



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACION Y TIPO DE FUENTE DE NITROGENO SOBRE LA CONIDIACION Y CRECIMIENTO DE *Trichoderma atroviride* IMI, BLR1-BLR2 Y MUTANTES BLU”

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p.Q.F.B. FRANCISCO JAVIER ARELLANO DURÁN

ASESOR:

D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

JULIO 2008

~~~~~

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A los que con su amor, consejos, pero sobre todo su apoyo me han impulsado a ser una persona mejor, a mis queridos padres: **Elena Durán Meza y Donato Arellano Gómez.**

A todos mis queridos **Hermanos: Martha, Adriana, Soledad, Trinidad, Juana, Silvia, Moisés, Jesús, Armando, José y Gerardo** que estuvieron ahí cuando los necesitaba y pusieron su granito de arena en el transcurso de mi formación.

A **Nydia** por su apoyo y comprensión en las buenas y en las malas en los momentos de desesperación y tristeza.

A todos mis amigos que siempre han estado ahí apoyándome y brindándome su amistad en todo momento: **David, Navor, Macario, Luis, kenia Agustín, mi primo Henrique, Fabiola, Edith, y a todos mis amigos (as)** los cuales no terminaría de mencionar **mil gracias.**

A **Dalia** por ser una gran amiga e instructora por ensayarme y aguantarme en el desarrollo de esta tesis **gracias.**

Y a todos mis compañeros del laboratorio por su ayuda y comprensión.

A mi asesor **Dr. Carlos Cortez Penagos** por haberme permitido formar parte de este grupo de investigación, por compartir sus conocimientos que han sido de importancia para mi formación científica pero sobre todo por su confianza y amistad brindada. **Gracias**

A mi comité de sinodales: Q.F.B. Ricardo Vega Tavera, Q.F.B. Rosenda Aguilar Aguilar, Q.F.B. Rosa María García Martínez, por sus atinadas sugerencias para la exitosa realización de este trabajo. **Gracias**

“Piensa, cree, sueña y atrévete”. WALT DISNEY

“Pregúntate si lo que estás haciendo hoy te acerca al lugar en el que quieres estar mañana”  
J.BROWN,E.U.

“Siempre habrá gente que te lastime, así que lo que tienes que hacer, es seguir confiando, y sólo ser más cuidadoso en quien confías por segunda vez”. G.G.MÁRQUEZ

## CONTENIDO

|                                           | Página     |
|-------------------------------------------|------------|
| <b>Dedicatoria y Agradecimientos.....</b> | <b>i</b>   |
| <b>Contenido.....</b>                     | <b>i</b>   |
| <b>Índice de Figuras.....</b>             | <b>iv</b>  |
| <b>Índice de Tablas.....</b>              | <b>vi</b>  |
| <b>Lista de Abreviaturas.....</b>         | <b>vii</b> |

## INDICE GENERAL

|                                                                                                                                               | Página   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Resumen.....</b>                                                                                                                           | <b>1</b> |
| <b>I. Introducción.....</b>                                                                                                                   | <b>3</b> |
| I.1. La luz y el efecto sobre los seres vivos.....                                                                                            | 3        |
| I.2. Percepción de la luz en plantas.....                                                                                                     | 5        |
| I.3. Mecanismos de reproducción en hongos.....                                                                                                | 6        |
| I.4. Percepción de la luz en hongos.....                                                                                                      | 6        |
| I.4.1 Percepción de la luz en <i>Neurospora crassa</i> .....                                                                                  | 7        |
| I.4. <i>Trichoderma</i> .....                                                                                                                 | 8        |
| I.4.1. <i>Trichoderma</i> como modelo fotomorfogénico.....                                                                                    | 8        |
| I.4.2. Genes regulados por la luz azul en la fotoconidiacion<br>de <i>T. atroviride</i> .....                                                 | 10       |
| I.4.3. Modelo propuesto de la respuesta a la luz y de la<br>esporulación por limitación de nutrientes de <i>T.</i><br><i>atroviride</i> ..... | 11       |
| I.4.4. Nitrógeno.....                                                                                                                         | 12       |
| I.4.4.1 Asimilacion del amonio y<br>Nitrato.....                                                                                              | 12       |

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.   | <b>Justificación</b>                                                                                                                                                                                                                                                                      | 15 |
| III.  | <b>Hipótesis</b>                                                                                                                                                                                                                                                                          | 16 |
| IV.   | <b>Objetivos</b>                                                                                                                                                                                                                                                                          | 17 |
|       | VI.1. Objetivo general                                                                                                                                                                                                                                                                    | 17 |
|       | VI.2. Objetivos específicos                                                                                                                                                                                                                                                               | 17 |
| V.    | <b>Materiales y Métodos</b>                                                                                                                                                                                                                                                               | 18 |
|       | V.1. Microorganismos                                                                                                                                                                                                                                                                      | 18 |
|       | V.2. Medios de cultivo                                                                                                                                                                                                                                                                    | 18 |
|       | V.3. Cinética de crecimiento radial colonial                                                                                                                                                                                                                                              | 19 |
|       | V.4. Determinación de biomasa por peso seco                                                                                                                                                                                                                                               | 19 |
|       | V.5. Determinación de la cantidad de conidias                                                                                                                                                                                                                                             | 20 |
|       | V.6. Equipo                                                                                                                                                                                                                                                                               | 20 |
|       | V.7. Estadística o manejo de datos                                                                                                                                                                                                                                                        | 21 |
| VI.   | <b>Resultados y Discusión</b>                                                                                                                                                                                                                                                             | 22 |
|       | VIII.1 Evaluación del efecto de la limitación en la fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ) sobre la velocidad de crecimiento colonial, la producción de biomasa y conidias en <i>Trichoderma atroviride</i> IMI, BLR1 y BLR2                                             | 22 |
|       | VIII.2. Evaluación del efecto de la limitación en la fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ) sobre la velocidad de crecimiento colonial, la producción de biomasa y conidias en <i>Trichoderma atroviride</i> IMI, y mutantes en genes asociados a la respuesta a la luz. | 30 |
|       | VII.2.1. Mutantes SEBLR                                                                                                                                                                                                                                                                   | 30 |
|       | VII.2.2. Mutantes ASBLU                                                                                                                                                                                                                                                                   | 31 |
|       | VII.2.3. Mutantes SEBLU                                                                                                                                                                                                                                                                   | 33 |
| VII.  | <b>Conclusiones</b>                                                                                                                                                                                                                                                                       | 51 |
| VIII. | <b>Bibliografía</b>                                                                                                                                                                                                                                                                       | 52 |

## INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Pagina |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Diagrama que representa la forma en que se relacionan los seres vivos entre sí formando ecosistemas.....                                                                                                                                                                                                               | 3      |
| 2. Espectro de luz visible.....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 4      |
| 3. Cambios morfológicos observados durante la fotoconidiación de <i>Trichoderma</i> .....                                                                                                                                                                                                                                 | 8      |
| 4. Modelo propuesto de respuesta a la luz y esporulación por limitación de nutrientes en <i>T. atroviride</i> .....                                                                                                                                                                                                       | 11     |
| 5. Trayectoria asimilativo del Nitrógeno (amonio).....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 12     |
| 6. Trayectoria asimilativa del Nitrogeno (nitrato).....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 13     |
| 7. Imágenes de la producción de conidias (esp/ml) de <i>T. atroviride</i> <i>IMI</i> , <i>BLR1</i> y <i>BLR2</i> bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ).....                                                                                           | 24     |
| 8. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de <i>T. atroviride</i> <i>IMI</i> , <i>BLR1</i> y <i>BLR2</i> bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ).....                                                                                        | 24     |
| 9. Determinación de la velocidad de extensión radial (mm/h) de <i>T. atroviride</i> <i>IMI</i> , <i>BLR1</i> y <i>BLR2</i> bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ).....                                                                                 | 25     |
| 10. Determinación de la biomasa (mg) <i>T. atroviride</i> <i>IMI</i> , <i>BLR1</i> y <i>BLR2</i> bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ).....                                                                                                           | 26     |
| 11. Imágenes de la producción de conidias (esp/ml) de <i>T. atroviride</i> <i>IMI</i> , <i>SEBLR 1-8</i> , <i>SEBLR 2-13</i> , <i>ASBLU 5-2</i> y <i>ASBLU 5-5</i> bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ).....                                         | 35     |
| 12. Imágenes de la producción de conidias (esp/ml) de <i>T. atroviride</i> <i>IMI</i> , <i>ASBLU 15-8</i> , <i>ASBLU 22-1</i> , <i>ASBLU 22-10</i> , <i>ASBLU 7-1</i> <i>ASBLU 7-7</i> y <i>SEBLU 7-10</i> bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ )..... | 36     |
| 13. Imágenes de la producción de conidias (esp/ml) de <i>T. atroviride</i> <i>IMI</i> , <i>SEBLU 17-6</i> y <i>SEBLU 17-12A</i> bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ).....                                                                            | 37     |
| 14. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de <i>T. atroviride</i> <i>IMI</i> , <i>SEBLR 1-8</i> y <i>SEBLR 2-13</i> bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ).....                                                                            | 38     |
| 15. Determinación de la biomasa (mg) <i>T. atroviride</i> <i>IMI</i> , <i>SEBLR 1-8</i> y <i>SEBLR 2-13</i> bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ).....                                                                                                | 39     |

|                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 16. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de <i>T. atroviride</i> IMI, ASBLU 5-2, ASBLU 5-5 y ASBLU 15-8 bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N (NH <sub>4</sub> Cl y KNO <sub>3</sub> )..... | 40 |
| 17. Determinación de la biomasa (mg) <i>T. atroviride</i> IMI, ASBLU 5-2, ASBLU 5-5 y ASBLU 15-8 bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N (NH <sub>4</sub> Cl y KNO <sub>3</sub> ).....                     | 41 |
| 18. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de <i>T. atroviride</i> IMI, ASBLU 22-1 y ASBLU 22-10 bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N (NH <sub>4</sub> Cl y KNO <sub>3</sub> ).....          | 42 |
| 19. Determinación de la biomasa (mg) <i>T. atroviride</i> IMI, ASBLU 22-1 y ASBLU 22-10 bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N (NH <sub>4</sub> Cl y KNO <sub>3</sub> ).....                              | 43 |
| 20. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de <i>T. atroviride</i> IMI, ASBLU 7-1 y ASBLU 7-7 bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N (NH <sub>4</sub> Cl y KNO <sub>3</sub> ).....             | 44 |
| 21. Determinación de la biomasa (mg) <i>T. atroviride</i> IMI, ASBLU 7-1 y ASBLU 7-7 bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N (NH <sub>4</sub> Cl y KNO <sub>3</sub> ).....                                 | 45 |
| 22. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de <i>T. atroviride</i> IMI, SEBLU 17-6 y SEBLU 17-12A bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N (NH <sub>4</sub> Cl y KNO <sub>3</sub> ).....         | 46 |
| 23. Determinación de la biomasa (mg) <i>T. atroviride</i> IMI, SEBLU 17-6, SEBLU 17-12A y SEBLU 7-10 bajo condiciones de luz oscuridad utilizando como fuente de N (NH <sub>4</sub> Cl y KNO <sub>3</sub> ).....                 | 47 |

## INDICE DE TABLAS

|                                                                  | Pagina |
|------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Genes regulados por la luz azul.....                          | 10     |
| 2. Cepas utilizadas provistas por el CINVESTAV-IPN Irapuato..... | 18     |
| 3. Preparación de medios.....                                    | 19     |

## ABREVIATURAS

|                           |                                        |
|---------------------------|----------------------------------------|
| A/UV                      | Luz ultravioleta                       |
| cDNA                      | DNA complementario                     |
| cm                        | centímetro                             |
| mm                        | milímetros                             |
| mg                        | miligramos                             |
| vel                       | velocidad                              |
| cry                       | criptocromo                            |
| phot                      | fototropinas                           |
| phy                       | fitocromos                             |
| <i>blr1</i> y <i>blr2</i> | blue light regulator                   |
| <i>wc</i>                 | white collar                           |
| SEBLR                     | Sobreexpresión de los genes <i>blr</i> |
| SEBLU                     | Sobreexpresión de los genes <i>blu</i> |
| ASBLU                     | Antisentido de los genes <i>blu</i>    |
| DNA                       | ácido desoxirribonucleico              |
| FAD                       | flavin adenin dinucleótido             |
| FMN                       | flavin mononucleótido                  |
| esp                       | esporas                                |
| h                         | hora                                   |
| LOV                       | luz, oxígeno, voltaje                  |
| min                       | minuto                                 |
| mM                        | milimolar                              |
| PAS                       | Per, Arnt, Sim                         |
| PDA                       | Papa, Dextrosa, Agar                   |
| RNA                       | ácido ribonucleico                     |

|                    |                                |
|--------------------|--------------------------------|
| mRNA               | ácido ribonucleico mensajero   |
| wt                 | cepa silvestre                 |
| IPN                | Instituto Politécnico Nacional |
| ml                 | mililitros                     |
| g                  | gramos                         |
| $^{\circ}\text{C}$ | grados centígrados             |
| N                  | Nitrógeno                      |
| M                  | molar                          |
| F.D.               | Factor de dilución             |
| $N_0$              | numero                         |

## RESUMEN

Las especies de *Trichoderma* se encuentran de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios como en desechos vegetales en descomposición así como en la madera, la esporulación asexual ocurre de manera unicelular, a través de la formación de conidias típicas de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro con una coloración verde. Estas conidias se generan en grandes cantidades a partir de la formación de conidióforos hialinos de forma larga, no verticilados. 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, donde los nutrientes se han agotado. Cuando la conidiación es inducida por luz, un pulso luminoso es suficiente para inducir la conidiación en una colonia que crece en obscuridad. La esporulación en hongos puede ser estimulada por otros factores, especialmente por aquellos que involucran algún tipo de estrés. En el caso de *Trichoderma*, éste esporula 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 esporulación. Se ha observado que la limitación de carbono en el medio de cultivo provoca la esporulación de *Trichoderma* y otros hongos. En este trabajo se reporta el efecto de la limitación de diferentes fuentes de Nitrógeno sobre la conidiación y crecimiento de *Trichoderma atroviride* IMI y las mutantes *BLR1-BLR2* (originadas por una interrupción en los genes *blr1* y *blr2*), cuyos productos son responsables de la regulación de la respuesta a la luz, así como las mutantes *SEBLRs* (resultado de una sobreexpresión de los genes *blr1* y *blr2*), *ASBLUs* (obtenidas del cambio de sentido de la cadena de DNA de algunos genes *blu* llamadas antisentido) y *SEBLUs* (resultado de la sobreexpresión de los genes *blu*). La limitación de la fuente de N como  $\text{NH}_4^{+1}$  promovió un aumento en la producción de conidias en las mutantes *BLR* en presencia de luz, sobresaliendo la *BLR2* en la velocidad de crecimiento sin importar la concentración de amonio utilizada. La utilización de  $\text{NO}_3^{-1}$  es similar al del amonio entre la cepa parental y las *BLR*, teniendo el nitrato un efecto notorio sobre el crecimiento y conidiación en la condición limitante. Mientras que las mutantes *SEBLR 1-8* y *SEBLR 2-13* no mostraron respuesta alguna en la limitación de amonio. Las

mutantes *ASBLU* y *SEBLU* tuvieron valores de producción de conidias inferiores al de la cepa parental en amonio, mientras que en nitrato algunas cepas mostraron una mayor producción como en el caso de la *ASBLU* 5-2 y *ASBLU* 7-1.

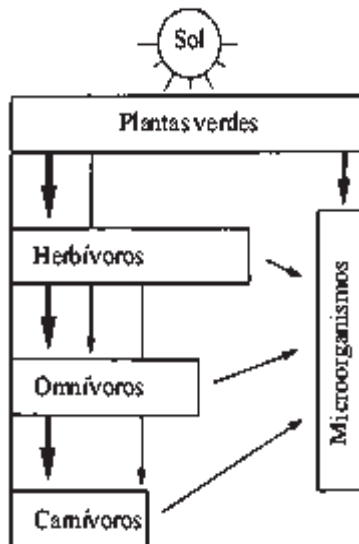
## I

### INTRODUCCION

#### 1. La luz y el efecto sobre los seres vivos

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. La luz solar es especialmente importante para plantas y muchos otros organismos tanto unicelulares como pluricelulares, ya que dependen de este estímulo energético para su crecimiento y desarrollo.

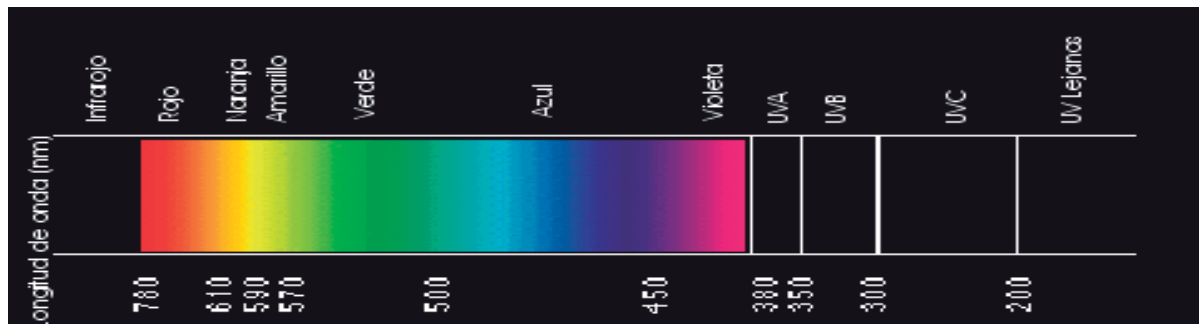
En la figura 1 se representa la forma en que los seres vivos están relacionados entre sí formando ecosistemas. Las plantas constituyen el punto de partida por su estrecha relación con el ambiente inorgánico, ellas captan la energía solar y absorben los recursos inorgánicos; después de procesarlos son transferidos a los demás seres vivos que no efectúan la función básica de la fotosíntesis.



**Figura 1.** Diagrama que representa la forma en que se relacionan los seres vivos entre sí formando ecosistemas. (<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx>)

El efecto de la luz sobre los seres vivos ha sido extensamente investigado desde los organismos procariontes hasta los eucariotas superiores. Algunas respuestas fisiológicas estudiadas son los tropismos positivo o negativo, crecimiento, desarrollo, reproducción, pigmentación, metabolismo y los ritmos circadianos (Linden y col., 1997; Iseki y col., 2002; Jiao y col., 2007).

La luz visible para el ojo humano comprende longitudes de onda que van desde 780 (rojo lejano) a 380 nm (violeta) (figura 2). Es en este intervalo que los organismos fotosintéticos, como las plantas, obtienen energía química mediante la transformación de energía luminosa a carbohidratos.



**Figura 2.** Espectro de luz visible.

La mayoría de las respuestas a la luz solar, en base a sus espectros de acción, son atribuidas a las regiones del rojo/rojo lejano, del azul/ UV-A o del UV-B (Briggs y Huala, 1999). Hoy en día se sabe que en eucariontes existen diferentes tipos de fotoreceptores, los cuales son capaces de percibir la luz roja/rojo lejano y azul (Cashmore y col., 1999).

