-2}$ del 8% (47.3 mg/h) en presencia de luz. El 3% $\Delta\text{BLR-1}$ y $\Delta\text{BLR-2}$ del 16 % en oscuridad, cuando se limitó el P. La cepa IMI presentó el mismo efecto en la fuente de P insoluble en concentraciones limitadas, incrementando ligeramente la cantidad de biomasa en un 5% en luz (26.8 mg/h) y un 30% (29.0 mg/h) en oscuridad (Fig.11).

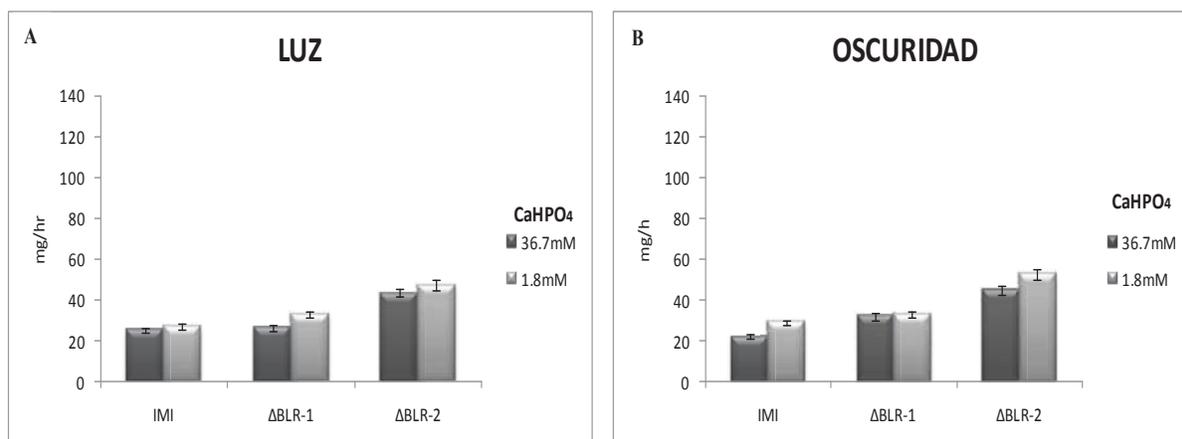


Figura 11. Análisis de la biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO_4) en las cepas IMI, $\Delta\text{BLR-1}$ y $\Delta\text{BLR-2}$ en presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 7 días a temperatura ambiente.

Las mutantes BLR generaron mayor cantidad de biomasa en las condiciones y concentraciones que se mencionan anteriormente con respecto a la cepa IMI, la $\Delta\text{BLR-2}$ presentó mayor cantidad de biomasa que la $\Delta\text{BLR-1}$ y la IMI, el efecto de la fuente de P insoluble fue poco evidente.

6.4.-CONIDIACIÓN DE LAS CEPAS CON SOBRE-EXPRESIÓN EN LOS GENES *blr* POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)

Se ha establecido la hipótesis de otras interacciones entre los sistemas de percepción de luz mediante la regulación convergente de genes regulados por luz azul, a través de las proteínas BLR. Estos resultados indican la presencia de sistemas funcionales adicionales a la percepción en *T. atroviride*. Las mutantes con interrupción en los genes *blr* son incapaces de generar el anillo de conidiación inducido por la luz, con ello algunos genes regulados por la luz deben ser necesarios para la formación del conidióforo.

Para establecer que *blr-2* es un factor limitante en el sistema de percepción de luz azul a través de las proteínas BLR, se realizó la sobre-expresión de *blr-2* en *T. atroviride*. Mostrando una respuesta aumentada a la luz azul, en tanto la sobre-expresión de *blr-1* mostró una disminución en la respuesta a la conidiación a la luz azul, en condiciones nutricionales favorables. En trabajos recientes mediante ensayos de dosis-respuesta se analizó si las cepas



sobre-expresantes estaban alteradas en la sensibilidad a la luz azul. Con los resultados obtenidos se sabe que la sobreexpresión de *blr-2*, aumentó la sensibilidad a la luz, caso contrario en la sobreexpresión de *blr-1* que causó una disminución en la fotoconidiación en *T. atroviride*.

Con el contexto anterior, se estableció si la sobre expresión de estos genes presentaba cambios en la formación de anillos de conidiación por limitación nutricional, para ello las cepas que sobre-expresan estos genes fueron sometidas a fuentes de P soluble a concentraciones limitadas en condiciones de luz y oscuridad.

6.4.1.- Efecto de la sobre-expresión de genes *blr-1* y *blr-2* en la conidiación por limitación de P soluble (KH₂PO₄)

La cepa IMI presentó mayor formación de conidias en un 20%, en condiciones limitadas de P (4.25E+06 conidias/ml), en relación a la condiciones normales de P (3.53E+06 conidias/ml), en presencia de luz, (Fig. 12 C). Los resultados de los ensayos mostraron que la cepa que sobre expresa el gen *blr-2* (Seblr2-13), presentó una evidente formación de anillo de conidiación en condiciones limitadas de P (Fig. 12 C). En tanto la cepa sobre-expresante del gen *blr-1* (Seblr1-8), no presentó el mismo efecto en condiciones limitadas de P, sino que respondió en condiciones favorables de P soluble. Estas cepas no presentaron formación de anillos de conidiación en condiciones de oscuridad. Para verificar el efecto sobre las cepas sobre-expresantes, se realizó una cuantificación de conidias de cada una de ellas, elaborándose una gráfica que muestra el número de conidias/ml en función de la concentración de P utilizado.

Con la cuantificación de conidias, se corroboró que la Seblr2-13 presenta mayor número de conidias cuando se limitó el P (6.18E+06 conidias/ml) en un 53%, respecto a la cepa IMI (4.25E+06 conidias/ml) y a Seblr 1-8 (1.63E+06 conidias/ml) en presencia de luz (Fig. 12 A, B).



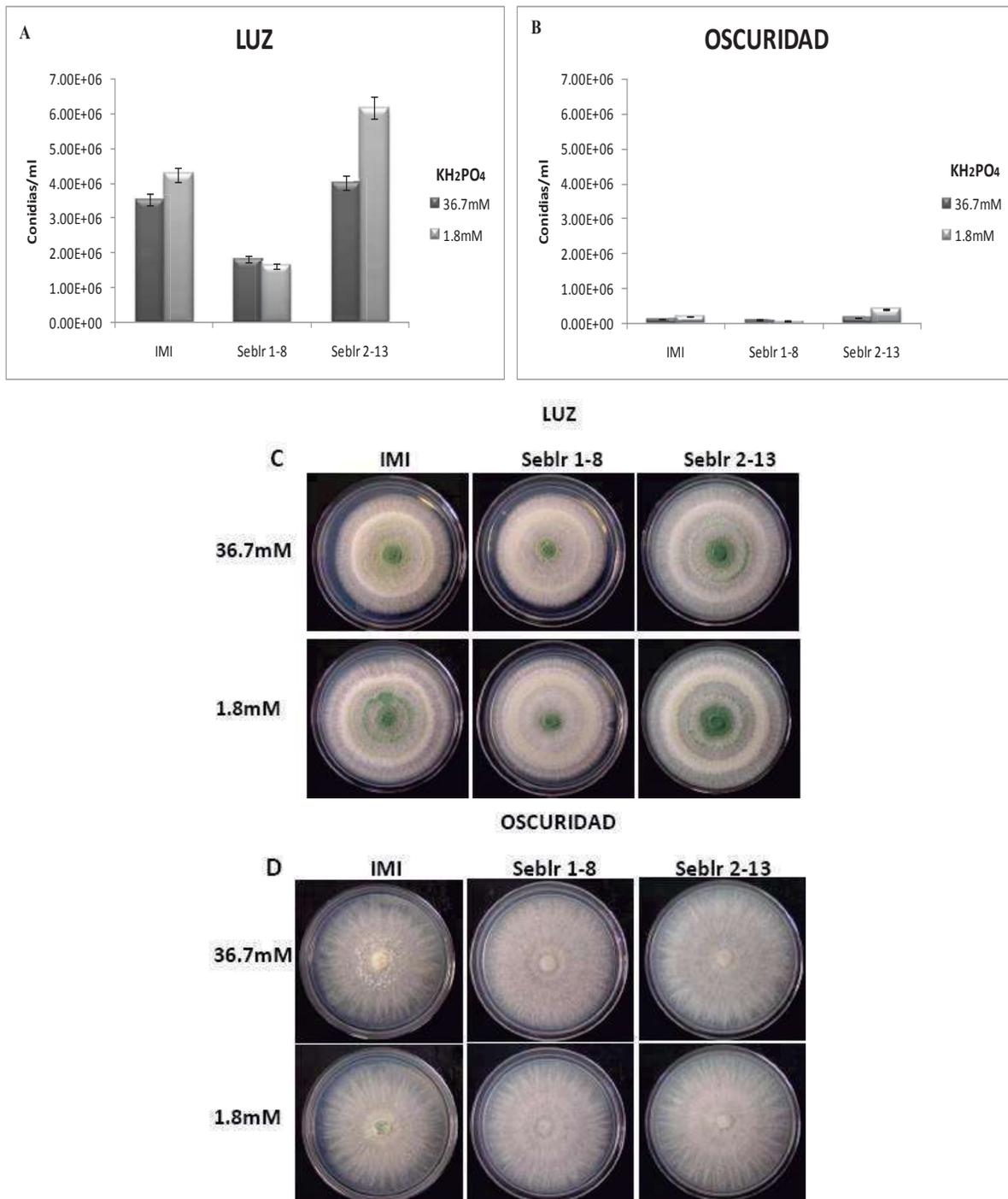
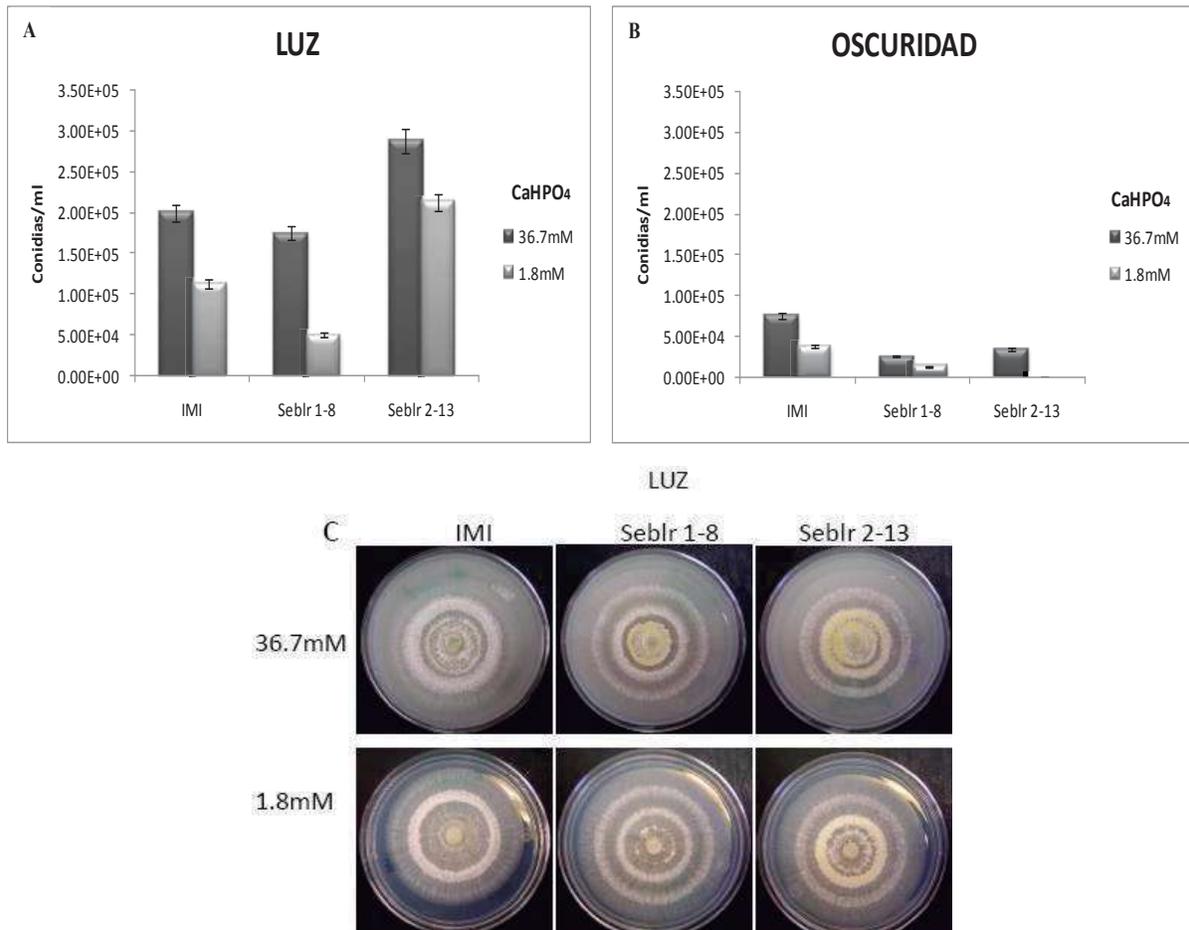


Figura 12. Análisis de la conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH₂PO₄) en las cepas IMI, y cepas con sobre-expresión de los genes *blr*, en presencia de luz (Izquierda) o en oscuridad (Derecha). (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Seblr1-8, Seblr2-13. (C) colonias crecidas en condiciones de luz, (D) colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.



