



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Químico Farmacobiología

Envoy en la Fotorrespuesta de Trichoderma atroviride

TESIS

Sustenta:

Emma Beatriz Beltrán Hernández

Para obtener el Grado de:

Licenciatura en Químico Farmacobiología

Director de la Tesis:

D.C Alfredo H.Herrera Estrella

Morelia, Michoacán Enero 2012



Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme vida, energía y salud para realizar este trabajo, por la capacidad de soñar, pensar y comprender, pero sobre todo por enseñarme la complejidad de todos los seres vivos, la perfección de cada componente de la maquinaria tan elaborada que estructura la vida, la maravilla de ver la importancia de cada procesos que en ella se ejecuta para hacer posible que todo un organismo funcione.

Agradezco al D.C. Alfredo Herrera Estrella del LANGEBIO-CINVESTAV Irapuato, asesor de este trabajo, por la oportunidad de realizarlo, por dejarme formar parte de su grupo de investigación, por su paciencia, por ser un guía y maestro ejemplar, pero sobre todo por su calidad humana que hacen tan ameno trabajar a su lado y aprender el.

Agradezco a los miembros del laboratorio de Expresión Génica y Desarrollo de Hongos (tricho lab): Pedro, Silvia Pérez, Mónica Esquivel, Jose Cetz, Nohemi, Ulises, Alex, Miguel y Edgar, por su compañerismo, por compartir sus conocimientos y enseñarme cuanto desconocía, pero sobre todo gracias por su amistad y hacer feliz trabajar.

Agradezco el esfuerzo incansable de mis padres y hermanos, su apoyo diario, sus palabras de aliento, su sacrificio para hacer posible este sueño. Gracias padre: por fomentar la lucha incansable para lograr mis metas, por permitirme soñar en grande, por enseñarme que los sueños están mas próximos en cada esfuerzo y sobre todo por ser un ejemplo de superación así como de lucha diaria. Gracias a mi madre, por tener siempre la palabra justa para alentarme, por su amor infinito, por su sabiduría, su plena confianza en mí y por ser el pilar de la familia. Josue gracias por saber ser un amigo y escuchar, Eliud gracias por el abrazo justo, hermanos, gracias por convertir mis preocupaciones en una sonrisa.

A mi abuelo que siempre esta presente en cada nueva etapa de mi vida, orgulloso y alentador, gracias abue por todo su amor.

Agradezco a mis amigos Dante, Noe, Char, Viky, Janny, Maga, por su paciencia, apoyo y comprensión en todo momento.

Agradezco a mis profesores de la Facultad de Químico Farmacobiología por los conocimientos que han compartido conmigo y los que me han ayudado a desarrollar, ya que son precisamente estos la herramienta que me ha ayudado a lograr cada paso que doy en el mundo del conocimiento y de forma muy especial al D.C. Octavio Rodiles por ser mi consejero en cada indecisión, por escuchar cada inquietud, por su tiempo, pero sobre todo por su amistad y sencillez.

Agradezco enormemente al D.C. Victor Rocha del CIEco-UNAM campus Morelia, por impulsarme en este camino, gracias por su confianza en mi ya que sin él este trabajo no hubiese sido posible.

Agradezco también a todas las personas que siempre se mantuvieron al pendiente de mi camino y no menos importantes, gracias por sus buenos deseos.

Dedicatorias

A mi novio Mintzirani por que cada día lo hace especial y por hacer de mi vida un hogar feliz en el que me busco refugio a cada momento.

A todas aquellas personas que como yo creen que la ciencia es una ventana a un mundo de conocimiento tan mágico y tan impredecible, totalmente cambiante y sin embargo absolutamente infinito que nos permite conocer tan solo una minima fracción quizá solo comparable al tamaño de un átomo, de cómo se comporta y como se compone la vida y el universo.



“Formamos parte de un universo infinito, tan infinito como el pensamiento o el conocimiento mismo, si bien nunca lo entenderemos completamente, por lo menos nos esforzamos en encontrar, en imaginar y descubrir todo cuanto se pueda y mas, ya que buscamos nuevos sistemas solares, nuevos planetas, vida fuera de la tierra, sin darnos cuenta de que desconocemos todos los sistemas biológicos que conforman nuestro planeta, y ni siquiera entendemos a plenitud la complejidad de la vida en nuestra amada tierra”.

| Índice | Pag. |
|--|-----------|
| I. Resumen..... | 9 |
| II. Introducción..... | 10 |
| 1. La luz..... | 10 |
| 2. Ritmicidad circadiana..... | 11 |
| 3. Fotorreceptores..... | 12 |
| 3.1. Receptores de luz azul | 14 |
| 3.2. Receptores de Luz Roja | 15 |
| 3.3. Receptores de luz verde..... | 16 |
| 4. Dominios PAS/LOV y su función como sensores..... | 17 |
| 5. Respuesta a la luz en hongos | 20 |
| 5.1. Respuestas en <i>Neurospora crassa</i> | 22 |
| 5.2. Respuestas en <i>Trichoderma atroviride</i> | 25 |
| 5.2.1. BLR-1 y BLR-2..... | 26 |
| 6. Activación de la vía de señalización del AMPc en <i>T. atroviride</i> por luz | 29 |
| 7. Utilización de diferentes fuentes de carbono..... | 31 |
| 8. Regulación de la respuesta de luz azul..... | 33 |
| 9. Efectos en la expresión de genes..... | 36 |
| III. Justificación..... | 37 |
| IV. HIPÓTESIS..... | 39 |
| V. Objetivo General..... | 39 |
| 1. Objetivos específicos..... | 39 |
| V. Material y métodos..... | 40 |
| 1. Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento..... | 40 |
| 2. Preinóculos..... | 40 |
| 3. Ensayos de respuesta a Luz..... | 40 |
| 3.1. Ensayos bajo iluminación constante..... | 40 |
| 3.2. Inducción con diferentes dosis de luz azul..... | 41 |

| | Pag. |
|--|-------------|
| 3.3. Ensayo de fotoperiodos..... | 42 |
| 4. Fotoconidiación..... | 42 |
| 5. Análisis del crecimiento..... | 42 |
| 6. Análisis de la expresión génica..... | 43 |
| 6.1. Condiciones para ensayos de expresión génica en respuesta a la luz | 43 |
| 6.2. Inducción de genes a un pulso saturante de luz azul..... | 43 |
| 6.3. Inducción de genes bajo iluminación constante..... | 43 |
| 7. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos..... | 44 |
| VII. Resultados..... | 45 |
| 1. Exceso de Fotoconidiación en la mutante env1-1..... | 45 |
| 2. Efectos de la mutación en morfología y conidiación..... | 47 |
| 3. El crecimiento a la luz azul de Trichoderma atroviride es regulado por Envoy..... | 53 |
| 4. Expresión de Genes..... | 55 |
| 4.1 Expresión bajo un pulso de luz..... | 55 |
| 4.2. Expresión en iluminación constante..... | 56 |
| 5. Crecimiento y Esporulación en diferentes fuentes de carbono..... | 57 |
| VIII. Análisis de datos..... | 58 |
| IX. Conclusiones..... | 63 |
| X. Bibliografía..... | 65 |

| Índice de Figuras | Pag. |
|---|-----------|
| Fig. 1. Genes fúngicos que codifican o se predice que codifican proteínas fotorreceptoras de acuerdo a una corta lista de cromóforos. | 13 |
| Fig.2. Fotofisiología fúngica: Morfogénesis y desarrollo. | 21 |
| Fig.3. Estructura de las proteínas formadoras del complejo <i>withe collar</i> (<i>WC-1</i> y <i>WC-2</i>) así como el fotorreceptor secundario <i>VIVID</i> de <i>Neurospora crassa</i> . | 23 |
| Fig. 4. Efecto de la luz azul en <i>Trichoderma</i> . | 25 |
| Fig. 5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los dominios <i>LOV</i> de <i>BLR-1</i> , <i>WC-1</i> y <i>Phot1</i> (<i>LOV1</i> y <i>LOV2</i>). | 27 |
| Fig.6. Estructura del complejo <i>BLR</i> formado por <i>BLR-1</i> y <i>BLR-2</i> en <i>Trichoderma atroviride</i> , ortólogo al complejo <i>Withe collar</i> de <i>N. crassa</i> . | 28 |
| Fig. 7. Efecto de la dosis de luz en la conidiación de <i>Trichoderma atroviride</i> . | 46 |
| Fig.8. Curva dosis-respuesta. Efecto de la intensidad de luz en la esporulación de <i>Trichoderma atroviride</i> . | 47 |
| Fig.9. Efecto de la luz azul en crecimiento y esporulación de <i>Trichoderma atroviride</i> . | 48 |
| Fig.10. Grafica del efecto de la luz azul en la producción de conidias en la cepa <i>IMI</i> y $\Delta env1-1$ a $2.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. | 48 |
| Fig.11. Efecto de la luz azul en crecimiento y esporulación de <i>Trichoderma atroviride</i> . | 49 |
| Fig.12. Las cepas fueron expuestas a una dosis de $11.6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (40%) de Luz azul durante 72hrs para evaluar el efecto de la luz en la morfología. | 50 |
| Fig. 13. Ensayo de fotoperiodos, para evaluar la fotosensibilidad en la ritmicidad circadiana. | 50 |
| Fig.14. Grafica de la variación de crecimiento observada en el ensayo de fotoperiodos. | 51 |
| Fig. 15. Crecimiento radial en oscuridad. Grafica que muestra la variación en el crecimiento radial de la cepa silvestre (<i>IMI</i>) en comparación con la mutante (<i>env1-1</i>) en oscuridad | 52 |
| Fig. 16. Velocidad de crecimiento radial de la cepa <i>IMI</i> y la cepa <i>env1-1</i> . | 53 |

| | Pag. |
|---|-------------|
| Fig.17. Diferencias morfológicas de las hifas aéreas. | 54 |
| Fig. 18. Cinética de expresión de los genes blu-1 y bld-2 en la cepa IMI y env1-1 sometidos a un pulso de luz saturante 1200 μ mol m ² s. | 56 |
| Fig. 19. Expresión de los genes blu-1 y bld-2 bajo iluminación constante. | 57 |
| Fig.20. Efecto de la mutación en T. atroviride. | 62 |

I. Resumen

Trichoderma atroviride es un hongo ascomiceto de gran importancia por su capacidad micoparasitaria, usado en el ámbito agricultor como biocontrol de hongos fitopatógenos, la forma en que se comercializa y distribuye es a través de esporas, por lo que entender el proceso de esporulación es de suma importancia. *Trichoderma* tiene la capacidad de conidiar (formación de estructuras reproductivas asexuales) por tres mecanismos diferentes: como respuesta a la exposición a luz, por deficiencia de nutrientes y por daño mecánico.

En respuesta a luz azul, *Trichoderma* tiene la capacidad de esporular en el frente de crecimiento que fue expuesto a este estímulo, la percepción de luz se encuentra a cargo de complejos de proteínas unidos a un cromóforo llamadas fotorreceptores, los cuales inciden en cambios conformacionales para la transducción del estímulo, en *Trichoderma* este papel es desarrollado por el complejo BLR, formado por dos proteínas BLR1 y BLR2, estas proteínas contienen dominios PAS (Per, Art, Sim) que le permite a *T. atroviride* obtener información del medio en que se encuentra y controlar la ritmicidad circadiana (variación de actividad entre noche y día), BLR1 contiene 3 dominios PAS, uno de estos dominios es también un dominio LOV capaz de censar variaciones de Luz, oxígeno y voltaje, mientras que BLR2 solo posee 1 dominio PAS, estas proteínas además poseen sitios de unión a DNA tipo dedo de zinc que actúan como factores de transcripción. Este complejo regula la expresión de genes tanto inducidos por luz azul (BLU) que promueven la esporulación, como reprimidos por luz azul (BLD) promotores del crecimiento, es aquí donde un segundo fotorreceptor llamado ENVOY por su función de mensajero en la señalización de celulosa en *T. reesei*, se hace cargo de regular tanto a los genes BLU como a los BLD, ENVOY es una proteína que codifica un pequeño dominio PAS/LOV que conserva un sitio de unión a FMN, en la señalización por luz se propone que regula negativamente a los genes inducidos por luz, para promover el crecimiento en luz constante (fotoadaptación) de acuerdo al estudio en *T. reesei*, en este trabajo se busca esclarecer la función de ENVOY en la respuesta de *T. atroviride* a la luz azul, mediante el estudio del comportamiento de una cepa carente del gen *env1*, en comparación con la cepa silvestre, e identificar el efecto fisiológico de la mutación, para de esta forma dilucidar el proceso de la fotorrespuesta en *T. atroviride*.

Palabras clave: *Trichoderma atroviride*, Envoy, blr-1, blr-2, PAS/LOV, fotoesporulación, fotorreceptores, fotoadaptación.

II. Introducción

1. La luz:

Los seres vivos detectan y responden a los cambios en las condiciones de su entorno y para ello se valen de diversos y complejos mecanismos, los cuales transforman el estímulo recibido en señales que provocan cambios bioquímicos y fisiológicos en las células de los organismos (Briggs-Huala, 1999). A lo largo de la evolución todas las formas de vida han sido expuestas a la radiación electromagnética emitida por el sol. En el sol se desarrollan reacciones de fusión termonuclear, liberando grandes cantidades de energía que se encuentran en forma de radiación electromagnética, a la se le conoce como luz (Rios-Momberg, 2004). Nuestro sol emite luz en un amplio rango de longitudes de onda, de la cual la radiación de mayor longitud de onda es la llamada infrarroja, siendo la mayormente transformada en movimiento molecular (calor). La radiación de baja longitud de onda, corresponde al ultravioleta (UV), y tiene la capacidad de iniciar reacciones fotoquímicas en moléculas de importancia biológica. Entre las moléculas que pueden ser afectadas por la radiación UV el ADN cobra gran importancia, ya que el resultado de una de sus reacciones puede ser transmitida como una mutación a la siguiente generación. (Lledias-Hansberg, 2000)

Las reacciones mediante las que se lleva a cabo los procesos metabólicos, son reacciones de oxidación-reducción, las cuales involucran la transferencia de electrones de una molécula donadora a una molécula aceptora. El aceptor terminal para pares de electrones removidos de metabolitos por su oxidación, es el oxígeno molecular (O_2), el cual solo puede aceptar electrones de uno en uno, lo cual se realiza por el sistema de transporte de electrones. Para la transferencia de los electrones, se necesita el uso de moléculas conjugadas (Cromóforos) que tienen un estado de oxidación de radical estable, pudiendo de esta forma realizar reacciones de traspaso de uno o de dos electrones, ejemplo de estas moléculas de activación por luz tenemos a las Flavinas o porfirinas (Voet –Voet, 1994)

La energía absorbida por las flavinas cae en rango UV cercano/azul esta radiación también puede dañar las moléculas a través de su capacidad para iniciar reacciones productoras de radicales libres de forma no controlada, en muchos de los casos involucrando especies reactivas de oxígeno (M. Schmoll et al., 2010). Los metabolitos parcialmente reducidos y altamente reactivos, pueden formarse durante las reacciones de transferencia de electrones, como aquellas en las que interviene la luz; entre estos metabolitos se incluye el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los cuales se forman debido a que el oxígeno pierde uno o dos electrones, respectivamente. En presencia de iones de metales de transición, puede formarse el radical hidroxilo (OH) que es más reactivo. Estos metabolitos parcialmente reducidos se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y son considerados como subproductos tóxicos del metabolismo; éstas moléculas pueden causar daño a lípidos, proteínas y ADN. (Thannical y Fangurg, 2000). Bajo estos términos la luz azul es potencialmente perjudicial. Cuando se detecta la presencia de ROS, la célula inicia la síntesis de toda una batería enzimática (catalasas, superóxido dismutasas y peroxidasas, entre otras) destinadas a controlar estas moléculas, así como también se sintetizan proteínas de reparación como las fotoliasas, que son las encargadas de la reparación de daños al ADN causado por la luz UV y péptidos pequeños como glutatín y tiorredoxina que soportan cambios redox generados por las ROS (Lledias-Hansberg, 2000)

2. Ritmicidad circadiana

La luz solar incide sobre nuestro planeta en periodos de luz/oscuridad presentes en un ciclo total de 24 horas, los seres vivos se han adaptado y son capaces de responder a las variaciones de la luz en este ciclo. Parte de esta adaptación en los seres vivos es mantener un registro de este ritmo, el cual no siempre es exactamente un periodo de 24 horas, pero sí muy aproximado, a este fenómeno se le denomina “reloj circadiano” ó “ritmo circadiano”, siendo una señal que

permite preparar anticipadamente la respuesta y se ha observado que este fenómeno se conserva aun en condiciones artificiales. (Ouyang et al., 1998).

Por ello es comprensible que la luz solar sea un elemento significativo para el mantenimiento de la vida, y que, además de la utilización de esta energía e información, durante la evolución muchos mecanismos han sido seleccionados por su capacidad de resistir estos efectos negativos. Por lo tanto la luz tiene roles contrastantes en relación a la vida, por una parte todos los organismos dependen de esta energía e información, y por otro lado puede llegar a ser potencialmente dañina, incluso causar muerte. Para la vida fúngica en la luz, los hongos requieren ajustes significativos en numerosos procesos regulatorios, que se refleja en los efectos regulatorios de su comportamiento (Herrera Estrella-Horwitz, 2007; Tisch - Schmoll, 2009).

3. Fotorreceptores

La percepción de la luz es particularmente importante en todos los organismos, desde bacterias y cianobacterias hasta animales, ya que la luz se encuentra regulando procesos tales como la fotosíntesis, fototropismo, la programación de ciclos circadianos, regulación del transporte de iones, y fototaxis, en el caso de los hongos, estos tienen una serie compleja de respuestas a la luz que van desde la síntesis de pigmentos hasta la regulación de los programas reproductivos (Chorrochano - Galland, 2006)

La percepción de este estímulo esta a cargo de proteínas o complejos de proteínas especializadas llamadas fotorreceptores, identificados en bacterias, arqueobacterias y eucariontes. Los fotorreceptores son complejos proteína/cromóforo, formadas por una apoproteína y una molécula de bajo peso molecular capaz de absorber fotones de una longitud de onda específica denominada cromóforo, y es el cromóforo lo que le da la especialidad al

fotorreceptor. En el caso de las plantas, estas poseen una compleja red para la percepción de la luz y la transducción de las señales que les permiten detectarla y responder a los cambios de esta, tales como: intensidad, dirección, duración y calidad de la luz. A esta capacidad se le denomina Fotoadaptación. Las plantas emplean al menos tres tipos de fotorreceptores: los criptocromos, las fototrópicas (que detectan la región UV cercana/ azul del espectro) y los fotocromos (que detectan en la región de luz roja/rojo lejano del espectro) (Frohlich et al., 2005). En organismos no fotosintéticos se han identificado receptores tipo opsinas y criptocromos. Las opsinas presentan un amplio rango de absorción y son mediadoras en el proceso de fototaxis en procariontes (Spudich, 2006) y responsables de la visión en los animales (Browmaker, 2008), mientras que los criptocromos se han asociado al encarrilamiento de los ciclos circadianos (Lin y Todo, 2005). Versiones de varios de estos fotorreceptores se han encontrado en bacterias, como las rodopsinas, los bacteriofitocromos y los criptocromos-DASH. (spudich, 2006; Karniol et al. 2005; lin y todo, 2005) los hongos también poseen una serie de fotorreceptores capaces de percibir diferentes longitudes de onda y el estudio de sus respuestas a la luz ha ocupado a especialistas en la investigación del desarrollo de estos organismos (tabla 1) (Chorrochano y Galland, 2006; Purshwitz et al. 2006; Herrera y Horwitz, 2007).