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 (fotoreceptores) 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. La energía absorbida causa un cambio conformacional en el cromóforo que lo transmite a la proteína causándole cambios estructurales que la convierten a un estado activo (Cheng y col., 2004; Ko y col., 2007). En el

estado activo, el fotoreceptor es capaz de transmitir la señal regulando efectores que desencadenan una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos o directamente regulan la expresión de genes necesarios para respuestas fisiológicas específicas en la célula (Froehlich y col., 2002; Chen y col., 2004; Ko y col., 2007). Los fotoreceptores estudiados poseen un dominio de unión al cromóforo y un dominio efector que puede participar en interacciones con proteínas necesarias para la transducción de la señal o pueden incluir una actividad enzimática como la de cinasa presente en los fitocromos y las fototropinas (Chen y col., 2004; Ko y col., 2007).

Se ha postulado mediante estudios estructurales, que en la oscuridad los fotoreceptores tienen una conformación “cerrada”, donde el dominio foto-sensorial interacciona con el dominio efector bloqueando su actividad (Chen y col., 2004; Ko y col., 2007). Durante la foto-activación, los fotoreceptores experimentan notables re-arreglos en su estructura conformacional donde el dominio de unión al cromóforo libera al dominio efector para activar respuestas fisiológicas en las células (Chen y col., 2004; Ko y col., 2007).

## 2. Percepción de la luz en plantas

El sistema fotosensorial que las plantas utilizan para monitorear el ambiente luminoso incluye tres familias de fotoreceptores: los criptocromos (cry), las fototropinas (phot) y los fitocromos (phy) (Kendrick y Kronenberg, 1994; Cashmore y col., 1999; Brigs y Olney, 2001; Smith, 2000). La acción combinada de estas moléculas capacita a la planta para detectar y responder a la presencia, ausencia, color, intensidad, direccionalidad y duración diurna de las señales luminosas. Las tres clases de fotoreceptores realizan distintas funciones fotosensoras y/o fisiológicas en las plantas (Briggs y Huala, 1999; Cashmore *et al.*, 1999; Smith, 2000). Los criptocromos son flavoproteínas que contienen dos cromóforos, una pterina o una deazoflavina en un sitio y FAD en el dominio amino terminal, el cual posee similitud con DNA fotoliasas. Las fototropinas también son flavoproteínas que contienen dos cromóforos de FMN, los cuales se encuentran asociados con dos dominios Per-Arnt-Sim (PAS). Los fitocromos son cromoproteínas diméricas que consisten de una subunidad polipeptídica que lleva un cromóforo de tetrapirrol en el dominio amino terminal, mientras

que el dominio carboxilo terminal funciona en la dimerización y contiene una región con secuencias similares a cinasas de histidinas del sistema procariótico de dos componentes.

Los criptocromos y las fototropinas detectan el rango de luz azul al A/UV-A del espectro, mientras que los fitocromos detectan las longitudes de onda roja primaria (R) y roja lejana (FR). Los criptocromos y fitocromos controlan el crecimiento y el desarrollo, dependiendo de las variaciones en la longitud de onda, la intensidad y la duración diurna de la radiación (Cashmore y col., 1999; Smith, 2000), mientras que las fototropinas funcionan principalmente controlando la direccionalidad del crecimiento (fototropismo) en respuesta a la ubicación de la fuente luminosa y/o al movimiento intracelular del cloroplasto en respuesta a la intensidad luminosa (Briggs y Huala, 1999; Kagawa y col., 2001; Sakai y col., 2001; Jarillo y col., 2001). Cada una de estas clases de fotoreceptores consiste de una familia pequeña de cromoproteínas relacionadas. En *Arabidopsis*, la planta más estudiada, se han descrito dos criptocromos (cry1 y cry2) (Cashmore y col., 1999), dos fototropinas (phot1 y phot2) (Briggs col., 2002) y cinco fitocromos (phyA a la phyE) (Mathews y Shamock, 1997).

### **3. Mecanismos de reproducción en hongos.**

La reproducción es la formación de nuevos individuos que tienen todas las características de la especie, hay dos tipos de reproducción: la sexual y la asexual. La reproducción sexual se puede llevar a cabo por diversos mecanismos tales como: copulación planogamética, contacto gametangial, copulación gametangial, espermatización y la somatogamia. Mientras que en la asexual los más comunes son la fragmentación del talo, la fusión (división de células somáticas en 2 células hijas), gemación de células somáticas, por mitosporas (producción de esporas mitóticas donde cada una forma un tubo germinativo que se elongan para generar una hifa y posteriormente un micelio. Existen 2 tipos de mitosporas las esporangiosporas y las conidiosporas).

### **4. Percepción de luz en hongos**

Las respuestas a luz en hongos incluyen diversos procesos como cambios en el metabolismo, síntesis de pigmentos, tropismo, morfogénesis y diferenciación. El hongo cuyas respuestas se han estudiado en mayor detalle es: *N. crassa*, donde los mecanismos genéticos y

moleculares son mejor conocidos, por otra parte en los estudios realizados a *Trichoderma sp.*, se han generado muchos datos fotobiológicos mientras que los estudios genéticos son más incipientes (Casas-Flores y col, 2004).

#### 4.1. Percepción de la luz en *Neurospora crassa*

El hongo del pan *Neurospora crassa* fue uno de los primeros modelos de estudios genético desde mediados del siglo XX, actualmente se clasifica de la siguiente manera; Filo: Ascomicota, Clase: Ascomicetes, Orden: Sordariales, Familia: Sordariaceae, Genero: *Neurospora*, Especie: *crassa* ([http://en.wikipedia.org/wiki/Neurospora\\_crassa](http://en.wikipedia.org/wiki/Neurospora_crassa)).

Se sabe que una gran variedad de respuestas biológicas son inducidas por la luz azul sobre *N. crassa*, tales como el fototropismo, la hiperpolarización de la membrana, la síntesis de carotenoides, la regulación del ciclo circadiano y la conidiación circadiana entre otros (Sommer y col., 1989). Las respuestas a luz azul en *N. crassa* es resultado de la inducción de genes y síntesis de proteínas que participan en diferentes procesos fisiológicos. El gen *frq* junto con el gen *al-3* son de los genes inducidos por luz que han sido más estudiados. De acuerdo a las cinéticas de inducción de la expresión genética por luz podemos encontrar dos tipos de genes: 1) de respuesta temprana y 2) de respuesta tardía (Linden *et al.*, 1997b; Lewis y col., 2002). En *Neurospora crassa*, una proteína con dominios PAS y LOV (White collar-1) fue propuesta como el regulador central de las respuestas a luz azul (Ballario, y col., 1996). Recientemente, se comprobó que esta proteína es un regulador transcripcional activo que a la vez actúa como fotoreceptor usando flavina como cromóforo (Ballario, y col., 1996; He y col., 2002). El único otro elemento que participa en la percepción de luz azul en *Neurospora* es la proteína WC2 (Linden y Macino, 1997), la contraparte de WC1 para formar un factor transcripcional funcional. Las mutantes en estos genes son ciegas y están alteradas en el re-establecimiento por luz de los ritmos circadianos pero no muestran ningún otro fenotipo (Levina y col., 2002).

### 5. *Trichoderma*

En la actualidad según los estudios realizados, las especie de *Trichoderma* se ha clasificado de la siguiente manera en su forma imperfecta pertenece a la Division: *Mycota*, Sub-división: *Eumycota*, Clase: *Deuteromycetes*, Orden: *Moniliales*, Familia: *Moniliaceae* y Genero: *Trichoderma*; Pero en su fase perfecta (estado anamorfo) está ubicada en la Clase: *Ascomycetes*, Serie: *Pyrenomycetes*, Orden: *Hipocreales*, Género: *Hypocrea* (Lewis y Papavizas, 1994).

### **5.1 *Trichoderma* sp como modelo fotomorfogénico**

Aquellos cambios morfológicos sufridos por un organismo después de ser expuesto a la luz es a lo que llamamos fotomorfogénesis. En *Trichoderma* la conidiación es un evento morfogenético que puede ser inducido 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. Cuando la conidiación es inducida por luz, un pulso luminoso es suficiente para inducir la conidiación en una colonia que crece en obscuridad y a las 24 h aproximadamente se forma un anillo de conidias localizado en lo que era la periferia de la colonia al momento de la iluminación (Betina, 1984). Hay otros factores que podrían estimular la esporulación en el caso de *Trichoderma* cuando el crecimiento ha cubierto totalmente la caja petri, lo cual se le atribuiría a una posible limitación de nutrientes.

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 8 y las 9 h las hifas aéreas se ramifican. La formación de las fialides inicia a las 12 h, a las 16 h se inicia la formación de las conidias y finalmente a las 24 h se pueden observar conidias maduras (Betina, 1984). Es necesario que transcurran 24 h para que la colonia pueda ser fotocompetente nuevamente.



**Figura 3.** Cambios morfológicos observados durante la fotoconidiación de *Trichoderma*. (Tomado de Betina 1984).

*Trichoderma atroviride* responde a la luz de manera sincronizada mediante la formación de un anillo de conidiación en el perímetro de la colonia al momento de su exposición a este estímulo. Esta respuesta es regulada por los genes, *blr1* y *blr2* (blue light regulator), homólogos a los genes white collar (*wc1* y *wc2*) que regulan todas las respuestas activadas por luz azul en *Neurospora crassa*. Se han identificado una serie de genes de respuesta rápida y transitoria a luz, entre los que existen genes de expresión dependiente e independiente de las proteínas BLR, indicando la existencia de al menos otra vía de percepción de luz azul. Ambas proteínas BLR tiene un motivo de unión a DNA tipo GATA que los identifica como reguladores transcripcionales. Al igual que WC1, BLR1 tiene un dominio LOV (Luz, Oxígeno y Voltaje) que une una molécula de flavina (FAD) y que es esencial para la fotopercepción. Además, están presentes dos dominios PAS en BLR1 y uno en BLR2 que participan en formación y estabilización de complejos entre las proteínas WC de *N. crassa* (Casas-Flores y col, 2004).

Es por eso que se ha investigado la participación de *Blr2* en las respuestas activadas por luz mediante su sobre-expresión. Para esto se han generado transformantes que sobre-expresan *blr2* bajo el control de un promotor constitutivo. Todas las transformantes mostraron altos niveles de expresión de *blr2* y una respuesta exacerbada a la luz azul. El aumento en la producción de conidias coincide con la sobre-expresión de genes de respuesta rápida a la luz azul en estas transformantes, indicando que estos genes son necesarios para la fotoconidiación. Además, la acumulación del RNA mensajero (mRNA) para estos genes es más rápida que la observada en la cepa silvestre, indicando que *Blr2* es un factor limitante en la transducción de la señal luminosa. Mediante PCR en tiempo real se ha corroborado que en la cepa silvestre los niveles de mRNA de *blr1* son aproximadamente de 2.5 veces más altos

que *blr2*. Además, los niveles de mRNA para los genes *blr* se incrementan después de un pulso de luz azul (alrededor del 30%), siendo más pronunciado por la sobre-expresión de *blr2* (hasta un 90%). Cambios similares son observados aún cuando se sobre-expresa . Interessantemente, las sobre-expresantes son 3 veces más fotosensibles a la luz azul que la cepa silvestre. Esto sugiere que *blr2* tiene una función esencial en la percepción de luz (Esquivel-Naranjo y col, 2007).

## 5.2 Genes regulados por la luz azul en la fotoconidiación de *T. atroviride*

Se han identificaron 40 genes que son regulados por la luz de manera dependiente e independiente de las proteínas BLR de *T. atroviride* (Rosales-Saavedra y col., 2006). Las mutantes con interrupción en los genes *blr-1* o *blr-2* pierden la capacidad de fotoconidiar y de regular la expresión de genes de respuesta a la luz azul. Esto sugiere una probable participación de algunos genes de respuesta temprana en la regulación del programa de reproducción asexual que es activado por la luz azul en *T. atroviride*. De estos genes, solo ha sido estudiada a detalle la función del gen *phr-1* (Berrocal-Tito y col., 1999, 2007). En *N. crassa*, un gran número de genes regulados por la luz azul han sido identificados y de estos sólo 2 genes (*grg-1/blu-1* y *al-3/blu-17*) son homólogos a los genes regulados por la luz de *T. atroviride*. Esto abre la posibilidad de explorar la función de nuevos genes en todos los procesos regulados por la luz en *T. atroviride* (Esquivel-Naranjo y col, 2007).

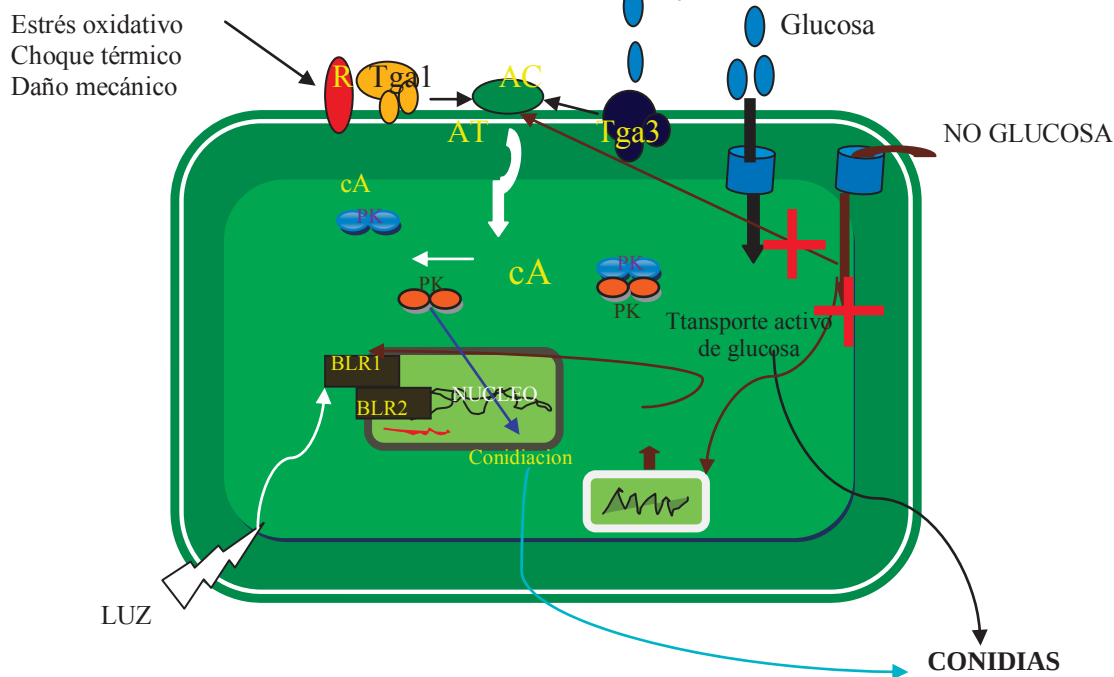
| Gen                | Posible función                                        |
|--------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>blu-4</i>       | Receptor con dominios CFEM                             |
| <i>blu-5/blu-8</i> | Sin homología                                          |
| <i>blu-6</i>       | Proteína de membrana                                   |
| <i>blu-7</i>       | Regulador de la transcripción con un dedo de zinc C2H2 |
| <i>blu-15</i>      | Permeasa de aminoácidos                                |
| <i>blu-16</i>      | Transportador de dotistromina                          |
| <i>blu-17</i>      | Geranilgeranil pirofosfato sintetasa                   |
| <i>blu-19</i>      | Receptor con dominio CFEM                              |
| <i>blu-22</i>      | Metil transferasa                                      |
| <i>bld-2</i>       | Deshidrogenasa con diferentes especificidades          |
| <i>bld-5</i>       | Inositol-1-fosfato dehidrogenasa                       |
| <i>bld-6</i>       | Activador de chaperonas                                |
| <i>bld-8</i>       | Alcohol-isoamílico oxidasa                             |

**Tabla 1.** Genes regulados por luz azul seleccionados para su análisis por medio de su sobre-expresión o silenciamiento en *T. atroviride*. Los genes *blu-5* y *blu-8* se muestran agrupados porque son el mismo gen (Esquivel-Naranjo y col, 2007).

### 5.3 Modelo propuesto de la respuesta a la luz y de la esporulación por limitación de nutrientes en *T. atroviride*.

En la fotoconidiación el complejo BLR-1/BLR-2 serían los implicados en percibir la señal luminosa para posteriormente unirse a los promotores de genes inducidos por luz y con ello llevar a la conidiación. En la esporulación por limitación de nutrientes los dominios LOV y PAS de las proteínas BLR estarían monitoreando los estados REDOX intracelulares y bajo condiciones de limitación de nutrientes se unirían a los promotores de genes de esporulación promoviendo con ello la conidiación como se ve en la figura 4 (Casas-Flores y col, 2004).

Respuesta general de estrés:

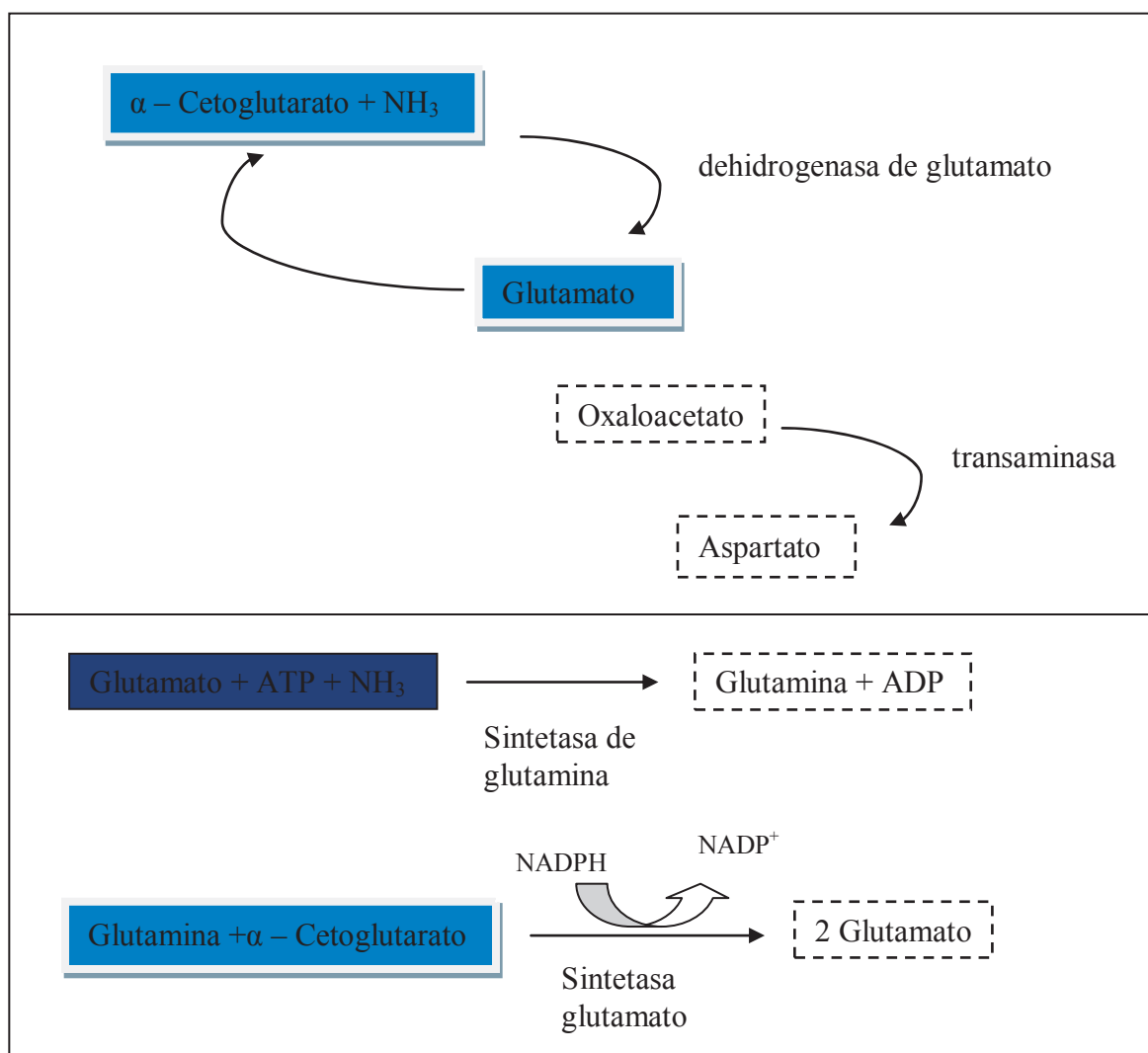


**Figura 4.** Modelo propuesto de respuesta a la luz y esporulación por limitación de nutrientes en *T. atroviride* (Casas-Flores y col, 2004).