6.4.2.- El efecto de la sobre-expresión de los genes *blr-1* y *blr-2* en la conidiación por limitación de P insoluble (CaHPO₄)

El número de conidias/ml de Seblr2-13 disminuyó cuando se limitó el P, de igual forma para Seblr1-8 y la cepa IMI, independientemente de las condiciones de luz y oscuridad. Haciendo la comparación de las mutantes con la cepa IMI (2.0E+05 conidias/ml), se observó que Seblr2-13 presentó mayor formación de conidias (2.8E+05 conidias/ml) en la concentración normal en presencia de luz (Fig.13 A y B). En la Seblr2-13 se observaron los anillos de conidiación con una pigmentación amarilla mayor en la concentración normal de P insoluble en presencia de luz, de igual forma para la Seblr1-8 (Fig.13 C). Por otra parte, en la concentración limitada solamente se observó perfectamente los anillos de conidiación, sin pigmentación, esto para las 3 cepas mencionadas anteriormente en condiciones de luz. En tanto en las condiciones de oscuridad, no se observaron perfectamente los anillos de conidiación, en las dos concentraciones de P para estas cepas (Fig.13 D).



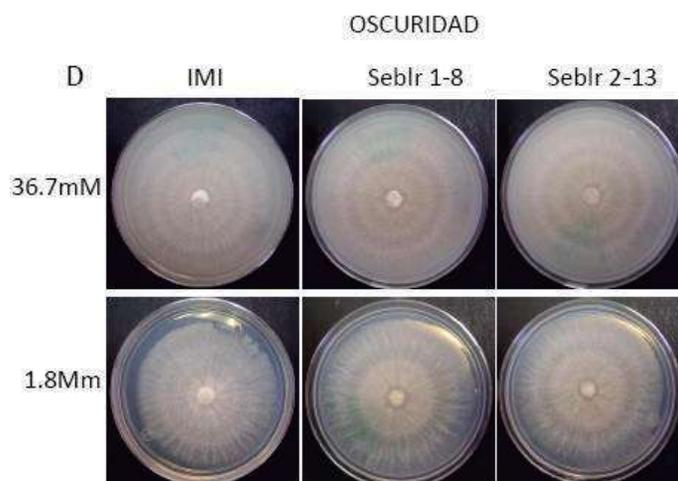


Figura 13. Análisis de la conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO_4) en las cepas IMI y cepas con sobre-expresión de los genes *blr* en presencia de luz (Izquierda) o en oscuridad (Derecha). (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Seblr1-8, Seblr2-13. (C) colonias crecidas en condiciones de luz, (D) colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

6.5.- BIOMASA GENERADA EN LAS CEPAS CON SOBRE-EXPRESIÓN EN LOS GENES *blr* POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)

6.5.1.- Efecto de la sobre-expresión del gen *blr-1* y *blr-2* en la biomasa, por limitación de la fuente P soluble (KH_2PO_4)

La cepa IMI, disminuyó la biomasa en un 12% cuando se limitó el P (68.375 mg/h) en presencia de luz y en un 5% en oscuridad (98.725 mg/h) con respecto a la condición normal de P. La biomasa generada por la Seblr2-13, fue ligeramente mayor 4% en la fuente limitada (1.8mM) de P soluble independientemente de las condiciones de luz (116.9 mg/h) y oscuridad (110.6 mg/h) (Fig.14 A y B). En lo que respecta a la Seblr1-8, disminuyó la biomasa cuando se limitó el P en condiciones de luz, pero aumentó en oscuridad (Fig.14). Las mutantes generaron mayor biomasa, en relación a la cepa IMI.

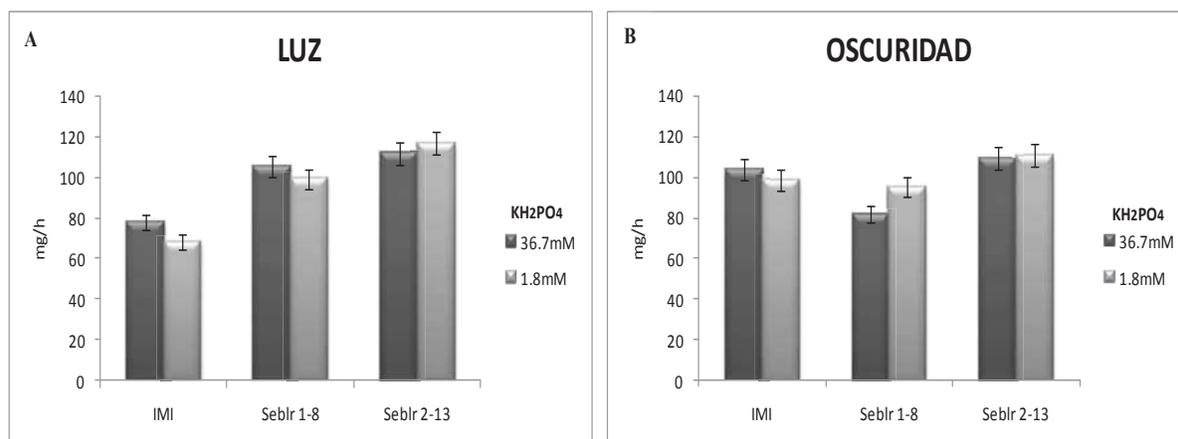


Figura 14. Análisis de la biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH₂PO₄) en las cepas IMI, Seblr1-8 y Seblr2-13, en presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

6.5.2.- Efecto de la sobre-expresión del gen *blr-1* y *blr-2* en la biomasa, por limitación de la fuente se P insoluble (CaHPO₄)

La biomasa de la cepa IMI disminuyó muy poco en condiciones limitadas de P tanto en presencia de luz (49.5 mg/h) y en oscuridad (46.2 mg/h). Las cepas Seblr1-8 y Seblr2-13, de igual forma disminuyeron muy poco cuando se limitó el P insoluble, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad.

Comparando la biomasa de la cepa IMI y de las mutantes, fue similar en condiciones de luz y oscuridad, excepto para Seblr1-8 que disminuyó ligeramente cuando se limitó el P (14.8 mg/h) en oscuridad (Fig.15 B).

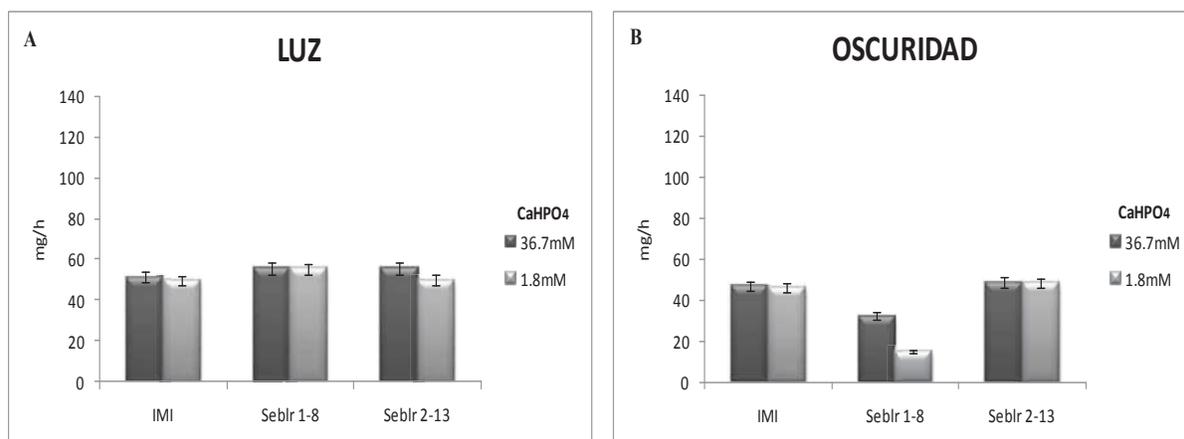


Figura 15. Análisis de la biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO₄) en las cepas IMI, Seblr1-8 y Seblr2-13, en presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

6.6.- CONIDIACIÓN EN LAS CEPAS CON SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN *blu* POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)

Previamente, se identificaron genes regulados por luz azul (Tabla No.4), que son tanto dependientes como independientes de las proteínas BLR (Rosales., y col., 2006). Además, se estableció una función dual para las proteínas BLR, que actúan tanto en la activación como en la represión de genes regulados por luz azul. Con el fin de realizar un análisis de la participación de los genes regulados por luz en la fotoconidiación, se generaron mutantes sobre-expresantes y silenciadas de dichos genes.

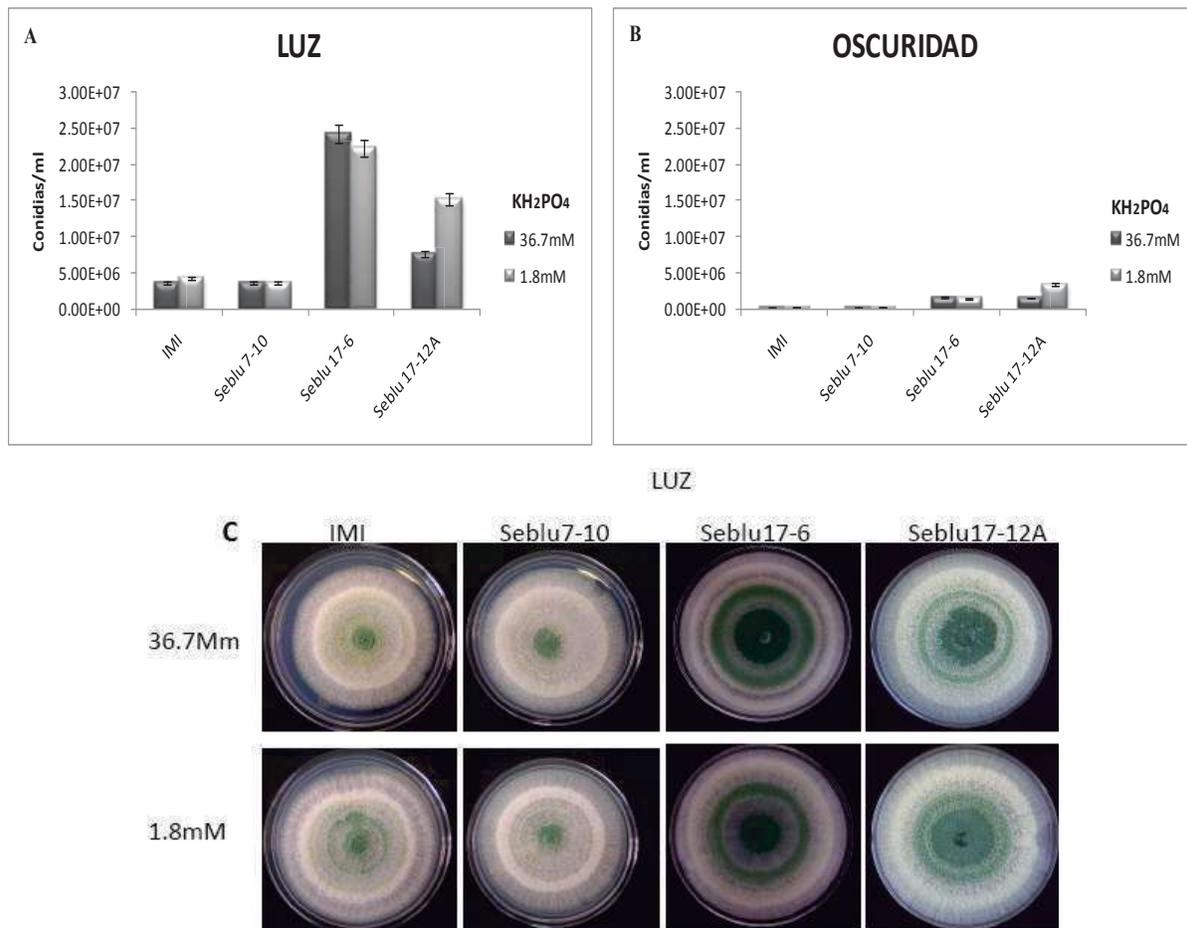
Tabla No.4. Genes regulados por luz azul seleccionados para su análisis por medio de su sobre-expresión o silenciamiento.