Fig. 1. Genes fúngicos que codifican, o se predice que codifican proteínas fotorreceptoras de acuerdo a una corta lista de cromóforos.

| Cromóforo | Absorción máxima | Apoproteína | Neurospora crassa | Ejemplos en otros hongos |
|-------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|--|
| Retinal | Verde | Opsina | <i>nop-1 orp-1</i> | <i>Lm ops</i> , <i>Cn ops1</i> , <i>Gf carO</i> |
| Fitocromobilina | Rojo, rojo lejano | Fitocromo | <i>phy-1 phy-2</i> | <i>An fphA</i> ; varias especies, (ver Kamiol et al. 2005) |
| Flavinas | Azul, UV-A | Fotoliasa/ | <i>Phr-1</i> | <i>Ta phr1</i> , <i>Fo phr1</i> , <i>Bo phr1</i> |
| (FMN, FAD) | (semiquinona: rojo) | Criptocromo | <i>Cry (DASH)</i> | |
| | | PAS/LOV | <i>Wc-1 vvd</i> | <i>Tr envoy</i> |
| | | AppA/BLUF | | <i>Um</i> |

An: Aspergillus nidulans; Lm: leptosphaeria maculans; Ta: Trichoderma Atroviride; Tr: Trichoderma reesei; Bo: Bipolaris oryzae; Cn: Cryptococcus neoformans; Um: Ustilago maydis; Gf: Gibberella fujikuroi.

(Herrera-Estrella y Howirtz, 2007)

3.1. Receptores de luz azul

La luz azul en el rango UV cercano/azul regula en plantas superiores una variedad de respuestas incluyendo el fototropismo, inhibición de la elongación del hipocotilo, la expresión de varios genes, la abertura de los estomas y la relocalización de los cloroplastos. Entre los receptores que absorben a la luz en el rango UV-azul se encuentran dos grandes grupos: los fotorreceptores con dominios PAS-LOV y la familia Criptocromo/fotoliasa.

Estudios en eucariontes han permitido identificar varios tipos de fotorreceptores para luz azul, los cuales son proteínas unidas a flavinas: los criptocromos, que son similares a las fotoliasas, usan FAD como cofactor y funcionan como fotorreceptores de luz azul para relojes circadianos y otras respuestas asociadas en insectos; y recientemente se han identificado a una adenilato ciclasa que une FAD, como el fotorreceptor de luz azul responsable de las respuestas de “fototaxis” en *Euglena gracilis* (Cheng et al., 2003).

Entre los fotorreceptores con dominios PAS-LOV encontramos a las fototropinas, moléculas que contiene una molécula de Flavin-mononucleótido (FMN) como cromóforo. Las fototropinas de plantas son cinasas de proteínas reguladas por la luz, median el fototropismo y otros procesos; estas contienen dos dominios LOV en el extremo carboxilo terminal de su dominio de serina/treonina. Análisis bioquímicas de los dominios LOV de las fototropinas mostraron que cada dominio LOV une de forma no covalente una molécula de FMN, la cual realiza un motociclo totalmente reversible (Cheng et al., 2003). También en este grupo se encuentra uno de los fotorreceptores más importantes de los hongos: el complejo Withe Collar (WCC). Este complejo, inicialmente descrito en el ascomiceto *Neurospora crassa*, se encuentra formado por dos proteínas, WC1 y WC2, ambas proteínas poseen dominios PAS de interacción entre proteínas, además de dominios de unión a ADN y dominios de activación de la transcripción, esto les permite funcionar como factores de transcripción, regulando directamente la expresión de genes que responden a luz (Linden, 2002).

La familia criptocromo/fotoliasa esta compuesta por un grupo de proteínas que unen dos cromóforos: FAD y una pterina o deazaflavina. En los criptocromos se pueden distinguir dos dominios: un dominio N-terminal, el cual posee gran similitud de con las fotoliasas. Posee también un dominio C-terminal en cuyo extremo contiene una extensión de aminoácidos, poco conservado y de longitud variable, cuya función es actuar como un dominio efector activando las respuestas inducidas por la luz azul en plantas. (Chen et al., 2004; Yu et al., 2007; Lin y Todo, 2005). La actividad de fotoliasas se limita a la reparación de daños causados por la luz UV al DNA, a este fenómeno se le denomina fotorreparación. Los criptocromos de organismos eucariontes superiores carecen de actividad fotorreparadora, teniendo en cambio la función de reprogramar el ciclo circadiano en respuesta a la luz, tanto en plantas como en animales y la regulación de la fotomorfogénesis en plantas. (Lin y Todo, 2005; Jiao, et al. 2007). Recientemente se han asociado estos fotorreceptores con la orientación en algunas especies migratorias (Zhun et al, 2007; Leidvogel, 2008).

Tanto los criptocromos como las fotoliasas, se encuentran codificadas en los genomas de varios hongos. En *Aspergillus nidulans* se ha demostrado que el único gen que codifica un criptocromo regula negativamente el desarrollo sexual del hongo y además conserva la función de fotoliasa. (Bayram, et al. 2008). De forma similar, *Phr-1* ortólogo de otros criptocromos en hongos, se encuentra regulando negativamente la formación de conidias y presenta actividad de fotoliasa en *Cercospora Zea-maydis* (Bluhm y Dunkle, 2008).

3.2. Receptores de Luz Roja

Las moléculas encargadas de la percepción de la luz roja son los fotocromos, estos son fotorreceptores capaces de discriminar la proporción ambiental entre la luz roja y roja lejana, han sido ampliamente estudiados en plantas, en las que regulan el crecimiento y los cambios entre distintas etapas del desarrollo en respuesta a este estímulo, que constituye un rango de longitud de onda muy informativo para organismos fotosintéticos también regulan la germinación de las semillas, fotomorfogénesis y ritmos circadianos(Jiao et al, 2007; Chen et al,

2004; Gärther y Braslavsky, 2003). Estos fotorreceptores se encuentran tanto en plantas y flores como en las criptopagamas, también se encuentran en las cianobacterias y las bacterias púrpuras, todos ellos organismos fotosintéticos. Sin embargo los fitocromos no son exclusivos de organismos ya que se han encontrado también en bacterias heterotróficas como *Deinococcus radiodurans* y *Pseudomonas aeruginosa* (Davis et al, 1999).

Los fitocromos, como se describen en las plantas, son cromoproteínas homodiméricas, que consisten en dos polipéptidos de aproximadamente 120 kDa. Cada polipéptido se organiza en dos grandes dominios: el dominio fotosensor, localizado en la región N-terminal y un dominio efector en la región C-terminal, el cual media la dimerización, además posee actividad de cinasa (Quall, 2002). El cromóforo de estos fotorreceptores es una molécula de tetrapirrol lineal, que establece una unión covalente con una cisteína, que se encuentra conservada en el dominio de unión al cromóforo. Esta molécula de tetrapirrol difiere entre los grupos de fitocromos; en plantas y cianobacterias el cromóforo natural es la fitocromobilina (PΦB) o la ficocianobilina (PCB), mientras que en los hongos y las bacterias el cromóforo es biliverdina (BV Xla)(Bhoo et al, 2001; Blumenstein et al, 2005). Estos fotorreceptores se pueden encontrar en dos formas interconvertibles: una forma *Pr* que absorbe luz roja y otra forma *Pfr* que absorbe luz roja lejana, esto debido a las diferencias estructurales y su sitio de unión en la proteína (Chen et al, 2004; Batshauer, 2003).

3.3. Receptores de luz verde

Otras proteínas capaces de absorber la luz son las opsinas, que son los principales pigmentos fotorreceptores usados en la visión de los animales. Estas proteínas se encuentran formadas por aproximadamente 350 aminoácidos integrando 7 α -hélices transmembranales que unen retinal como cromóforo, cuya máxima absorción se encuentra en el rango verde de la luz visible. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en todos los reinos de la vida,

desde arqueobacterias hasta mamíferos. Pertenecen a un grupo de receptores de membranas asociados a proteína G. (Kateriya et al, 2004).

Las variaciones en los aminoácidos que forman el bolsillo donde se coloca el retinal determinan el espectro de absorción de cada opsina. De esta manera se pueden encontrar a las rodopsinas bacterianas, que pueden responder a la luz azul y a la luz naranja, funcionando como reguladoras del proceso de fototaxis y como bombas de iones reguladas por luz (Spudich, 2006), también se encuentran cinco familias de opsinas responsables de la visión en los vertebrados y que pueden absorber la luz en rango violeta, azul, verde y verde-rojo (Browmaker, 2008). Aunque este tipo de fotorreceptores se encuentran codificados en los genomas de varios hongos, no ha sido posible asignarles función. Solamente en el caso de *nop-1* de *N. crassa* que codifica una opsina que une trans-retinal como cromóforo, formando un pigmento foto-activo absorbente de luz visible con un pico máximo de 534nm (luz verde) (Bieszke et al, 1999a-b), ha sido posible establecer que este gen está relacionado con las fases tardías de la esporulación asexual y su expresión se encuentra regulada negativamente por *wc2*, de forma totalmente independiente de luz (Bieszke et al, 2007).

4. Dominios PAS/LOV y su función como sensores

Los dominios *PAS* son importantes módulos de señalización que monitorean cambios en luz, potencial redox, oxígeno, pequeños ligandos y niveles de energía celular. A diferencia de muchos módulos sensores, los dominios *PAS* se localizan en el citoplasma (Taylor y Zhulin, 1998). El descubrimiento de las proteínas *Aer* de la *Escherichia coli* y el proceso de análisis de la proteína *Inl* de *Azotobacter vinelandii* han mostrado que dichas proteínas transductoras de señal tienen un dominio *PAS*, asociado a *FAD* como cofactor y que detecta cambios redox en el sistema de transporte de electrones o en el estado redox intracelular (Bibikov et al., 1997; Hill et al., 1996). Los dominios *PAS* pueden

detectar factores ambientales que crucen la membrana celular y/o afecten el metabolismo celular como el oxígeno, potencial redox, o fuerza protón-motriz como una vía para monitorear cambios de energía en las células (Taylor y Zhulin, 1998).

Se han identificado dominios *PAS* en proteínas desde bacterias hasta eucariontes. Estas proteínas incluyen cinasas de histidina o serina/treonina, quimiorreceptores y fotorreceptores para la taxis y el tropismo, proteínas de ciclo circadiano, canales iónicos activados por el voltaje, fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos o reguladores de la respuesta a hipoxia y a desarrollo embrionario del sistema nervioso central. Los dominios *PAS* se conjugan con una gran variedad de módulos regulatorios en proteínas multidominio. Como resultado, una gran mayoría de respuestas celulares a los cambios en el medio ambiente y a las condiciones intracelulares, son controladas vía receptores, traductores y reguladores que contienen dominios *PAS*. Se han identificado dominios *PAS* en más de 200 proteínas de diferentes organismos (Taylor y Zhulin, 1998).

PAS es un acrónimo formado por nombres de las proteínas en donde por primera vez fue reconocida una secuencia repetida imperfecta: *PER*, la proteína de periodo del ciclo circadiano de *Drosophila*, *ARNT*, el traslocador de receptores nucleares de aril-hidrocarburos en vertebrados, y *SIM*, la proteína "Single-minded" de *Drosophila*. Los estudios sugieren que los dominios *PAS* comprenden una región de aproximadamente 100 a 120 aminoácidos. Es frecuente encontrar dominios *PAS* en pares en activadores transcripcionales de eucariontes mientras que las proteínas se pueden encontrar desde uno hasta más de seis (Nabu et al., 1991).

Los dominios *PAS* se encuentran de forma predominante en proteínas que están involucradas en la transducción de señales. De las más de 200 proteínas en las que se han encontrado dominios *PAS*, se ha propuesto que la mayoría de ellas

funcionan como receptores, transductores de señales y factores de transcripción (Zhulin et al, 19997).

En una vía de señalización típica, el receptor detecta e interactúa con el estímulo y traduce una señal que puede ser procesada por la célula. En algunas vías de señalización la señal del receptor es autotransducida a una forma diferente de energía por una segunda proteína, la segunda proteína es llamada transductor. La transducción de señales es dirigida mediante interacciones proteína-proteína y la interacción generalmente se realiza por los dominios *PAS*. El centro del dominio puede determinar la especificidad de la interacción. Los dominios *PAS* permiten el aumento de la estabilidad y de la especificidad de los dímeros de proteínas, esto también aumenta la respuesta de unión a DNA cuando los dímeros actúan como factores transcripcionales (Huang et al., 1993)

Existe un tipo específico de dominios *PAS* que se encargan de la percepción de señales emitidas al detectar los estímulos de la luz, el oxígeno y el voltaje a estos se les denomina dominios *LOV* (Luz, Oxígeno y Voltaje) el agotamiento de los niveles de energía celular se detecta primeramente como un decremento en el sistema de transporte de electrones y la fuerza protón motriz que precede un cambio notorio en la concentración de ATP. Monitorear el sistema de transporte de electrones o la fuerza protón-motriz puede alertar rápidamente a la célula sobre la energía. Los efectos metabólicos del oxígeno, la luz, la fuerza protón-motriz y el potencial redox están relacionados con el nivel en el flujo de equivalentes reducidos a través del sistema de transporte de electrones. Esto permite a la célula, que detectando cualquiera de estos parámetros, pueda detectar los niveles de energía celular. La detección directa del oxígeno puede ser ventajosa en células que tienen reacciones enzimáticas que son inactivados por oxígeno. Detectar la fuerza protón-motriz o el potencial redox puede proveer una forma más versátil de medir la energía celular (Taylor y Zhulin, 1998).

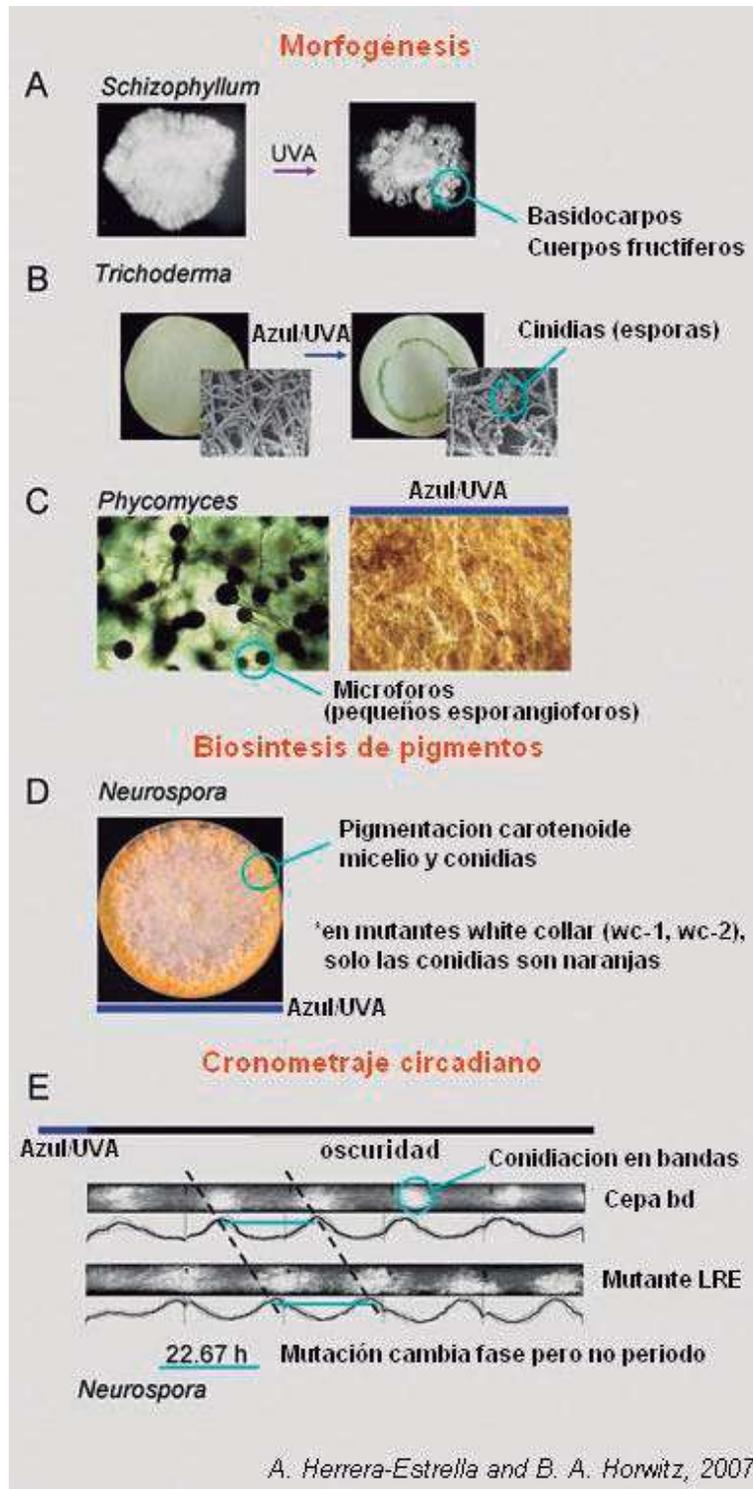
Los dominios *LOV* unen una molécula de flavin mononucleótido (*FMN*), y cíclicamente modifican su estructura de forma dependiente de la luz. La

estructura cristalizada del complejo *LOV-FMN*, revelan un conjunto de residuos cercanos a *FMN* los cuales son altamente conservados, sugieren que las uniones a flavina le confieren la función de receptores de luz azul.