#### 4.4. Nitrógeno

El nitrógeno es sin duda un elemento de gran importancia dentro del metabolismo ya que forma parte de las proteínas, los ácidos nucleídos y muchos otros compuestos de importancia biológica. Básicamente el nitrógeno se encuentra distribuido en cantidades enormes en la atmósfera y ya que es un elemento poco reactivo es aprovechado por la mayoría de las formas de vida, existiendo en la naturaleza de varias formas químicas tales como el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), nitrógeno orgánico ( $\text{R-NH}_2$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) entre otros. En el caso de hongos y plantas el nitrógeno debe ser asimilado bajo la forma de nitrato y amonio, siendo este último una fuente primaria ya que no necesita ser reducido en otro compuesto para asimilarlo. El nitrato es considerado una fuente secundaria debido a que necesita ser reducido para poder ser utilizado como nutriente.

##### 4.4.1 Asimilación del Amonio y Nitrato (Trayecto asimilativo del amonio y nitrato)

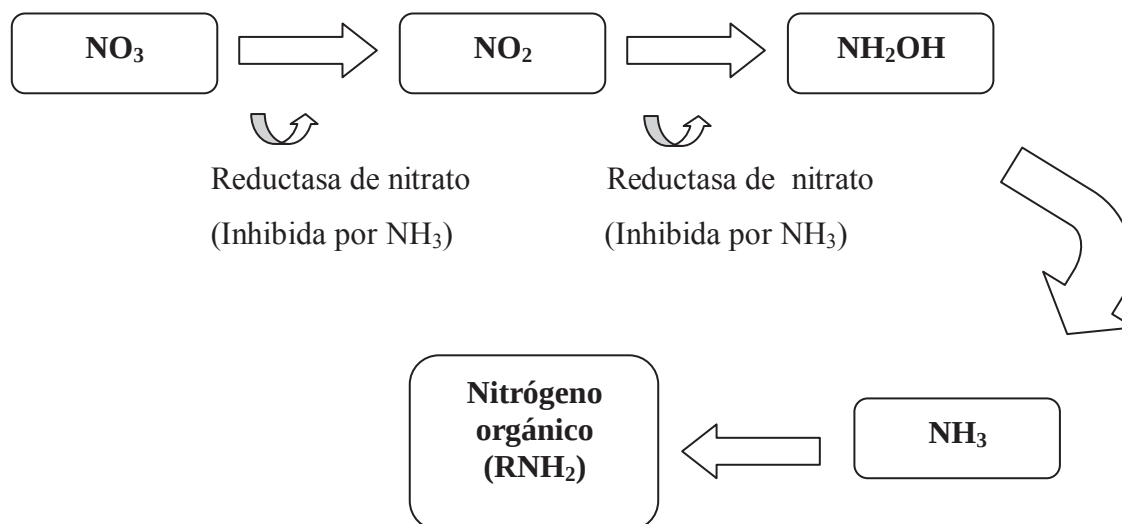


**Figura 5.** Asimilación del amoníaco (<http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p3-nitrogeno.pdf>).

La asimilación del amoníaco al protoplasma celular es mediada por varias enzimas, una de las más utilizada es la dehidrogenasa de ácido glutámico, esta enzima cataliza la incorporación reductiva de amoníaco al ácido acetoglutárico para formar ácido glutámico. El grupo amino que presenta el ácido glutámico puede ser transferido a otras moléculas orgánicas mediante transaminasas. De esta forma se originan otros aminoácidos, purinas y pirimidinas. La asimilación de amoníaco a moléculas orgánicas puede ser mediada por otras dehidrogenasas de aminoácidos y por la sintetasa de glutamina. Esta última cataliza la adición de amoníaco al ácido glutámico para formar glutamina. En una reacción subsiguiente, la

enzima sintetasa de ácido glutámico cataliza el transferimiento del grupo amida de la glutamina al ácido acetoglutárico, formándose dos moléculas de ácido glutámico.

El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) es asimilativo cuando el mismo es reducido para utilizarse como nutriente. Dicho proceso de reducción es conocido como metabolismo asimilativo, el cual es muy diferente al proceso de desnitrificación el cual es un trayecto disimilativo, mientras que el proceso de amonificación es un trayecto asimilativo, teniendo esta última como producto principal al amoníaco, el cual es incorporado posteriormente al material celular mediante las reacciones de asimilación. Las reductasas de nitrato que intervienen en el proceso las cuales son proteínas solubles que no son afectadas por el oxígeno, este proceso lo llevan a cabo plantas, hongos y algunas bacterias por el contrario la desnitrificación solamente las bacterias la llevan a cabo.



**Figura 6.** Trayecto asimilativo de nitrato (<http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p3-nitrogeno.pdf> )

## II

### JUSTIFICACION

En muchas de las especies de *Trichoderma* se reconoce que la conidiación puede ser disparada por factores ambientales como la luz y la disponibilidad de nutrientes, así como por varios tipos de estrés, entre los que se encuentran: la desecación, limitación de espacio (*in vitro*) y el daño al micelio vegetativo. La conidiación en respuesta a luz ha sido el fenómeno más estudiado en *Trichoderma*, ya que en contraste con lo que sucede en otros sistemas es una respuesta de todo o nada y hasta hace muy poco parecía ser la única respuesta asociada con el estímulo luminoso. Las mutantes de *Trichoderma atroviride* *BLR1* y *BLR2* sufrieron una mutación en los genes *blr1* y *blr2* lo que originó un fenotipo de no formación de conidias en presencia de luz. El presente trabajo se realizó con la finalidad de determinar el efecto que tiene la limitación de nitrógeno en presencia y ausencia de luz sobre un fondo genético *blr1* y *blr2* nulo. De manera simultánea se estudió el efecto del nitrógeno en concentración y origen sobre mutantes sobreexpresantes y antisendo de genes asociados a la respuesta luminosa.

### III

#### HIPOTESIS

La limitación de Nitrógeno como fuente nutricional promueve la conidiación y el aumento en la velocidad de crecimiento en condiciones de luz y oscuridad en las cepas mutantes de *Trichoderma atroviride* BLR1, BLR2 y BLU.

## VI

### OBJETIVOS

#### 1. Objetivo general:

- Estudiar el efecto que tiene la limitación de Nitrógeno sobre la reproducción asexual de *Trichoderma atroviride*, mutantes *BLR* y *BLU*.

#### 2. Objetivos específicos:

- Determinar el efecto del tipo y limitación de la fuente de N sobre la conidiación de *T. atroviride* y mutantes afectadas en la presencia de luz.
- Evaluar la influencia de la fuente de N y su limitación sobre el crecimiento de *T. atroviride* y mutantes *BLR* y *BLU*.

## V

### MATERIALES Y METODOS

#### 1. Microorganismos

| CEPAS        | GEN MODIFICADO |
|--------------|----------------|
| IMI *        | wt             |
| BLR1 **      | <i>blr1</i>    |
| BLR2 **      | <i>blr2</i>    |
| SEBLR 1- 8   | <i>blr1</i>    |
| SEBLR 2- 13  | <i>blr2</i>    |
| SEBLU 7- 10  | <i>blu-7</i>   |
| ASBLU 15- 8  | <i>blu-15</i>  |
| ASBLU 5- 2   | <i>blu-5</i>   |
| ASBLU 5-5    | <i>blu-5</i>   |
| ASBLU 22-1   | <i>blu-22</i>  |
| ASBLU 22-10  | <i>blu-22</i>  |
| ASBLU 7-1    | <i>blu-17</i>  |
| ASBLU 7-7    | <i>blu-17</i>  |
| SEBLU 17-6   | <i>blu-17</i>  |
| SEBLU 17-12A | <i>blu-17</i>  |

**Tabla 2.** Cepas utilizadas provistas por el CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato

#### 2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron: a) **PDA** (Papa Dextrosa Agar):– DIFCO- preparado según las especificaciones del proveedor, brevemente: 39g del polvo de PDA se agregan a 1L de agua destilada. Mezclar bien y calentar agitando frecuentemente hasta hervir 1 minuto para disolver completamente. b) **VMG** (Medio de Vogel y Glucosa): preparado a partir de un stock 50X [750 ml de medio de: (150 g citrato de Na<sub>3</sub>, 5 ½ H<sub>2</sub>O; 250g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro; 100 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> anhidro; 10 g MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O; 5 g CaCl<sub>2</sub>, 2 H<sub>2</sub>O) Solución de Elementos Traza (5 ml)(5 g Acido cítrico, 1 H<sub>2</sub>O; 5 g ZnSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O; 1 g Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>,6 H<sub>2</sub>O; 0.25 g CuSO<sub>4</sub>,5 H<sub>2</sub>O; 0.05 g MnSO<sub>4</sub>,1 H<sub>2</sub>O; 0.05 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> anhidro; 0.05 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>,2 H<sub>2</sub>O)]. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados por calor húmedo en autoclave a 121 °C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 15 min. El cual contiene: todos los componentes anteriormente mencionados por litro menos la fuente de Nitrógeno.

El medio solido VMG se preparó en diferentes versiones de acuerdo a la Tabla: **NH 25** ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  25mM), **NH 1.25** ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.25mM), **NO 25** ( $\text{KNO}_3$  25mM) y **NO 1.25** ( $\text{KNO}_3$  1.25mM)

| Medio * | Stock 2M<br>Fuente de N (ml) | Stock 2M<br>Glucosa (ml) | Stock 50X Medio<br>Voguel (ml) |
|---------|------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| NH25    | 6.25                         | 50                       | 10                             |
| NH1.25  | 0.3125                       | 50                       | 10                             |
| NO25    | 6.25                         | 50                       | 10                             |
| NO1.25  | 0.3125                       | 50                       | 10                             |

**Tabla 3.** \*Para preparar 500ml de medio.

Brevemente, la preparación de estos medios se llevó a cabo adicionando 434ml de agua destilada a los matraces, 7.5g de agar y 10 ml de solución stock 50X de Voguel (esterilización en autoclave). Posteriormente se agregaron 50 ml correspondientes la fuente de C (Glucosa) y finalmente la fuente de N a partir del stock 2M, 6.25 ml (25mM) y 0.3125 ml (1.25mM).

### 3. Cinética de crecimiento radial colonial

A partir de una colonia de 48 a 60h de cada una de las cepas de *Trichoderma* crecidas en oscuridad en medio PDA se obtuvieron bloques de micelio, mismos que fueron colocados en el centro de las placas conteniendo cada uno de los medios VMG descrito anteriormente. Las placas así inoculadas fueron incubadas a temperatura ambiente bajo dos condiciones:

a) ciclos de luz – oscuridad y b) oscuridad total.

El crecimiento radial de la colonia fue monitoreado cada 12 h tomando el diámetro con ayuda de una regla.

### 4. Determinación de biomasa por peso seco

Utilizando placas de cada uno de los medios cubiertas con una membrana de celofán estéril, brevemente: círculos de celofán fueron lavados con agua destilada caliente 2 veces y

colocadas entre toallas de papel para mantener la humedad de los mismos. Todas las piezas de celofán fueron esterilizados por calor húmedo a 121°C durante 15 minutos. Las placas fueron inoculadas de forma similar que aquellas correspondientes al a determinación de crecimiento radial incubadas a temperatura ambiente bajo dos condiciones: a) ciclos de luz – oscuridad y b) oscuridad total. Al tiempo establecido de 5 días se colectó el micelio con ayuda de una espátula y colocada en un papel filtro marcado. La muestra así colectada se coloca en una estufa a 80 °C hasta obtener el peso seco constante.

## 5. Determinación de la cantidad de conidias

A partir de placas de cada uno de los medios, inoculadas utilizando bloques de micelio se incubaron durante 5 o 7 días a temperatura ambiente en condiciones de luz o de oscuridad procurando que a este tiempo las conidias fueran cosechadas, raspando cuidadosamente con ayuda de una espátula, posteriormente se pasa a través de una tela y la suspensión es colectada en un tubo falcón. Por último se realizó el conteo con ayuda de la cámara de Neubauer.

El total de conidias se obtuvieron aplicando la siguiente fórmula:

$$(N_o \text{ de esporas})(N_o \text{ de cuadrantes})(\text{Factor de dilución})(10000) = \text{esporas / ml}$$

Donde: No. Esporas corresponde al número de esporas que se encuentran en 5 de los cuadrantes de la cámara, cuatro correspondientes a cada una de las esquinas y el cuadrante central de la cámara; el (5) corresponde al factor que multiplicado da el total de cuadrantes; F.D es el factor de dilución, 10000 es una Constante y Esporas/ml es el número de conidias en 1 ml de la suspensión evaluada.

## 6. Equipo

Incubadora Rotatoria (ENVIRON SHAKER-®-). Campana de Flujo Laminar (MINIHELIC® DWYER INSTRUMENTS INC). Estufa (felisa HORNO). Báscula analítica (Sartorius® BL120S). Microscópio (ZEISS).

## 7. Estadística o manejo de datos

Respecto a las estadísticas reportadas cabe destacar que los ensayos de monitoreo de crecimiento radial colonial, biomasa (peso seco) y determinación de conidias se realizaron dos veces, cada una por duplicado.

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

$$X = \sum x / n$$

Para la desviación estándar 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 X. se calculó usando la siguiente fórmula.

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

Finalmente la pendiente de crecimiento radial se calculó empleando la siguiente fórmula:

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

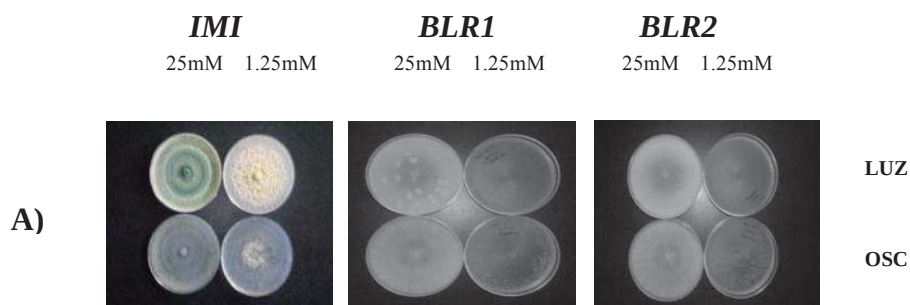
## VI RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Evaluación del efecto de la limitación en la fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ) sobre la velocidad de crecimiento colonial, la producción de biomasa y conidias en *Trichoderma atroviride* IMI, BLR1 y BLR2

La mutación en los genes *blr1* y *blr2* de *T. atroviride* IMI origina un fenotipo de no formación de conidias por efecto de la luz en las mutantes respectivas (*BLR1* y *BLR2*). Siendo el fenómeno de conidiación influenciado no solo por el estímulo luminoso sino también por factores nutricionales, se procedió a determinar la influencia de la limitación en la fuente de N: amonio ( $\text{NH}_4^{+1}$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^{-1}$ ), fuentes primaria y secundaria respectivamente, sobre la conidiación (figura 7). Bajo condiciones estándar de la concentración de amonio, esto es 25mM según lo establece la formulación del Medio Voguel (H.J. Voguel, 1956), la formación de conidias en las mutantes *BLR1* y *BLR2* es prácticamente nula, llegando a ser hasta 100 veces menor que la cepa parental en presencia de luz. Cuando la fuente de N se redujo 20 veces (1.25mM) *T. atroviride* IMI disminuyó la producción de conidias de  $1.3 \times 10^8$  hasta  $6.7 \times 10^6$ . Por el contrario las mutantes BLRs incrementaron la producción de conidas (ejemplo:  $1.5 \times 10^6$  a  $4.0 \times 10^6$  conidias/ml de la cepa *BLR1*) (Figura 8). En ausencia de luz la formación de conidias en la cepa silvestre pasó de  $1.3 \times 10^8$  a  $4.0 \times 10^7$  en el medio NH25, mientras que para el medio NH1.25 la cuenta fue de  $6.7 \times 10^6$  a  $4.0 \times 10^5$ . Para las mutantes BLRs la ausencia de luz promueve un efecto similar a la silvestre, esto es, disminución de la concentración de conidias producidas. Cuando se utilizó nitrato como fuente de N a una concentración de 25mM la producción de conidias fue similar en número entre las cepas ensayadas (IMI, *BLR1* y *BLR2*) alcanzando el rango de  $10^6$ /ml en la condición de luz y de  $10^5$  en oscuridad. La condición limitante de nitrato (1.25mM) promovió una reducción en la concentración de conidias producidas en todas las cepas e independiente de la presencia o ausencia de luz (ejemplo:  $4.7 \times 10^6$  a  $4 \times 10^6$  conidias/ml de la cepa IMI)

Por otra parte y con el fin de evaluar la influencia que tiene la limitación de la fuente de N sobre el crecimiento colonial expresado como velocidad de extensión de la colonia y la producción de biomasa se ensayaron las cepas IMI, *BLR1* y *BLR2* bajo las condiciones antes mencionadas. Cuando la concentración de amonio se limitó (1.25mM), la velocidad de

extensión de las cepas *IMI* y *BRL1* aumentó respecto a la concentración estándar (de 0.085 a 0.99 mm/h para la cepa *IMI*). Por el contrario el crecimiento de la cepa *BRL2* disminuyó cuando la concentración de amonio fue limitante. Adicionalmente es de destacar que esta última cepa tiene un crecimiento más acelerado que las anteriormente descritas, esto es 0.121 mm/h para *BRL2* comparado con 0.085 mm/h para *IMI*. Este efecto es independiente de la presencia de luz ya que en oscuridad se observó el mismo comportamiento. Cuando se evaluó la limitación de la fuente secundaria de N (nitrato), las cepas *IMI*, *BLR1* y *BLR2* aumentaron su velocidad de extensión, siendo *BLR2* la de mayor de velocidad, esto es, de 0.095 en la condición estándar a 0.097 mm/h en la condición limitante comparado con *IMI* cuya velocidad fue de 0.068 a 0.069mm/h respectivamente). Este comportamiento fue independientemente de la presencia de luz ya que en oscuridad se obtuvo el mismo resultado (figura 9). Respecto a la producción de micelio se utilizó la determinación de biomasa por peso seco. El peso del micelio de la cepas *IMI* *BLR1* y *BLR2* en el medio NH25 resultó ser de 98.4, 59.2 y 27.3 mg respectivamente a las 96h de crecimiento. Cuando la determinación se hizo en el medio NH1.25 a los 4 días de incubación, la biomasa producida fue de 10.3, 12.5 y 4.6 mg respectivamente. Cuando los ensayos se llevaron a cabo en la oscuridad la producción de biomasa disminuyó considerablemente para el caso de la cepa silvestre (de 98.4 a 64.6 mg), no así para las mutantes *BLRs*. La utilización de nitrato como fuente de N en el medio independientemente de la concentración utilizada y de la presencia del estímulo luminoso fue muy escaso (4.6, 8.5 y 9.0 mg para las cepas *IMI*, *BLR1* y *BLR2* respectivamente en el medio NO25 y luz comparado con 4.3, 7.8 y 8.4 mg de las mismas cepas en el medio NO1.25 con luz) (figura 10).