Gen	Posible función
<i>blu-7</i>	Regulador de la transcripción con un dedo de zinc C ₂ H ₂
<i>blu-15</i>	Permeasa de aminoácidos
<i>blu-17</i>	Geranilgeranil pirofosfato sintetasa
<i>blu-22</i>	Metil transferasa
<i>bld-5</i>	Inositol-1-fosfato dehidrogenasa



6.6.1.- Efecto de la sobre-expresión de genes *blu7*, *blu17*, en la conidiación por limitación de la fuente de P soluble (KH_2PO_4)

De los resultados obtenidos se observó que la cepa Seblu17-12A, formó mayor cantidad de conidias ($1.52\text{E}+07$ conidias/ml) en la fuente limitada de P soluble (1.8mM) en presencia de luz (Fig.16 C), caso contrario de la sobre-expresante Seblu17-6, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad. Para la cepa Seblu7-10, la conidiación fue similar en las dos concentraciones de P, la diferencia fue nula, tanto en las condiciones de luz y oscuridad (Fig.16 C, D). Estos resultados se confirmaron al observar las fotografías donde la formación de anillos de conidiación fue clara. Adicionalmente se realizó una cuantificación de conidias con la finalidad de establecer una comparación.



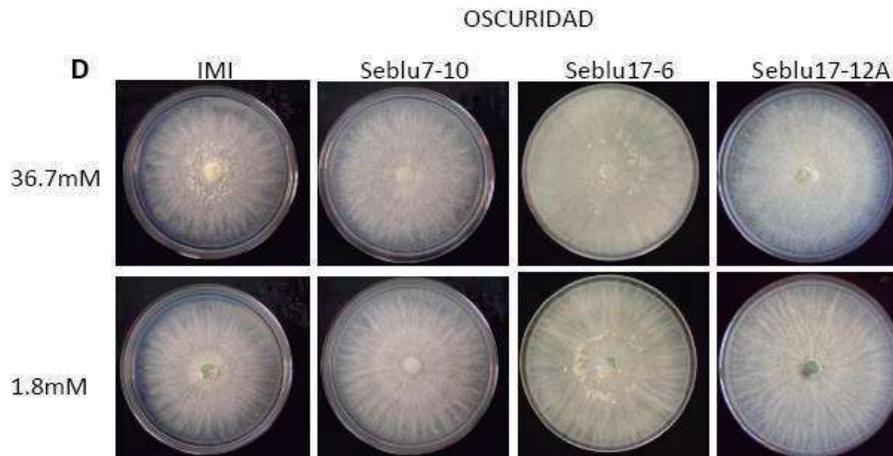


Figura 16. Análisis de la conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH_2PO_4) en las cepas IMI, cepas con sobre-expresión del gen *blu*, en presencia de luz (Izquierda) o en oscuridad (Derecha). (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Seblu7-10, Seblu17-6, Seblu17-12A. (C) colonias crecidas en condiciones de luz, (D) colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

Con el conteo de conidias se observó que la Seblu17-12A, efectivamente formó mayor cantidad de conidias en condiciones limitadas de P soluble, seguido de la cepa Seblu17-6, para el caso de la Seblu7-10, la cantidad de conidias fue similar en la condición limitada y normal. En comparación con la cepa IMI, las Seblu17-12A y Seblu17-6, presentaron mayor cantidad de conidias, independientemente de la concentración de P y de las condiciones luz y oscuridad. La Seblu7-10 conidió de forma similar que lo hace la cepa IMI (Fig.16 C y D).

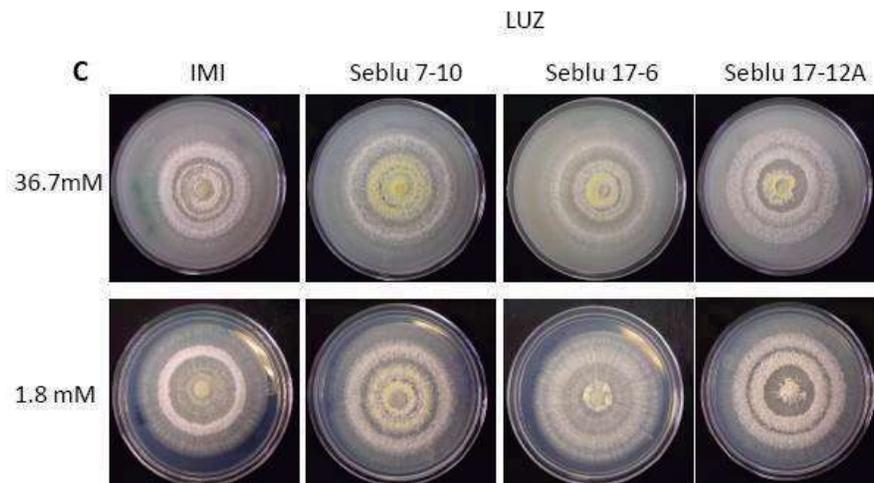
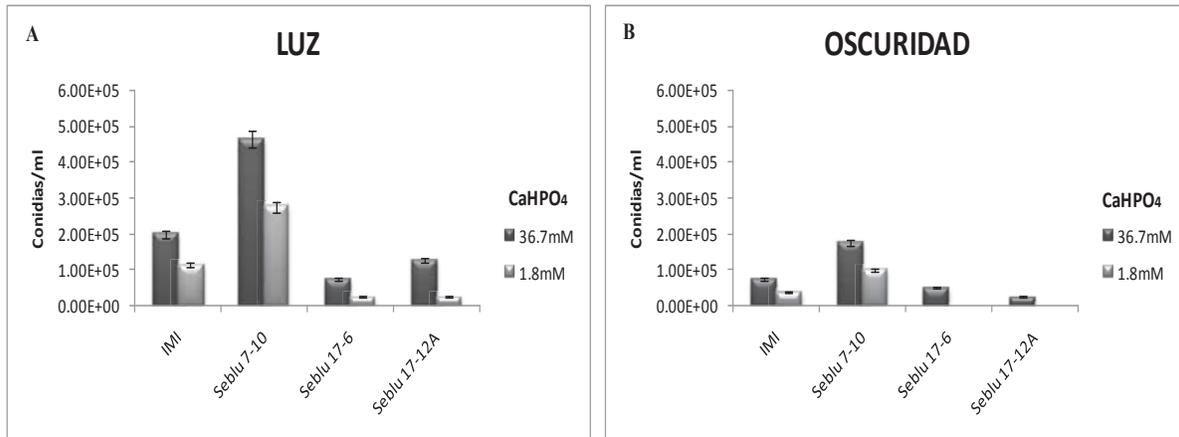
6.6.2.- El efecto de la sobre-expresión de los genes *blu7* y *blu17* en la conidiación por limitación de P insoluble

La cepa IMI presentó formación de anillos de conidiación con pigmentación amarilla, siendo más evidente en la cepa Seblu7-10 en condiciones normales de P insoluble (36.7mM). En tanto en la condición limitada (1.8mM) solamente se observó la formación de los anillos de forma marcada, sin pigmentación, esto en condiciones de luz. En condiciones de oscuridad los anillos de conidiación no fueron muy evidentes, tampoco presentaron pigmentación, en las dos concentraciones de P (Fig.17 C y D).





En la cuantificación de conidias, la cepa Seblu7-10, presentó mayor número de conidias en condiciones normales de P, independientemente de las condiciones de luz ($4.63E+05$ conidias/ml) y oscuridad ($1.75E+05$ conidias/ml), en comparación a las cepas Seblu17-6, Seblu17-12A y principalmente con la cepa IMI (Fig.17 A y B).



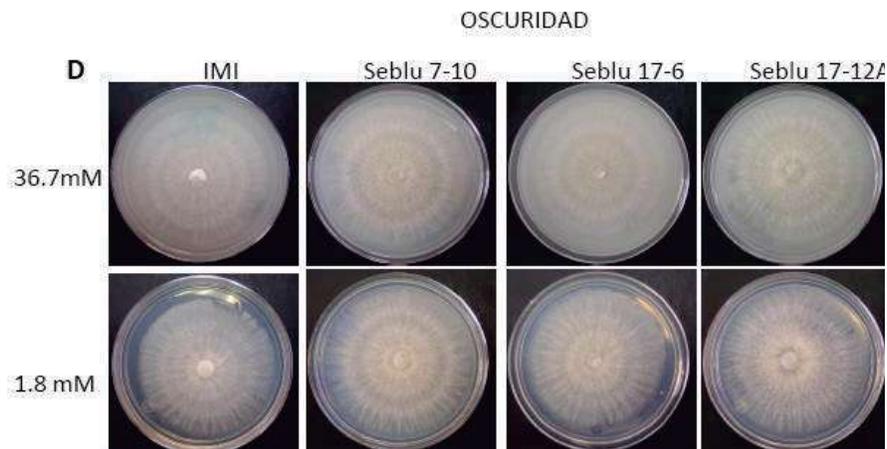


Figura 17. Análisis de la conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO_4) en las cepas IMI y cepas con sobre-expresión gen *blu*, en presencia de luz (Izquierda) o en oscuridad (Derecha). (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Seblu7-10, Seblu17-6, Seblu17-12A. (C) colonias crecidas en condiciones de luz, (D) colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

6.7.- BIOMASA GENERADA EN LAS CEPAS CON SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN *blu* POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)

6.7.1.- Efecto de la sobre-expresión del gen *blu7* y *blu17* en la biomasa, por limitación de la fuente de P soluble (KH_2PO_4)

La biomasa generada por la cepa IMI, disminuyó ligeramente cuando se limitó el P, tanto en luz (68.3 mg/h) y oscuridad (98.7 mg/h). La cepa Seblu17-6, presentó mayor biomasa en la condición normal (134.1 mg/h), con una diferencia mínima, en concentraciones limitadas de P (133.1 mg/h), independientemente de las condiciones de luz y oscuridad, de igual manera para la cepa Seblu17-12A. Solamente la Seblu7-10 incrementó la conidiación al limitarse la fuente de P en presencia de luz (92.7 mg/h) y oscuridad (88.6 mg/h). En comparación con las mutantes alteradas en la fotoconidiación, la biomasa producida por la cepa IMI fue menor (Fig.18 A y B).