Las formas generales de los dominios *LOV* muestran los mayores picos de absorción a 360 y 450nm, pero cuando absorben luz, el patrón de absorbancia cambia, presentándose especies que absorben de forma máxima a los 390 nm. Este intermediario ha sido señalado como el aducto flavina-cisteína entre la proteína y el carbono (C4) del cromóforo (*FMN*), este aducto se rompe de manera espontánea y la proteína vuelve a su estado general ([Salomón et al., 2000](#)). La estructura permite identificar que la molécula *FMN* esta interactuando de forma no covalente, el lugar corresponde al azufre de la cisterna 39 a aproximadamente 4.2 Å del C4 del *FMN* ([Swartz et al., 2001](#))

5. Respuesta a la luz en hongos

Los hongos filamentosos, como otros microorganismos, responden a una variedad de señales ambientales, recibiendo de ellas información acerca de su entorno, para de esta forma regular positiva o negativamente su comportamiento en cuanto a la orientación del crecimiento micelial, nutrientes contenidos en el medio, dispersión de esporas y otros estreses. Una respuesta a la luz puede ser muy rápida, simplemente reorientando la dirección del crecimiento, o proveer la fuente inicial de alterar los perfiles transcripcionales. Estas en su momento proveen las enzimas y metabolitos necesarios para la protección contra el daño, así como programando la diferenciación de nuevas estructuras, ([Herrera y Horwitz, 2007](#)). En los hongos, la luz azul-UVA regula el fototropismo, la carotenogénesis, el crecimiento, la reproducción y los ritmos circadianos. Fig.2. ([Linden y col., 1997](#); [Casas-Flores y col., 2004](#); [Schmoll y col., 2005](#); [Silva y col., 2006](#); [Idnurm y col., 2006](#)).



A. Formación de cuerpos fructíferos en *Schizophyllum commune*. Las colonias fueron crecidas en oscuridad (izquierda) o expuestas a luz UV-A (derecha) y fructificación reportada tres días después.

B. Un breve pulso de luz azul induce esporulación en *Trichoderma atroviride*. Las colonias fueron crecidas en papel filtro con medio líquido; las esporas solo son visibles (derecha), en el perímetro de la colonia donde el estímulo de luz fue recibido, 24 horas después la foto fue tomada. Escaneo EM (Inserción) muestra la hifa (izquierda) e hifa y conidioforos (derecha).

C. Bajo condiciones apropiadas, opciones de desarrollo están determinadas por la luz en *Phycomyces*. Izquierda, microforos formados en la oscuridad. La luz azul inhibe formación de microforos. En ambos casos los esporangioforos grandes se eliminaron.

D. Luz azul continua promueve síntesis de carotenoides en *Neurospora*.

E. Control circadiana de conidiación en *Neurospora*. Los genes *white collar* (*wc-1* y *wc-2*), descubiertos en una pantalla para detectar regulación de biosíntesis de pigmentos codifican el fotoregulador mejor caracterizado, el complejo *white collar* (*wcc*). Aquí se muestra la configuración de la fase de transferencia de luz a oscuridad en la banda (*bd*) los

antecedentes genéticos, y la fase alterada en un mutante carente de un elemento responsivo a luz (*LRE*) reconocido por el *WCC* en el promotor del gen *frq*. *FRQ*, es el centro del reloj circadiano.

Esta mutante se deleta de la parte proximal de los dos *LREs* en el promotor de *FRQ*

Fig.2. Fotofisiología fúngica: Morfogénesis y desarrollo.

5.1. Respuestas en *Neurospora crassa*:

Un mayor avance para el entendimiento de los mecanismos de señalización disparados por la luz en organismos fúngicos, se realizó tras la identificación de dos proteínas "white collar (WC)", WC-1 y WC-2, como componentes clave de las respuestas a luz en *Neurospora* (Linden y Macino, 1997).

Fue así que el hongo modelo para el estudio de la fotomorfogénesis llegó a ser el ascomiceto *Neurospora crassa*, que responde de muchas formas a la luz. Su pigmentación es debida a las grandes cantidades de β -caroteno que sintetiza en las esporas asexuales (conidias) y en las hifas del micelio (Linden et al., 1997). En este hongo la síntesis de carotenoides, la inducción de protoperipecios, cambios en el potencial de membrana, la inducción del crecimiento de las hifas, la formación de las esporas, la programación del ciclo circadiano, el fototropismo de los sacos periteciales, la inducción de la expresión génica y modificación proteica, son respuestas reguladas por luz azul UV o luz azul (Lauter, 1996).

Estas respuestas se encuentran reguladas por un complejo proteico denominado *White Collar (WCC)*, formado por dos proteínas; WC-1 y WC-2 (*White Collar-1* y -2), con dominios PAS y un dominio de unión a DNA tipo GATA dedo de zinc (Fig.3), que regulan todas las respuestas a la luz azul descritas en este hongo (Ballario et al., 1996; Linden y Macino, 1997). La proteína WC-1 tiene tres dominios PAS (PAS-A, -B, -C) y WC-2 tiene sólo un dominio PAS. Estas proteínas se encuentran asociadas formando heterodímeros a través de interacciones entre sus dominio PAS (Talora et al., 1999). El dominio PAS-A de WC-1 es un dominio especializado LOV, Posteriormente, se demostró que WC-1 es el fotorreceptor y que posee una molécula de FAD en el dominio LOV el cual es esencial para la percepción de luz (Froehlich et al., 2002; He et al., 2002). Estas características estructurales de WC-1 son consistentes con su función como un factor de transcripción, cuya actividad es regulada por la luz azul a través del dominio LOV. La proteína WC-1 se localiza exclusivamente en núcleo, mientras que WC-2 la pareja necesaria de WC-1 para regular las respuestas a la luz azul, está localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma

(Schwerdtfeger y Linden, 2000). Proteínas similares al fotorreceptor *WC-1* se han identificado en todo el reino de los hongos y este fotorreceptor corresponde al criptocromo largamente buscado en los hongos (Herrera-Estrella y Horwitz, 2007; Corrochano, 2007).

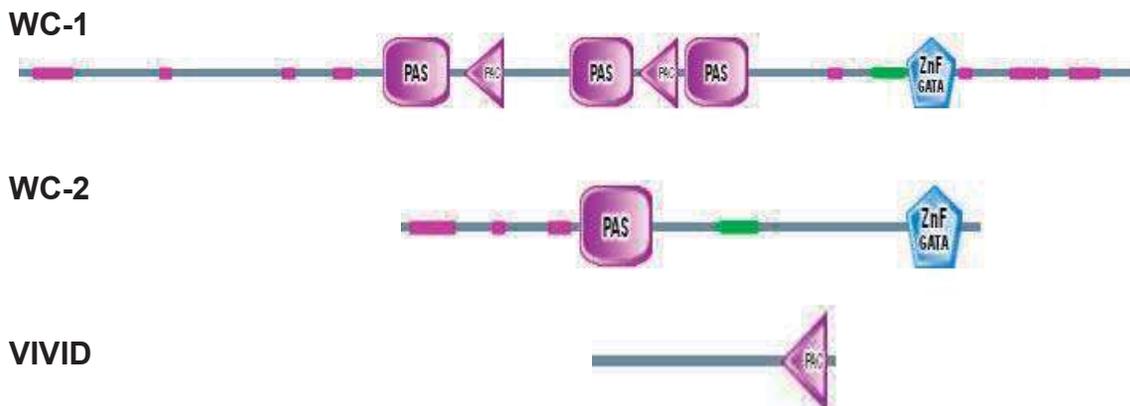


Fig.3. Estructura de las proteínas formadoras del complejo *with the collar* (*WC-1* y *WC-2*) así como el fotorreceptor secundario VIVID de *Neurospora crassa*. La imagen muestra la arquitectura de sus dominios. Generadas por SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

Además del fotorreceptor *WC-1*, en *N. crassa* se describió un Segundo fotorreceptor de luz azul-UVA, que es necesario para la foto-adaptación bajo iluminación constante y le permite al hongo detectar cambios en la intensidad de la luz (Schwerdtfeger y Linden, 2003). Este fotorreceptor secundario (VIVID, Fig.3.) a diferencia de *WC-1*, es una proteína con un único dominio *LOV* que posee una molécula *FAD*. Estudios estructurales de la proteína VIVID cristalizada muestran evidencia de la formación de un enlace covalente entre el C-4 del *FAD* con una cisteína conservada en el dominio *LOV* y rearrreglos conformacionales ocasionados por la luz, similares a los descritos para los dominios *LOV* de fototropinas en plantas (Zoltowski et al.,2007; Ko et al.,2007) la expresión del gen *vidid* es regulada por la luz azul a través de las proteínas *WC* y la proteína VIVID es necesaria para detener la inducción de los genes regulados por luz azul, estableciendo así un circuito regulado por luz.

Análisis de microarreglos de cDNA revelaron que la transcripción de más de 30 genes en *Neurospora* es inducida por luz (Lewis et al., 2002). Estos genes inducidos por luz pueden agruparse en dos clases: genes de respuesta temprana o inmediata y genes de respuesta tardía. Se sabe que la luz además de inducir fosforilación postraducciona en muchas proteínas, inducidas WC-1 y la nucleosido difosfato cinasa (NDK-1). Estos eventos de fosforilación son rápidos (aproximadamente 15 minutos después del pulso de luz) y muestran cinéticas similares a aquellas de los genes de respuesta temprana. La luz además puede inducir cambios en el potencial de la membrana provocando transporte de iones, dentro de los primeros minutos del tratamiento así como cambios de la conductancia en la membrana en los primeros segundos de exposición a la luz. Estas respuestas a la luz que no dependen de la transcripción, sugieren que se pueden tener mecanismos de señalización diferentes de los eventos transcripcionales inducidos por luz.

Además de su papel esencial en la respuesta a la luz, ambas proteínas del complejo WC-1 y WC-2, participan en la retroalimentación positiva (feedback loop) del ritmo circadiano de *Neurospora crassa*. En constante oscuridad ambas proteínas forman un complejo heterodimérico, que se une a los LREs en el promotor de *frq*, activando su transcripción. FRQ actúa como elemento negativo en el loop, pues al llegar a un nivel específico de expresión, reprime la transcripción de *frq*, probablemente por interacción directa con las proteínas WC. Esta retroalimentación negativa genera la expresión rítmica de *frq* (Aronson et al., 1994).

5.2. Respuestas en *Trichoderma atroviride*

Trichoderma es utilizado como modelo fotomofogenético debido a su capacidad de conidiar tras su exposición a la luz. En la oscuridad total, *T. atroviride* crece indefinidamente como micelio, siempre que los nutrientes no sean limitantes. Sin embargo, la falta de nutrientes, la exposición a la luz y el daño mecánico, disparan el desarrollo de las estructuras especializadas de reproducción asexual (conidias). Un breve pulso de luz azul (400-480 nm) dado a una colonia crecida de forma radial en una placa induce la esporulación sincrónica (Fig.4). Un anillo de conidióforos con conidias verdes es producido en el perímetro de la colonia en el momento del pulso de luz (Gressel y Galun, 1967).

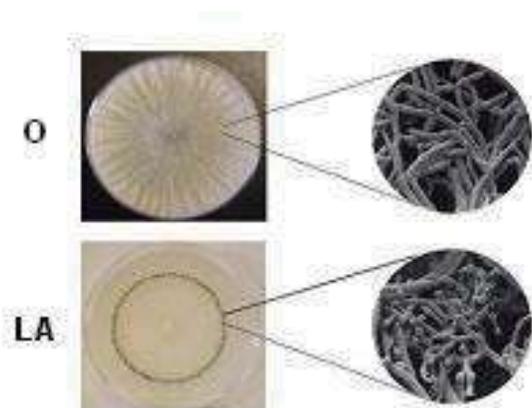


Fig. 4. Efecto de la luz azul en *Trichoderma*.

La imagen muestra el efecto de un pequeño (5min) pulso de luz azul (LA) en *T. atroviride*. Las fotos superiores muestran una colonia de *Trichoderma* crecida en oscuridad (D). La imagen inferior muestra una colonia de *Trichoderma* 36 hrs después de la exposición a la luz, con el anillo verde característico de las conidias en el perímetro de la colonia al momento de la exposición. Las imágenes de la derecha corresponden a micrografías electrónicas de barrido de la zona indicada (líneas finas), las hifas (arriba) y las Hifas y conidióforos (abajo).

El primer evento inducido por la luz de forma temprana y primer orden, es la reacción fotoquímica que no requiere la presencia de oxígeno molecular y es independiente de la temperatura. El hongo parece ser fotocompetente hasta las 16 horas de crecimiento (Gressel y Galun, 1967). De tres a siete horas después de la inducción de hifa aérea abundante, con un incremento de septos, y desarrollo de conidioforos son observados (Galun, 1971). Al exponerse a la luz azul, se identificaron: cambios del potencial de membrana, en los niveles de

ATP, y un transitorio bifásica oscilación de los niveles de AMPc intracelular, (Gresik et al., 1988). AMPc exógeno promueve esporulación en la oscuridad (Berrocal-Tito et al., 2000; Nemcovic y Farkas, 1998), y un pulso de luz azul resultan en la activación de la adenilato ciclasa (Kolarova et al., 1992).

Una segunda respuesta de luz en *T. atroviride* es la regulación de la expresión del gen fotoliasa *phr-1*. La luz azul y el desarrollo regulan la expresión de *PHR-1*. El ARNm de *phr-1* no se detecta en la oscuridad, pero de inmediato se vuelve detectable después del pulso de luz (Berrocal-Tito et al., 1999). AMPc no pasa por el requisito de la luz para la esporulación, mientras que la atropina, un compuesto conocido para reducir el AMPc los niveles en las células de hongos, evita la esporulación, incluso después de la fotoinducción. Una regulación ligera de *PHR-1*, sin embargo, es indiferente a estos dos efectores (Berrocal-Tito et al. 2000). La inducción de la expresión fotoliasa se comporta como una respuesta directa, rápida a luz independientes, de la inducción de esporulación (Berrocal-Tito et al., 2000).

5.2.1. BLR-1 y BLR-2

Puesto que el espectro de acción de la fotoconidiación era similar al de las respuestas a luz en *Neurospora*, se pensó que dicho fenómeno podría ser dirigido por ortólogos de las proteínas *WC-1* y *WC-2*. La clonación y análisis de dos fragmentos encontrados en *Trichoderma atroviride* mostraron un alto grado de homología con los genes *wc-1* y *wc-2* de *N. crassa* e indico que estas contenían los genes complementos para *T. atroviride*, a los que se nombro *Blue Light Regulador 1* y *2* (*blr-1* y *blr-2*). El análisis indico que *blr-1* y *blr-2* están presentes como copia única en el genoma de *T. atroviride*. Las proteínas predichas codificadas por estos genes son similares a sus contrapartes en *N. crassa*: BLR-1 tiene 120 aminoácidos y presenta un 53% de identidad con *WC-1*, mientras que BLR-2 tiene 484 aminoácidos y es 52% idéntica a *WC-2* (Fig.5). Ambas proteínas BLR poseen dominios de unión a *DNA tipo GATA-dedo de Zinc*

y BLR-1 presenta señales de identificación nuclear en la misma posición que WC-1. Este análisis sugiere que las proteínas BLR funcionan como factores de transcripción (Casas-Flores et al., 2004).

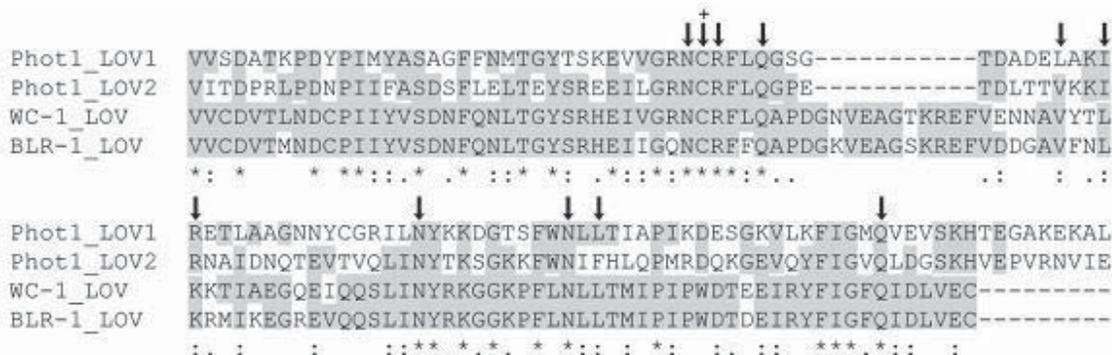


Fig. 5. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los dominios LOV de BLR-1, WC-1 y Phot1 (LOV1 y LOV2). Los residuos idénticamente conservados están sombreados, asteriscos marcan residuos completamente conservados, los dos puntos y los puntos indican residuos similares. Las flechas indican los residuos predichos para interactuar con la flavina y el signo mas indica que el residuo de cisteína previsto para interactuar con la flavina en respuesta a la luz.

La característica más distintiva de estas proteínas es la presencia de varios dominios PAS, tres en BLR-1 y uno en BLR-2 (Fig.6). Los dominios PAS han sido descritos como dominios multifuncionales, como dominios de transducción de señales que monitorean el estado de energía interno de la célula, como dominios de interacción proteína-proteína y también como detectores de señales ambientales. En BLR-1 el primero de sus dominios PAS, tiene una función de dominio LOV, encargado de unir flavinas como cromóforo y detectar la luz, este dominio posee todos los residuos necesarios para unir a la flavina, incluyendo la cisterna conservada que participa en la formación del aducto flavina-cisteína de los dominios LOV en plantas (Casas-Flores., 2004). El dominio presente en BLR-2 se requiere para la interacción proteína-proteína. La expresión de *blr-1* y *blr-2* es constitutiva, son activos transcripcionalmente y sus transcritos correspondientes no parecen ser afectados significativamente por la luz. (casas-Fores et al., 2004)

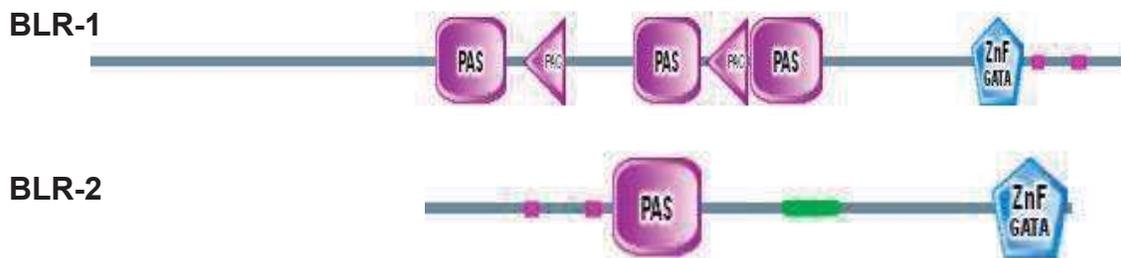


Fig.6. Estructura del complejo BLR formado por BLR-1 y BLR-2 en *Trichoderma atroviride*, ortólogo al complejo *White collar* de *N. crassa*. La imagen muestra la arquitectura de sus dominios. Generadas por SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

Al igual que ocurre en *N. crassa*, la proteína BLR-1 actúa como el fotorreceptor, y al asociarse con BLR-2 se transduce la señal luminosa mediante la regulación de la expresión de los genes de respuesta a la luz azul a través de ERL (elementos regulatorios de luz) presentes en sus promotores. Mediante el uso de microarreglos de cDNA, se identificaron 40 genes regulados por la luz blanca (el 2.8% de los genes impresos en el arreglo); de esos, 30 genes fueron inducidos (2%) y 10 fueron reprimidos (0.8%). Todos los genes regulados a través de las proteínas BLR requieren estrictamente de ambas proteínas funcionales, sugiriendo que BLR-1 y BLR-2 actúan como un complejo, interactuando a través de sus dominios *PAS*, al igual que en el caso de *N. crassa* (Casas-Flores et al., 2004; Rosales-Saavedra et al., 2006). La región promotora de los genes regulados por la luz azul a través de las proteínas BLR, tiene elementos tipo *GATA*, similares a la secuencia consenso de los ERL (*GATNC---CGATN*) descrita en los genes regulados por la luz en *N. crassa* (Berrocal-Tito et al., 1999; Rosales-Saavedra et al., 2006; He y Liu, 2005). Las proteínas BLR actúan tanto en la activación como en la represión de la transcripción de los genes regulados por la luz azul, una función dual que aún no se ha descrito en proteínas homólogas de otros hongos (Rosales-Saavedra et al., 2006). El hecho de que la región promotora de los genes reprimidos por la luz azul también tenga elementos tipo *GATA*, implica un mecanismo más complejo que debe establecer la actividad transcripcional de las proteínas BLR (Jiao, et al., 2007).