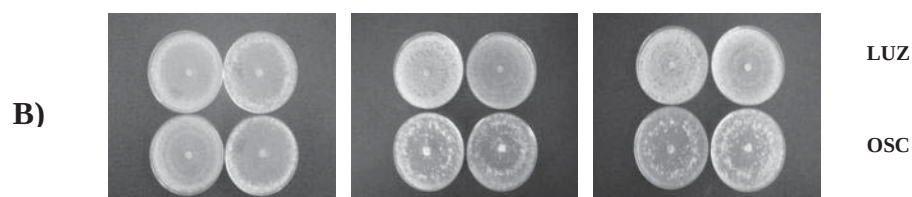


FIGURA 7. Morfología colonial de las cepas *T. atroviride* IMI, BLR1 y BLR2. Las cepas fueron crecidas en medio vogel bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM) a los 7 días de incubación.

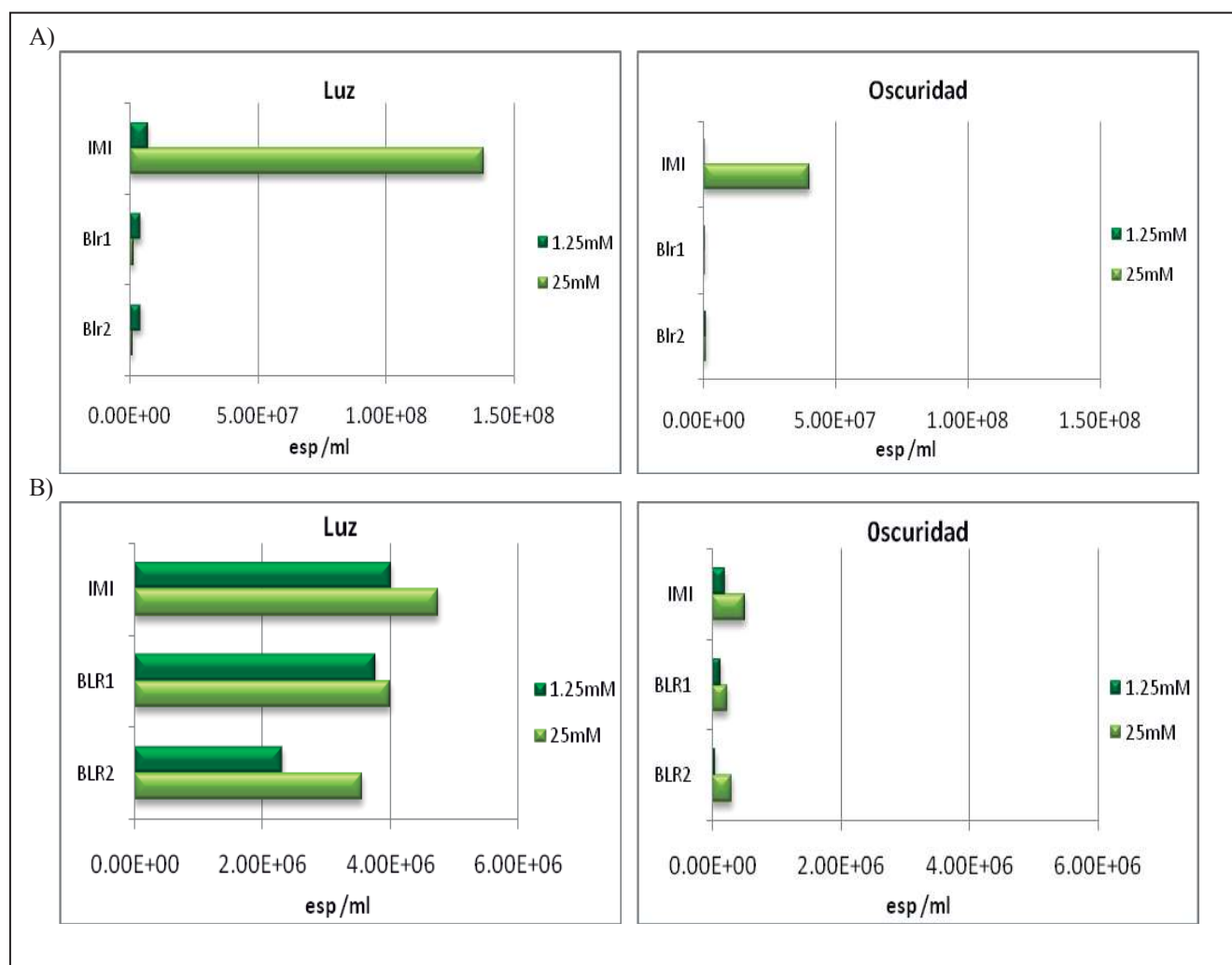


FIGURA 8. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de *T. atroviride* IMI, BLR1 y BLR2 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

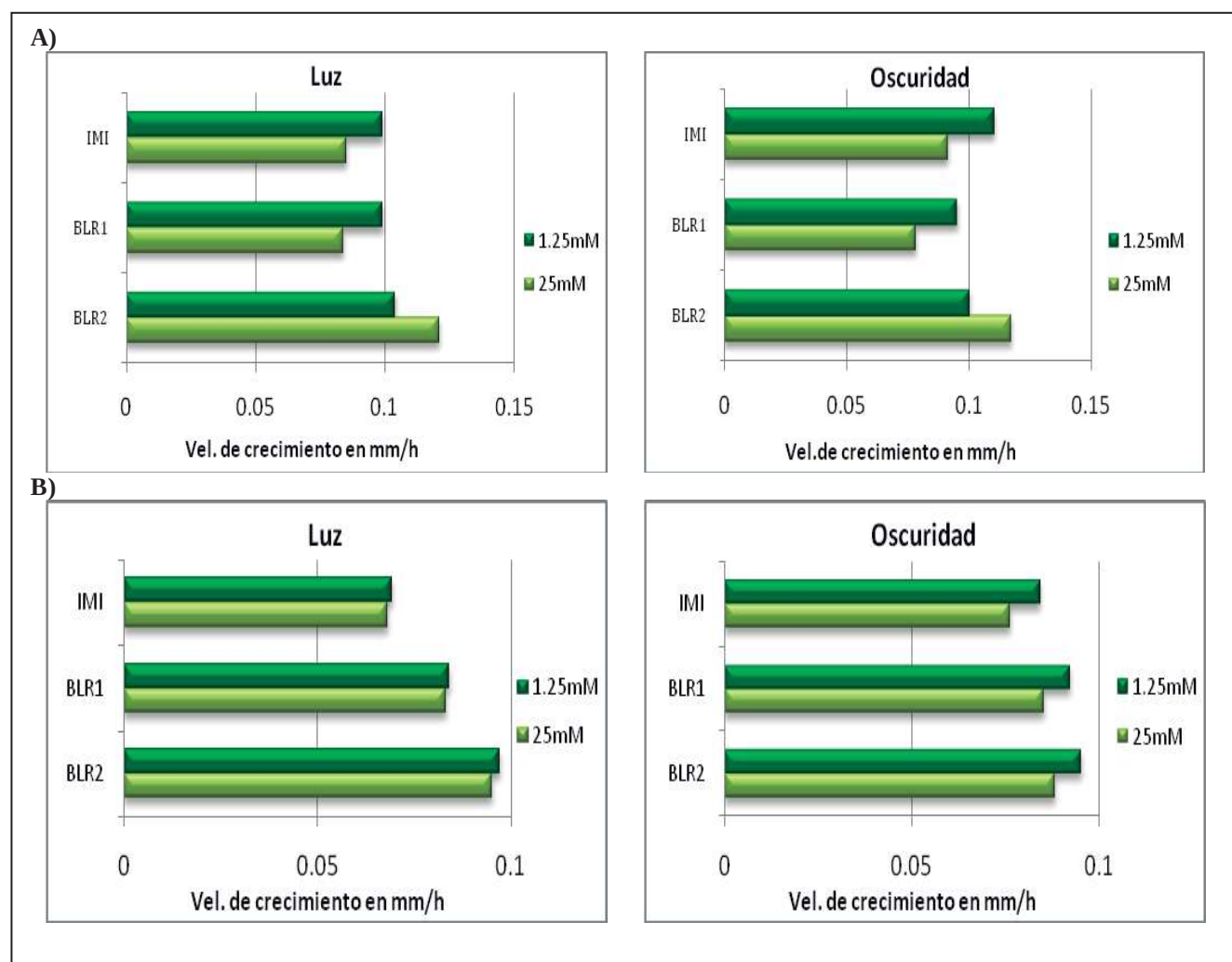


FIGURA 9. Determinación de la velocidad de extensión radial (mm/h) de *T. atroviride* IMI, BLR1 y BLR2 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

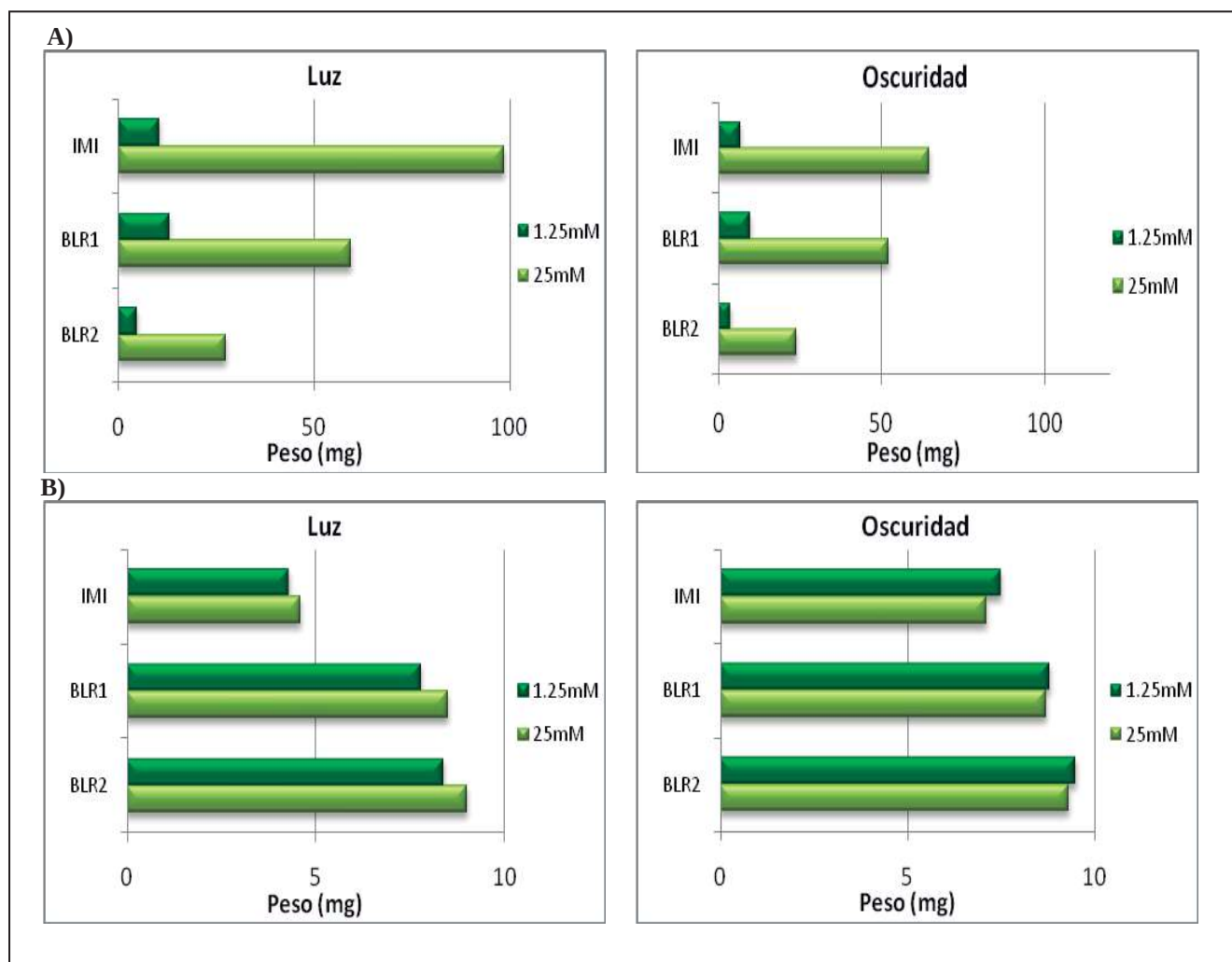


FIGURA 10. Determinación de la biomasa (mg) de *T. atroviride* IMI, BLR1 y BLR2 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

En *Trichoderma atroviride* se han identificado dos genes que codifican proteínas (BLR-1 y BLR-2) homólogas a las proteínas WC de *N. crassa*, que son esenciales para la conidiación inducida por la luz azul. La presencia de un dominio LOV de BLR-1 sugiere que esta proteína es el fotoreceptor de luz azul en *T. atroviride* (Casas-Flores y col., 2004). Se ha propuesto un modelo de la respuesta a la luz y de la esporulación por limitación de nutrientes en *T. atroviride*. En la fotoconidiación el complejo BLR-1/BLR-2 serían los implicados en percibir la señal luminosa para posteriormente unirse a los promotores de genes inducidos por luz y con ello llevar a la conidiación.

Debido a que el fenómeno de diferenciación es estimulado por diferentes factores entre el que se encuentra aquel relacionado con nutrientes, se realizó un primer ensayo para determinar el efecto de la fuente de N sobre la conidiación, crecimiento colonial y cantidad de biomasa. Para ello se utilizaron:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (cloruro de amonio una fuente primaria) y  $\text{KNO}_3$  (nitrato de potasio una fuente secundaria). Así se procedió a crecer las cepas *IMI*, *BLR1* y *BLR2* en medios conteniendo diferentes concentraciones de la fuente de N y la utilización de glucosa como fuente de C. Al término del ensayo, la conidiación fue evidenciada con la aparición de halos de color verde característico de las conidias en la cepa silvestre bajo condiciones estándar de la concentración de amonio, esto es 25mM según lo establece la formulación del Medio Voguel (H.J. Voguel, 1956). La cepa silvestre en presencia de luz como se esperaba conidió formando sus característicos halos de color verde oscuro en la condición estándar de amonio (25mM), mientras que en la condición limitante la cepa parental se vio afectada en la producción de conidias ya que tan solo produjo 1/20 parte que en la condición estándar. La ausencia de luz tuvo el efecto esperado, disminución de la concentración de conidias producidas en ambas condiciones (luz y oscuridad), lo cual nos indica que para la cepa parental la luz es un factor necesario para la conidiación aun mayor que el de la limitación de nutrientes. Por otra parte al utilizar al nitrato como fuente de N se observó que la producción de conidias no fue tan afectada por la limitación ya que la producción en ambas concentraciones estuvo en un rango máximo de  $10^6$  conidias/ml esto en luz, en oscuridad la concentración de esporas disminuyó respecto a la obtenida en luz aunque en esta condición al parecer también la limitación no tuvo un gran efecto ya que en ambos medios la producción de conidias estuvo en un rango máximo de  $10^5$ . Por otra parte con el fin de evaluar la influencia que tiene la limitación de N sobre la velocidad de crecimiento así

como la producción de biomasa, se ensayaron las cepas *IMI*, *BLR1* y *BLR2* en las condiciones ya mencionadas. Bajo la condición limitante de amonio y nitrato la cepa parental tuvo un comportamiento similar ya que la velocidad de crecimiento fue mayor en esta condición que en la concentración estándar sin importar la presencia o ausencia de luz, destacando que en oscuridad en ambos medios (NH1.25 y NO1.25) se presentó la mayor velocidad de crecimiento lo cual quiere decir que la limitación de N y la ausencia de luz son factores para que esta cepa crezca con mayor rapidez, cabe mencionar que la velocidad de crecimiento fue mayor en todas las condiciones al utilizar el amonio como fuente de N. Con respecto a la producción de micelio en condiciones de luz la limitación de amonio (1.25mM) tuvo efecto en la producción de micelio ya que tan solo creció 0.11 parte que la obtenida en la concentración estándar (25mM). Por otro lado al utilizar el nitrato la producción de micelio de la cepa silvestre fue muy escasa produciendo 0.047 parte de lo que produjo el amonio en la condición estándar con luz (control).

La formación de conidias en las mutantes *BLR1* y *BLR2* resultó ser prácticamente nulas llegando a ser hasta 100 veces menos que la cepa parental en presencia de luz este resultado era esperado ya que las cepas son consideradas ‘ciegas’ ya que no contienen los genes *blr1* y *blr2* asociados a la percepción de la luz (Casas-Flores y col, 2004). La pequeña producción fue producto de la limitación de N en este caso de amonio. Mientras que en la velocidad de crecimiento la *BLR1* tuvo un comportamiento igual a la cepa parental creciendo más rápido la condición limitante en luz y oscuridad, por el contrario el crecimiento de *BLR2* disminuyó en la condición de amonio limitante, destacando de esta última el mayor crecimiento acelerado superando a las otras cepas esto en la concentración estándar. Por otra parte la producción de micelio fue menor que el de la cepa silvestre en ambos medios (NH25 y NH1.25) y condiciones (luz y oscuridad), teniendo un comportamiento similar entre sí ya que en ambas la concentración estándar (25mM) produjo mayor cantidad de micelio siendo la mutante *BLR1* la mayor. Al utilizar nitrato como fuente de N en presencia de luz la conidiación resultó ser menor que la de la cepa silvestre en ambas concentraciones (25mM y 1.25mM) pero en este caso la diferencia no fue mucha ya que las 3 cepas estuvieron en un rango máximo de  $10^6$  conidias/ml siendo *BLR1* la mayor productora de las 2 mutantes *BLRs*. En oscuridad la producción disminuyó drásticamente aproximadamente de 20 veces menos que las producidas en luz lo que nos indica que tanto la limitación como la ausencia de luz

tuvieron efecto. Mientras que cuando se evaluó la limitación del nitrato para la velocidad de crecimiento las cepas *BLR1* y *BLR2* tuvieron un aumento en su velocidad de extensión al igual que la cepa parental, siendo *BLR2* al igual que en el otro medio la de mayor velocidad, este comportamiento en ambos medios fue independiente de la presencia de luz ya que en oscuridad se observó el mismo comportamiento. Ahora al utilizar nitrato como fuente de N en ambas concentraciones en presencia de luz la producción de micelio fue muy escasa al igual que en la cepa parental, pero teniendo mayor cantidad de micelio las mutantes *BLRs*, mientras que la limitación en oscuridad produce mayor cantidad de micelio hecho contrario a lo que ocurre en luz, siendo la mutante *BLR2* la mayor productora superando a las otras dos en ambos medios (NH25 y NH1.25). Cabe mencionar que *T. atroviride* crece más rápido en condiciones de oscuridad que en condiciones de luz blanca continua, un fenómeno que se atribuía originalmente al gasto energético invertido en la fotoconidiación. Este atributo se conserva en la cepa mutante *BLR2*, la cual crece más rápido en condiciones de oscuridad que en condiciones de luz blanca; sin embargo, la mutante también crece más rápido en condiciones de oscuridad y luz que la cepa silvestre. Esta observación sugiere algún tipo de regulación en el crecimiento por parte de *BLR2* en *T. atroviride* (Casas-Flores y col, 2004).