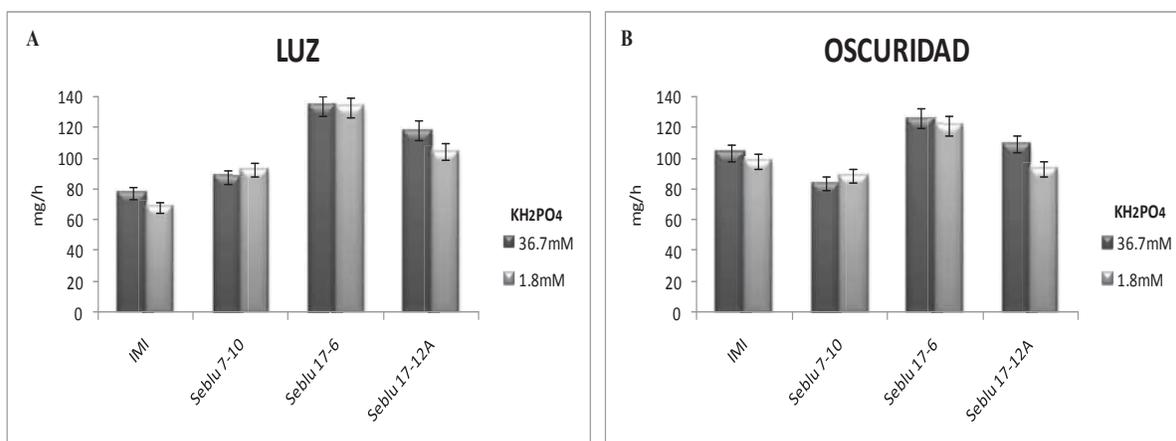


Figura 18. Análisis de la biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH₂PO₄) en las cepas IMI, Seblu7-10 y Seblu17-6, Seblu17-12A. En presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

6.7.2.- Efecto de la sobre-expresión del gen *blu7* y *blu17* en la biomasa, por limitación de la fuente de P insoluble (CaHPO₄)

La biomasa de la cepa IMI disminuyó cuando se limitó el P tanto en luz como en oscuridad. Para las cepas Seblu7-10, Seblu17-6 y la Seblu17-12A, la limitación en la fuente de P (1.8mM), promovió una mayor producción de biomasa, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad (Fig.19 A y B). Haciendo una comparación en la cantidad de biomasa entre las mutantes y la cepa IMI, se observó que la cepa Seblu7-10 (62 mg/h) y cepa la Seblu17-12A (58.8 mg/h), presentaron más biomasa en luz.

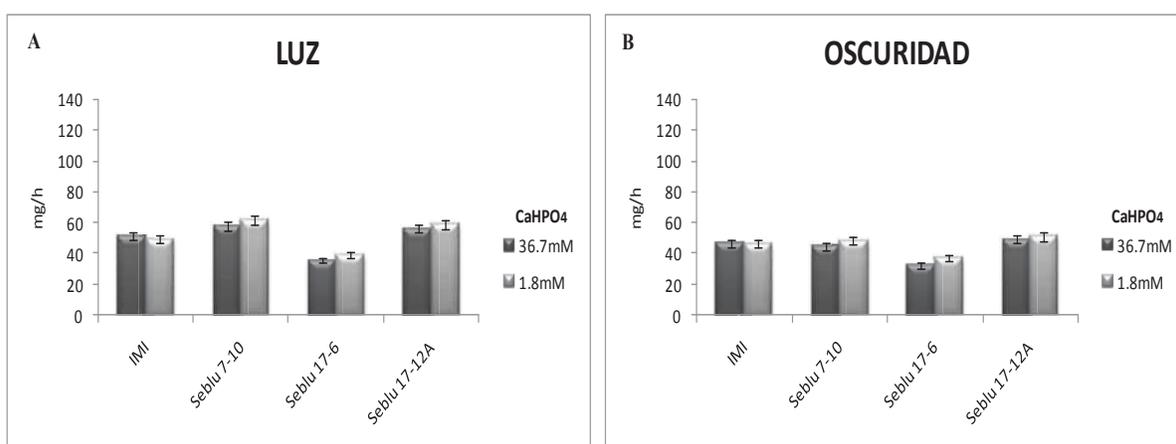


Figura 19. Análisis de la biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO₄) en las cepas IMI, Seblu7-10 y Seblu17-6, Seblu17-12A. En presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente

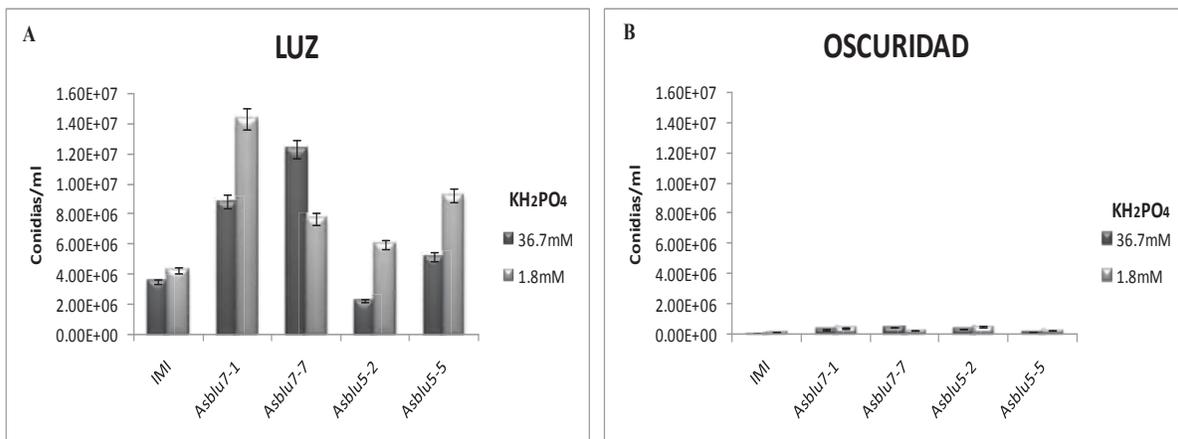


6.8.- CONIDIACIÓN EN LAS CEPAS CON EXPRESIÓN CON ANTI-SENTIDO DEL GEN *blu* POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)

6.8.1.-Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu7* y *blu5*, en la conidiación por limitación de la fuente de P soluble (KH₂PO₄)

El análisis de la participación de los genes regulados por luz en la fotoconidiación se abordó mediante un silenciamiento masivo de genes; las mutantes resultantes se estudiaron mediante ensayos de dosis respuestas de luz, observando los anillos de conidiación formada posterior al pulso de luz.

En los ensayos de este trabajo se pretende estudiar el efecto del silenciamiento de los genes *blu*, en concentraciones limitadas de P bajo condiciones de luz y oscuridad. Al término del periodo de incubación en condiciones antes mencionadas y en concentraciones normales y limitadas de P, se observó que las cepas Asblu7-1, Asblu5-2, y Asblu5-5, presentaron formación de anillos de conidiación intensos. Solamente la cepa Asblu7-7 respondió mejor en concentraciones normales de P (anillos más intensos de color verde) en condiciones de luz (Fig.20 C y D). De los resultados obtenidos se observó que la cepa Asblu7-1 (1.43E+07 conidias/ml), Asblu5-2 (5.99E+06 conidias/ml), Asblu5-5 (9.24E+06 conidias/ml), presentaron mayor cantidad de conidias, inducidas por la limitación nutricional de la fuente de P soluble, en presencia de luz que en oscuridad (Fig. 20 A y B).



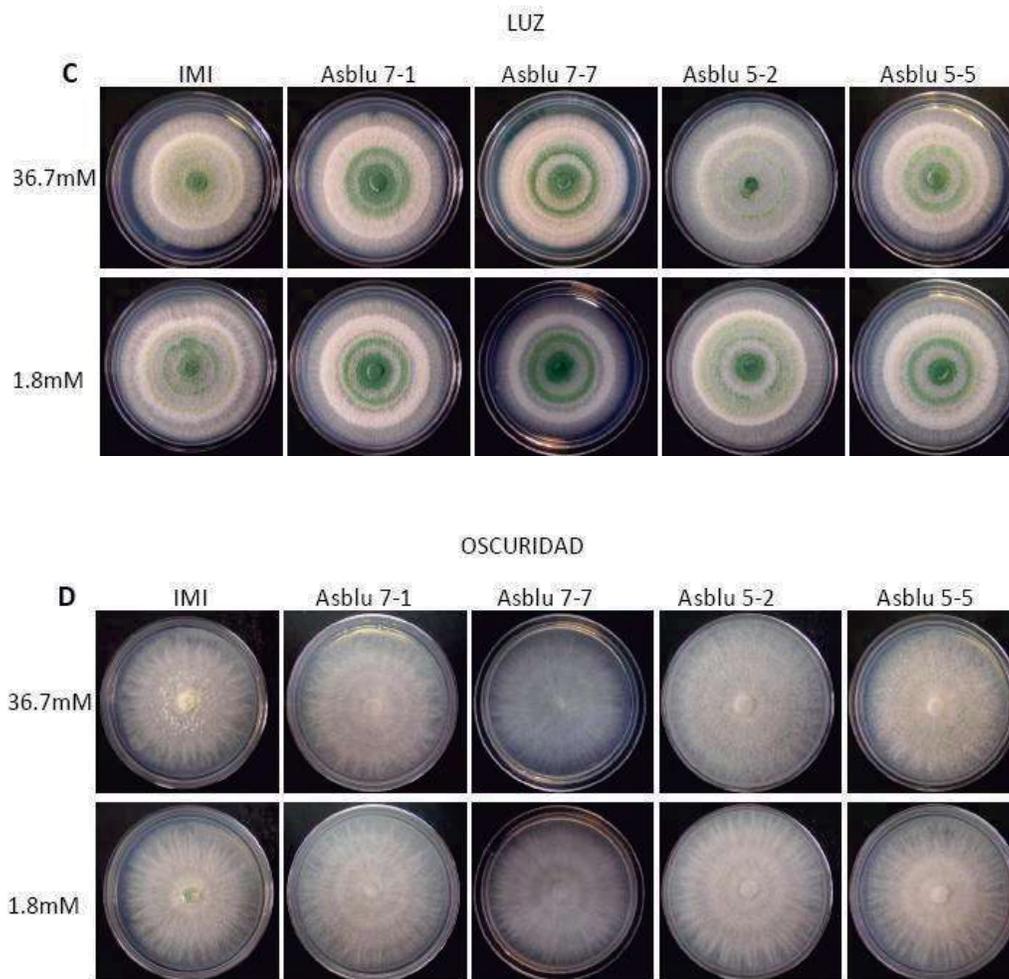


Figura 20. Análisis de la conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH_2PO_4) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido del gen *blu* en presencia de luz (Izquierda) o en oscuridad (Derecha). (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Asblu7-1, Asblu7-7, Asblu5-2, Asblu5-2. (C) colonias crecidas en condiciones de luz, (D) colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

Haciendo la comparación del número de conidias inducidas por el efecto de la limitación nutricional de P, con la cepa IMI que posee todos los factores para la inducción de conidias, se observó que las mutantes con silenciamiento del gen *blu*, presentaron mayor número de conidias inducidas por la limitación de la fuente de P, sin importar las condiciones de luz y oscuridad.





6.8.2.- El efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu7* y *blu5* en la conidiación por limitación de la fuente de P insoluble (CaHPO_4)

La cepa IMI, presentó formación de anillos de conidiación con una ligera pigmentación amarilla, siendo más evidente en la cepa *Asblu5-2*, en condiciones normales de P insoluble. En tanto en las condiciones limitadas solamente se observó de forma evidente la formación de anillos, sin pigmentación, excepto la cepa *Asblu5-2*, en condiciones de luz para ambos casos. En condiciones de oscuridad no hubo formación anillos de conidiación, en las dos concentraciones de P (Fig.21 C, D).