Se ha determinado que al menos diez genes son inducidos y dos reprimidos por la luz azul, de una manera dependiente de las proteínas BLR en *T. atroviride* (Rosales-Saavedra et al., 2006), esto sugiere un papel dual de estas proteínas, como activadores y represores de la expresión génica. Por otro lado, se han identificado varios genes que responden a la luz de forma independiente de las proteínas BLR. Esta evidencia apoya la existencia de una vía de detección de la luz, independiente de las proteínas BLR (Rosales- Saavedra et al., 2006). Existen datos que sugieren que la vía de fotorrecepción independiente de los proteínas BLR, puede estar relacionada con la vía de utilización de AMPc (Adenosin Mono-Fosfato cíclico), como Segundo mensajero (casas-Flores et al., 2006).

6. Activación de la vía de señalización del AMPc en *T. atroviride* por luz

Los efectos de la luz en la fisiología de *Trichoderma* incluyen la hiperpolarización de la membrana plasmática (Gresik et al., 1991; Horwitz et al., 1984b). Los primeros cambios bioquímicos detectables después de la inducción con luz, están asociadas con la activación de una vía de señalización a través de AMPc, como son incrementos transitorios en los niveles de AMPc (Gresik et al., 1998), en la actividad de la adenilato ciclasa (Kolarova et al., 1992), y cambios en el patrón de fosforilación de proteínas. La fosforilación de proteínas puede ser mimetizado in vivo en extractos celulares por la adición de AMPc o por la adición de membranas celulares, bajo condiciones de iluminación (Gresik et al., 1989). La adición de un análogo del AMPc. (dibutilil AMPc) a una colonia crecida en la oscuridad, es capaz de inducir la conidiación, y un inhibidor de la actividad de la adenilato ciclasa (atropina) bloquea la conidiación inducida por luz azul (Berrocal-Tito y col., 2000). Este inhibidor no interfiere con la activación transcripcional del gen *phr-1* inducido por la luz, indicando la presencia de dos vías de señalización independientes que son activadas por luz azul. Estas

evidencias, aunque contrastantes con los datos bioquímicos, son consistentes con la participación de la vía del AMPc en la foto-conidiación. Sin embargo, se debe considerar que la vía del AMPc es un punto de convergencia de muchas señales externas que son percibidas a través de receptores asociados a proteínas G heterotriméricas en la membrana citoplasmática (Bahn et al., 2007). Los receptores que detectan los niveles de glucosa o sacarosa fuera de la célula se encuentran asociados a las proteínas G α y cuando los niveles de éstos son bajos (estrés por limitación de nutrientes), evitan la activación de la adenilato ciclasa a través de una proteínas G α , causando una disminución en los niveles de AMPc y consecuentemente en la actividad de la PKA (Bahn et al., 2007). Esta situación es comparable a la que ocurre en las transformantes que sobre-expresan el gen *pkr-1* y posiblemente represente un estado constante de estrés en la célula, que induce la conidiación de forma constitutiva. Cuando los nutrientes son suficientes existe una activación constante de la vía del AMPc que favorece el crecimiento vegetativo e inhibe los cambios diferenciativos o de reproducción (Bahn et al., 2007). Una diferencia notable a lo que ocurre en las transformantes con niveles elevados o disminuidos de la actividad de la PKA, es que la luz induce un incremento transitorio en los niveles de AMPc. Los datos moleculares mencionados, sugieren mecanismos complejos en la participación de la vía del AMPc en la regulación del programa de reproducción asexual en *T. atroviride*.

El receptor de luz responsable de la activación de la vía del AMPc no se ha identificado, pero debe estar asociado a los componentes iniciales de esta vía como son las proteínas G heterotriméricas o posiblemente la adenilato ciclasa. En *Euglena gracilis* se han descrito 2 proteínas (PAC α y PAC β), cada una con dos dominios de adenilato ciclasa acoplados con 2 dominios BLUF que unen una molécula del cromóforo *FAD* por dominio. Estas dos proteínas forman un complejo heterotetramérico que es el fotorreceptor de luz azul responsable de regular la respuesta fotofóbica a altas fluencias de luz (Iseki et al., 2002). La percepción de la luz azul a través del dominio fotorreceptor causa un incremento en la actividad de adenilato ciclasa y subsecuentemente la dirección del

desplazamiento de *E. gracilis*. En los genomas de hongos disponibles, sólo en *Ustilago maydis* se encuentra un gen que codifica una presunta proteína con un dominio BLUF, pero carece del dominio de adenilato ciclasa (Herrera-Estrella y Horwitz, 2007). Adicionalmente, las opsinas sensoriales son activadores potenciales de las proteínas G; sin embargo, en los hongos su mecanismo de acción y si estas están asociadas a proteínas G se desconoce.

7. Utilización de diferentes fuentes de carbono

Si los hongos son cultivados en condiciones subóptimas, las diferencias en el crecimiento de la luz y la oscuridad pueden ser observadas (Carlisle, 1965).

Para *T. atroviride* este fenómeno es confirmado por experimentos que analizan el crecimiento de este hongo en numerosas fuentes de carbono a la luz y la oscuridad (Friedl et al., 2008a, b). Por lo tanto, la presencia o ausencia de la luz parece ser relevante para la utilización y/o absorción de una fuente de carbono específico también en las especies de *Trichoderma* (Tisch y Schmoll, 2009).

La evidencia inicial de la influencia directa de la luz sobre el metabolismo de carbono provenía del hecho de que mutantes de *T. atroviride*, ya sea en BLR1 o BLR2 fueron incapaces de producir conidias en respuesta a una privación repentina de fuente de carbono (Casas-Flores et al., 2004). El análisis de conidiación de *T. atroviride* en fuentes de carbono diferentes revelaron que este proceso es muy dependiente de la fuente de carbono utilizada, tanto en la luz y la oscuridad y que sólo la luz desempeña un papel catalizador en el aumento de conidiación. Curiosamente, la conidiación no fue reprimida por completo en los mutantes de los fotorreceptores en gran parte a ciegas $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$, presentando conidiación en varias fuentes de carbono (Friedl et al., 2008a). Estos patrones diferentes en conidiación sugirieron que se debe a diferentes potenciales redox en el catabolismo de las diferentes fuentes de carbono utilizadas. Esta sugerencia está de acuerdo con la hipótesis de que BLR1 y

BLR2 podría actuar como sensores redox y oxígeno (Casas-Flores et al., 2006). Sin embargo, no sólo la conidiación, sino también el crecimiento vegetativo en diferentes fuentes de carbono está influenciado por la luz en *T. atroviride*. A partir de los patrones de crecimiento en diferentes fuentes de carbono, se puede concluir que BLR1 es responsable de la selectividad de carbono de origen, pero que la intensidad de la respuesta requiere de ambas proteínas BLR (Friedl et al., 2008b). De acuerdo con estos datos, un estudio comparable en *T. reesei* también reveló una tasa de crecimiento mayor, así como indicios de una respuesta de estrés oxidativo en la luz de varias fuentes de carbono. Sin embargo, a diferencia de las mutantes del fotorreceptor estudiadas en *T. atroviride*, que mostraban una respuesta residual de luz con respecto al crecimiento y no hay defecto de crecimiento evidentes a la luz, experimentos similares con la cepa $\Delta env1$ de *T. reesei*, mostraron un fenotipo severo; reducción en el crecimiento en todas las fuentes de carbono (Schuster et al., 2007). Se ha supuesto que el complejo BLR-1/BLR-2, en sí mismo percibe o traduce la señal originada por la falta de glucosa (Casas-Flores et al., 2006). El requerimiento de las proteínas BLR-1 y BLR-2 para respuestas de limitación de nutrientes, implica que uno o más de sus dominios PAS/LOV pueden estar involucrados en la unión de señales específicas derivadas del metabolismo de carbono en *T. atroviride* (Casas-Flores et al., 2006). BLR-1 podría tener la función de unir uno o varios ligandos diferentes y responder a la presencia o ausencia de fuentes de carbono específicas en el medio. De forma alternativa, cualquiera de los dominios PAS encontrados en BLR-1 ó BLR-2 podrían tener capacidades duales de detección; integrando redox (como limitación de carbono) y luz. El hecho de que el complejo BLR-1/BLR-2 esté involucrado en el control de la limitación de carbono en *Trichoderma* representa una nueva conexión entre la detección de luz y fuentes de carbono (Casas-Flores et al., 2006)

8. Regulación de la respuesta de luz azul

Los organismos han desarrollado mecanismos para adaptarse a la prolongada exposición a la luz sin perder la sensibilidad de responder a la variación de cambios en la intensidad de luz. Los organismos no solo deben ser conscientes de la presencia o ausencia de luz, si no ser capaces de detectar variaciones sutiles de la calidad e intensidad de luz para obtener las respuestas conductuales y de desarrollo. Para percibir la luz, los organismos están equipados con proteínas capaces de reaccionar a la luz (Fotorreceptores), principalmente a través de una reversible unión covalente a un cromóforo a través del cual se absorbe y se transfiere la energía de la luz (Chen et al., 2010). Además del fotorreceptor *WC-1*, en *N. crassa* se describió un segundo fotorreceptor de luz azul-UVA, que es necesario para la foto-adaptación bajo iluminación constante y le permite al hongo detectar cambios en la intensidad de la luz (Schwerdtfeger y Linden, 2003). Este fotorreceptor secundario (VIVID), a diferencia de *WC-1*, es una proteína con un único dominio *LOV* que posee una molécula de *FAD* (Schwerdtfeger y Linden, 2003). *vvd* ha sido el fotorreceptor más estudiado en *Neurospora crassa* después de *WC-1*, pero cuyas acciones moleculares han sido menos entendido. Los mutantes en *vvd* fueron identificados debido a la aparición de color naranja brillante única del micelio cuando se crece en la luz constante, probablemente debido a la activación persistente de la biosíntesis de carotenoides. Los estudios han demostrado que *vvd* actúa como represor de la actividad de *WCC* para la mayoría de las respuestas inducidas por luz (Chen et al., 2010).

VIVID es una proteína que contiene un dominio *PAS/LOV*, de 21 kDa diferente a las proteínas *WCC*, la función de VIVID también se asocia a fotorrecepción de luz azul-UVA ya que conserva un sitio de unión a *FMN*, este Segundo fotorreceptor es necesario para la foto-adaptación bajo iluminación constante y le permite al hongo detectar los cambios de intensidad de la luz (Schwerdtfeger y Linden, 2003). Este fotorreceptor a diferencia del fotorreceptor *WC-1* contiene

un solo dominio *LOV* que contiene una molécula de *FAD*, la expresión del gen *vvd* esta regulada por luz azul a través del complejo WCC y la proteína VIVID es necesaria para detener la inducción de los genes regulados por luz azul, estableciendo así un circuito regulado por luz. VVD se localiza exclusivamente en el citosol, mientras que el WCC reside en el núcleo. VVD se acumula en el núcleo sobre la inducción de luz, y la acumulación de este se demuestra que es independiente de la activación de la luz. Además, VVD puede interactuar directamente con el WCC y el nivel de interacción entre VVD y el WCC se correlaciona con los niveles de represión del WCC a la luz constante. El aumento de la cantidad de proteína VIVID en la célula antes de la exposición a la luz, resulta en la represión efectiva de las respuestas a la luz en los primeros 15 minutos, lo que indica que VVD por sí sola es suficiente para alterar la dinámica de Fotoadaptación (Chen et al., 2010).

Trichoderma reesei es un hongo ascomiceto con una importante aplicación industrial para producir enzimas celulolíticas y hemicelulolítica para degradar la biomasa (Martínez et al., 2008). La luz no sólo afecta a la esporulación y el crecimiento de *Trichoderma*, sino que también regula su capacidad de expresar (*cbh1*, un gen de celulasa) cellobiohidrolasa 1 (Schmoll et al., 2005). Los genes *blr1* y genes *blr2*, ortólogos de los genes en *Neurospora wc-1* y *wc-2*, son esenciales para activar las respuestas a luz en *Trichoderma*. Un homólogo *vvd* ha sido identificado recientemente en *Trichoderma* llamado ENVOY (*env1*) y la investigación muestra que la transcripción de *env1* está fuertemente inducida por la luz con una cinética similar a la transcripción del *vvd*. Por otra parte, mutantes *env1* también presentan defectos fotoadaptación a la luz constante, similar a la cepa Δvvd , (Castellanos et al., 2010). ENVOY podría reprimir la actividad de BLR1 y BLR2 a través de una interacción física directa como VVD y el WCC en *Neurospora* (Chen et al., 2010).

Se han clonado y caracterizado el gen ENVOY (*env-1*), que se expresa bajo condiciones de inducción de celulasa, en *H. jecorina* este gen codifica para una proteína con un pequeño dominio *LOV*. Por la similitud existente entre Envoy y

Vivid se examinó si el gen *env1* y *vvd* están involucrados en la regulación de procesos dependientes de luz, pueden responder a diferentes estímulos fisiológicos dependiendo de la fisiología y del hábitat de estos dos hongos. Se ha visto que la proteína Envoy quizá pueda estar sujeta a un circuito complejo de autorregulación: y que esta autorregulación dependiente de luz, podría estar relacionada con ortólogos de *WC-1* y *WC-2*, (*BLR-1* y *BLR-2*). Se asume que Envoy puede unir FMN, esto por los residuos encontrados en su estructura, ya que conserva el sitio de unión a cisteína, lo que hace pensar que ésta proteína puede unir varios ligandos diferentes y responder a la presencia de diferentes fuentes de carbono específicas del medio ([Schmoll et al., 2005](#)).

Envoy es una proteína que contiene dominios *PAS/LOV*, *ENVOY* en *T. reesei* se encuentra asociada a la inducción de la expresión de celulosa y respuestas a luz, la única proteína con características similares a Vivid es Envoy, el cual tiene un 38% de identidad y 57 % de similitud a nivel de proteína, pero no a nivel de DNA, ambas proteínas conservan residuos de unión a FMN, Envoy al igual que Vivid se encuentra involucrada en la fotoadaptación y desensibilización por luz. Mutantes $\Delta env1$ de *T. reesei* mostraron un drástico efecto negativo en el crecimiento micelial, indicando la importante función que tiene *env1* en la tolerancia a la luz ([Schmoll et al., 2005](#)).

Env1 se transcribe en presencia de luz acumulándose de forma dependiente a la fuente de carbono y su expresión requiere de las proteínas formadoras del complejo BLR (*BLR1* y *BLR2*), las proteínas BLR se encargan de regular el crecimiento micelial en condiciones de iluminación, y *ENVOY* actúa regulando la fotoadaptación como su homólogo *VIVID*, ya que al igual que en *N. crassa*, *T. reesei* es capaz de detectar cambios en la intensidad de la luz, esta capacidad es atribuida a Envoy, la estimulación de las enzimas celulíticas por la luz ha demostrado que *ENVOY* está implicado en la modulación de la expresión del gen de celulasa por luz ([Schmoll et al., 2005](#)).

9. Efectos en la expresión de genes

Recientemente en un análisis de expresión de genes, usando pirosecuenciación se identificaron 331 genes de respuesta temprana regulados por luz, 70 de los cuales parecen ser BLR-independientes, soportando la existencia de adicionales receptores de luz funcionales. Este conjunto incluye genes que codifican factores de transcripción, enzimas reparadoras de DNA, y enzimas metabólicas. Interesantemente 39 de los 178 genes inducidos por la luz se relacionan con las respuesta a estrés, de estos genes inducidos por estrés 17 corresponden a respuestas de estrés oxidativo (Schmoll et al.,2010).

Este conjunto de genes incluye elementos clave, tales como los componentes de la MAPK (*p38/Hog1*) en cascada. En *N. crassa*, el gen correspondiente (*OS-2*) también inducida por la luz y su fosforilación muestra oscilaciones circadianas, la regulación de la expresión rítmica de los genes de la producción (de Paula et al., 2008). Estos datos sugieren que la luz se percibe como una señal de tensión que afectan una cascada de MAPK, quizás anticipando efectos nocivos de la luz, para proporcionar protección contra ellas (Schmoll et al.,2010).

En *T. reesei*, ENVOY influye en la expresión de genes no sólo en la luz, sino también en la oscuridad (Schuster et al., 2007). Sin embargo, ENVOY depende de la presencia de más factores para llevar a cabo su función reguladora. La variedad de genes que se encuentran regulados por la luz y en parte por ENVOY de *T. reesei* esta en un rango que involucra genes de transcripción, traducción y transducción de señales a genes implicados en el metabolismo y el transporte (Schuster et al., 2007). En *T. reesei* se ha demostrado que la transcripción de *hfb2* (hidrofobinas) está influenciada por la luz (Nakari-Setälä et al., 1997) y que el *gna1* subunidad alfa de la proteína G está involucrado en el presente regulamiento (Seibel et al., 2009). Por otra parte, en *T. atroviride* los fotorreceptores BLR1 y BLR2 contribuyen a la adaptación de los niveles de hidrofobina a las condiciones ambientales (Mikus et al., 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

Los cultivos de plantas son atacados por muchas enfermedades y plagas, siendo de los agentes principales los hongos que se aprovechan de las plantas para satisfacer sus demandas nutricionales. En el último siglo el uso indiscriminado de productos químicos como pesticidas produjo un desequilibrio, afectando indirectamente a animales y humanos, pero eso no se evidenció sino años después tendiendo que retirar muchos de estos pesticidas del mercado tal es el ejemplo del DDT.