## 2. Evaluación del efecto de la limitación en la fuente de N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ y $\text{KNO}_3$ ) sobre la velocidad de crecimiento colonial, la producción de biomasa y conidias en *Trichoderma atroviride* IMI, y mutantes en genes asociados a la respuesta a la luz

### 2.1 Mutantes SEBLR

La sobreexpresión de los genes *blr1* y *blr2* de *T. atroviride* IMI origina un fenotipo de reducción en la inducción de conidias y de hiperconidiación respectivamente (Esquivel-Naranjo y col, 2007). Con el fin de establecer el efecto de la fuente de N (tipo y concentración) sobre el fondo genético de sobreexpresión de los genes *blr* respecto a la formación de conidias y crecimiento, se llevaron a cabo los ensayos correspondientes descritos en materiales y métodos.

Bajo condiciones estándar de la concentración de amonio (25mM), la formación de conidias en las mutantes *SEBLR1-8* y *SEBLR2-13* fue de  $5.2 \times 10^5$  y  $9 \times 10^6$  conidias/ml respectivamente, comparada con  $3.5 \times 10^7$  conidias/ml de la cepa parental (IMI) en presencia de luz. Cuando la fuente de N se redujo 20 veces (1.25mM) *T. atroviride* IMI disminuyó considerablemente la producción de conidias de  $3.5 \times 10^7$  hasta  $5.7 \times 10^5$ . Por otra parte las mutantes SEBLRs disminuyeron ligeramente la producción de conidas (ejemplo:  $5.2 \times 10^5$  a  $5.0 \times 10^5$  conidias/ml de la cepa *SEBLR1-8*) (figura 14A). En ausencia de luz la formación de conidias en la cepa silvestre pasó de  $3.5 \times 10^7$  a  $2.2 \times 10^7$  en el medio NH25, mientras que para el medio NH1.25 la cuenta fue de  $5.7 \times 10^5$  a  $3.5 \times 10^5$ . Para la mutante *SEBLR 2-13* la ausencia de luz tiene un efecto importante ya que no hay la formación de conidias independientemente de la concentración de amonio utilizada. Cuando se utilizó nitrato como fuente de N a una concentración de 25mM la producción de conidias fue similar en número entre las cepas ensayadas (*SEBLR 1-8* y *SEBLR 2-13*) alcanzando el rango de  $10^5$ /ml en la condición de luz. La condición limitante de nitrato (1.25mM) no tuvo efecto sobre la concentración de conidias producidas en todas las cepas en presencia de luz (ejemplo:  $5.2 \times 10^5$  a  $5.3 \times 10^5$  conidias/ml de la cepa IMI). Por el contrario en ausencia del estímulo luminoso la limitación de la fuente de nitrato inhibió la formación de conidias en la cepa parental. Bajo esta misma condición ambas mutantes SEBLRs formaron conidias, no así cuando la concentración de nitrato fue de 25mM (figura 14 B). Respecto a la producción de micelio se utilizó la determinación de biomasa por peso seco. El peso del micelio de la cepas *SEBLR 1-8* y *SEBLR 2-13* en el medio NH25 resultó ser de 129.5 y 100.1 mg respectivamente a los 5 días de crecimiento siendo estos mayores que el de la cepa silvestre (99 mg). Cuando la determinación se hizo en el medio

NH1.25 a los 5 días de incubación, la biomasa producida fue de 11.6 y 12.1 mg respectivamente. Cuando los ensayos se llevaron a cabo en la oscuridad la producción de biomasa disminuyó considerablemente para el caso de la cepa silvestre (de 99 a 64.6 mg), no así para las mutantes *SEBLRs*. La utilización de nitrato como fuente de N en el medio independientemente de la concentración utilizada y de la presencia del estímulo luminoso fue muy escaso (7.3 y 6.2 mg para las cepas *SEBLR 1-8* y *SEBLR 2-13* respectivamente en el medio NO25 y luz comparado con 5.1 y 4.5 mg de las mismas cepas en el medio NO1.25 con luz). Mientras que en ausencia del estímulo luminoso la producción de biomasa aumento independientemente del medio (NO25 y NO1.25) para el caso de la cepa silvestre (de 3.4 a 9 mg en la concentración estándar y de 2.9mg a 7.4mg en la limitante) (ver figura 15).

## 2.2 Mutantes ASBLU

Através de la expresión del cDNAs en orientación antisentido analizando el vector pUE08 fue posible llevar a cabo un silenciamiento masivo de genes regulados por la luz para el análisis del fenómeno de fotoconidiacion en *T. atroviride*. Las transformantes se nombraron en función de la orientación del gen en el vector de expresión pUE08, por ejemplo, Anti-Sentido del gen *blu-4* (ASblu4). Las transformantes ASblu5 y ASblu8 se muestran agrupadas porque corresponden al mismo gen (Esquivel-Naranjo y col, 2007).

Bajo condiciones estándar de la concentración de amonio (25mM), la formación de conidias en las mutantes *ASBLU 5-2*, *ASBLU 5-5*, *ASBLU 15-8*, *ASBLU 22-1*, *ASBLU 22-10*, *ASBLU 7-1* y *ASBLU7-7* fue de  $1.3 \times 10^7$ ,  $1.4 \times 10^7$ ,  $6.3 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^7$ ,  $1.4 \times 10^7$ ,  $4.4 \times 10^6$  y  $1.8 \times 10^6$  conidias/ml respectivamente, comparada con  $3.5 \times 10^7$  conidias/ml de la cepa parental (IMI) en presencia de luz. Cuando la fuente de N se redujo 20 veces (1.25mM) *T. atroviride* IMI disminuyó considerablemente la producción de conidias de  $3.5 \times 10^7$  hasta  $5.7 \times 10^5$ . Por otra parte las mutantes ASBLUs disminuyeron notablemente la producción de conidas (ejemplos:  $1.4 \times 10^7$  a  $3 \times 10^5$  conidias/ml de la cepa *ASBLU 5-5* y de  $4.4 \times 10^6$  a 0 conidias/ml de la cepa *ASBLU 7-1*) (Figuras 16,18 y 20 A). En ausencia de luz la formación de conidias en la cepa silvestre pasó de  $3.5 \times 10^7$  a  $2.2 \times 10^7$  en el medio NH25, mientras que para el medio NH1.25 la cuenta fue de  $5.7 \times 10^5$  a  $3.5 \times 10^5$ . Para la mutante *ASBLU 5-2* la ausencia de luz tiene un efecto importante ya que no hay la formación de conidias independientemente de la concentración de amonio utilizada, mientras que para la *ASBLU 5-2*, *ASBLU 15-8* y *ASBLU*

7-7 el efecto de no producción de conidias se da en el medio NH25. Cuando se utilizó nitrato como fuente de N a una concentración de 25mM la producción de conidias fue similar en número entre las cepas ensayadas (*ASBLU 5-2*, *ASBLU 5-5*, *ASBLU 15-8*, *ASBLU 22-1*, *ASBLU 22-10*, *ASBLU 7-1* y *ASBLU7-7*) alcanzando el rango de  $10^5$ /ml en la condición de luz. La condición limitante de nitrato (1.25mM) no tuvo efecto sobre la concentración de conidias producidas en todas las cepas en presencia de luz (ejemplo:  $5.2 \times 10^5$  a  $5.3 \times 10^5$  conidias/ml de la cepa IMI). Por el contrario en ausencia del estímulo luminoso la limitación de la fuente de nitrato inhibió la formación de conidias en la cepa parental. Bajo esta misma condición las cepas *ASBLU 15-8*, *ASBLU 7-1* y *ASBLU 7-7* sufren un efecto importante ya que no hay formación de conidias sin importar la concentración de nitrato utilizado, mientras que para la cepa *ASBLU 22-10* dicho efecto de no producir conidias se dio en el medio NO1.25 o limitante (ver figuras 16,18 y 20 B). Respecto a la producción de micelio se utilizó la determinación de biomasa por peso seco. El peso del micelio de la cepas *ASBLU 5-2*, *ASBLU 5-5*, *ASBLU 15-8*, *ASBLU 22-1*, *ASBLU 22-10*, *ASBLU 7-1* y *ASBLU7-7* en el medio NH25 resultó ser de 118.2, 126.9, 104.4, 107.8, 107.2, 99.3 y 90.9 mg respectivamente a los 5 días de crecimiento en presencia de luz, siendo estos mayores que el de la cepa silvestre (99 mg). Cuando la determinación se hizo en el medio NH1.25 a los 5 días de incubación, la biomasa producida fue de 19.1, 16.7, 16.4, 19, 19.8, 16.7 y 10.3 mg respectivamente. Cuando los ensayos se llevaron a cabo en la oscuridad la producción de biomasa disminuyó considerablemente para el caso de la cepa silvestre (de 99 a 64.6 mg), no así para las mutantes *ASBLU 5-2* y *ASBLU 5-5* que tuvieron un pequeño aumento (de 118.2 a 126.2 mg y de 126.9 a 132 mg). La utilización de nitrato como fuente de N en el medio independientemente de la concentración utilizada y de la presencia del estímulo luminoso fue muy escaso (5.4, 7.8, 8.1, 3.2, 5.9, 7.2 y 5.2 mg para las cepas *ASBLU 5-2*, *ASBLU 5-5*, *ASBLU 15-8*, *ASBLU 22-1*, *ASBLU 22-10*, *ASBLU 7-1* y *ASBLU7-7* respectivamente en el medio NO25, aunque en el medio NO1.25 con luz se percibió un ligero aumento en las cepas *ASBLU 22-1*, *ASBLU22-10* Y *ASBLU 7-7*(de 3.2 a 4.4 mg, 5.9 a 6.2 mg y de 5.2 a 8.4 mg). Mientras que en ausencia del estímulo luminoso la producción de biomasa aumento independientemente del medio (NO25 y NO1.25) para el caso de la cepa silvestre (de 3.4 a 9 mg en la concentración estándar y de 2.9 a 7.4 en la limitante) además de las cepas *ASBLU 7-1* y *ASBLU 7-7* (que de 7.2 a 8.6 mg y

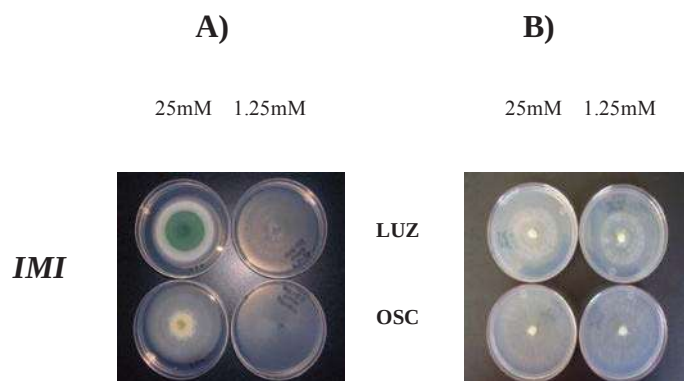
5.2 a 9.1 mg aumentaron en la concentración estándar y de 6.8 a 7 mg y 8.4 a 9.4 en la limitante) (ver figuras 17,19 y 21).

### 2.3 Mutantes SEBLU

Como otra forma de estudiar la relación de la fotoconidiación con los genes encargados de la regulación de la luz, se realizó una sobreexpresión de estos genes, estas transformantes al igual que las anteriores se nombran considerando el efecto de la sobreexpresión de los genes por ejemplo sobreexpresión del gen *blu 17* (*SEBLU 17*) (Esquivel-Naranjo y col, 2007).

Bajo condiciones estándar de la concentración de amonio (25mM), la formación de conidias en las mutantes *SEBLU 17-6*, *SEBLU 17-12A* y *SEBLU 7-10* fue de  $1 \times 10^7$ ,  $1.6 \times 10^7$  y  $2.7 \times 10^6$  conidias/ml respectivamente, comparada con  $3.5 \times 10^7$  conidias/ml de la cepa parental (IMI) en presencia de luz. Cuando la fuente de N se redujo 20 veces (1.25mM) *T. atroviride* IMI disminuyó considerablemente la producción de conidias de  $3.5 \times 10^7$  hasta  $5.7 \times 10^5$ . Por otra parte las mutantes SEBLUs disminuyeron también considerablemente la producción de conidias (ejemplo:  $1 \times 10^7$  a  $3.5 \times 10^5$  conidias/ml de la cepa *SEBLU 17-6*) (Figura 22A). En ausencia de luz la formación de conidias en la cepa silvestre pasó de  $3.5 \times 10^7$  a  $2.2 \times 10^7$  en el medio NH25, mientras que para el medio NH1.25 la cuenta fue de  $5.7 \times 10^5$  a  $3.5 \times 10^5$ . Para las mutantes *SEBLU 17-6*, *SEBLU 17-12A* y *SEBLU 7-10* la ausencia de luz tiene un efecto similar en ambos medios (NH25 y NH1.25) ya que alcanzando un rango de  $10^5$  conidias/ml excepto en la condición limitante de la cepa *SEBLU 7-10* en la que no hubo producción. Cuando se utilizó nitrato como fuente de N a una concentración de 25mM la producción de conidias fue similar en número entre las cepas ensayadas (*SEBLU 17-6*, *SEBLU 17-12A* y *SEBLU 7-10*) y la silvestre alcanzando el rango de  $10^5$  conidias/ml en la condición de luz. La condición limitante de nitrato (1.25mM) tuvo efecto sobre la producción de conidias de la cepa *SEBLU 17-12A* de  $2 \times 10^5$  a  $4 \times 10^5$  conidias/ml, mientras que en las otras cepas no tuvo un efecto relevante (ejemplo  $2.2 \times 10^5$  a  $1.8 \times 10^5$  conidias/ml de la cepa *SEBLU 17-6*). Por el contrario en ausencia del estímulo luminoso la limitación de la fuente de nitrato inhibió la formación de conidias en la cepa parental. Bajo esta misma condición la cepa *SEBLU 7-10* no tiene producción de conidias en ambos medios (NH25 y NH1.25), mientras que las otras SEBLUs tienen un comportamiento similar independientemente de la

concentración de nitrato utilizado (ejemplo de  $7.5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  de la cepa *SEBLU 17-6*) (ver figura 22B). Respecto a la producción de micelio se utilizó la determinación de biomasa por peso seco. El peso del micelio de las cepas *SEBLU 17-6*, *SEBLU 17-12A* y *SEBLU 7-10* en el medio NH25 resultó ser de 80.2, 90.4 y 106.9 mg respectivamente a los 5 días de crecimiento teniendo esta última mayor biomasa que la cepa silvestre (99 mg). Cuando la determinación se hizo en el medio NH1.25 a los 5 días de incubación, la biomasa producida fue de 17.1, 13.4 y 15.7 mg respectivamente estos bajo condiciones de luz. Cuando los ensayos se llevaron a cabo en la oscuridad la producción de biomasa disminuyó considerablemente para el caso de la cepa silvestre (de 99 a 64.6 mg), no así para las mutantes *SEBLUs*. La utilización de nitrato como fuente de N en el medio independientemente de la concentración utilizada y de la presencia del estímulo luminoso fue muy escasa (4.4, 2.6 y 8 mg para las cepas *SEBLU 17-6*, *SEBLU 17-12A* y *SEBLU 7-10* respectivamente en el medio NO25, aunque en el medio NO1.25 con luz se percibió un ligero aumento en las cepas *SEBLU 17-6* y *SEBLU 17-12A* (de 4.4 a 6.4 mg y de 2.6 a 3.6 mg). Mientras que en ausencia del estímulo luminoso la producción de biomasa aumentó independientemente del medio (NO25 y NO1.25) para el caso de la cepa silvestre (de 3.4 a 9 mg en la concentración estándar y de 2.9 a 7.4 en la limitante), mientras que en esta condición de ausencia de luz las cepas *SEBLU 17-6* y *SEBLU 17-12A* tuvieron un incremento en la condición limitante (de 4.9 a 8.5 mg y de 5.3 a 7.2) (ver figura 23).



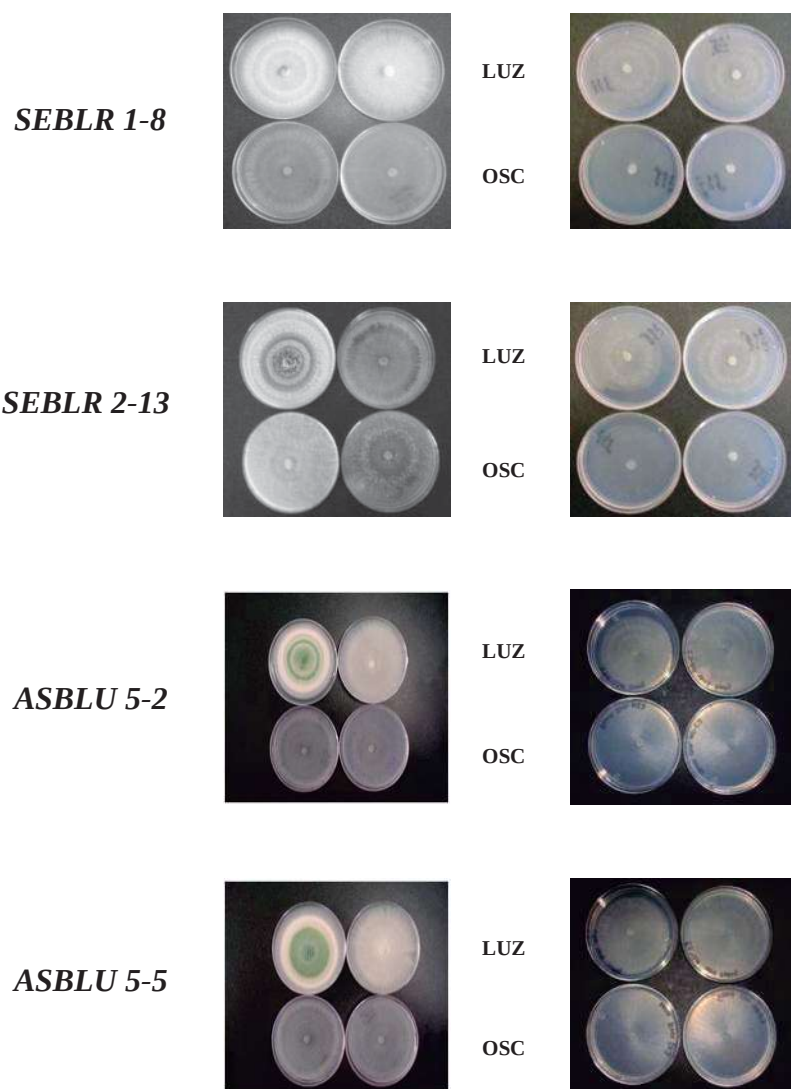
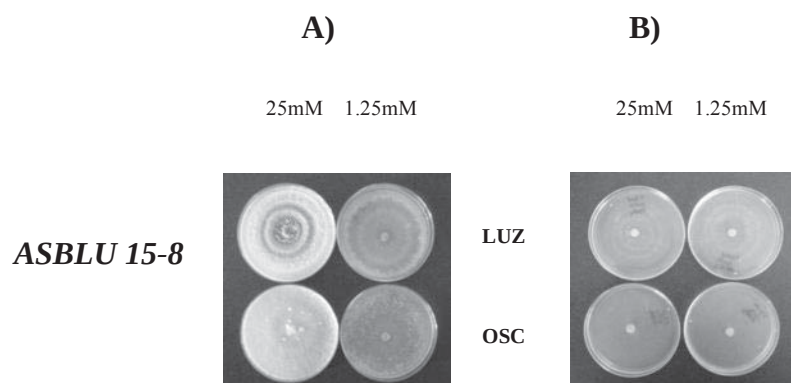


FIGURA 11. Morfología colonial de las cepas *T. atroviride* IMI, *SEBLR 1-8*, *SEBLR 2-13*, *ASBLU 5-2* y *ASBLU 5-5*. Las cepas fueron crecidas en medio Vogel bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM) a los 5 días de incubación.