En la cuantificación de conidias, todas las mutantes con anti-sentido disminuyeron la conidiación cuando se limitó el P, pero el número de conidias fue mayor en relación a la cepa IMI, independientemente de las condiciones de luz y oscuridad (Fig.21 A, B).

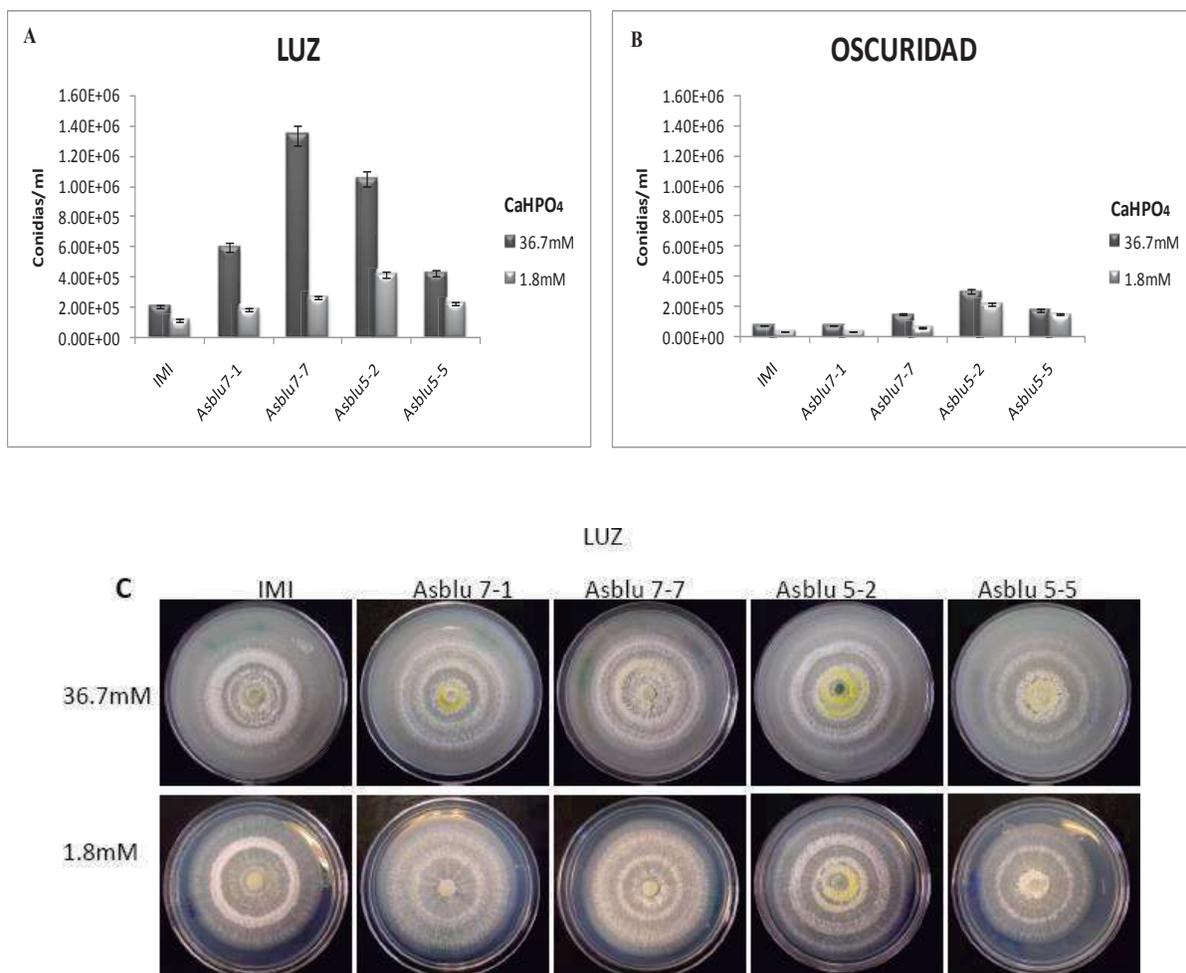




Figura 21. Análisis de la conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO_4) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido del gen *blu* en presencia de luz (Izquierda) o en oscuridad (Derecha). (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Asblu7-1, Asblu7-7, Asblu5-2, Asblu5-2. (C) colonias crecidas en condiciones de luz, (D) colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

6.8.3.- Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu15* y *blu22*, en la conidiación por limitación de la fuente de P soluble (KH_2PO_4)

La formación de anillos de conidiación en la cepa IMI, fue inducida por la limitación de P (1.8mM), al igual que las mutantes, siendo más evidente en presencia de luz. Las cepas crecidas en oscuridad no presentaron conidias solamente crecimiento micelial. En tanto la Asblu15-8 formaron conidias de forma similar a la cepa IMI (Fig.22 C y D). La Asblu22-1, Asblu22-10 presentaron mayor formación de conidias.

Para lograr establecer la diferencia de inducción en la formación de conidias, se realizó una cuantificación de conidias, obteniendo de esa forma el número de conidias en función de las concentraciones utilizadas de P soluble (1.8mM y 36.7mM). Esta cuantificación nos mostró (Fig.22 A, B), que únicamente la cepa Asblu22-1 presentó mayor número de conidias inducida por la limitación de P (1.8mM) soluble independientemente de las condiciones de luz ($9.35\text{E}+06$ conidias/ml) o de oscuridad ($5.63\text{E}+05$ conidias/ml), siendo en menor proporción del número de conidias en esa condición, en comparación con la cepa IMI. La cepa Asblu15-8, presentó un valor similar a la cepa IMI en condiciones de luz y de oscuridad, pero no de igual forma para la cepa Asblu22-10 que presentó un valor inferior de conidias.

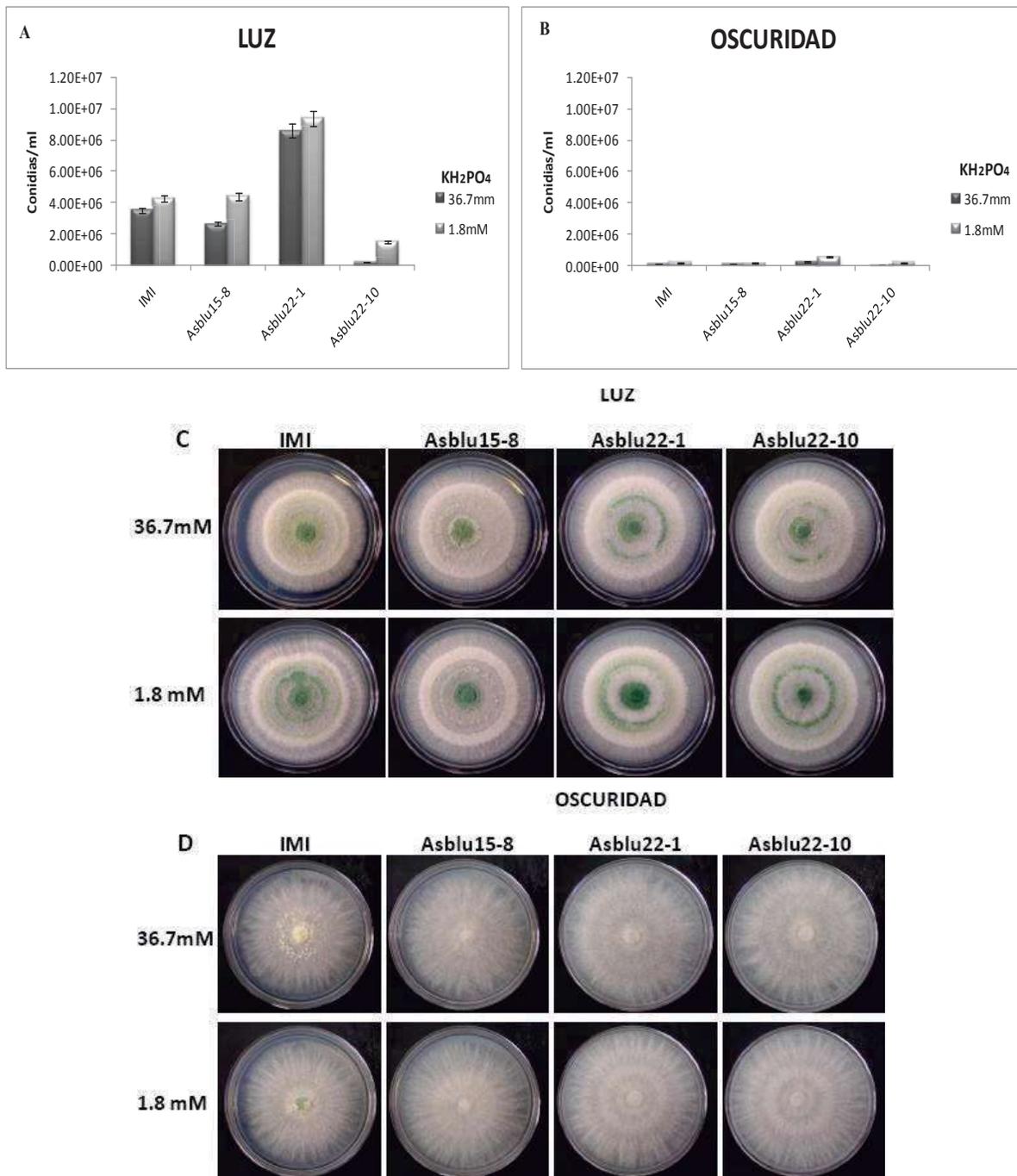


Figura 22. Análisis de la conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH₂PO₄) en las cepas IMI, y cepas con anti-sentido del gen *blu*, en presencia de luz (Izquierda) o en oscuridad (Derecha). (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Asblu15-8, Asblu22-1, Asblu22-10. (C) colonias crecidas en condiciones de luz, (D) colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

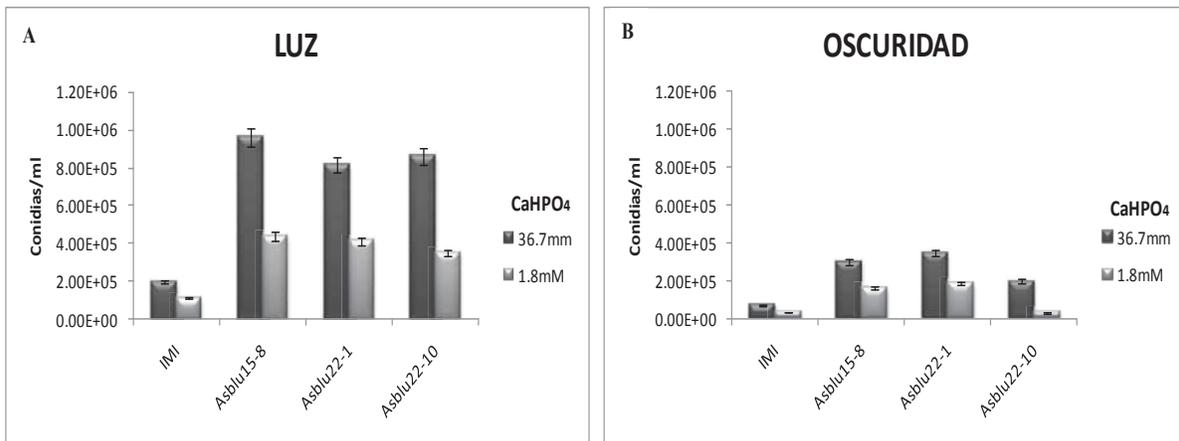




6.8.4.- El efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu15* y *blu22* en la conidiación por limitación de P insoluble

La cepa IMI presentó una formación reducida de pigmentación en condiciones normales y limitadas bajo condiciones de luz, por otra parte no hubo formación de anillos en condiciones de oscuridad. En tanto las cepas en anti-sentido en condiciones normales de P insoluble (36.7mM) presentaron anillos de conidiación con mayor pigmentación amarilla, pero cuando se limitó el P (1.8mM), fue más evidente la formación de los anillos en condiciones de luz, con poca pigmentación en la cepa *Asblu15-8* (Fig.23 C). En condiciones de oscuridad la formación de los anillos fue poco visible, en las dos concentraciones de P insoluble (Fig. 23 D).