Los hongos fitopatógenos, representan un gran problema en la agricultura, ya que comprometen la calidad y la integridad de los cultivos, en respuesta, la ciencia busca soluciones a este problema. El desarrollo de plaguicidas solucionó en algo este conflicto, sin embargo los organismos han desarrollado resistencias, por lo que cada día se elaboran plaguicidas de más amplio espectro, sin embargo el uso indiscriminado de plaguicidas representa un problema de carácter ecológico, ya que se encuentran contaminando aguas por mecanismos de filtración y escurrimientos, así como el suelo donde se absorbe directamente, poniendo en el peligro a la biota beneficiosa y al propio ser humano.

Es por ello que actualmente se buscan nuevas alternativas para solucionar estos problemas de forma sustentable. *Trichoderma atroviride* es un hongo ascomiceto, saprofito de suelo y es un poderoso antagonista microbiano, gracias a la producción de enzimas liticas, caracterizado además por una elevada capacidad de adaptación y por un crecimiento muy rápido.

La presencia de *Trichoderma atroviride* en una planta o en su medio ambiente mejora el estado fitosanitario general del vegetal, sin eliminar los demás microorganismos beneficiosos. *Trichoderma* estimula el desarrollo de las plantas y previenen los ataques por agentes patógenos o por otros microorganismos perjudiciales. Además tiene la capacidad de aumentar la productividad de las plantas, aumentando la absorción de sustancias nutritivas, elevando su

solubilidad y la disponibilidad de nitrógeno en el suelo. Ecológicamente también contribuye degradando algunos pesticidas muy persistentes en el ambiente y volviendo inactivos compuestos tóxicos en la zona radicular.

La forma en que *Trichoderma* es aplicado en suelo, es a través de formulaciones de esporas, la formación de estas estructuras asexuales (conidias) se ve estimulada de tres formas diferentes: daño mecánico, limitación de nutrientes y por luz, la producción de conidias a gran escala representa un problema, por lo que entender el proceso de esporulación es de vital importancia en el desarrollo de nuevas formulaciones.

El trabajo aquí propuesto tiene la finalidad de brindar mayor información sobre el proceso de esporulación, la regulación génica y la fotoadaptación a través del estudio de una cepa carente de gen *env1*, que codifica un pequeño dominio *PAS/LOV* ($\Delta env1-1$) produciendo un fenotipo con esporulación exacerbada, para conocer la importancia de dicho gen, en los procesos responsivos a luz, esto con la finalidad de desarrollar mejores productos tecnológicamente aplicables.

IV. HIPÓTESIS:

Envoy es una proteína con dominio *PAS/LOV* encargada de la regulación negativa de los genes inducidos por luz, interfiriendo también en el proceso de fotoadaptación, que además tiene efecto en los genes reprimidos por luz, por consiguiente procesos como crecimiento y esporulación se encuentran íntimamente ligados a *env1*. *Envoy* al ser un dominio LOV puede responder diferenciadamente a la fuente de carbono en que es crecido.

V. Objetivo General:

Determinar el papel de ENVOY en respuesta fisiológica a la luz azul

1. Objetivos específicos:

- *Determinar el papel de ENVOY en la fotoadaptación*
- *Estudiar el mecanismo utilizado en el proceso de fotoadaptación*
- *Analizar el efecto de la mutación en la sensibilidad a la luz y crecimiento*
- *Establecer el papel fisiológico de ENVOY a la luz azul*

VI. Material y métodos

1. Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

En este trabajo se utilizó la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride* IMI 206040 (WT) y una cepa deletada en el marco de lectura del gen *envoy* ($\Delta env1-1$). El crecimiento de las mismas se llevo acabo en medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA; DIFCO®) a una temperatura 28 °C en la oscuridad para tomas de fragmentos circulares.

2. Preinóculos:

Las placas de PDA se inocularon con 1 μ l de suspensión de conidias y se incubaron durante 48 h a una temperatura de 28° C en la oscuridad. De ellas se tomaron discos de micelio del frente de crecimiento de la colonia para inocular placas para posteriores experimentos.

Todas las manipulaciones de los cultivos se realizaron en un cuarto oscuro usando luz roja de seguridad con una fluencia de 0.1 μ mol/m² seg.

3. Ensayos de respuesta a Luz

3.1. Ensayos bajo iluminación constante:

Para los ensayos de crecimiento a luz constante se inocularon cajas de Petri de 150x15mm con 70 ml de medio PDA con un preinoculo de las cepas sobre la parte central de las placas.

Las placas fueron expuestas en una cámara de crecimiento PERCIVAL modelo E30LED, con iluminación por diodos emisores de luz (LED) azul con una fluencia de 2.4 μ mol/m²*s durante 72 horas a una temperatura de 28° C. Las colonias se fueron examinando cada 24 horas para medir el crecimiento radial.

También se realizó el experimento en dosis mas altas de luz azul con una fluencia de 9.2 μ mol/m²*s durante 72 horas, también fueron examinadas cada 24

horas para medir el crecimiento radial.

Se colocaron controles, inoculadas bajo las mismas condiciones, en placas con las mismas características a las que fueron expuestas a luz, pero estas se envolvieron en papel aluminio de forma que no penetrara luz, para mantener condiciones de oscuridad, fueron crecidas paralelamente, durante el periodo del experimento a la misma temperatura de 28° C.

Todas las placas fueron inoculadas bajo luz de seguridad. En ningún momento durante la incubación las cajas fueron movidas o destapadas. Todas las manipulaciones se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad. Al término del experimento se evaluó la morfología, el crecimiento, se fotografiaron, se colectaron las esporas en 5ml de agua destilada para su posterior cuantificación en un microscopio Axiostar plus, ZEISS usando una cámara de Neubauer.

Cada experimento se realizó por triplicado de manera completamente independiente.

3.2. Inducción con diferentes dosis de luz azul.

Para los ensayos de crecimiento a luz constante se inocularon cajas de Petri de 150x15mm con 70 ml de medio PDA con un preinoculo de las cepas sobre la parte central de las placas, bajo luz de seguridad, las placas fueron incubadas en oscuridad a una temperatura de 28° C durante 36 horas, después de este periodo de tiempo las colonias fueron expuestas a diferentes dosis de luz azul (0, 15, 35, 75, 150, 300, 600, 1200, 2400 y 4800 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) donde 0 es el control crecido enteramente en oscuridad hasta el final del experimento y posteriormente se volvieron a incubar durante 36 horas en la oscuridad a 28 °C. Al término de este tiempo, se fotografiaron, se colectaron las esporas en 5 ml de agua y se cuantificaron en un microscopio Axiostar plus, ZEISS usando una cámara de Neubauer.

Cada experimento se realizó por triplicado de manera completamente independiente.

3.3. Ensayo de fotoperiodos:

Para los ensayos de crecimiento a luz constante se inocularon cajas de Petri de 150x15mm con 70 ml de medio PDA con un preinoculo de las cepas sobre la parte central de las placas, bajo luz de seguridad.

Las placas fueron expuestas en una cámara de crecimiento PERCIVAL modelo E30LED, con iluminación por diodos emisores de luz (LED) azul con una fluencia de $2.4 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ en periodos de 12 horas luz, 12 horas oscuridad sucesivas, durante un periodo de 72 horas a una temperatura de 28°C iniciando con luz. Al término de este tiempo, se fotografiaron.

4. Fotoconidiación.

Las colonias fotoinducidas se incubaron en la oscuridad durante 48 horas a 27 °C. Las placas con los anillos de conidias se fotografiaron y, posteriormente, las conidias se colectaron en 5 ml de agua destilada estéril y se cuantificaron en un microscopio Axiostar plus, ZEISS usando una cámara de Neubauer.

5. Análisis del crecimiento.

El análisis de crecimiento radial en la oscuridad, bajo iluminación constante o sujeto a fotoperiodos, se realizó en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura (28 °C) e iluminación. A partir de preinóculos crecidos durante 48 horas, se cortaron discos del micelio del frente de crecimiento de la colonia y se inocularon sobre la parte central de placas de PDA de 15 cm de diámetro. El frente de crecimiento de las colonias se marcó cada 12 horas, durante 72 horas para determinar el crecimiento radial total y el alcanzado en cada medición. El promedio de 6 replicas experimentales para cada cepa analizada en este trabajo se representa en gráficas con sus respectivas desviaciones estándar.

6. Análisis de la expresión génica:

6.1. Condiciones para ensayos de expresión génica en respuesta a la luz.

Las placas de PDA se inocularon con 1 μ l de suspensión de conidias y se incubaron durante 48 h a 27 °C en la oscuridad. Del frente de crecimiento de la colonia, se cortaron discos de micelio y se colocaron sobre la parte central de placas de PDA cubiertas con celofán (para la recuperación del micelio y extracción del RNA) o sin celofán (para el análisis de la fotoconidiación).

Los cultivos se incubaron en oscuridad durante 36 horas a 27 °C para los ensayos de inducción con luz como fuera descrito previamente por Berrocal-Tito y col. (1999). El sistema de iluminación utilizado, consistió de una cámara de diodos azules....Todas las manipulaciones de los cultivos se realizaron en un cuarto oscuro usando luz roja de seguridad con una fluencia de 0.1 μ mol/m² seg.

6.2. Inducción de genes a un pulso saturante de luz azul.

En este experimento se inocularon cajas petri de 75x15mm con 40 ml de PDA, con un fragmento de micelio previamente crecido en oscuridad y se incubaron 36 horas a 28°C para su inducción.

Las colonias fueron expuestas a una dosis de luz azul saturante 1200 μ mol (5 μ mol/m²) durante 5 min. y posteriormente se volvieron a incubar durante 15, 30, 60, 120, 240 y 480 min. en la oscuridad a 28 °C, con un control sin inducir. Al término de este tiempo, el micelio se colectó y se congeló en nitrógeno líquido.

6.3. Inducción de genes bajo iluminación constante.

Las colonias fueron expuestas a la luz azul (5 μ mol/m² seg) en diferentes tiempos (5, 15, 30, 60, 120, 240, 480 min.), al termino de cada tiempo de iluminación, con un control de crecido en oscuridad, el micelio fue colectado y congelado en N₂ líquido para el análisis de expresión de los genes regulados por la luz azul.

7. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos.

Las extracciones del DNA se realizaron del micelio crecido en la oscuridad 36 horas sobre placas de PDA cubiertas con celofán, por el método descrito por Raeder y Broda (1985). La extracción de RNA se realizó siguiendo el protocolo descrito por Jones y col. (1989). Las hibridaciones tipo Southern y Northern se realizaron por métodos convencionales (Sambrook, 1989) y según las especificaciones del fabricante de membranas de Nylon. El marcaje radiactivo de las sondas con [α - 32 P]-dCTP se realizó por el método de "Random Priming", siguiendo el protocolo del proveedor (Amersham Biosciences).

Las sondas fueron amplificadas a partir de DNA de la cepa WT, por PCR usando el método y reactivos de INVITROGEN® Taq Recombinante, posteriormente se purificaron usando columnas y método de QUIAGEN®, cortando la banda correspondiente del gel de agarosa, obtenida por electroforesis.

VII. Resultados:

El presente trabajo es parte de la investigación previa realizada en el laboratorio de Expresión Génica y desarrollo de hongos, acerca de la caracterización de las mutantes *envoy*, para identificar su funcionalidad y tratar de esclarecer el proceso de fotoesporulación así como regulación genética. De acuerdo a trabajos previos con *Neurospora crassa*, la expresión genética es regulada por una proteína llamada VIVID, *Trichoderma atroviride* posee un gen ortólogo a *vvd*, llamado *env*, que codifica una proteína con dominio PAS/LOV denominada ENVOY, por su función de mensajero en la vía de señalización de celulasas en *T. reesei*.

Envoy es una proteína PAS/LOV de 203 aminoácidos en *T. atroviride* cuyo gen tiene un tamaño de 1331pb, posee dos intrones de 78 y 108pb, la única proteína previamente caracterizada es Vivid de *N. Crassa* de 186 pb codificada por el gen *vvd*, con la cual tiene una identidad de 30.84% y una similaridad de 43.61%. Otra proteína caracterizada es ENV en *T. reesei*, la cual posee también dos intrones de 79 y 89 pb que codifica una proteína llamada Envoy de 208 aminoácidos, con la cual comparte una identidad de 60.56% y una similitud de 75.12%.

1. Exceso de Fotoconidiación en la mutante *env1-1*

Con el fin de estudiar el efecto de la mutación se analizó la conidiación inducida por luz azul en la cepa *env1-1*, comparándola con la silvestre como control, este experimento se realizó sometiendo las cepas previamente inoculadas y crecidas durante 36 hrs en oscuridad, a diferentes dosis de luz como se indica en métodos.

La cepa Envoy responde a la misma dosis de intensidad de luz, que la cepa silvestre (IMI) para iniciar el proceso de conidiación, pero la producción de conidias inducida por luz es mayor (Fig.7).

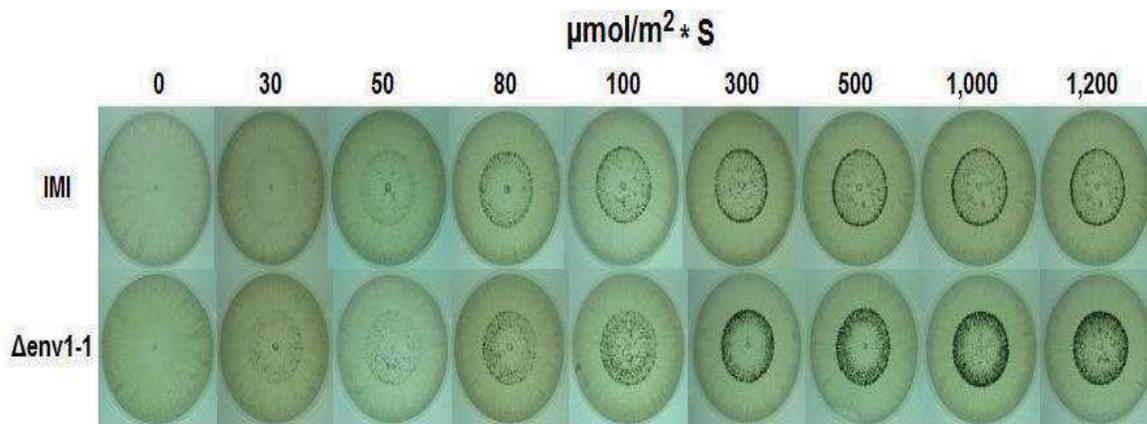


Fig. 7. Efecto de la dosis de luz en la conidiación de *Trichoderma atroviride*. Las placas fueron expuestas a diferentes dosis de luz azul, y las esporas fueron cuantificadas.

En este experimento se pudo observar que ambas cepas responden a la misma intensidad mínima de luz azul, $30\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, produciendo un aro de conidias en el sitio donde el estímulo fue recibido, sin embargo existe una variación considerable en la cantidad de conidias producidas por ambas cepas, siendo mayor la producción en la cepa mutante $\Delta\text{env}1-1$.

De acuerdo al conteo de esporas, en la cepa silvestre se puede observar que aparentemente el comportamiento en cuanto a la producción de conidias es proporcional al aumento en la intensidad de luz (Fig.8), pero a $500\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ se manifiesta un comportamiento constante aun aumentado la intensidad de luz en la cepa silvestre, indicando que existe una posible saturación de respuesta a fotoconidiación (línea roja). Por lo que los genes de respuesta a luz están siendo regulados y responden de forma normal al efecto de la luz. Contrastantemente en la cepa mutante la cantidad de conidias va en aumento al aumentar la intensidad de luz azul, y parece mantenerse este comportamiento aun a la dosis mayor de $1200\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ utilizada en este experimento. Por lo que los genes de respuesta a luz promotores de la fotoconidiación se encuentran encendidos sin ser regulados.

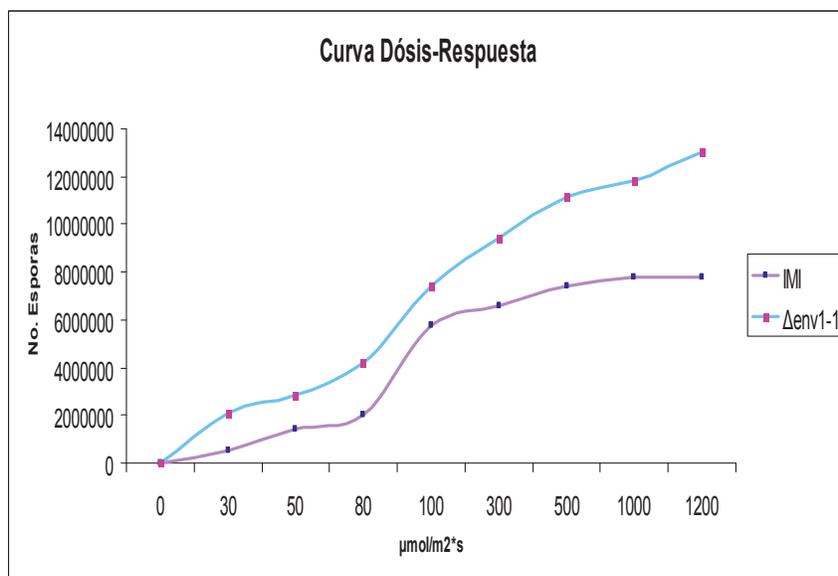


Fig.8. Curva dosis-respuesta. Efecto de la intensidad de luz en la esporulación de *Trichoderma atroviride*.

2. Efectos de la mutación en morfología y conidiación:

Una vez que fue observada una mayor producción de conidias inducidas por luz, y que ambas cepas IMI y $\Delta\text{env1-1}$ son capaces de responder ante la presencia de luz azul, se decidió evaluar cuan mayor era este efecto de la sobreproducción de conidias de la cepa $\Delta\text{env1-1}$ respecto a la silvestre, así como evaluar las diferencias morfológicas, principalmente crecimiento, que nos ayuden a entender el efecto de la mutación.

Se realizaron experimentos de crecimiento bajo diferentes intensidades de luz azul de la manera descrita en la sección de métodos, siendo las cepas mutante y silvestre (IMI) sometidas a la iluminación con luz azul durante 72 horas, durante este periodo se monitoreo el crecimiento de las cepas. Al termino de las 72 hrs se procedió a evaluar el crecimiento micelial y la capacidad de conidiación mediante un conteo de esporas.