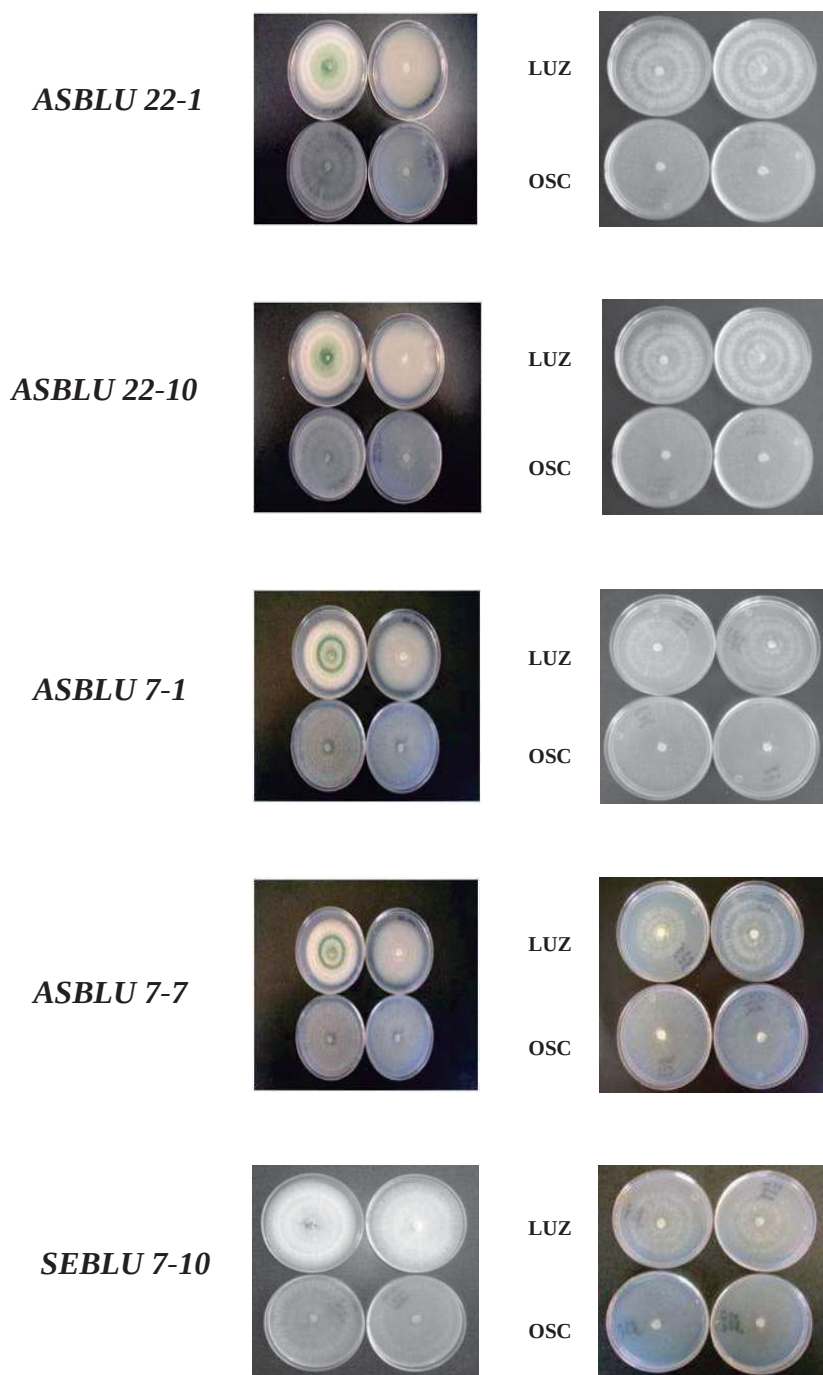


FIGURA 12. Morfología colonial de las cepas *T. atroviride* IMI, ASBLU 15-8, ASBLU 22-1, ASBLU 22-10, ASBLU 7-1, ASBLU 7-7 y SEBLU 7-10. Las cepas fueron crecidas en medio vogel bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM) a los 5 días de incubación.

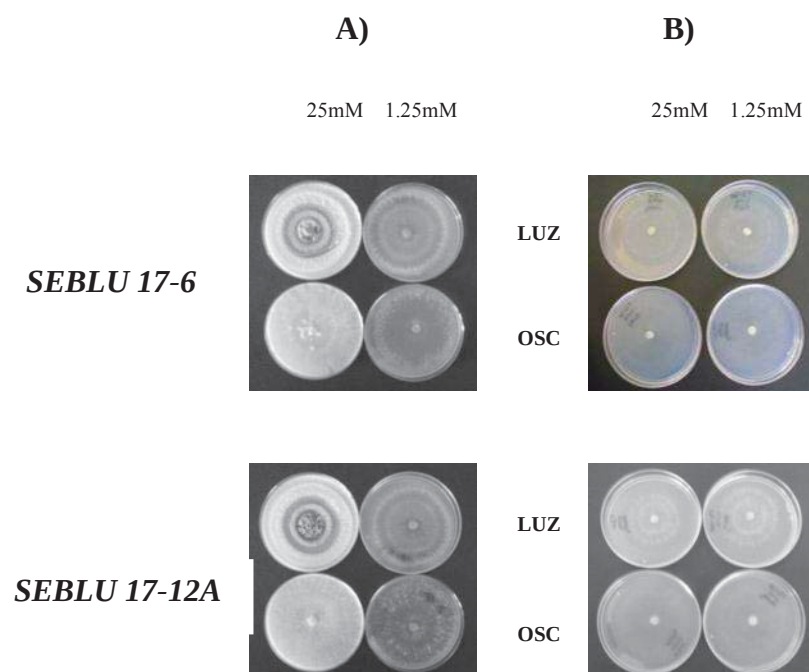


FIGURA 13. Morfología colonial de las cepas *T. atroviride* IMI, SEBLU 17-6 y SEBLU 17-12A. Las cepas fueron crecidas en medio voguel bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM) a los 5 días de incubación.

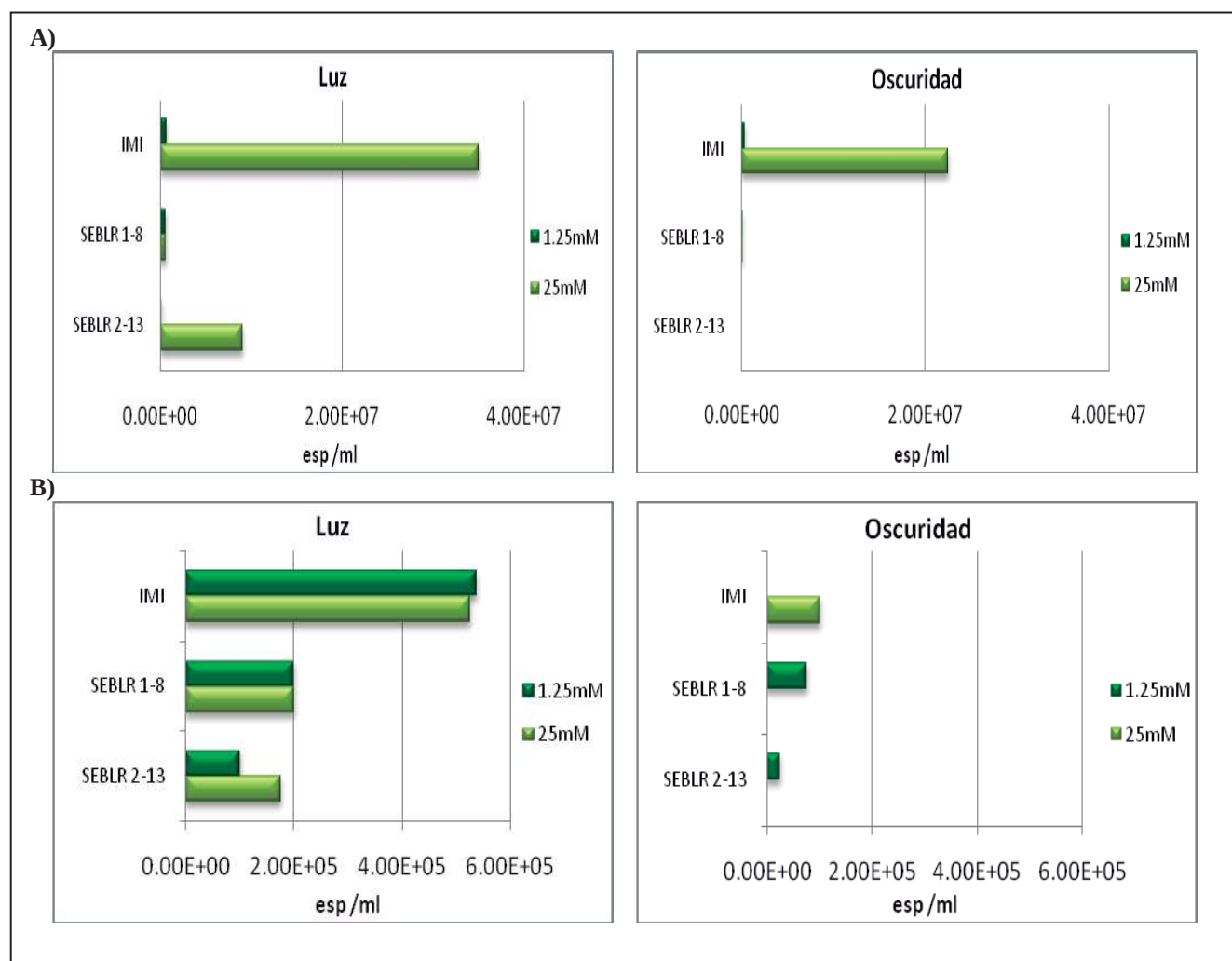


FIGURA 14. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de *T. atroviride* IMI, SEBLR 1-8 y SEBLR 2-13 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

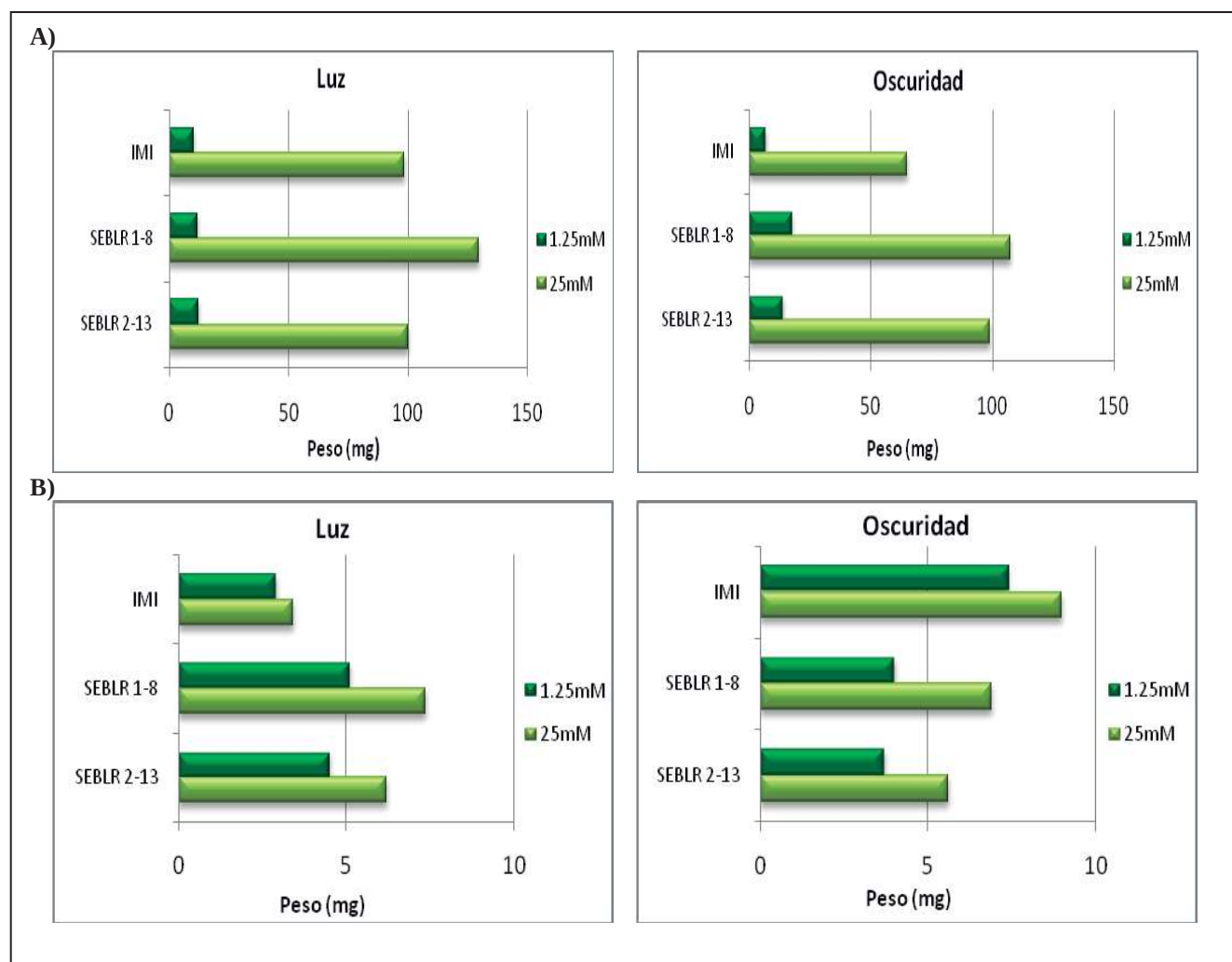


Figura 15. Determinación de la biomasa (mg) de *T. atroviride* IMI, SEBLR 1-8 y SEBLR 2-13 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

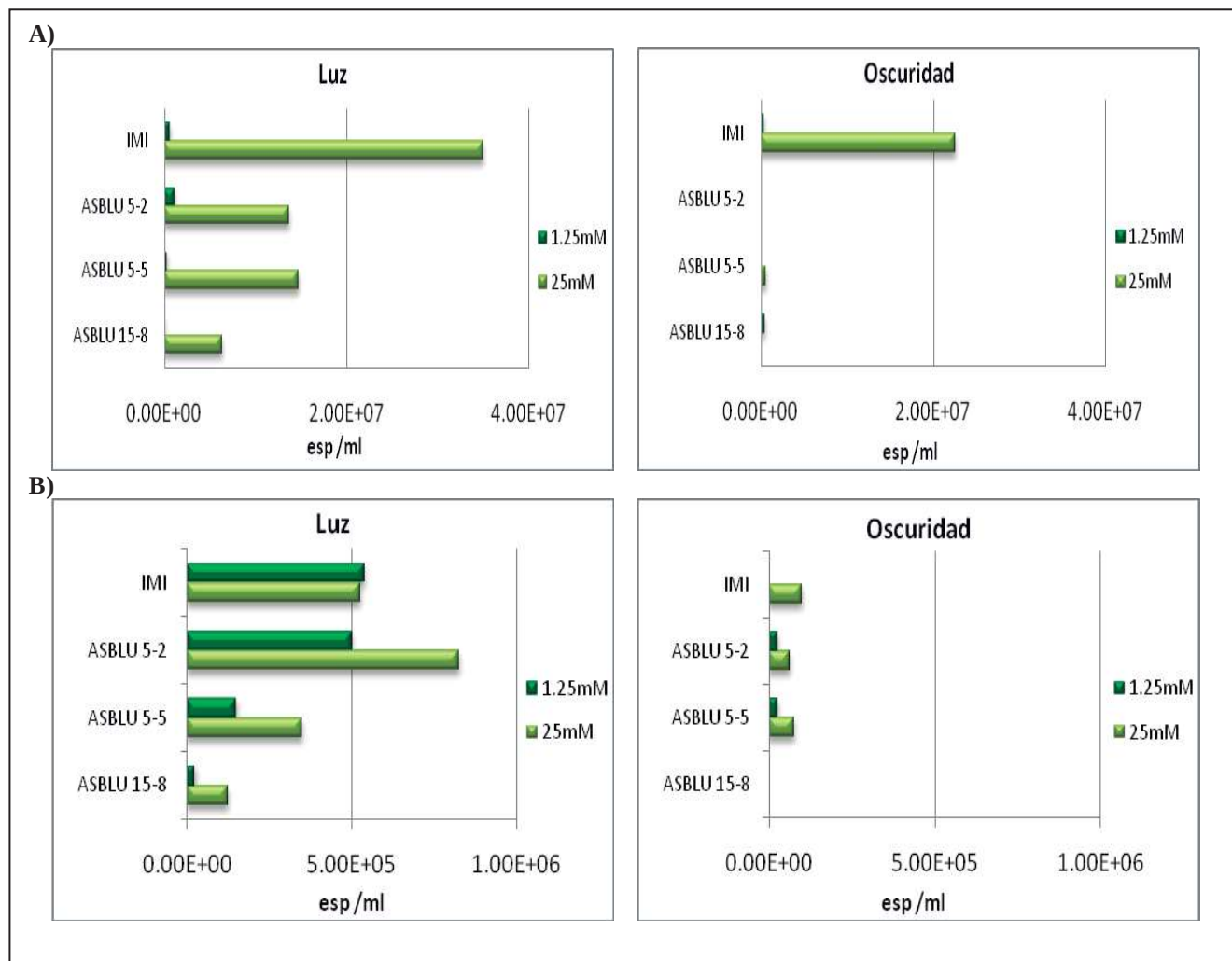


FIGURA 16. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de *T. atroviride* IMI, ASBLU 5-2, ASBLU 5-5 y ASBLU 15-8 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno NH<sub>4</sub>Cl(A) y KNO<sub>3</sub> (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

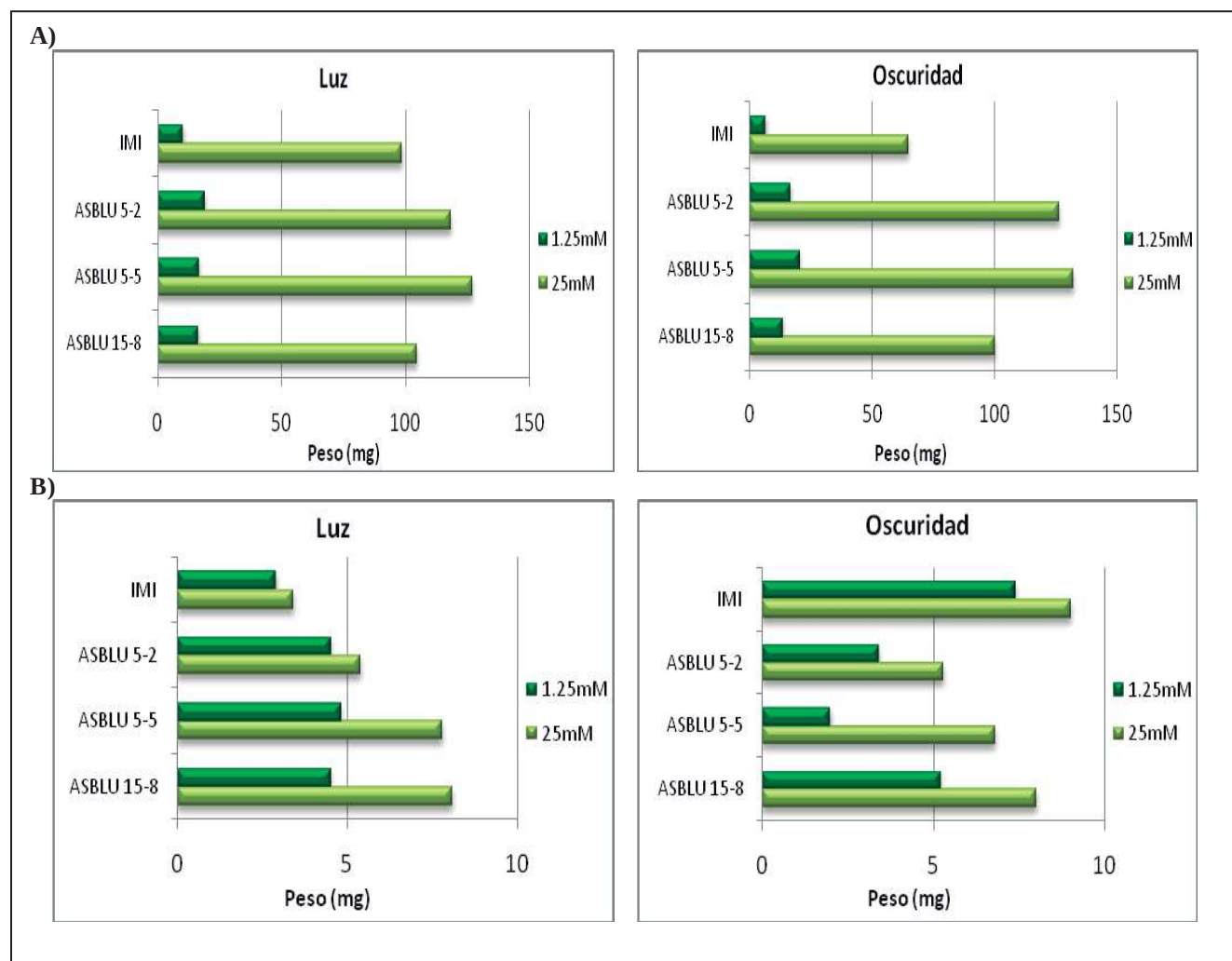


FIGURA 17. Determinación de la biomasa (mg) de *T. atroviride* IMI, ASBLU 5-2, ASBLU 5-5 y ASBLU 15-8 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

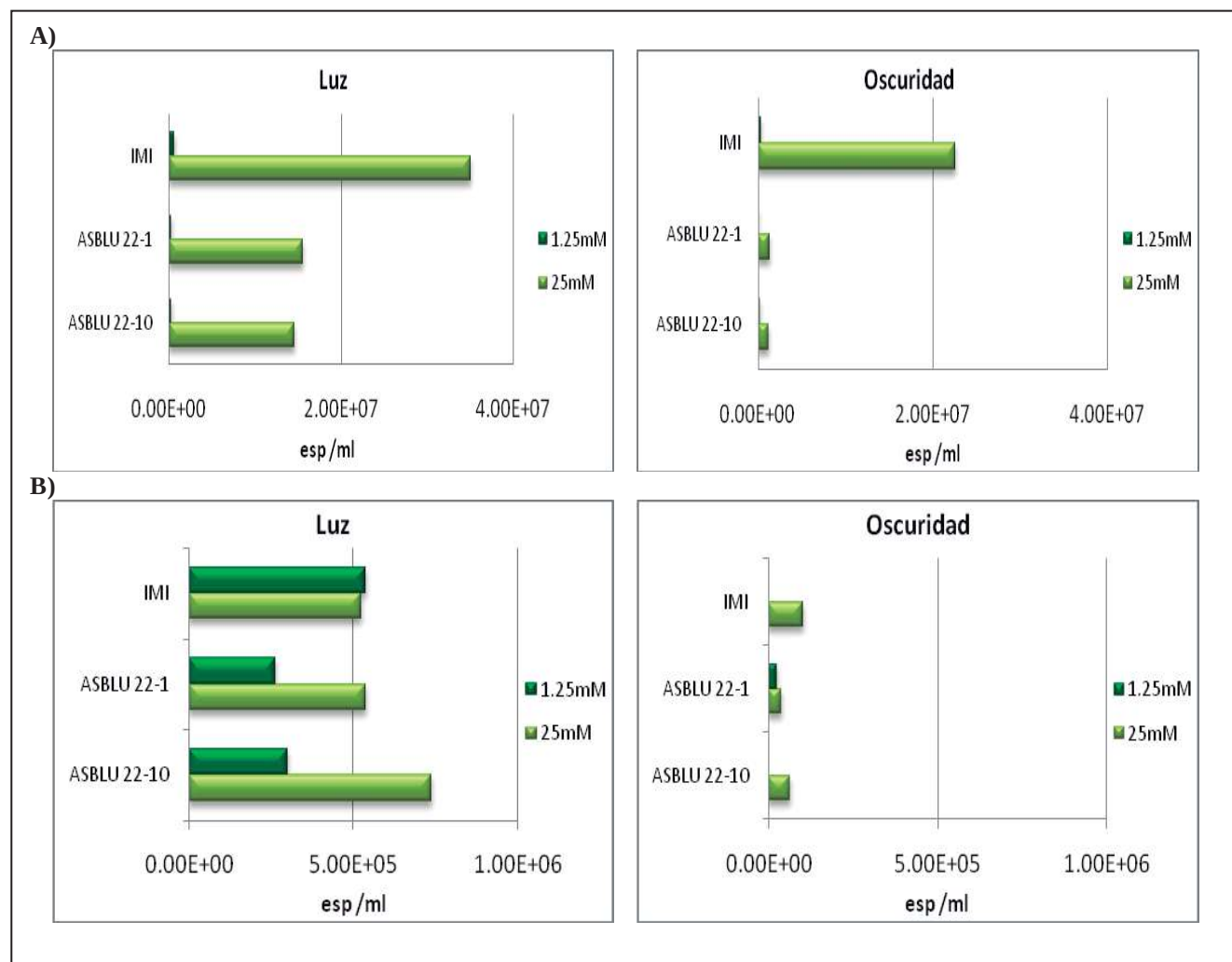


FIGURA 18. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de *T. atroviride* IMI, ASBLU 22-1 y ASBLU 22-10 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

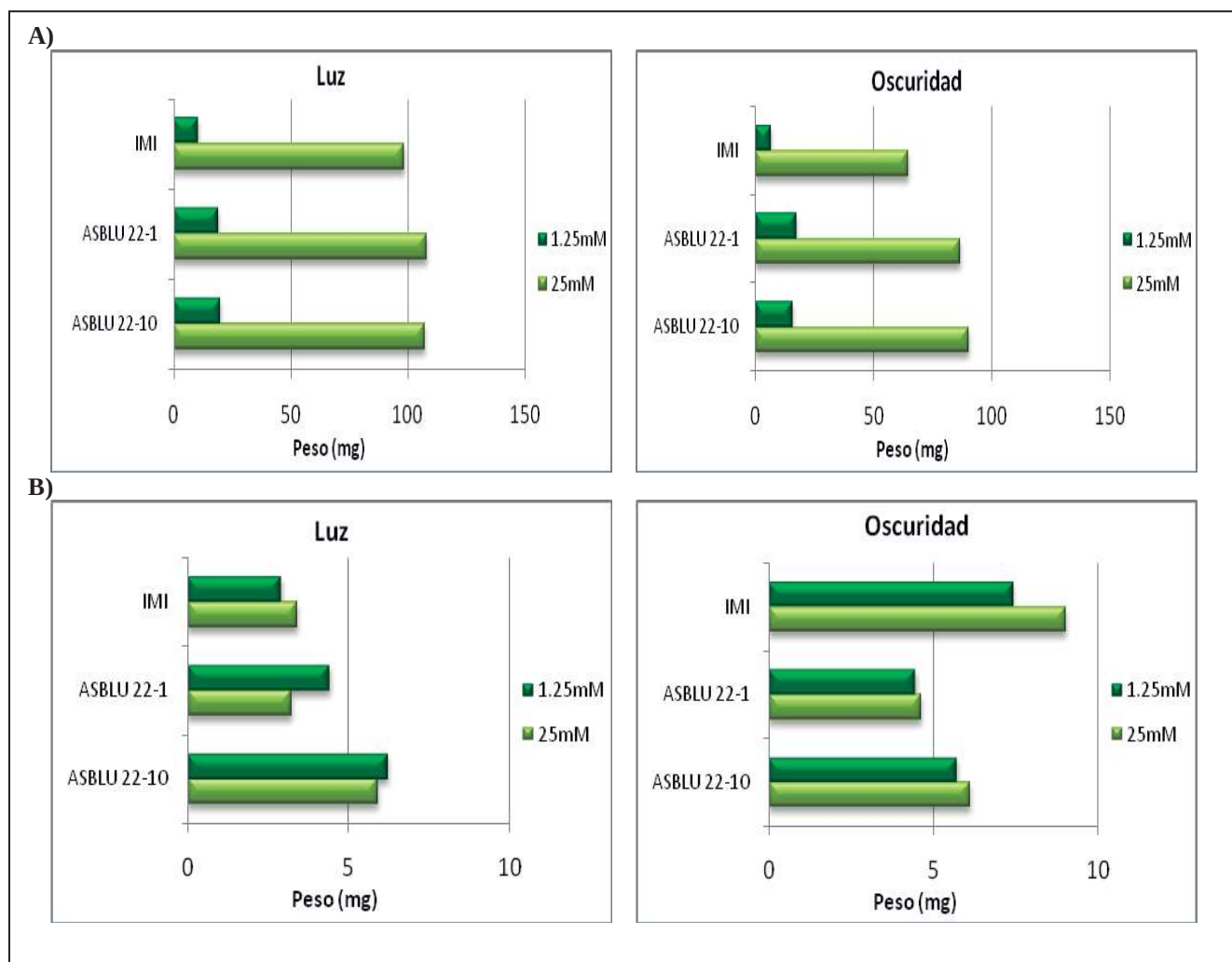


Figura 19. Comparación de la producción de biomasa de *T. atroviride* IMI, ASBLU 22-1 y ASBLU 22-10 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno NH<sub>4</sub>Cl(A) y KNO<sub>3</sub> (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

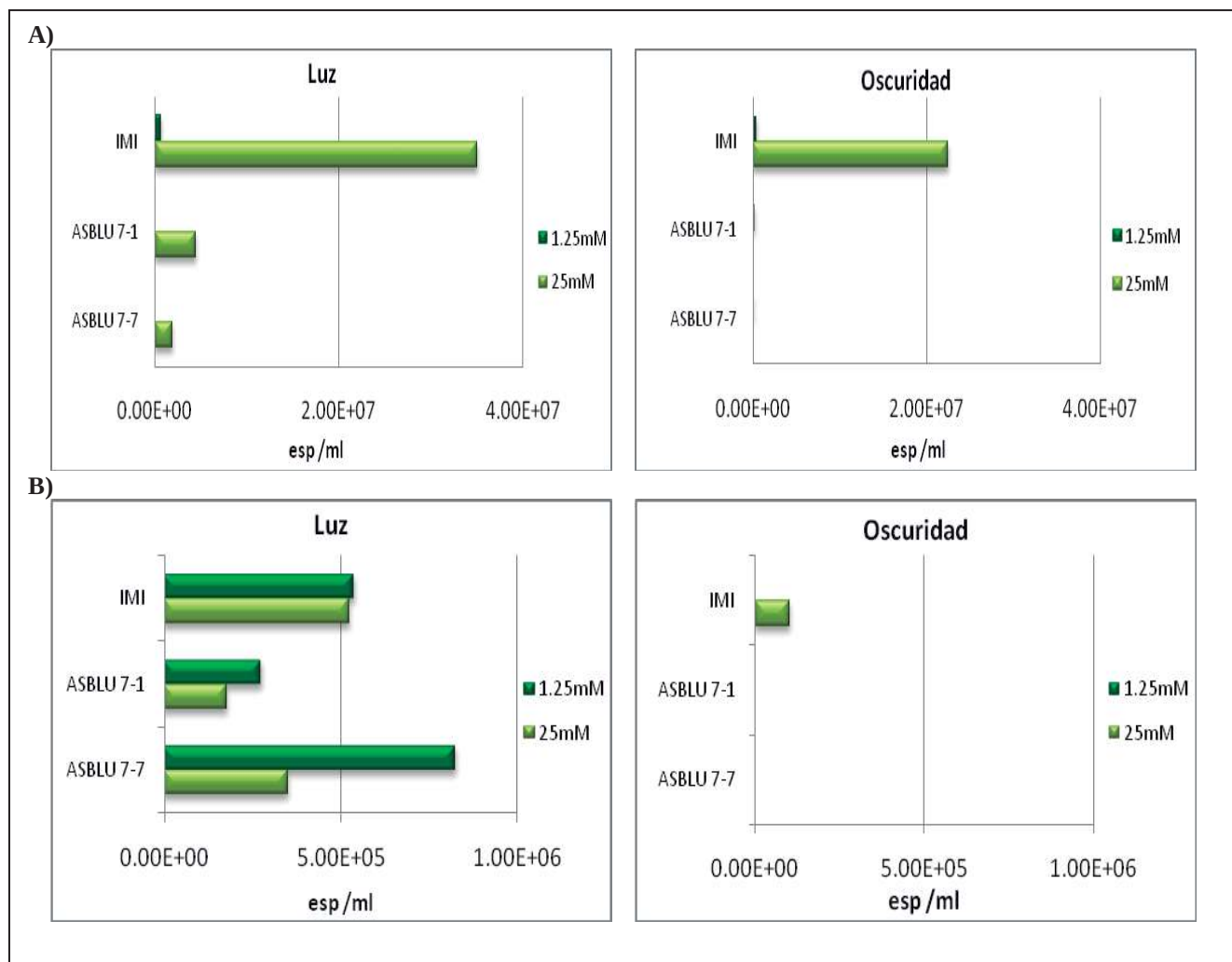


FIGURA 20. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de *T. atroviride* IMI, ASBLU 7-1 y ASBLU 7-7 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

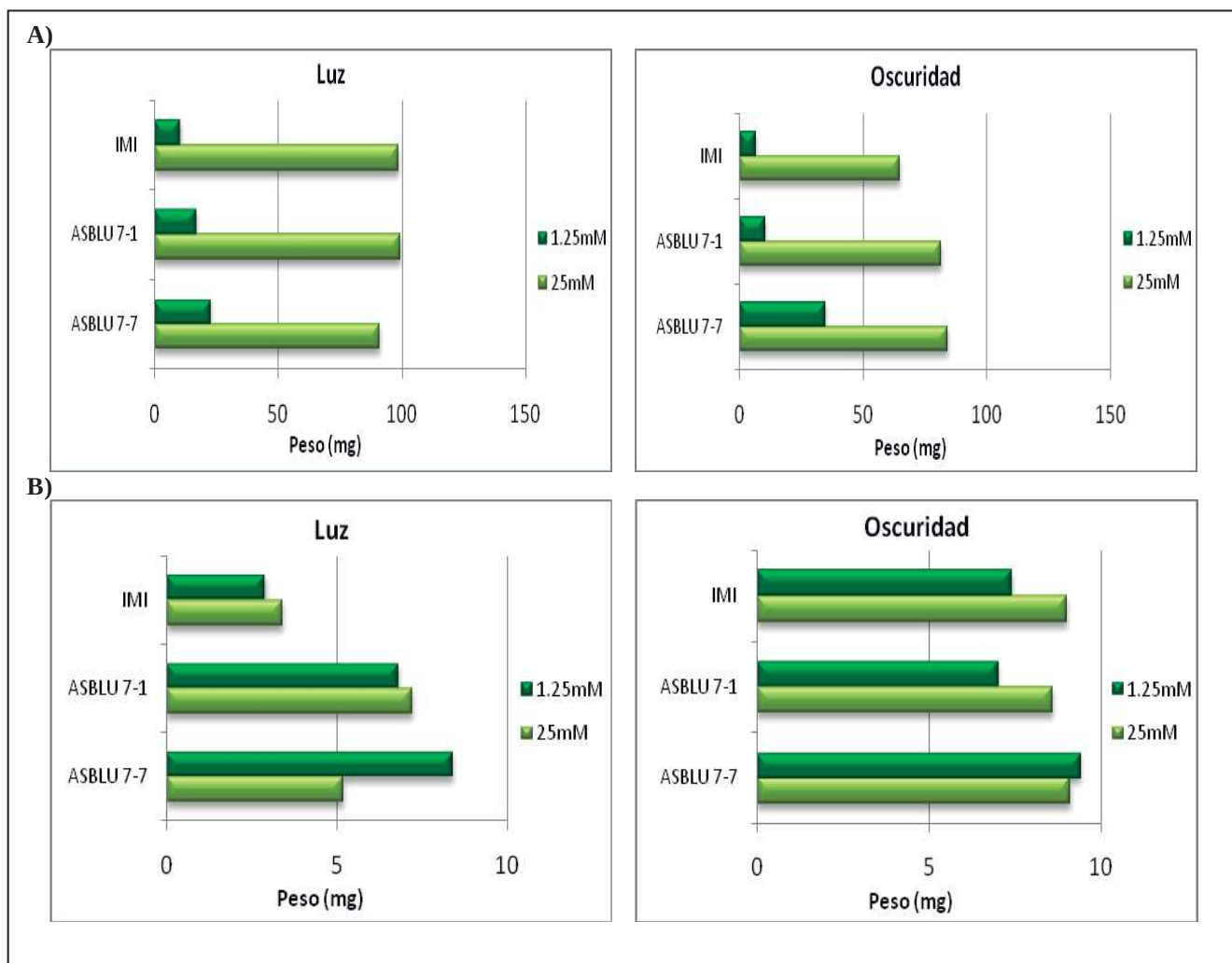


FIGURA 21. Comparación de la producción de biomasa (mg) de *T. atroviride* IMI, ASBLU 7-1 y ASBLU 7-7 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno NH<sub>4</sub>Cl(A) y KNO<sub>3</sub> (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

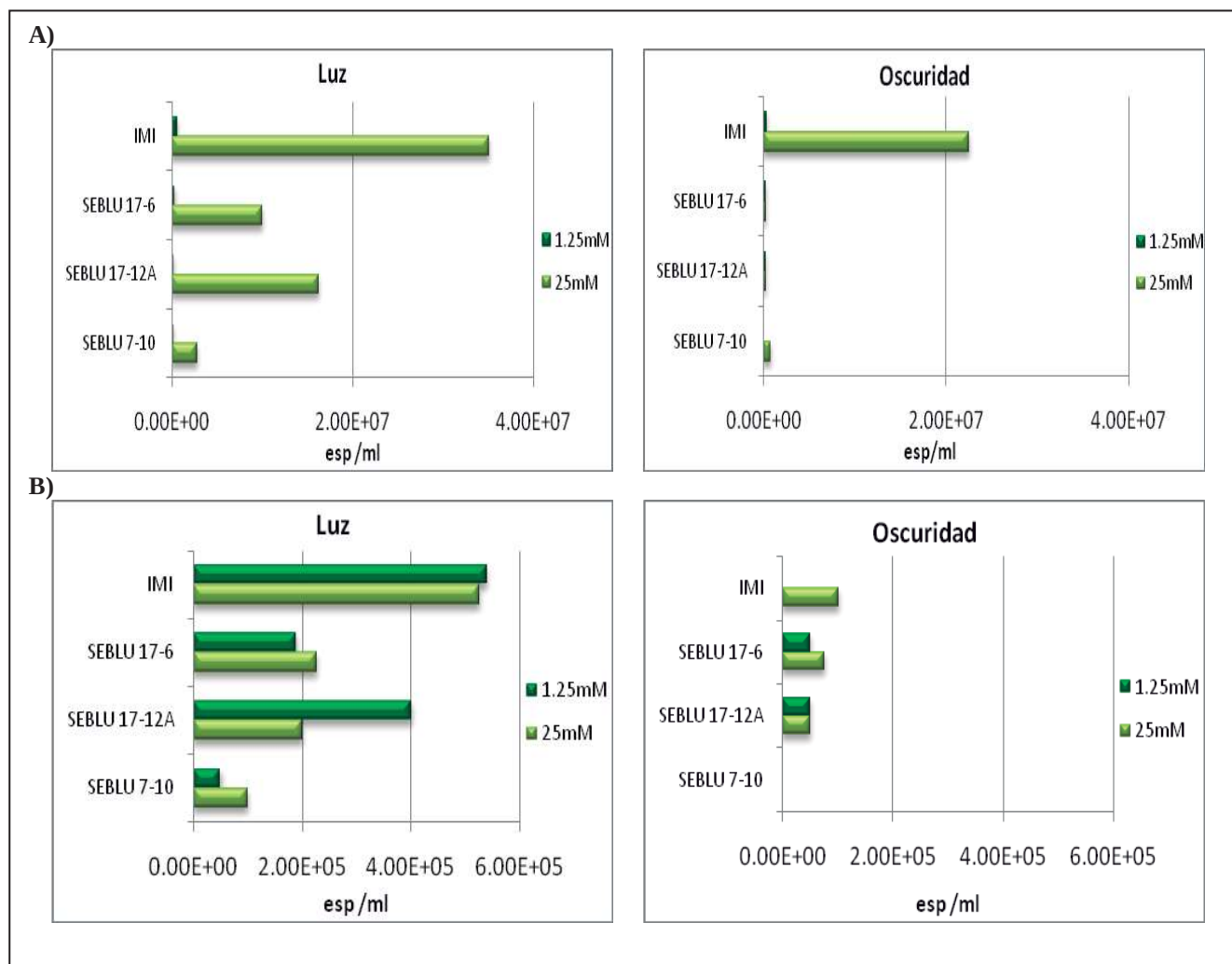


FIGURA 22. Comparación de la producción de conidias (esp/ml) de *T. atroviride* IMI, SEBLU 17-6, SEBLU 17-12A y SEBLU 7-10, bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno NH<sub>4</sub>Cl(A) y KNO<sub>3</sub> (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

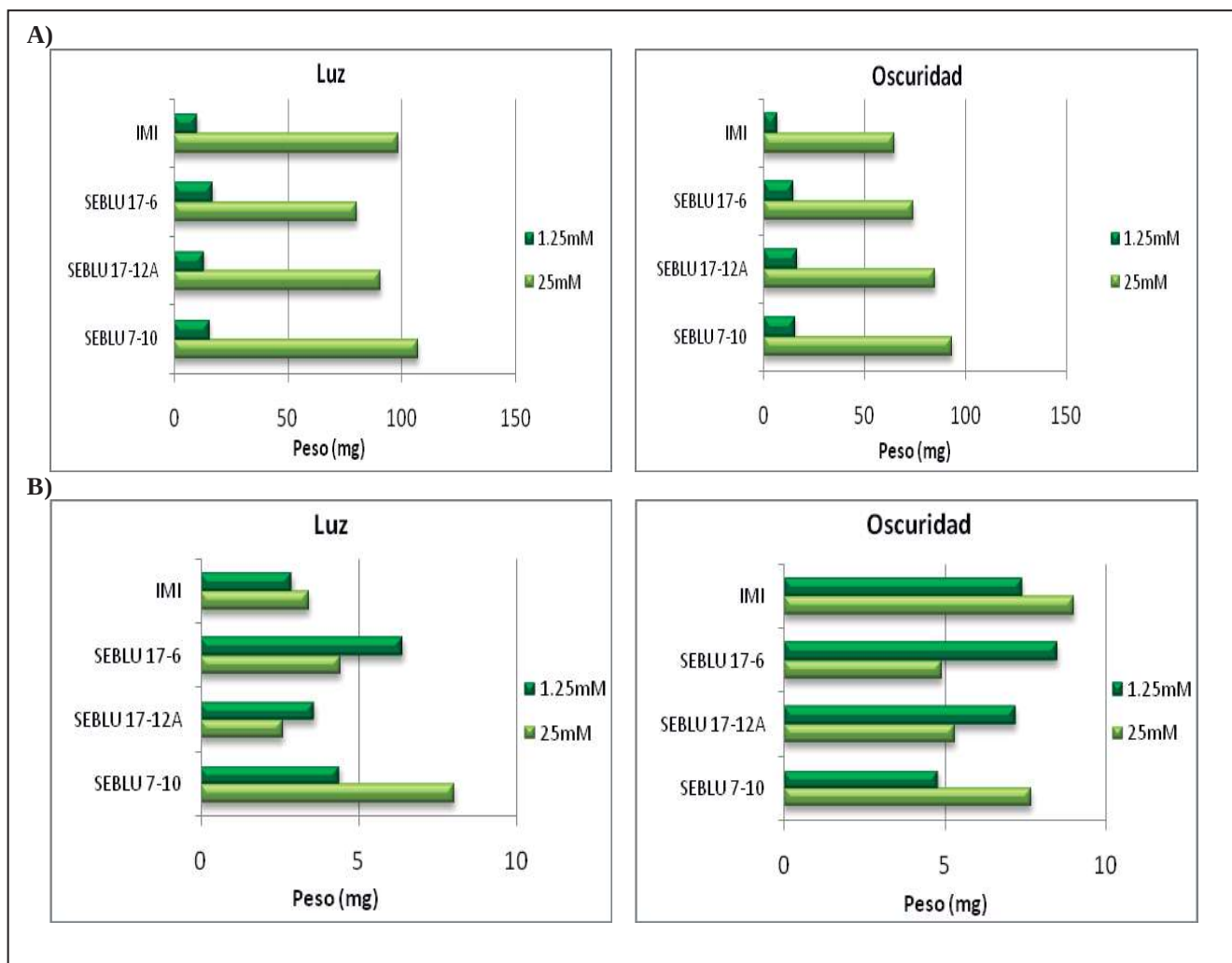


FIGURA 23. Determinación de la biomasa (mg) de *T. atroviride* IMI, SEBLU 17-6, SEBLU 17-12A y SEBLU 7-10 bajo condiciones de luz y oscuridad, utilizando como fuentes de nitrógeno  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (A) y  $\text{KNO}_3$  (B) en concentración estándar (25mM) y limitante (1.25mM).

La sobreexpresión de los genes *blr1* y *blr2* de *T. atroviride* IMI origina un fenotipo de reducción en la formación de conidias y de hiperconidiación respectivamente (Esquivel-Naranjo y col, 2007). Con el fin de establecer el efecto de la fuente de N (tipo y concentración) sobre el fondo genético de sobreexpresión de los genes *blr* respecto a la formación de conidias y crecimiento, se llevaron a cabo los ensayos correspondientes descritos en materiales y métodos. Al igual que con las mutantes *BLRs* utilizando como fuente de N amonio en la concentración estandar las mutantes *SEBLRs* conidieron muy poco en presencia de luz, la *SEBLR 1-8* unas 70 veces menos y la *SEBLR 2-13* unas 4 veces. En la concentración limitante la producción de esporas fue mucho menor. Mientras que en oscuridad la concentración de conidias bajo considerablemente llegando a ser nula en la *SEBLR 2-13* sin importar el medio utilizado. En cuanto a la producción de micelio aquí las mutantes *SEBLRs* tuvieron una producción mayor que la cepa silvestre tanto en luz como en oscuridad ya que en ambos medios se mostro el mismo comportamiento, sobresaliendo la mutante *SEBLR 1-8*. Mientras que al utilizar el nitrato la conidiacion fue menor que en la cepa silvestre tanto en luz como en oscuridad, aunque en esta ultima la condición limitante fue la que tuvo producción de conidias algo que no sucedió con la cepa silvestre, además de que en el medio NO25 no hubo presencia de conidias para las mutantes *SEBLRs*. En cuanto a la obtención de biomasa utilizando nitrato esta fue muy escasa, aunque en condiciones de luz y en ambos medios (NO25 y NO1.25) la producción de micelio de las *SEBLRs* resulto ser mayor que el de la cepa parental destacando con una producción mayor la cepa *SEBLR 1-8*. En ausencia de luz el comportamiento fue similar al obtenido en luz pero aquí la cepas *SEBLRs* tuvieron una producción menor de micelio que en dicha condición y al obtenido por la cepa silvestre.