Al realizar la cuantificación de conidias, el número de conidias de la cepa IMI y de todas las mutantes con anti-sentido, disminuyó cuando se limitó el P, independientemente de las condiciones de luz y oscuridad, pero la conidiación de las mutantes fue mayor en condiciones limitadas de P en relación a la cepa IMI (Fig.23 A y B).



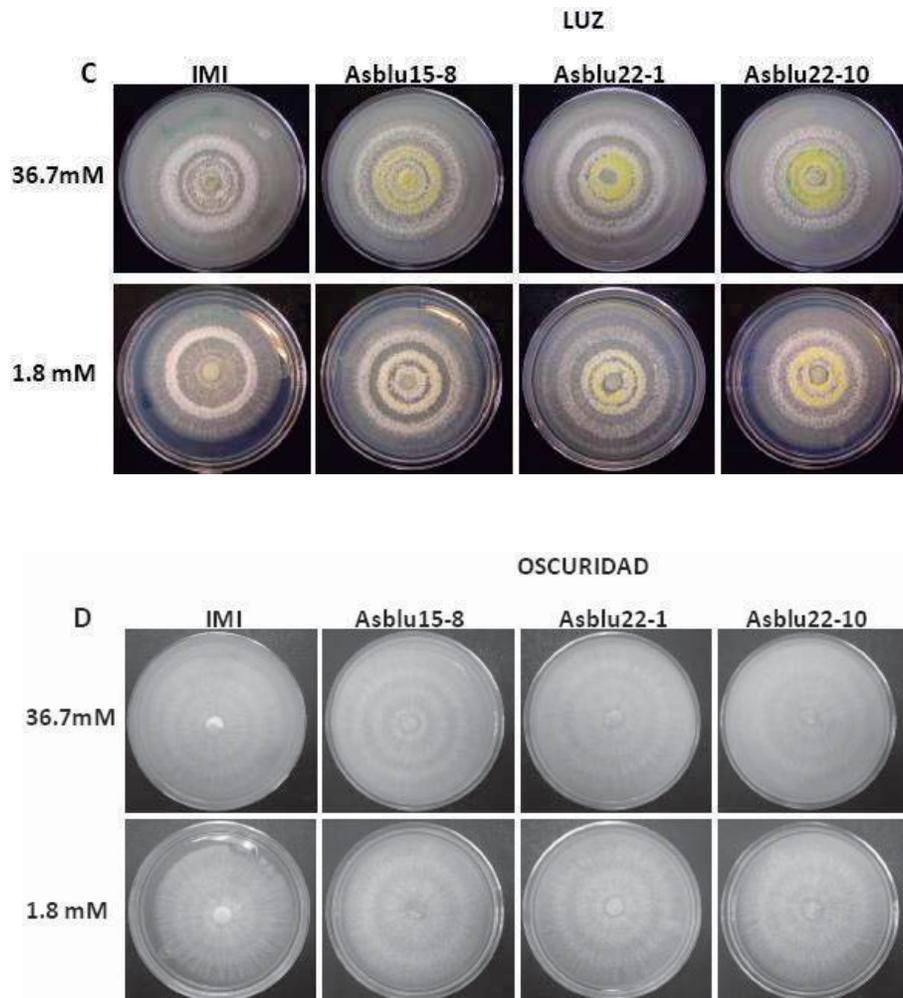


Figura 23. Análisis de la conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO_4) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido del gen *blu*, en presencia de luz (Izquierda) o en oscuridad (Derecha). (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Asblu15-8, Asblu22-1, Asblu22-10. (C) colonias crecidas en condiciones de luz, (D) colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

6.9.- BIOMASA GENERADA EN LAS CEPAS CON EXPRESIÓN CON ANTI-SENTIDO DEL GEN *blu* POR LIMITACIÓN DE FOSFATO (P)

6.9.1.- Efecto de la expresión con anti-sentido del gen *blu7* y *blu5* en la biomasa, por limitación de la fuente de P soluble (KH_2PO_4)

La cepa IMI disminuyó la biomasa cuando se limitó el P (98.7 mg/h); por otra parte incrementó su biomasa en condiciones de oscuridad (103.9 mg/h), en la concentración normal





de P soluble (Fig.24 B). En concentraciones limitadas de P soluble (1.8mM), la Asblu7-1, Asblu5-2, y Asblu5-5, presentaron más biomasa, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad. La Asblu7-7 respondió favorablemente en concentraciones normales, tanto en luz (100.2 mg/h) y oscuridad (93.1 mg/h) (Fig. 24 A, B). En presencia de luz la biomasa de la cepa IMI (77.8 mg/h) fue menor en comparación con las mutantes, en tanto en condiciones de oscuridad la biomasa fue similar (103.9 mg/h).

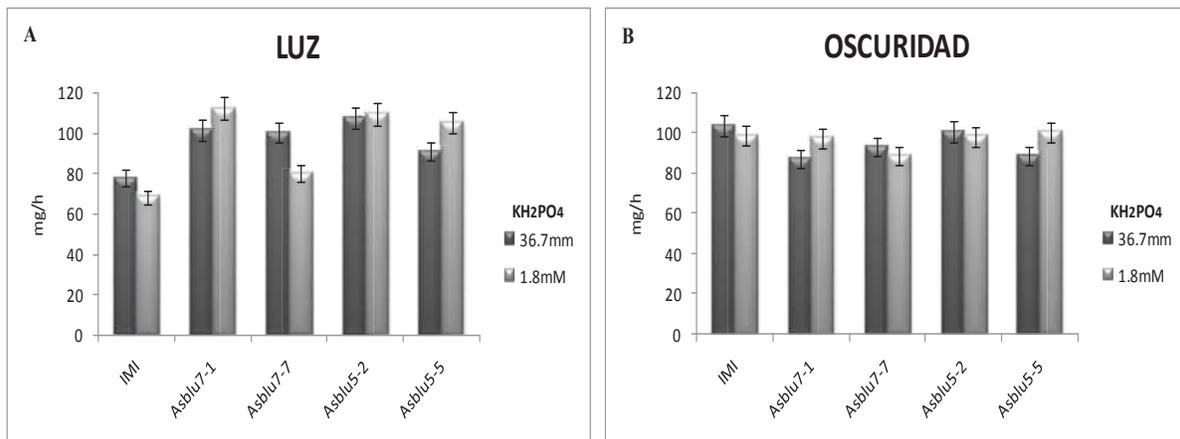


Figura 24. Análisis de la biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH₂PO₄) en las cepas IMI, Asblu7-1 y Asblu7-7, Asblu5-2, Asblu5-5. En presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

6.9.2.- Efecto de la expresión con anti-sentido del gen *blu7* y *blu5* en la biomasa, por limitación de la fuente de P insoluble (CaHPO₄)

Las mutantes que generaron mayor cantidad de biomasa en la limitación de fuente de P (1.8mM), fueron las cepas Asblu7-1 y la cepa Asblu7-7, independientemente de las condiciones de luz (Asblu7-1 de 52.6 mg/h y Asblu7-7 de 50.0 mg/h) y oscuridad (Asblu7-1 de 42.2 mg/h y Asblu7-7 de 46.6 mg/h). En tanto las cepas Asblu5-2 y Asblu5-5, generaron mayor biomasa en concentraciones normales de P (36.7mM), independientemente de las condiciones de luz u oscuridad, de la misma manera para la cepa IMI (Fig.25). Las mutantes generaron una biomasa similar a la cepa IMI, tanto en luz y oscuridad, claro que en concentraciones diferentes como se mencionó anteriormente.

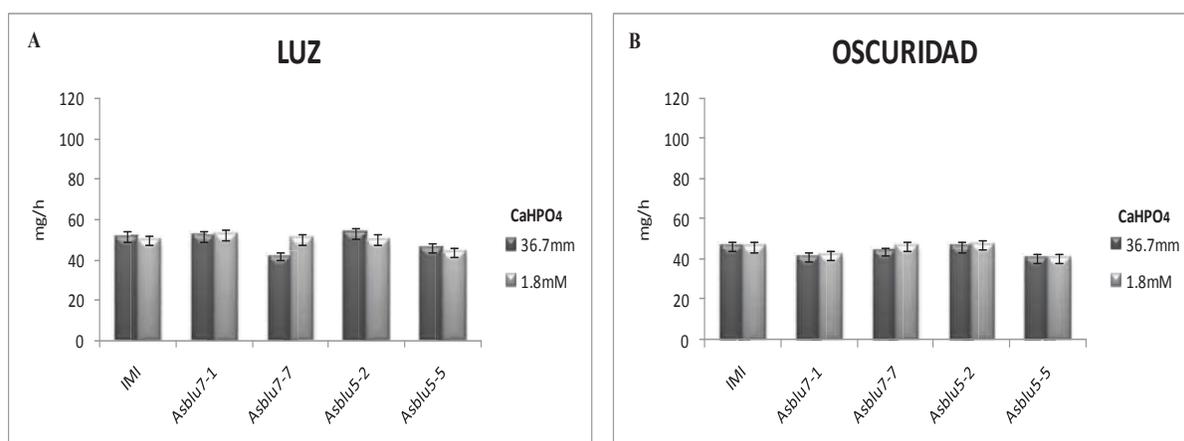


Figura 25. Análisis de la biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO_4) en las cepas IMI, Asblu7-1 y Asblu7-7, Asblu5-2, Asblu5-5. En presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

6.9.3.-Efecto de la expresión con anti-sentido del gen *blu15* y *blu22* en la biomasa, por limitación de la fuente de fosfato soluble (KH_2PO_4)

La cepa IMI disminuyó la biomasa cuando se limitó el P, tanto en luz como en oscuridad. La Asblu22-1, seguida de la Asblu22-10, generó mayor cantidad de biomasa, en concentraciones normales de P (36.7mM), y en condiciones de luz u oscuridad (Fig.26). En tanto la cepa Asblu15-8, fue la única que respondió favorablemente en la concentración limitada de P soluble, independientemente de las condiciones de luz (100.7 mg/h) u oscuridad (86.2 mg/h).

La cepa IMI presentó menor biomasa en las dos concentraciones de P, en relación con las 3 mutantes mencionadas anteriormente, y en oscuridad solamente con la Asblu22-1 (Fig.26).

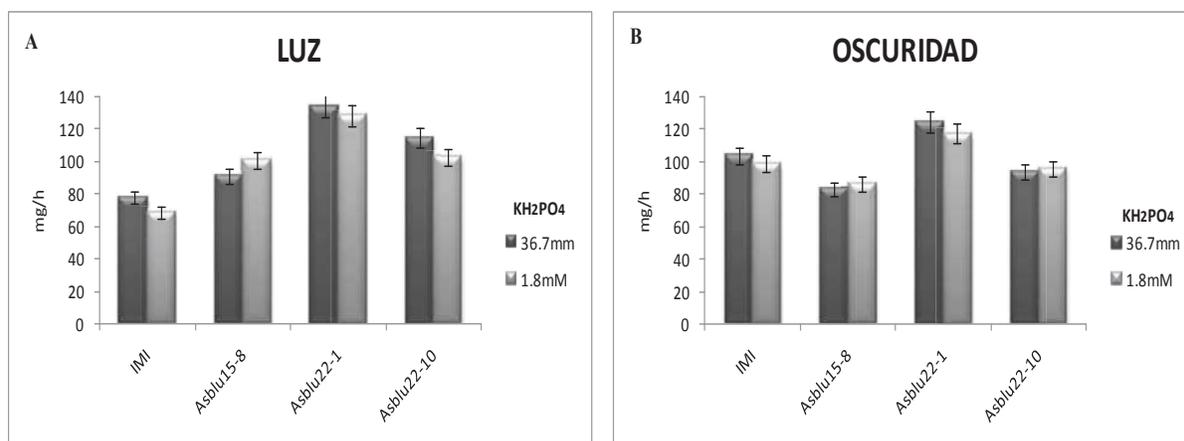


Figura 26. Análisis de la biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de P soluble (KH₂PO₄) en las cepas IMI, Asblu15-8 y Asblu22-1, Asblu22-10. En presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente.