La cepa $\Delta\text{env1-1}$, mostro un alto nivel en la producción de conidias tras la exposición a una dosis de $2.9 \mu\text{mol/m}^2\cdot\text{s}$ (fluencia de 10%), que es la dosis minima a la cual *Trichoderma* puede esporular, durante 72 horas (Fig. 9), ambas cepas no mostraron signos de esporulación en la obscuridad, indicando que este

comportamiento es totalmente dependiente de la luz, para estimar el impacto de la deleción del gen *env*, en cuanto a esporulación se cuantifico la producción de conidias. La cepa $\Delta env1-1$ tiene aumentados los niveles de producción de conidias sobre la cepa silvestre, este dato aporta información de que *env*, es un gen implicado en la regulación del proceso de fotoconidicación, mostrando aumentos en esporulación aproximadamente de 8 veces mayor en la mutante $\Delta env1-1$ sobre la silvestre (Fig.10).

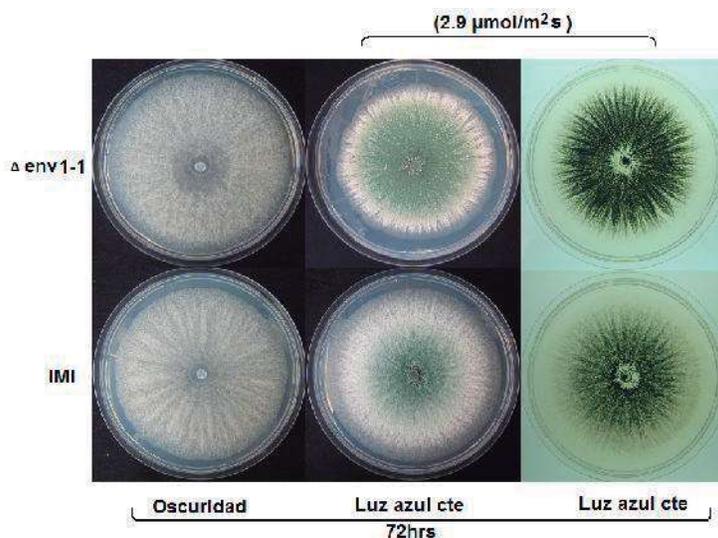


Fig.9. Efecto de la luz azul en crecimiento y esporulación de *Trichoderma atroviride*. Las cepas fueron crecidas en PDA a $2.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}$, durante 72 horas

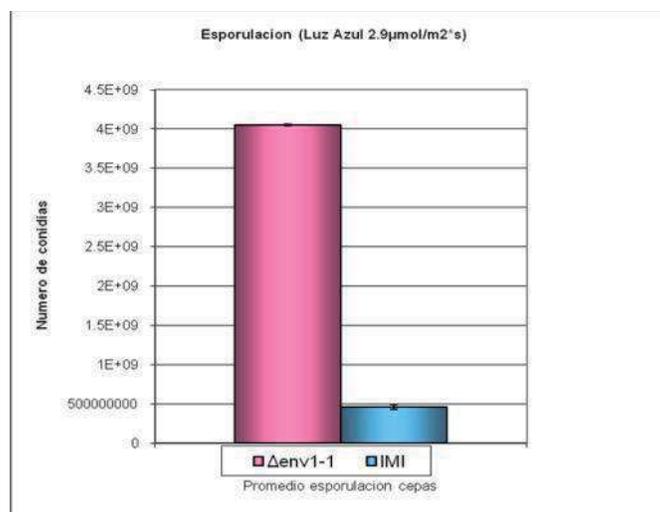


Fig.10. Grafica del efecto de la luz azul en la producción de conidias en la cepa IMI y $\Delta env1-1$ a $2.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}$. Se observa un gran aumento en la cantidad de conidias producidas por la cepa mutante en comparación con la cepa silvestre.

A una intensidad de $5.1 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (20%) el efecto es similar a el observado a $2.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, la reducción en el tamaño de la cepa mutante es ligeramente mayor en comparación con la cepa silvestre, tanto la cepa silvestre como la cepa $\Delta\text{env1-1}$ presentan una esporulación mas aumentada que las cepas expuestas a $2.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, aun así $\Delta\text{env1-1}$ presenta una esporulación aumentada sobre la cepa silvestre, pero la variación en es de 4 veces mayor esporulación en la cepa $\Delta\text{env1-1}$ sobre la silvestre (Fig.11) no tan drástica como la variación observada en $2.9 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, mientras que el crecimiento es homogéneo y regular en ambas cepas. En la oscuridad se observo una ligera variación en el crecimiento poco significativo, aumentado en la cepa mutante en comparación con la cepa silvestre.

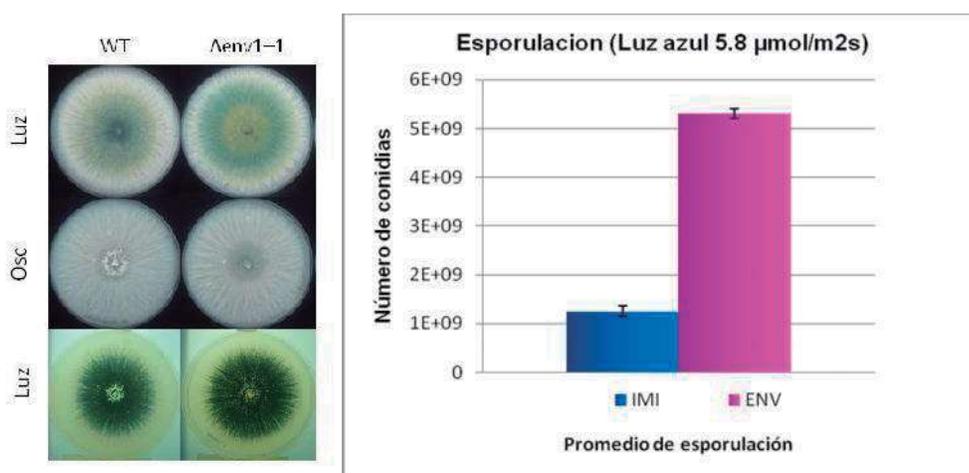


Fig.11. Efecto de la luz azul en crecimiento y esporulación de *Trichoderma atroviride*. Las cepas fueron crecidas en PDA a $5.8 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}$, durante 72 horas

A una intensidad de $11.6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, se puede observar una diferencia mas significativa en cuanto a crecimiento, y que aun a pesar de que en la mutante $\Delta\text{env1-1}$ se observa una disminución de crecimiento, su fotosensibilidad es mayor, reflejado en una mayor producción de conidias de la cepa $\Delta\text{env1-1}$ sobre la cepa silvestre, sin embargo deja de ser drástica, como fue observado a 2.9 y $5.8 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (Fig.12), es en esta dosis donde es mas evidente el efecto de la mutación en crecimiento, con una reducción de hasta 2 cm de crecimiento radial en comparación con la silvestre. Otra cosa interesante que debe captarse es el

crecimiento desigual en la mutante, mientras que en la silvestre el crecimiento radial se da de forma homogénea. Lo cual indica que Envoy es requerida para llevar a cabo los procesos de fotoadaptación de la cepa silvestre.

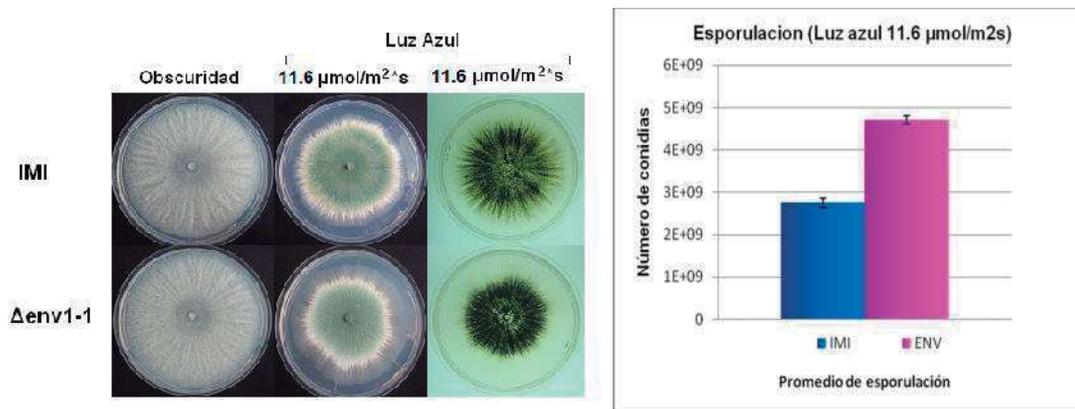


Fig.12. Las cepas fueron expuestas a una dosis de $11.6 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (40%) de Luz azul durante 72hrs para evaluar el efecto de la luz en la morfología. Las conidias fueron colectadas y cuantificadas.

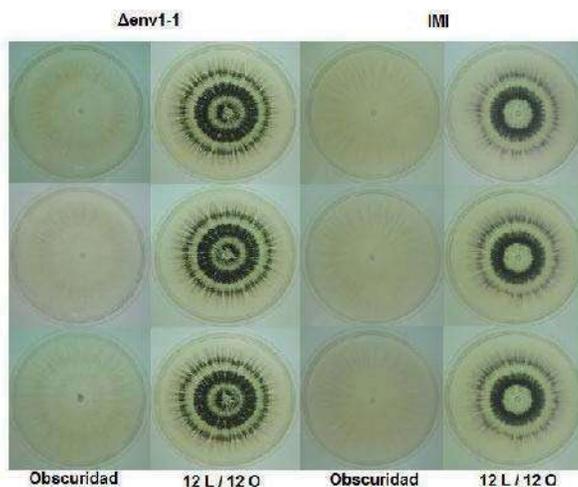


Fig. 13. Ensayo de fotoperiodos, para evaluar la fotosensibilidad en la ritmicidad circadiana.

En esta imagen (Fig.13) es apreciable la mayor fotosensibilidad de la cepa $\Delta\text{env1-1}$, ya que presenta una esporulación superior incluso en el primer periodo de exposición a la luz, mientras que en el mismo periodo de exposición en la cepa silvestre no se observó esporulación, esto debido a que *Trichoderma atroviride* es fotosensible hasta 16 horas de crecimiento después de ser

inoculado, las 12 horas contiguas fueron de oscuridad donde no se observan diferencias entre las cepas analizadas terminado este periodo se continuo con un lapso de 12 horas de la misma dosis de luz azul, en esta segunda exposición a luz se observo una mayor producción de conidias por parte de la cepa $\Delta env1-1$ sobre la cepa silvestre. Las segundas 12 horas de oscuridad no mostraron efecto diferencial entre las cepas, fue en el tercer periodo de luz donde se acentúo el efecto de los fotoperiodos sobre el crecimiento de las cepas, notándose una disminución en el crecimiento de la cepa mutante sobre la cepa silvestre así como una mayor fotoconidiación por parte de la cepa $\Delta env1-1$, siguiendo con el ultimo periodo de oscuridad que ayudo a la cepa mutante a reponerse del efecto de la luz sobre el crecimiento y disminuyó esta variación con la cepa silvestre (Fig.14).

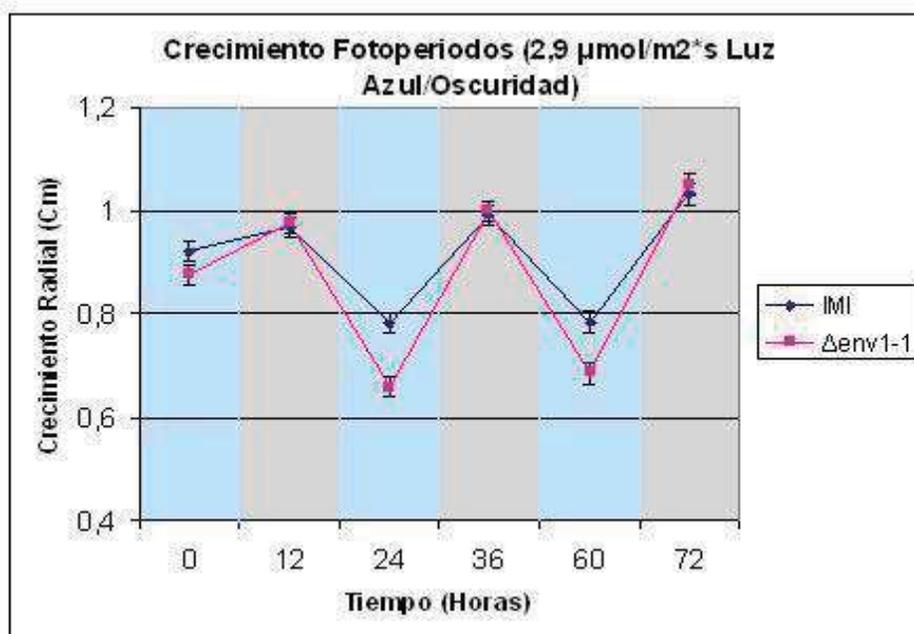


Fig.14. Grafica de la variación de crecimiento observada en el ensayo de fotoperiodos.

la velocidad de crecimiento en la luz por parte de la silvestre fue superior a la mutante y prácticamente igual en oscuridad, se mantuvo una ritmicidad constante, donde la disminución del crecimiento se mantuvo constante por parte de la mutante, se inicio con un periodo de 12 horas bajo 2.9 mol/m2s de luz azul donde la variación de crecimiento entre la cepa mutante y la silvestre no fue tan

marcada aunque si se observo una mayor capacidad de crecimiento por parte de la cepa silvestre, seguida de un periodo de 12 horas oscuridad donde ambas cepas presentan el mismo crecimiento, en el segundo periodo de luz se observo un crecimiento menor mas notorio por parte de la cepa mutante que el observado en la primera exposición a la luz de la misma cepa, en el siguiente periodo de oscuridad se observo igualmente el crecimiento de la cepa mutante y la cepa silvestre, en la tercera exposición de las cepas a la luz se mantuvo la diferencia de crecimiento observada entre cepa IMI y $\Delta env1-1$ que la observada en la segunda exposición, se obtuvo un crecimiento global mayor de la cepa silvestre sobre la mutante, pero esta variación no fue mayor a .5 cm de crecimiento radial ya que la cepa mutante $\Delta env1-1$ en oscuridad (Fig.15) alcanzo un crecimiento igual o incluso .1 cm superior a la cepa silvestre lo que indica que la cepa mutante presenta un estado de recuperación, y que el defecto de adaptación de $\Delta env1-1$ se encuentra enteramente relacionada con la luz.

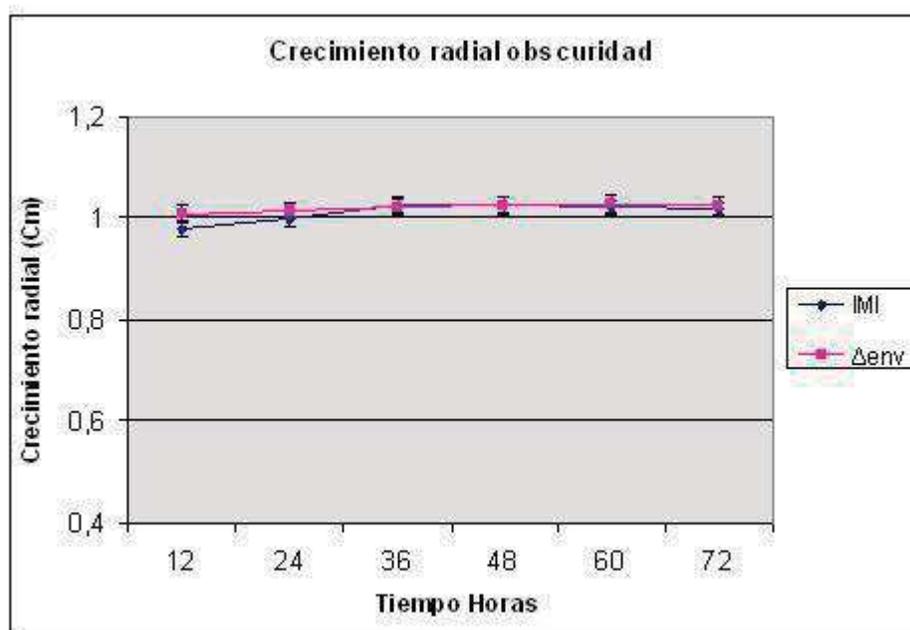


Fig. 15. Crecimiento radial en oscuridad. Grafica que muestra la variación en el crecimiento radial de la cepa silvestre (IMI) en comparación con la mutante ($\Delta env1-1$) en oscuridad.

3. El crecimiento a la luz azul de *Trichoderma atroviride* es regulado por Envoy.

En un trabajo previo llevado a cabo por F. Castellanos et al, se identificó una disminución drástica del crecimiento de cepas $\Delta env1-1$ *T. reesei*, en exposición continua a luz. Considerando este antecedente se analizó el efecto de la luz en el crecimiento en cepas $\Delta env1-1$ de *T. atroviride* comparada con la respuesta de la cepa silvestre como control. En todas las condiciones de crecimiento analizadas, se determinó el crecimiento radial alcanzado cada 12 horas (velocidad de crecimiento radial). En oscuridad tanto la cepa mutante como la silvestre mostraron una velocidad de crecimiento radial similar, alcanzando un máximo a las 24 hrs, donde inicia un comportamiento constante de crecimiento radial, el crecimiento radial total se ve reflejado en la [fig. 16](#), a las 72 horas.

Bajo iluminación constante, tanto la cepa $env1-1$ como la IMI mostraron un patrón de velocidad de crecimiento radial diferente de acuerdo a su fenotipo, la cepa silvestre tuvo un máximo de crecimiento radial entre las 36 y 48 hrs, mientras que en la cepa $env1-1$, alcanzó su máximo velocidad de crecimiento radial hasta las 48 hrs, disminuyendo ambas cepas gradualmente su velocidad de crecimiento radial.