Las mutantes *ASBLUs* tienen una expresión del cDNAs en orientación antisentido en el vector pUE08 ocurriendo un silenciamiento de aquellos genes regulados por la luz (Esquivel-Naranjo y col, 2007). Las mutantes *ASBLUs* conidieron ligeramente menos que la cepa silvestre, siendo la de mayor producción de conidias la *ASBLU 22-1* esto en la concentración estándar de amonio y en presencia de luz. Cuando la fuente de nitrógeno se limito (1.25mM) la cepa parental se vio afectada considerablemente ya que la concentración de conidias disminuyo bastante, hecho que también ocurrió en las mutantes *ASBLUs* habiendo en algunos casos la ausencia de conidias como en la *ASBLU 7-1*. Mientras que en

oscuridad en el caso particular de la cepa *ASBLU* 5-2 la ausencia de luz tiene un efecto importante ya que no hay formación de conidias esto independientemente de la concentración de amonio utilizada, mientras que este fenómeno también se presentó en las cepas *ASBLU* 5-2, *ASBLU* 15-8 y *ASBLU* 7-7 pero esto solamente en la concentración estándar de amonio, respuesta que no ocurrió en la cepa silvestre independientemente del medio. En cuanto a la producción de micelio el cual se determino por peso seco a los 5 días de incubación, en la concentración estándar de amonio las mutantes *ASBLUs* tuvieron una mayor producción de micelio que la cepa parental siendo la *ASBLU* 5-5 la de mayor producción, mientras que en la limitación de amonio (1.25mM) se dio una escasa producción de micelio todo esto en presencia de luz. En oscuridad en la cepa silvestre se observó una disminución considerable respuesta que no ocurrió en algunas mutantes *ASBLUs* (*ASBLU* 5-2 y *ASBLU* 5-5) las cuales tuvieron un pequeño aumento. Al utilizar nitrato como fuente de N las mutantes *ASBLUs* se comportaron de manera muy similar al tener un rango máximo de  $10^5$  conidias/ml esto en el medio NO25 y en presencia de luz, por otro lado la condición limitante de nitrato si tuvo efecto sobre la concentración de conidias producidas en todas las cepas incluida la silvestre esto en presencia de luz. Por el contrario en oscuridad la limitación inhibió la producción de conidias en las cepas *ASBLU* 15-8, *ASBLU* 7-1 y *ASBLU* 7-7 pero aquí sin importar la concentración de nitrato utilizada, respuesta que también ocurrió en la cepa parental, mientras que para la cepa *ASBLU* 22-10 dicho efecto de no producir conidias solo se dio en el medio limitante (NO1.25). Respecto a la producción de micelio utilizando nitrato se observó una muy escasa producción de micelio en todas las cepas incluyendo la silvestre independientemente del medio utilizado y de la presencia o ausencia de luz aunque en la condición limitante con luz se observó una mayor producción de micelio independientemente de la concentración de N.

Como otra forma de estudiar la relación de la fotoconidiación con los genes encargados de la regulación de la luz, se realizó una sobre-expresión de estos genes, estas transformantes al igual que las anteriores se nombran considerando el efecto de la sobre-expresión de los genes por ejemplo sobre-expresión del gen *blu* 17 (*SEBLU* 17) (Esquivel-Naranjo y col, 2007). En condiciones estándar de la concentración de amonio 25mM la producción de conidias en las mutantes *SEBLUs* fue menor que la cepa parental teniendo un rango máximo de  $10^7$  conidias /ml esto en presencia de luz, cuando la fuente de nitrógeno se

redujo 20 veces (1.25mM) tanto la cepa parental y las *SEBLUs* disminuyeron considerablemente la producción de conidias, por otra parte en oscuridad las cepas *SEBLUs* disminuyeron la concentración de conidias en ambos medios (NH25 y NH1.25), teniendo un efecto similar al de la cepa silvestre alcanzando un rango máximo de  $10^5$  conidias /ml excepto en la condición limitante de la cepa *SEBLU 7-10* en la cual no hubo producción de conidias. En cuanto a la producción de micelio en la concentración estándar de amonio y en presencia de luz la cepa *SEBLU 7-10* tiene la mayor producción de micelio superando aun a la cepa silvestre, mientras que al reducir 20 veces la concentración de nitrógeno es notable la presencia de este efecto por la poca producción, siendo la *SEBLU 17-6* la que produjo más aun que la cepa silvestre. Ahora en oscuridad en la concentración estándar las cepas mutantes *SEBLRs* tuvieron mayor producción de micelio que la cepa parental, mientras que en la condición limitante ocurrió lo mismo que en la concentración estándar pero con un descenso considerable en la producción de micelio. Por otra parte al utilizar nitrato a una concentración estándar la producción de conidias fue similar en número entre todas las cepas incluyendo a la silvestre en un rango máximo de  $10^5$  conidias/ ml esto claro en presencia de luz. Mientras que bajo la condición limitante de nitrato hay un efecto mínimo sobre la cepa *SEBLR 17-12A* la cual tiene un ligero aumento en la producción de conidias bajo esta condición, no teniendo este mismo efecto en las demás cepas. Por otro lado la ausencia de luz inhibió la producción de conidias en la cepa silvestre en la condición limitante de nitrato, mientras que la cepa *SEBLU 7-10* no formó conidias independientemente de la concentración de N, mientras que las demás *SEBLUs* tienen un comportamiento similar entre ellas teniendo una pequeña producción de conidias tanto en la concentración estándar como en la limitante. Respecto a la utilización de nitrato como fuente de N no fue tan productiva en la producción de micelio ya que sin importar medio y condición luminosa la biomasa que se obtuvo fue muy poca, destacando el aumento en la condición limitante tanto de luz y de oscuridad de las cepas *SEBLU 17-6* y *SEBLU 17-12A*.