6.9.4.- Efecto de la expresión con anti-sentido del gen *blu15* y *blu22* en la biomasa, por limitación de la fuente se fosfato insoluble (CaHPO₄)

La Asblu22-10, generó ligeramente más biomasa en la concentración limitada de P, tanto en luz (60.5 mg/h) como en la oscuridad (55.7 mg/h). La Asblu15-8, Asblu22-10, al igual que la cepa IMI, generaron mayor biomasa en la concentración normal de P, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad (Fig.27)

Las mutantes alteradas en la fotoconidiación, generaron un ligero incremento de biomasa, en relación a la cepa IMI, en luz y oscuridad, siendo similares en las dos condiciones, pero en concentraciones distintas (Fig.27).

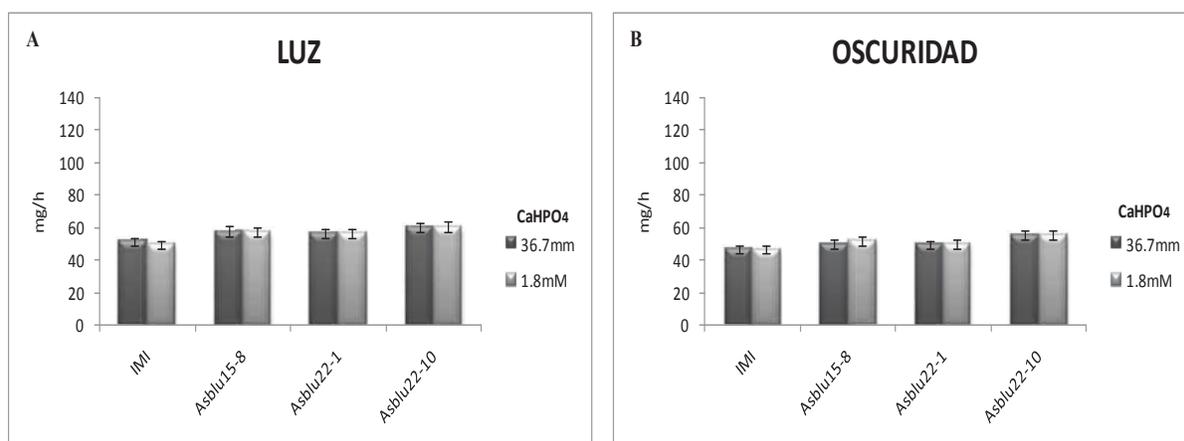


Figura 27. Análisis de la biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de P insoluble (CaHPO₄) en las cepas IMI, Asblu15-8 y Asblu22-1, Asblu22-10. En presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura ambiente



7.- DISCUSIÓN

En trabajos anteriores se ha demostrado e identificado que *T. atroviride*, presenta proteínas homólogas al sistema de percepción de la luz azul de *N. crassa* (Casas y col., 2004). Los genes *blr-1* y *blr-2* (**blue light regulator**) de *T. atroviride* son las proteínas que regulan el sistema de percepción y transducción de la luz azul, a través de la formación de un complejo que promueve la formación de un anillo de conidiación en el perímetro de la colonia, al momento de ser expuesta a este estímulo (Casas y col., 2004). Los genes *blr-1* y *blr-2* son los homólogos a los genes *white collar* (*wc-1* y *wc-2*) que regulan todas las respuestas activadas por luz azul en *Neurospora crassa*. La interrupción de los genes *blr-1* y *blr-2* en *T. atroviride*, hace que pierda la actividad sensorial y la regulación transcripcional en la fotoconidiación en condiciones nutricionales e iluminación constante. Resultados demostrados en ensayos de dosis respuesta a luz, presentando solamente crecimiento micelial rápido y abundante, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad, en comparación con la cepa IMI (Esquivel., 2007). La formación del complejo, entre BLR-1 y BLR-2 es importante para la fotorecepción luminosa, y con ello la inducción de la fotoconidiación.

Para entender más a fondo el complejo sistema de percepción de luz, se realizó una sobre expresión de los genes *blr-1* y *blr-2* (Seblr1 y Seblr2), observándose un incremento en la fotosensibilidad por parte de la Seblr2, caso contrario a Seblr1. Para completar el estudio, también los genes inducidos por la luz por la activación del complejo transcripcional BLR, se sobre-expresaron o se silenciaron a través de una expresión en anti-sentido (Esquivel., 2007).

Adicionalmente se sabe que la limitación de nutrientes es considerado como un mecanismo mas, que induce la formación de conidias en hongos, clara evidencia en *T. atroviride*, donde una repentina privación de carbono, simula el efecto de luz, impulsando un discreto desarrollo del anillo de conidias en la orilla de crecimiento de la colonia (Casas y col., 2004). En este trabajo se presentan evidencias sobre la influencia de la limitación nutricional en la fuente de P es un factor importante que induce la formación de los anillos de conidiación en las mutantes BLR-1 y BLR-2.

Con la finalidad de establecer, si las mutantes BLR presentaron alteración alguna en la conidiación por limitación nutricional, se observó la formación de un discreto anillo de



conidias en las mutantes BLR, cuando la concentración de P soluble se limitó (1.8mM), al igual que la cepa IMI incrementando su conidiación, en presencia de luz, pero no de la misma manera en la limitación de P insoluble (ver fig.6), mientras que la cepa IMI presentó una mejor formación de los anillos de conidiación con pigmentación amarilla cuando se limitó el P insoluble, con espacios marcados entre ellos en presencia de luz, en tanto, en condiciones de oscuridad el anillo no se alcanzó a visualizar perfectamente (ver fig.7).

Con los resultados descritos se puede decir que tanto BLR-1 y BLR-2, mantienen alguna relación con el sistema de promotores que regulan la disponibilidad, el transporte y la inducción de enzimas extracelulares, para este tipo de P insoluble (CaHPO_4) y por consecuente no se hidrolizan los ésteres orgánicos de P, que no pueden ser transportados por los canales proteicos de la membrana plasmática, y no se pueda inducir la conidiación en las mutantes BLR por la limitación de P insoluble, caso contrario para la fuente de P soluble. También cabe la posibilidad que la expresión de genes de conidiación no se lleven a cabo en las mutantes por la ausencia de BLR-1 ó BLR-2, que con lleva a ningún tipo de señalización por la falta de P insoluble en el medio de cultivo. Se sabe que en otros organismos la limitación de nutrientes conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno y que generan un estrés oxidativo, y permita el proceso de diferenciación celular (Peraza y Hansberg., 2002).

Los dominios PAS, como se mencionó anteriormente, posiblemente actúan monitoreando señales a estímulos intra y extracelulares (Pérez., 2007), tales como la limitación nutricional, que al ser detectado por estos dominios de las proteínas BLR, los receptores presentes sufren ciertos cambios para responder a tal estímulos y con ello la conidiación, claro esta que dependiendo del tipo de sustrato, en este caso la fuente de P soluble ó insoluble.

Los ensayos realizados por limitación nutricional de carbono, nitrógeno, tanto del tipo de P presente en el medio son factores que dependiendo directa o indirectamente de las proteínas BLR, para inducir la conidiación. Con las vías alternas posibles descritas en el sistema de percepción por estrés nutricional, se pueda aclarar un poco, el complejo sistema de conidiación que tiene *T. atroviride*, además de la generada por la luz azul.

En el crecimiento radial/colonial, las cepas mutantes tuvieron un ligero incremento cuando se limitó el P, al igual la cepa IMI, la diferencia de crecimiento fue nula bajo condiciones de luz y oscuridad, aunque se puede decir que en oscuridad solamente existió desarrollo micelial



abundante cuando la fuente de P fue soluble (ver Fig.8), pero no de igual forma cuando fue insoluble, la velocidad de crecimiento fue similar, pero el micelio fue escaso (ver fig. 9). Esto parece indicar, que es necesaria la presencia de *blr-1* y *blr-2* para inducir la expresión de proteínas que favorezcan la asimilación del tipo de P presente en el medio. Para la determinación de peso seco, se observó que las mutantes incrementaron su biomasa tanto en la fuente soluble como la insoluble, más micelio en fuente soluble independientemente de la concentración y de las condiciones de luz o oscuridad, Δ BLR-1 incrementó su biomasa en concentraciones normales de P, Δ BLR-2 cuando se limitó el P, al igual que la cepa IMI (ver fig.10 y 11).

Con lo que respecta a la mutantes BLR, todo indica que el tipo de P presente en el medio de cultivo, en conjunto con las proteínas BLR, son factores que determinan la eficiencia de inducción de cambios estructurales de desarrollo y de protección de los organismos vivos, en este caso *T. atroviride*.

Por otra parte, para establecer que *blr-2* fue un factor limitante en el sistema de percepción de luz azul a través de las proteínas BLR, se realizó la sobre-expresión de *blr-2* en *T. atroviride*. Mostrando una respuesta aumentada a la luz azul, en tanto la sobreexpresión de *blr-1* mostró una disminución en la respuesta de conidiación a la luz azul, en condiciones nutricionales favorables (Esquivel., 2007). Todos los genes inducidos por la luz (genes *blu*) que se analizaron en este trabajo, presentaban niveles de sobre-expresión y expresión con anti-sentido, para observar el posible efecto con limitación de la fuente de P en la conidiación.

En lo que concierne a la cepa Seblr2-13 conidió mucho más, cuando se limitó el P soluble en presencia de luz, que la cepa IMI. Mientras tanto la Seblr1-8 disminuyó su conidiación cuando el P está limitado (ver fig.12). Con los resultados se puede comprobar que la sobre expresión de *blr-2*, fue un factor limitante tanto en la transducción de la luz, como en la percepción de señal por limitación de nutrientes, esto se corroboró con la sobre-expresión de *blr-1*, que presentó una disminución de conidiación en relación a Seblu2-13 y la cepa IMI de *T. atroviride*. Es como si la sobre expresión del gen *blr-2*, favoreciera la expresión de genes reguladores de la conidiación por estrés nutricional en conjunto con las condiciones de luz, caso contrario para la sobre expresión del gen *blr-1*, la acumulación del transcrito, ocasionó una regulación negativa en la capacidad de señalización a tal estímulo, entonces los genes blr



necesitan tener un equilibrio en los niveles de expresión y puedan regular de forma adecuada los diferentes tipos de señalización en la limitación de nutrientes.

La biomasa generada por la cepa Seblr2-13, incrementó cuando se limitó el P soluble, pero disminuyó en la fuente insoluble, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad. En tanto la cepa Seblr1-8 e IMI disminuyeron su biomasa en concentraciones limitadas de P (soluble e insoluble) en luz y oscuridad (ver fig.14 y 15)

Una de las tantas funciones de los genes *blr*, es la regulación del crecimiento radial colonial de *T. atroviride* en conjunto con el desarrollo micelial, manteniendo un inducción equilibrada entre estos dos aspectos a través de la formación del complejo BLR, ya que la sobre expresión de *blr-1* inhibe la producción de micelio, se sabe que *blr-1* tiene una expresión mayor en relación a *blr-2* en *Trichoderma atroviride*, el gen *blr-2* también es un factor limitante en generación de micelio (Esquivel., 2007).

El gen *blr-2* es regulado por la luz a través de las proteínas BLR, aparentemente a nivel postranscripcional. Para investigar si la sobre-expresión de *blr-2* ocasionó una alteración global en el mecanismo de fotoadaptación, se analizó la expresión de los genes regulados por la luz azul (Esquivel., 2007).