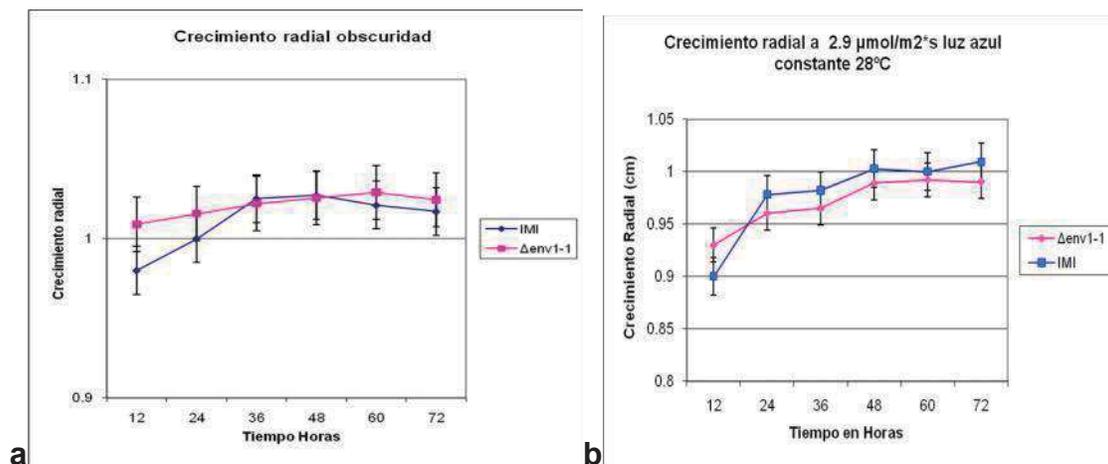


Fig. 16. velocidad de crecimiento radial de la cepa IMI y la cepa $env1-1$. La velocidad de crecimiento radial fue monitoreada cada 12 horas, tanto de las cepas crecidas en oscuridad (a) como de las cepas crecidas en iluminación constante (b).

En este experimento se monitoreó el crecimiento de *Trichoderma* durante 72 horas, se evaluó la morfología para identificar diferencias, y el crecimiento radial,

se pudo observar una disminución del crecimiento en la mutante, y una esporulación aproximadamente 8 veces mayor en *env1-1*, el crecimiento es radial y homogéneo, el micelio de la cepa silvestre crecida en luz es mas algodonoso.

Se observo que la cepa mutante $\Delta env1-1$, presenta un aumento en la producción de micelio aéreo, presentando un fenotipo mas algodonoso en la obscuridad, mientras que en la exposición a la luz (Fig.17), la cepa IMI presenta la formación de estructuras aéreas, dando también un efecto algodonoso a la cepa.

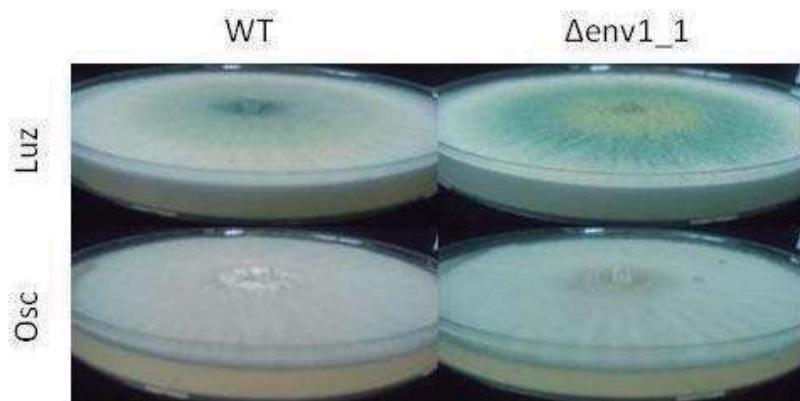


Fig.17. diferencias morfológicas de las hifas aéreas. Demostrando que la cepa WT o silvestre muestra una mayor producción de hifas aéreas en un aspecto algodonoso, estas estructuras no se manifiestan en la cepa mutante $\Delta env1-1$.

Como fue reportado un mutante carente del dominio PAS de *T. reesei*, presenta una severa disminución de crecimiento en luz blanca, (Schmoll et al., 2009), y datos reportados por F. Castellanos et al., 2010, donde la misma cepa $\Delta env1-1$ de *T. reesei* fue crecida en diferentes condiciones de luz: en luz blanca, luz azul, luz roja, y luz roja lejana, donde fue evidente la drástica disminución de crecimiento en luz blanca y luz azul, mientras que en luz roja y luz roja lejana se presenta el mismo fenotipo que en la obscuridad. Por esta razón en este trabajo se realizaron los experimentos con luz azul, debido a que tanto en luz azul como en luz blanca se apreciaban fenotipos similares, se decidió trabajar con luz azul,

debido a que la maquinaria de señalización e inducción genética se lleva a cabo por complejos receptores de luz azul, y a que la mutación $\Delta env1-1$ evaluada, es dependiente de la luz azul.

4. Expresión de Genes:

Los resultados indican que ENVOY es solo detectado después de la inducción con luz azul, y su regulación esta a cargo del complejo BLR.

La similitud entre ENVOY con VIVID de *N. Crassa* cuya función esta en la regulación de la tolerancia a la luz, sugirió que Envoy se encargaba de regular respuestas similares. En este trabajo se evaluó el comportamiento de un gen inducido por luz BLU1 y un gen reprimido por luz BLD2, para determinar el papel de ENVOY en la expresión genética de este grupo de genes.

4.1 Expresión bajo un pulso de luz:

Blu-1 es un gen regulado de forma positiva por la luz azul, su transcripción requiere de la exposición a luz, en este experimento se analizo el patrón de expresión del gen en *T. atroviride*, tanto en la cepa silvestre (IMI) como en la cepa mutante (*env1-1*), Obteniendo que el gen *blu-1* que se induce por luz dependiente del complejo BLR, fue claramente sobre expresado en la cepa $\Delta env1-1$ en comparación con los niveles de expresión de la cepa silvestre (Fig.18). Blu-1 muestra en la cepa silvestre un patrón de expresión tardío, iniciando la transcripción 15 minutos después del estímulo, alcanzando sus niveles máximos de expresión entre los 30 y los 60 min, manteniéndose aun a los 60 minutos después de la fotoinducción y disminuyendo a sus niveles basales 2 horas después del estímulo, 4 y 8 hr después no es detectable. En la cepa $\Delta env1-1$ la expresión del gen *blu-1* fue aumentada incluso a los 15 minutos después del estímulo, alcanzando niveles máximos de expresión a los 30 y 60 minutos, y sobre expresados en comparación con la silvestre, disminuyendo a las 2 horas igual que en la cepa silvestre.

En el 2006 se identificaron y se caracterizaron genes regulados por luz azul que son tanto dependientes como independientes de las proteínas BLR por Rosales-

Saavedra et al., Bld-2 es un gen que se reprime en presencia de luz, se pudo observar que la represión del gen *bld-2* por luz azul, aumentado el nivel de transcrito existente en la obscuridad por la cepa silvestre en comparación con la cepa $\Delta env1-1$ (Fig. 18).

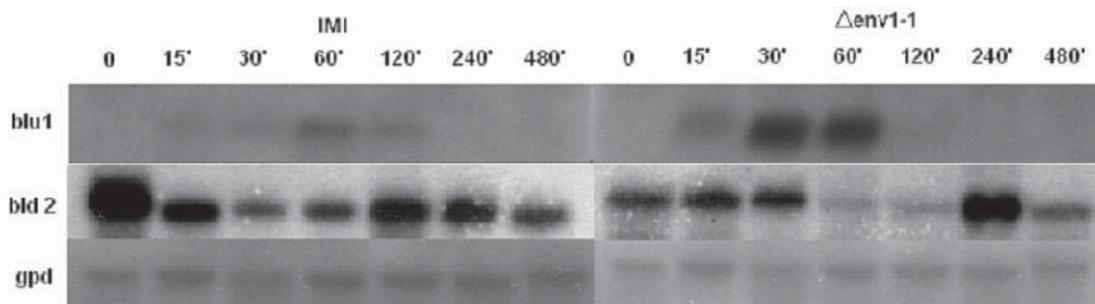


Fig. 18. Cinética de expresión de los genes *blu-1* y *bld-2* en la cepa IMI y *env1-1* sometidos a un pulso de luz saturante $1200\mu\text{mol m}^2\text{s}$.

En la cepa silvestre se ve claramente una disminución en la expresión de *bld-2* al ser expuesta a un pulso saturante de luz azul, donde disminuye la expresión del *Obscuridad* a 30 minutos después del pulso, a los 60 min inicia su recuperación, manteniéndose a las 2 y 4 horas a un nivel considerablemente alto y llevado a la basalidad 8 hrs después del estímulo, a partir de ese tiempo se cree que se mantiene la expresión, siendo esta la actividad basal. Mientras que en la cepa $\Delta env1-1$ el nivel de expresión de *bld-2* en la obscuridad es menor respecto a la obscuridad de la cepa silvestre, iniciando la represión 60 min después del pulso de luz, manteniéndose a 2hrs y teniendo una recuperación 4 horas después teniendo un máximo de expresión a esta hora, y alcanzando niveles basales 8 hrs después, similar a la silvestre.

4.2. Expresión en iluminación constante.

Todos los genes inducidos por luz, están sujetos a fotoadaptación, la fotoadaptación es la capacidad de los organismos de atenuar la respuesta a la luz, y prepararlo para responder a un segundo pulso de luz. Para evaluar el papel de *Envoy* en la respuesta de *Trichoderma atroviride*, y fotoadaptación, se evaluó el gen *blu-1* y *bld-2* (Fig.19), mediante ensayo de inducción a luz azul de forma constante, obteniendo que *blu-1* fue claramente sobre expresado en la

cepa $\Delta env1-1$ en comparación con los niveles de expresión de la cepa silvestre. *Blu-1* muestra en la cepa silvestre un patrón de expresión tardío, iniciando la transcripción 15 minutos después del estímulo, alcanzando sus niveles máximos de expresión entre los 30 y los 60 min, manteniéndose aun a los 60 minutos de la fotoinducción constante y disminuyendo gradualmente a sus niveles basales a 6 horas de exposición al estímulo, 8 horas después ya no se detecta. En la cepa $\Delta env1-1$ la expresión del gen *blu-1* fue mas rápida, iniciando a los 5 minutos después del inicio del pulso de luz y sostenida durante un tiempo mas prolongo; mostro un nivel de transcripción igual a la cepa silvestre a los 30 minutos, aumentando ligeramente a los 60 min y alcanzando un nivel máximo a las 2 horas, disminuyendo a las 4 horas, y aun a las 8 horas era detectable, es probable que después de 8 horas aun siga siendo detectable *blu1* en la cepa $\Delta env1-1$. Indicando que *Envoy* es el encargado de atenuar la expresión de *blu-1*. Para el gen *bld-2* se puede observar claramente que su expresión es reprimida en ambas cepas al ser expuestas a la luz.

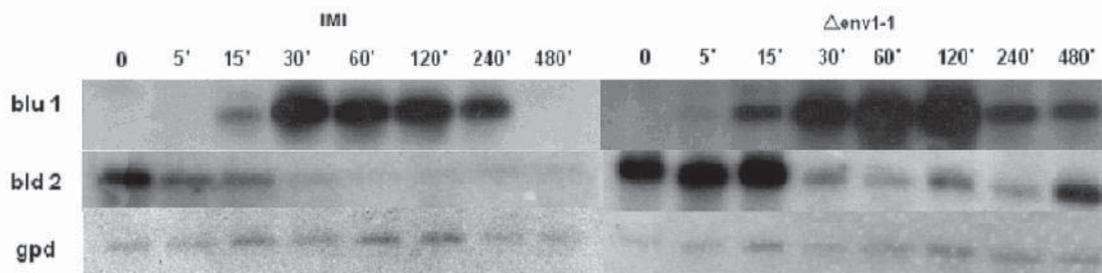


Fig. 19. Expresión de los genes *blu-1* y *bld-2* bajo iluminación constante.

5. Crecimiento y Esporulación en diferentes fuentes de carbono:

Trichoderma tiene la capacidad de responder a las diferentes fuentes de carbono, y es capaz de metabolizarlo de diferente manera.

Se llevo acabo el crecimiento de *Trichoderma atroviride* cepa silvestre y cepa $\Delta env1-1$, en diferentes fuentes de carbono, para observar variaciones entre ambas cepas, en cuanto a su desarrollo y su capacidad para utilizar asi como para metabolizar diferentes fuentes de carbono: Glicerol, PDA, fructosa, glucosa, sacarosa, sorbosa. Fig.o. Fueron expuestas las cepas a una fluencia de 5.1

mol/m²s de luz azul constante durante un periodo de 72 horas, con los respectivos controles en obscuridad.

En diferentes fuentes de carbono, el crecimiento y la esporulación se encuentran alteradas, sobretodo en glicerol, donde existió poco crecimiento y esporulación, similar en ambas cepas en exposición a la luz, en la cepa crecida en obscuridad se aprecia un comportamiento similar al de luz, incluso se observo esporulación en ausencia de luz.

VIII. Análisis de datos:

Neurospora crassa es un modelo fotomorfogénico, con proteínas bien caracterizadas de percepción de luz azul, y proteínas homologas se han encontrado en *T. atroviride*, esenciales en la fotoconidiación y la regulación de genes de respuesta a luz (complejo BLR y *envoy*). Se han estudiado y caracterizado estas proteínas en *T. atroviride* y *T. reesei*, en *T. reesei* se caracterizo una proteína homologa a la proteína *vivid* de *N. Crassa*, *vivid* se encarga de regular la respuesta de los genes responsivos a luz, similar al efecto que tiene *envoy*, debido a que en *T. reesei* se observo un fenotipo drástico en crecimiento de la mutante carente del gen *env1*, se evaluó el efecto de la mutación en la cepa de *T. atroviride*, encontrando que efectivamente existía una reducción en el crecimiento en luz blanca que se vio intensificada en exposición a luz azul. En *N. Crassa*, la luz disminuye la velocidad de crecimiento radial bajo periodos de luz-obscuridad y este efecto es parcialmente modulado por WC-1 (Ambra et al., 2004).

El crecimiento en la obscuridad de la cepa $\Delta env1-1$ y la cepa silvestre fue similar, notando un no significativo sobre crecimiento de la cepa mutante, notando como diferencia un aumento en la cantidad de micelio aéreo por la cepa mutante. También se observo una disminución en la velocidad de crecimiento radial en las cepas mutantes expuestas a iluminación constante y bajo fotoperiodos (12 hrs luz/12 hrs obscuridad). En la cepa $\Delta env1-1$, la luz azul tiene un efecto negativo sobre el crecimiento indicando que la proteína ENVOY tiene un papel importante en la regulación del crecimiento miceliar. En fotoperiodos la

cepa mutante mostro un comportamiento ligeramente arrítmico en el primer fotoperiodo de exposición a la luz, en comparación con la cepa silvestre, donde al final del tiempo de evaluación no se encontró diferencias significativas en la variación de crecimiento entre cepa silvestre y cepa mutante, mostrando que la cepa mutante es capaz de recuperarse durante los periodos de obscuridad. Sin embargo la cepa mutante mostro un efecto de insensibilidad a la luz en el segundo fotoperiodo, indicando un defecto de fotoadaptación, sugiriendo la importancia de ENVOY en este fenómeno. Comprobado al revisar la expresión de BLU-1 bajo iluminación constante, donde en la cepa silvestre puede atenuar la expresión de los genes inducidos por luz, modular su producción de conidias, para de esta forma continuar con su crecimiento, mientras que en la cepa mutante $\Delta env1-1$ no es capaz de atenuar la expresión de los genes responsables de la fotoconidiación, genes inducidos por luz, y es incapaz de continuar con su crecimiento normalizado en luz. ENVOY SE ENCUENTRA REGULADA POR LA LUZ ATRAVEZ DEL COMPLEJO BLR. Estos datos son consistentes a los reportados en F. Castellanos et al., 2010, donde se indica que las proteínas BLR modulan negativamente el crecimiento micelial bajo iluminación constante y ENVOY desensibiliza la respuesta a la luz, regulando negativamente la actividad del complejo fotorreceptor BLR por retroalimentación.

En la cepa $\Delta env1-1$, fue evidente que el gen *blu-1* inducido por luz, presenta un alto nivel de expresión con un tiempo de aparición de transcritos mas corto, al compararse con la cepa silvestre, íntimamente relacionada con la fotoconidiación excesiva, notando la existencia de una alteración en la percepción de luz azul y transducción de la señal, indicando la importancia de ENVOY en la regulación de este proceso dependiente de luz a través del complejo BLR, por lo que existe una comunicación mas que evidente entre el complejo BLR y Envoy, se hace penar que la regulación de los genes inducidos por luz, se encuentra a cargo de la proteína ENVOY, y en su ausencia otros mecanismos regulatorios se encargan de regular este proceso.

La fotoadaptación es un proceso importante en los seres vivos para ajustarse a las condiciones de iluminación constante. De manera similar a lo que ocurre en otros organismos, los genes regulados por la luz de *T. atroviride* están sujetos a fotoadaptación, mostrando un patrón de expresión transitorio bajo iluminación constante (Rosales-Saavedra et al., 2006). El patrón de expresión de *Blu-1* fue transitorio aun en la cepa mutante, indicando que diferentes mecanismos de adaptación están actuando. En *N. Crassa*, la flavoproteína *VIVID*, actuando por un mecanismo de retroalimentación negativa y fosforilación por diferentes cinasas, desensibilizan a *WC-1* y bloquean la actividad transcripcional del complejo *WC*, respectivamente. En *T. reesei* este papel de desensibilización esta asociado a la proteína *Envoy*, ortóloga a *VIVID*. Estos son los principales mecanismos que controlan la respuesta adaptativa bajo iluminación constante. En *T. reesei* se caracterizo una proteína (*ENVOY*) similar a *VIVID* que parece ejercer funciones similares en la fotoadaptación. Análisis de secuencias sugieren que esta proteína constituye el sistema de percepción de luz azul/UV, de *T. reesei*, la regulación de genes inducidos por luz fue similar a sus ortólogos *BLR* descritos en *T. atroviride*. (Rosales-saavedra et al., 2005)

En *N. Crassa*, las proteínas *WC* se encuentran como heterodimeros en la obscuridad y forman complejos grandes inmediatamente después de su activación con luz azul, que transitoriamente se une a los *ERL* presentes en los promotores de los genes regulados por luz.

Muchas especies de hongos son capaces de responder a la luz, incluyendo a *Trichoderma atroviride*, en el que se ha estudiado con anterioridad el papel de las proteínas *BLR* en la respuesta a luz azul y esporulación. *Trichoderma atroviride* produce un anillo de conidias en el perímetro de la colonia expuestas a la luz azul y luz blanca, no presenta formación de conidias en luz roja y luz roja lejana, mutantes $\Delta blr1$ y $\Delta blr2$, no son capaces de responder ante la presencia de luz, los genes *blu* no se encuentran transcritos en estas mutantes, y no presenta formación de conidias en respuesta a luz. Presentando un crecimiento similar a la cepa silvestre en obscuridad, indicando que estas cepas no pueden

translucir la señal. Indicando el importante rol de las proteínas blr en la regulación de la expresión de genes en *Trichoderma atroviride* y esta regulación también se encuentra a cargo de la proteína envoy, ortóloga de vivid en *N. Crassa*, donde desempeña funciones de tolerancia a la luz y regulación de genes inducidos por luz.