## VII

### CONCLUSIONES

- La limitación en la fuente de N como (NH<sub>4</sub>) promovió un aumento en la formación de conidias en las mutantes *BLR*, estando ligado esta respuesta a la presencia de luz.
- La velocidad de crecimiento de la cepa *BLR2* es notablemente superior al de la cepa parental independientemente de la concentración de amonio como fuente de N analizada.
- La utilización de las fuentes de N ya sea amonio o nitrato es similar entre la cepa silvestre y mutantes *BLR*, teniendo para el nitrato un efecto notorio en la limitación sobre el crecimiento y conidiación de las cepas.
- Las mutantes *SEBLR 1-8* y *SEBLR 2-13* no muestran una respuesta a la limitación de amonio sobre la formación de conidias, siendo la producción inferior en todos los casos a la cepa silvestre.
- Todas las mutantes *ASBLU* y *SEBLU* tienen valores de producción de conidias inferiores a la cepa silvestre cuando el amonio es utilizado como fuente de N.

Por otra parte en medio conteniendo NO<sub>3</sub> como única fuente de N la producción de conidias llegó a ser superior a la cepa silvestre como en el caso de la mutante *ASBLU 5-2*, *ASBLU 7-7*, *ASBLU 22-1* y *ASBLU 22-10*.

## VIII

### BIBLIOGRAFIA

- Ballario**, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabbibo, 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., Sametz-Baron, L., Eichenberg, K., Horwitz, B. A. and Herrera-Estrella, A. (1999). Rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene. *J. Biol. Chem.* 274: 14288-14294.
- 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.
- Betina**, V. (1984). Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Int J Microbiol* 2, 55-68.
- Briggs W.** and Huala E. (1999). Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev Cell Dev Biol* 15, 33-62.
- Briggs, W.** and Olney, M. (2001). Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol* 125, 85-88.
- Casas Flores, S.** (2004). Obtención y caracterización de mutantes de *Trichoderma atroviride* alteradas en la respuesta a la luz azul. Tesis de Doctor en ciencias, especialidad en Biología, CINVESTAV Irapuato.
- 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.

**Esquivel Naranjo E.U.** (2007). Análisis molecular de la percepción de luz en *T. atroviride*. Tesis de Doctorado en ciencias, especialidad de Biotecnología de plantas CINVESTAV Irapuato, Gto.

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

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

**Iseky, M.**, Matsunaga, S., Murakami, A., Ohnu, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T., and Watanabe, M. (2002). Blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena Gracilis*. *Nature* 416, 1047-1051.

**Jarillo, J.**, Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J., Ecker, J. and Cashmore, A. (2001). Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410, 952-954.

**Jiao, Y.**, Lau, O. S. and Deng, X. W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat. Rev. Genet.* 8:217-230.

**Kagawa, T.**, Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., and Wada, M. (2001). *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291, 2138-2141.

**Ko, W. H.**, Nash, A. I. and Gardner, K. H. (2007). A LOVely view of blue light photosensing. *Nat. Chem. Biol.* 3:372-374.

**Lewis, Z.**, Correa, A., Schwerdtfeger, C., Link, K., Xie, X., Gomer, R. (2002). Overexpression of White Collar-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 45, 917-931.

**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.

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

**Ma, L.**, Li, J., Qu, L., Chen, Z., Zhao, H. and Deng, W. (2001). Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 13, 2589-2607.

**Mathews, S.** and Sharrock, A. (1997). Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ.* 20, 666-671.

**Importancia de la luz para plantas y animals** [Citada en Internet] Abril 2008

[http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/48/html/sec\\_5.html](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/48/html/sec_5.html)

***Neurospora crassa***. [Citada en Internet] Abril 2008.

[http://en.wikipedia.org/wiki/Neurospora\\_crassa](http://en.wikipedia.org/wiki/Neurospora_crassa)

***Neurospora crassa***. [Citada en Internet] Abril 2008.

<http://www.microbelibrary.org/Fungi/details.asp?id=688&Lang=Spanish>

**Nutrientes y Gases: Nitrógeno** [Citada en Internet] Abril 2008.

<http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p3-nitrogeno.pdf>

**Papavizas, G. C.** (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. *Ann Rev Phytopath* 23, 23-54

**Sakai, T.**, Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, E., Christie, M., Briggs, R., Wada, M. and Okada, K. (2001). *Arabidopsis nph1* and *npl1*: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6969-6974.

**Smith, H.** (2000). Phytochromes and light signal perception by plants an emerging synthesis. *Nature* 407, 585-591.

**Sommer, T.,** Chambers, J., Eberle, J., Lauter, F. and Russo, V. (1989). Fast light-regulated genes of *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res* 17, 5713-5723.

**Tepperman, M.,** Zhu, T., Chang, S., Wang, X and Quail, H. (2001). Multiple E transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9437-9442.