La cepa Seblu17-6 y Seblu17-12A, presentaron mayor conidiación en comparación con la Seblu7-10 e IMI presentaron conidiación similar, cuando se limitó el P soluble (ver fig. 16). Mientras tanto en las cepas con expresión en anti-sentido de los genes *blu*, también se analizaron y así se estableció si existió alguna alteración en los mecanismos de conidiación. Las cepas Asblu5-2, Asblu5-5, Asblu22-1, Asblu22-10, y la Asblu7-1, incrementaron su conidiación cuando se limitó el P soluble, siendo más notorio la pigmentación en las cepas Asblu7-1, Asblu5-2 (ver fig. 20 y 22).

Con la sobre-expresión se incrementó la sensibilidad a la luz y al estrés nutricional en las cepas Seblu17-6 y Seblu17-12A, mostrando altos niveles de conidiación. Pero la expresión en anti-sentido de estos mismos genes *blu*, los niveles de conidiación disminuyó un poco (Asblu5-2, Asblu5-5, Asblu22-1, Asblu22-10, y la Asblu7-1). Los genes regulados por la luz, son factores importantes para la formación de anillos de conidiación, ya que con el silenciamiento la conidiación disminuyó ligeramente, caso contrario a la sobre-expresión (Tabla No.4). Los genes regulados por la luz y los genes *blr* son indispensables del sistema de



percepción de estímulos del medio. Diferentes vías de percepción a estrés mantienen estrecha relación con el complejo BLR, manteniendo una comunicación cruzada (Pérez., 2007).

En relación a la biomasa, las cepas sobre-expresantes de los genes regulados por la luz, generaron más biomasa cuando el P soluble se limitó, cepas Seblu17-6 y Seblu17-12A, en comparación con las demás (ver fig. 18). Cuando es de fuente insoluble, la biomasa fue mucho menor, con peso similar entre esta fuente (1.8mM y 36.7mM), independientemente de las condiciones de luz u oscuridad (ver fig. 19). Por otra parte las cepas con expresión con anti-sentido del gen *blu7-1*, *blu5-2* y *blu5-5*, incrementaron su peso cuando se limitó el P soluble independientemente de las condiciones de luz u oscuridad (ver fig. 24). En P insoluble los resultados revelaron pesos similares entre ellos y la cepa IMI en luz y oscuridad, el efecto fue casi nula, la diferencia fue muy poca (ver fig. 25)

Esto nos indicó que no todos los genes inducidos por la luz fueron funcionales para el desarrollo eficiente de micelio, conidiación, entre otros aspectos, ya que al ser sobre-expresados o expresados con anti-sentido (Tabla No.4) pueden disminuir o incrementar la respuesta a los diferentes tipos de estrés nutricional; por otra parte, dependiendo del tipo de estrés, estos genes pueden ser factores limitantes en la formación de biomasa y conidias. Dependiendo del tipo de P presente en el medio, los cambios que indujeron en *T. atroviride* fueron diferentes, no tiene el mismo impacto en la cepa.

Un efecto interesante se observó, que las cepas cultivadas (Tabla No.1) en medios con fuentes de P insoluble (CaHPO_4) provocó la inducción de cierta pigmentación amarilla en los anillos de conidiación, siendo más intensos en concentraciones normales de P, en tanto, cuando se limitó la fuente de P, la pigmentación fue menor, pero con anillos evidentes y espacio entre cada anillo fueron muy marcados, en presencia de luz solamente. En condiciones de oscuridad no existió efecto alguno, únicamente crecimiento micelial. Este efecto tal vez se debió por el Ca^{++} presente en el medio, que al no ser asimilable posiblemente, existió una acumulación intracelular, manifestándose en el cambio de pigmentación de la cepa. Cabe hacer mención que tanto la cepa IMI, como las mutantes BLR produjeron conidias de menor tamaño en oscuridad, sin la formación de anillos y pigmentación, a las observadas en las cepas crecidas en presencia de luz en la concentración limitada de P.



Mediante la utilización de dos fuentes de P (Tabla No.3), como estrés nutricional, se observó que *Trichoderma* presentó diferentes vías alternas de respuesta y adaptación al medio, presentando un sistema complejo de señalización reflejados mediante cambios en su desarrollo, como la formación de anillos de conidiación, que de una u otra forma es una evidencia del comportamiento de este microorganismo ante ciertas condiciones desfavorables para su desarrollo. Que dependiendo del tipo de sustrato del medio *T. atroviride* tuvo la capacidad de adecuarse a ello, mediante la expresión de proteínas que le permitieron recibir y transmitir esa señal del medio circundante.





8.- CONCLUSIONES

- * La limitación de la fuente de P soluble indujo mayor conidiación y crecimiento para *T. atroviride* IMI.
- * La limitación de P soluble indujo en las cepas Δ BLR-1 y Δ BLR-2 un discreto anillo de conidiación en presencia de luz, mientras que la fuente de P insoluble no indujo la conidiación.
- * La sobre-expresión de *blr-2* aumentó la conidiación cuando se limitó el P soluble, en tanto la sobre-expresión de *blr-1* disminuyó la conidiación. En la limitación de P insoluble disminuyó la conidiación en ambas cepas, pero siguió siendo mayor la conidiación de la sobre-expresante de *blr-2*.
- * En los genes *blu17* sobre-expresantes aumentaron la conidiación por limitación de P soluble y la expresión en anti-sentido de genes *blu5*, *blu22*, *blu15*, *blu7* reprimió la conidiación ligeramente.
- * El P insoluble indujo la formación de anillos de conidiación con pigmentación amarilla y una sincronización en tiempo y espacio en la cepa IMI, y mutantes afectadas en la percepción de luz, excepto en la cepas Δ BLR-1 y Δ BLR-2.





9.- BIBLIOGRAFÍA

- * **Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. and Macino G.** (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.* 15: 1650-1657.
- * **Berrocal-Tito, G. M., Esquivel-Naranjo, E. U., Horwitz, B. A. and Herrera Estrella, A.** (2007). *Trichoderma atroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. *Eukaryot. Cell* 6:1682-1692.
- * **Berrocal-Tito, G., Rosales Saavedra, M. T., Herrera-Estrella, A. and Horwitz, B. A.** (2000). Characterization of blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr-1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochem. Photobiol.* 71: 662-668.
- * **Betina, V.** (1984) Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Int J Microbiol* 2, 55-68.
- * **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, H.M., Rosales-Saavedra, T., Martínez-Hernández, P., Olmedo-Monfil, V. and Herrera-Estrella, A.** (2006). Cross Talk between a Fungal Blue-Light Perception System and the Cyclic AMP Signaling Pathway. *Eukaryot. Cell* 5: 499-506.
- * **Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce Noyola, P. and Herrera-Estrella, A.** (2004). BLR-1 and BLR-2 are key regulatory elements for photoconidiation and mycelial growth in *T. atroviride*. *Microbiology* 150: 3561-3569.
- * **Cashmore, A., Jarillo, J., Wu, Y., and Liu, D.** (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760-765.
- * **Cheng, M., Chory, J. and Fankhauser, C.** (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* 38:87-117.
- * **Cheng, P., He, Q., Yang, Y., Wang, L., and 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.
- * **Domsch, K. Gams, W. Anderson, O.** 1993. Compendium of Soil Fungi: *Trichoderma*. Germany, IHW-Verlag.794 – 809. Vol II.
- * **Esquivel Naranjo E. U.** (2007). Análisis molecular de la percepción de luz en *Trichoderma atroviride*. Tesis de Doctor en ciencias, especialidad de Biotecnología de plantas. CINVESTAV Irapuato.
- * **Froehlich A. C., Noh B., Vierstra R. D., Loros J.J. y Dunlap J. C.** (2005). Genetic and Molecular Analysis de Phytochromes from the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Eukariotic Cell*, 4:2140-2152.
- * **Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J. and Dunlap J. C.** (2002). White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the *frequency* promoter. *Science* 297: 815-819.
- * **Gresik, M., Kolarova, N. and Farkas, V.** (1988). Membrane potential, ATP, and cyclic AMP changes induced by light in *Trichoderma viride*. *Exp. Mycol.* 12:295-301.
- * **H. J. Vogel.** *Microbial Genetics Bulletin* 13:42-43, 1956
- * **Herrera-Estrella, A. and Horwitz, B.** (2007). Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol. Microbiol.* 64:5-15.
- * **Hidalgo A.** 1989. Comparación de dos métodos para la selección de aislamientos de *Trichoderma* para el combate biológico de *Fusarium* y *Rhizoctonia* en clavel. Tesis para optar por el grado de Licenciado en Agronomía. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 89 p.
- * **Horwitz, B. A., Gressel, J., and Malkin, S.** (1985). Photoperception mutants in *Trichoderma*: mutants that sporulate in response to stress but not light. *Curr. Genet.* 9: 605-613.
- * **Horwitz, B. A., Malkin, S. and Gressel, J.** (1984). Roseoflavin inhibition of photoconidiation in a *Trichoderma* riboflavin auxotroph: indirect evidence for flavin requirement for photoreactions. *J. Photochem. Photobiol.* 40:763-769.
- * **Idnurm, A., Rodríguez Romero, J., Corrochano, L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P. and Heitman, J.** (2006). The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-



- light photoreceptor for phototropism and other light responses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4546-4551.
- * **Ko, W. H., Nash, A. I. and Gardner, K. H.** (2007). A LOVely view of blue light photosensing. Nat. Chem. Biol. **3**:372-374.
 - * **Kolarova, N., Haplová, J. and Gresik, M.** (1992) Light activated adenylyl cyclase from *Trichoderma viride*. FEMS Microbiol. Lett. **72**:275-278.
 - * **Linden, H. and Macino, G.** (1997) White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. EMBO J. **16**: 98-109.
 - * **Linden, H., Ballario, P., and Macino, G.** (1997). Blue Light Regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **22**: 141-150.
 - * **López Márquez R. L., Pérez Castiñeira J. M., Losada M. y Serrano A.** (2001). Expression studies on proton translocating pyrophosphatases of photosynthetic bacteria and algae. Universidad de Sevilla CSIC, ISBN 84-699-4960-8.
 - * **Ma, L., Li, L., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H. and Deng, X. W.** (2001). Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. Plant Cell **13**:2589-2607.
 - * **Pérez Aguilar S.** (2007). Determinación de la función del Dominio LOV de la proteína BLR-1 de *Trichoderma atroviride*. Tesis de Maestra en ciencias, especialidad de Biología Molecular. IPICYT.
 - * **Persson, B. L., J. Petersson, U. Fristedt, R. Weinander, A. Berhe.,** 1999. Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. Biochim. Biophys. Acta **1422**: 255– 272.
 - * **Ríos-Momberg H. M.** (2004). Papel de una proteína homóloga a WC-1 de *Neurospora crassa* en las respuestas a luz de *Trichoderma atroviride*. Tesis de Doctor en ciencias, especialidad de Biotecnología de plantas. CINVESTAV Irapuato.
 - * **Rosales-Saavedra, T., Esquivel Naranjo E. U., Casas Flores, S., Martínez Hernández P., Ibarra Laclette E., Cortes-Penagos C. and Herrera Estrella A.** (2006). Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. Microbiology **152**:3305-3317.



- * **Schmoll, M., Franchi, L., and Kubicek, C.P.** (2005). Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. *Eukaryot. Cell* 4: 1998-2007.
- * **Silva, F., Torres-Martínez, S. and Garre, V.** (2006). Distinct *white collar-1* genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.* **61**: 1023-1037.
- * **Van Aalten, D., Crielaard, W., Hellingwerf, K., and Joshua-Tor, L.** (2000). Conformational substates in different crystal forms of the photoactive yellow protein correlation with theoretical and experimental flexibility. *Protein Sci* 9: 64-72.
- * http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/03%20Yeast%20Metabolism.pdf
- * http://perso.wanadoo.es/frs88/tpn/desc/espectro_archivos/image005.jpg