Env es un gen inducido por luz, su transcripción como se demostró solo es detectada en presencia de luz azul, y es regulada por el complejo BLR. En *t. reseei* se observó que mutantes $\Delta env1-1$ muestra severa reducción en el crecimiento bajo exposición a la luz, sin embargo en la mutante $\Delta env1-1$ de *Trichoderma atroviride*, esta reducción en el crecimiento es evidente pero no tan drástica como la reportada en *T. reseei*. La señal de luz azul es captada por *Trichoderma atroviride* en el cromóforo de la proteína BLR1, que interacciona con la proteína BLR2 a través de los ERL para la transducción de la señal, produciendo la represión de genes (BLD) e inducción de genes regulados positivamente por luz (BLU), se da también la expresión de la proteína envoy, Envoy desensibiliza los genes BLU responsables de la fotoconidiación y activa los genes BLD, para permitir el crecimiento micelial y modular la esporulación en ausencia del gen envoy, no existe regulación de genes responsivos a luz, por lo que los genes BLU son inducidos por un periodo mayor de tiempo, y los BLD son totalmente inhibidos, dichos efectos detienen el crecimiento micelial y promueven la formación de conidias, sin embargo estos genes responsivos a luz, son seguramente regulados por otra vía de regulación alternativa para que el hongo continúe desarrollándose (Fig.20). Estos datos nos indica que efectivamente Envoy se encuentra involucrado directamente en los procesos de fotoadaptación de *Trichoderma atroviride*.

En diferentes Fuentes de carbono el AMPc produce un estrés constitutivo en *Trichoderma* llevándolo a la producción de conidias aun en oscuridad y un crecimiento radial menor, como se observó en el crecimiento de las cepas silvestre y mutante en medio con glicerol.

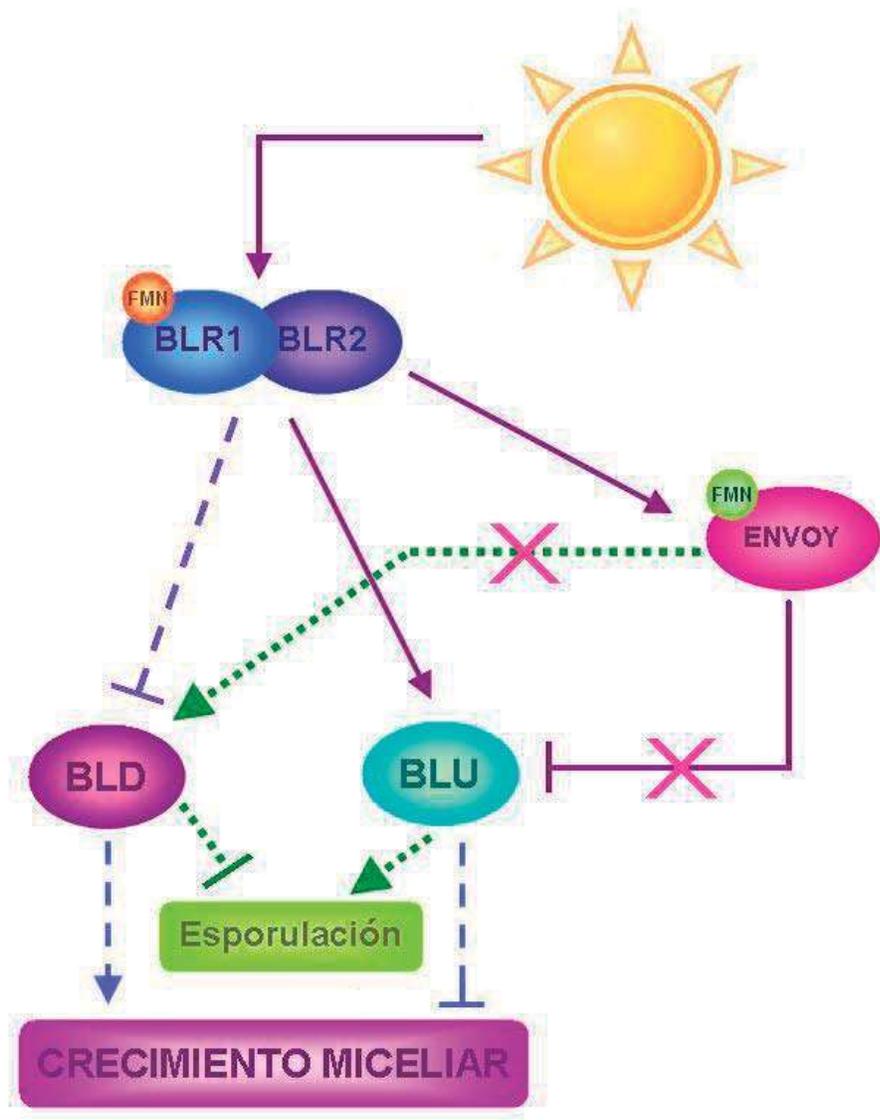


Fig.20. Efecto de la mutación en *T. atroviride*. El estímulo luminoso es censado en el cromóforo del complejo BLR, promoviendo la expresión de los genes BLU y reprimiendo la expresión de los genes BLD, por lo que se desencadena un proceso de esporulación exacerbado y una disminución en el crecimiento micelial.

IX. Conclusiones:

En base a los resultados obtenidos y el análisis de estos resultados, basados en el modelo fotomorfogénico de N. Crassa, e investigaciones anteriores en especies del género *Trichoderma*, se concluye que Envoy es responsable de regular la expresión de los genes responsivos a luz azul, en el caso de los genes inducidos (*blu*) *envoy* actúa como regulador negativo de la expresión y en el caso de los genes reprimidos por luz (*bld*) *envoy* actúa regulando positivamente la expresión.

Envoy interactúa directamente con el complejo BLR, pues es un gen inducido por luz, y totalmente dependiente de la interacción de este complejo, y su transcripción requiere específicamente de luz azul o luz blanca. Conserva un sitio de unión a Flavina, por lo que se considera un fotorreceptor secundario, putativamente.

Envoy al ejercer efecto negativo en la regulación de los genes inducidos por luz, permiten al hongo la fotoadaptación, atenuación de los efectos de estrés producidos por la luz en *Trichoderma atroviride*, para que continúe con sus funciones constitutivas tales como crecimiento y absorción de nutrientes.

Al encargarse de la regulación de los genes BLU, *envoy* juega un papel importante en la regulación y respuesta del proceso de esporulación inducida por luz. *Envoy* puede responder a las diferentes fuentes de carbono en que *Trichoderma* es crecido.

De acuerdo a los datos de fotoperiodos se puede identificar que la cepa $\Delta env1-1$ posee mayor fotosensibilidad que la cepa silvestre, esto concuerda con los datos obtenidos de la curva dosis respuesta, viendo que la cepa mutante tiene la capacidad de responder de forma temprana ante los estímulos luminosos, otro dato importante que arroja este experimento es que a pesar de que la cepa mutante reduce su crecimiento en los periodos de crecimiento en luz continua al ser puesto en condiciones de oscuridad esta cepa tiende a recuperar su

crecimiento incluso presentando un crecimiento radial despreciablemente mayor que en la cepa silvestre. Las cepas no presentan defectos en su ritmicidad circadiana, pero si en la capacidad de adaptación a la luz y en las respuestas tempranas que presenta, indicando un mecanismo defectuoso de control en estas respuestas.

X. Bibliografía:

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

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

S. Michán, F. Lledías, W. Hansberg, (2003). Asexual development is increased in *Neurospora crassa* CAT-3 null mutant strains, *Eukaryot. Cell* **2**. 798–808

Lledias, F., Hansberg, W. (2000). Catalase modification as a marker for singlet oxygen, *Methods Enzymol*, **319**. 110–119

Schmoll, M., Esquivel-Naranjo, U., Herrera-Estrella, A. (2010). *Trichoderma* in the light of day – Physiology and development. *Rev. Fungal Genetics and Biology*, **47**. 909-916.

Thannical, VJ and Fanburg, BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* **279**: L1005-L1028.

Ouyang, Y., Andersson, C., Kond, T., Golden, S., Johnson, Carl., (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 8660–8664.

Herrera-Estrella, A., and Horwitz, B., (2007). Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Molecular Microbiology*, **64**, 5-15.

Chorrochano, LM., Galland, P., (2006) Photomorphogenesis and gravitropism in fungi. In: *The Mycota. Growth, Differentiation and Sexuality* (U Kües, R Fischer, eds).I. 233–259.

Froehlich, A. C., Noh B., Vierstra R.D., Loros J. J., Dunlap, J. (2005). Genetic and molecular Analysis of Phytochromes from the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Eukariotic Cell*, **4**, 2140-2152.

Lin, c., Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biol.***6**:220.

Karniol B, Wagner JR, Walker JM, Vierstra RD (2005) Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem J* **392**: 103–116.

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

Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg, D. (2005), Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13. 111–118

Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A., 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

Bayram, O., Biesemann, C., Krappmann, S., Galland, P., Braus, G.H. (2008). More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol. Biol. Cell*, 19. 3254–3262

Bergman, K., Burke, P.V., Cerda-Olmedo, E., David, C.N., Delbruck, M., Foster, K.W., Goodell, E.W., Heisenberg, M., Meissner, G., Zalokar, M., Dennison, D.S., Shropshire Jr, W. (1969). *Phycomyces*. *Bacteriol. Rev.*, 33. 99–157

Berrocal-Tito, G., Sametz-Baron, L., Eichenberg, K., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A. (1999). Rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene. *J. Biol. Chem.*, 274. 14288–14294

Berrocal-Tito, G.M., Rosales-Saavedra, T., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A. (2000), Characterization of blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochem. Photobiol.*, 71. 662–668

Berrocal-Tito, G.M., Esquivel-Naranjo, E.U., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A. (2007), *Trichoderma atroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. *Eukaryot. Cell*, 6. 1682–1692

Bluhm, B.H., Dunkle, L.D. (2008). PHL1 of *Cercospora zea-maydis* encodes a member of the photolyase/cryptochrome family involved in UV protection and fungal development. *Fungal Genet. Biol.*, 45. 1364–1372

Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Catchside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D.J., Zelter, A., Kalkman, E.R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., Pratt, R. (2004), Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68. 1–108

Brunner, M., Kaédi, K. (2008), Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, 68. 255–262.

Carlisle, M.J. (1965), The photobiology of fungi. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 16. 175–202

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

Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Rosales-Saavedra, T., Martinez-Hernandez, P., Olmedo-Monfil, V., Herrera-Estrella, A. (2006). Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot. Cell*, 5. 499–506.

Castellanos, F., Schmoll, M., Martinez, P., Tisch, D., Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A. Esquivel-Naranjo, E.U. (2010), Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet. Biol.*, 47. 468–476

Darwin, C. (1880). *The Power of Movement in Plants*. John Murria, London.

R.M. de Paula, T.M. Lamb, L. Bennett, D. Bell-Pedersez. (2008), A connection between MAPK pathways and circadian clocks. *Cell Cycle*, 7. 2630–2634

Duclohier, H. (2007), Peptaibiotics and peptaibols: an alternative to classical antibiotics?. *Chem. Biodivers.*, 4. 1023–1026

E.U. Esquivel-Naranjo, A. Herrera-Estrella. (2007), Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by *blr-2* overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology*, 153. 3909–3922

Eveleigh, D. (1985) *Trichoderma*. A.L. Demain, N.A. Solomon (Eds.), *Biology of Industrial Microorganisms*, Butterworths, Menlo Park, CA

Friedl, M.A., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2008), Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74. 245–250

Friedl, M.A., Schmoll, M., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2008), Photostimulation of *Hypocrea atroviridis* growth occurs due to a cross-talk of carbon metabolism, blue light receptors and response to oxidative stress. *Microbiology*, 154. 1229–1241

Galun, E., Gressel, J. (1966), Morphogenesis in *Trichoderma*: suppression of photoinduction by 5-fluorouracil. *Science*, 151. 696–698.

Gremel, G., Dorrer, M., Schmoll, M. (2008), Sulphur metabolism and cellulase gene expression are connected processes in the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). *BMC Microbiol.*, 8. 174

Gresik, M., Kolarova, N., Farkaz, V. (1988), Membrane potential, ATP, and cyclic AMP changes induced by light in *Trichoderma viride*. *Exp. Mycol.*, 12. 295–301

Gresik, M., Kolarova, N., Farkas, V. (1991), Hyperpolarization and intracellular acidification in *Trichoderma viride* as a response to illumination. *J. Gen. Microbiol.*, 137. 2605–2609

Gressel, J. (1979), Yearly review: blue light photoreception. *Photochem. Photobiol.*, 30. 749–754

Gressel, J., Galun, E. (1967), Morphogenesis in *Trichoderma*: photoinduction and RNA. *Dev Biol.*, 15. 575–598

Gressel, J., Bar-Lev, S., Galun, E. (1975), Blue light induced response in the absence of free oxygen. *Plant Cell Physiol.*, 16. 367–370

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

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

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

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

Horwitz, B.A., Malkin, S., Gressel, J. (1984), Roseoflavin inhibition of photoconidiation in a *Trichoderma* riboflavin auxotroph: indirect evidence for flavin requirement for photoreactions. *Photochem. Photobiol.*, 40. 763–769

Horwitz, B.A., Weisenseel, M.H., Dorn, A., Gressel, J. (1984), Electric currents around growing *Trichoderma* hyphae, before and after photoinduction of conidiation. *Plant Physiol.*, 74. 912–916

Horwitz, B.A., Gressel, J., Malkin, S., Epel, B.L. (1985), Modified cryptochrome in vivo absorption in *dim* photosporulation mutants of *Trichoderma*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82. 2736–2740

Horwitz, B.A., Trad, C.H., Lipson, E.D. (1986), Modified light-induced absorbance changes in dim Y photoreponse mutants of *Trichoderma*. *Plant Physiol.*, 81. 726–730

Horwitz, B.A., Perlman, A., Gressel, J. (1990), Induction of *Trichoderma* sporulation by nanosecond laser pulses: evidence against cryptochrome cycling. *Photochem. Photobiol.*, 51. 99–104

Kolarova, N., Haplova, J., Gresik, M. (1992), Light-activated adenyl cyclase from *Trichoderma viride*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 72. 275–278

Komon-Zelazowska, M., Neuhof, T., Dieckmann, R., von Dohren, H., Herrera-Estrella, A., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. (2007), Formation of atroviridin by *Hypocreaatroviridis* is conidiation associated and positively regulated by blue light and the G protein GNA. *Eukaryot. Cell*, 6. 2332–2342

Kubicek, C.P., Komon-Zelazowska, M., Sandor, E., Druzhinina, I.S. (2007), Facts and challenges in the understanding of the biosynthesis of peptaibols by *Trichoderma*. *Chem. Biodiv.*, 4. 1068–1082

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Borner, T., Kubicek, C.P. (1996), Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93. 7755–7760

Kumagai T., Oda Y. (1969), An action spectrum for photoinduced sporulation in the fungus *Trichoderma viride*. *Plant Cell Physiol.*, 10. 387–392

Linden H., 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

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

Lledias F., Hansberg W. (2000), Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol.*, 319. 110–119

Martinez D., Berka R.M., Henrissat B., Saloheimo M., Arvas M., Baker S.E., Chapman J., Chertkov O., Coutinho P.M., Cullen D., Danchin E.G., Grigoriev I.V., Harris P., Jackson M., Kubicek C.P., Han C.S., Ho I., Larrondo L.F., de Leon A.L., Magnuson J.K., Merino S., Misra M., Nelson B., Putnam N., Robbertse B., Salamov A.A., Schmoll M., Terry A., Thayer N., Westerholm-Parvinen A., Schoch C.L., Yao J., Barbote R., Nelson M.A., Detter C., Bruce D., Kuske C.R., Xie G., Richardson P., Rokhsar D.S., Lucas S.M., Rubin E.M., Dunn-Coleman N., Ward M., Brettin T.S. (2008), Genome sequencing

and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). Nat. Biotechnol., 26. 553–560

Marzluf G.A. (1997), Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. Annu. Rev. Microbiol., 51. 73–96

Mikus M., Hatvani L., Neuhof T., Komon-Zelazowska M., Dieckmann R., Schwecke T., Druzhinina I.S., von Dohren H., Kubicek C.P. (2009), Differential regulation and posttranslational processing of the class II hydrophobin genes from the biocontrol fungus *Hypocrea atroviridis*. Appl. Environ. Microbiol., 75. 3222–3229

Nakari-Setälä T., Aro N., Ilmen M., Muñoz G., Kalkkinen N., Penttilä M. (1997), Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei* – cloning and characterization of the *hfb2* gene. Eur. J. Biochem., 248. 415–423

Rocha-Ramirez V., Omero C., Chet I., Horwitz B.A., Herrera-Estrella A. (2002), *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. Eukaryot. Cell, 1. 594–605

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

Sancar A. (1996), No “End of History” for photolyases. Science, 272. 48–49

Schmoll M. (2008), The information highways of a biotechnological workhorse – signal transduction in *Hypocrea jecorina*. BMC Genomics, 9. 430

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

Schmoll M., Franchi L., Kubicek C. P. (2005), Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. Eukaryot. Cell, 4. 1998–2007

Schmoll M., Schuster A., do Nascimento Silva R., Kubicek C.P. (2009), The G-alpha protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) regulates cellulase gene expression in the presence of light. Eukaryot. Cell, 8. 410–420

Schuster A., Schmoll M. (2009), Heterotrimeric G-protein signaling and light response: two signaling pathways coordinated for optimal adjustment to nature. Commun. Integr. Biol., 2. 308–310

- Schuster A., Kubicek C.P., Friedl M.A., Druzhinina I.S., Schmoll M.** (2007), Impact of light on *Hypocrea jecorina* and the multiple cellular roles of ENVOY in this process. *BMC Genomics*, 8. 449
- Schwerdtfeger C., Linden H.** (2001), Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, 39. 1080–1087
- Schwerdtfeger C., Linden H.** (2003), VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J.*, 22. 4846–4855
- Seibel C., Gremel G., Silva R.D., Schuster A., Kubicek C.P., Schmoll M.** (2009), Light-dependent roles of the G-protein subunit GNA1 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). *BMC Biol.*, 7. 58
- Seidl V., Seibel C., Kubicek C.P., Schmoll M.** (2009), Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106. 13909–13914
- Sestak S., Farkas V.** (1993), Metabolic regulation of endoglucanase synthesis in *Trichoderma reesei*: participation of cyclic AMP and glucose-6-phosphate. *Can. J. Microbiol.*, 39. 342–347
- Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Z., Hatvani L., Manczinger L., Vagvolgyi C.** (2005), Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 52. 137–168
- Tisch D., Schmoll M.** (2009), Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85. 1259–1277
- Vargovic P., Pokorny R., Holker U., Hofer M., Varecka L.** (2006), Light accelerates the splicing of *srh1* homologue gene transcripts in aerial mycelia of *Trichoderma viride*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 254. 240–244