



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICOFARMACOBIOLOGÍA

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO
SOBRE LA CONIDIACIÓN DE *Trichoderma atroviride*
IMI Y MUTANTES BLR1, BLR2 Y BLU”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICOFARMACOBIOLOGO

PRESENTADO POR:

p.Q.F.B. NAVOR MONDRAGÓN DOMÍNGUEZ

ASESOR DE TESIS:

D.C. CARLOS CORTÉS PENAGOS

Morelia, Michoacán, Noviembre 2009



DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A los que con su amor, me han dado el ejemplo del estudio y del trabajo. A quien debo cuanto soy, por su apoyo incondicional y enseñarme con su vida el verdadero significado de la responsabilidad. A quien con sus consejos han sabido guiarme por el buen camino y me han impulsado a ser una persona mejor, a mis queridos padres: **Celina Domínguez Valenzuela y Navor Mondragón Soto.**

A mis queridos hermanos: *Xochilt, Cuauhtémoc, Freddy, Citlaly, Víctor Manuel y José Guadalupe* por el apoyo que siempre me han otorgado para poder seguir estudiando y prepararme para un mejor futuro, mil gracias.

A *Martha Berenice* por su apoyo y comprensión en los momentos buenos y malos, momentos de tristeza y desesperación.

A todos mis amigos (as) que siempre me han brindado su amistad y que han estado ahí cuando más los he necesitado, que en días buenos hemos pasado momentos inolvidables de risa y en momentos malos de tristeza me han alentado gracias.

A todos mis amigos de laboratorio: *David, Paco, Macario, Luis, Carlos Humberto, George* que me ayudaron de una manera incondicional siempre que lo necesite.

A una gran persona y amiga (*Dalia Rubí*) que a través de los años me ha transmitido sus conocimientos para una mejor preparación de esta tesis gracias.

A todos los maestros que han estado durante toda mi formación académica, gracias por transmitirme sus conocimientos.

A mi asesor *D.C. Carlos Cortés Penagos*, por tener la confianza en mí y su motivación para seguir el camino de la ciencia. Por compartir sus conocimientos que me han ayudado en la realización de este trabajo de tesis, por su paciencia, atención y amistad brindada mil gracias.

A mi comité de sinodales: *D.C. Consuelo de Jesús Cortés Penagos, M.C. Luz Elena Arévalo León, Q.F.B. Rodrigo Díaz Balcázar*, por ofrecerme sus consejos y críticas que han ayudado en la realización de este trabajo.

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo de tesis fue realizado en el laboratorio de investigación de biotecnología en hongos de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del Dr. Carlos Cortés Penagos. Para la realización del trabajo, fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) no.de proyecto 47809.

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	viii
ABREVIACIONES.....	ix
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
I.1. La luz y su efecto sobre los seres vivos.....	2
I.2. Receptores de luz.....	4
I.3. Percepción de la señal luminosa en hongos.....	7
I.4. <i>Neurospora crassa</i> como modelo de la percepción de la luz azul.....	8
I.5. Características del género <i>Trichoderma</i>	10
I.6. Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma atroviride</i>	10
I.7. Conidiación de <i>Trichoderma atroviride</i>	11
II. JUSTIFICACIÓN.....	17
III. OBJETIVOS.....	18
III.1. Objetivo general.....	18
III.2. Objetivos específicos.....	18

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
IV.1. Microorganismos.....	19
IV.2. Medios de cultivo.....	19
IV.2.1. Medio PDA.....	20
IV.2.2. Medio Vogel.....	20
IV.2.3. Medio Mínimo Vogel.....	21
IV.2.4. Soluciones stock.....	21
IV.2.5. Condiciones de esterilización.....	21
IV.3. Preparación de papel celofán.....	21
IV.4. Determinación de crecimiento por peso seco.....	22
IV.5. Cuantificación de la producción de conidias.....	22
IV.6. Equipos.....	23
IV.7. Estadística empleada en los ensayos.....	23
V. RESULTADOS	24
V.1. Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de carbono (C).....	24
V.2. Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de C (glucosa).....	24
V.2.1. Determinación de la producción de biomasa generada por limitación de C (glucosa) en la cepa IMI y mutantes BLR.....	26
V.3. Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de C (Fructuosa).....	27
V.3.1. Determinación de la producción de biomasa generada por limitación de C (Fructuosa) en la cepa IMI y mutantes BLR.....	28

V.4. Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de C (Sacarosa).....	29
V.4.1. Determinación de la producción de biomasa generada por limitación de C (Sacarosa) en la cepa IMI y mutantes BLR.....	31
V.5. Conidiación en las cepas con sobre-expresión en los genes <i>blr</i> por limitación de carbono (C).....	32
V.6. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>blr-1</i> y <i>blr-2</i> en la conidiación por limitación de C (glucosa).....	32
V.6.1. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>blr-1</i> y <i>blr-2</i> en la producción biomasa, por limitación de la fuente C (glucosa).....	34
V.7. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>blr-1</i> y <i>blr-2</i> en la conidiación por limitación de C (sacarosa).....	34
V.7.1. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>blr-1</i> y <i>blr-2</i> en la producción biomasa, por limitación de la fuente C (sacarosa).....	36
V.8. Conidiación en las cepas con sobre-expresión de los genes <i>blu</i> por limitación de carbono (C).....	37
V.9. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>blu7</i> y <i>blu17</i> en la conidiación por limitación de la fuente de C (glucosa).....	37
V.9.1. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>blu7</i> y <i>blu17</i> en la producción de biomasa, por limitación de la fuente de C (glucosa).....	39
V.10. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>blu7</i> y <i>blu17</i> en la conidiación por limitación de la fuente de C (sacarosa).....	40
V.10.1. Efecto de la sobre-expresión de los genes <i>blu7</i> y <i>blu17</i> en la producción de biomasa, por limitación de la fuente de C (sacarosa).....	42
V.11. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu5</i> y <i>blu7</i> en la conidiación por limitación de la fuente de C (glucosa).....	43

V.11.1. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu5</i> y <i>blu7</i> en la producción de biomasa, por limitación de la fuente de C (glucosa).....	45
V.12. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu5</i> y <i>blu7</i> en la conidiación por limitación de la fuente de C (sacarosa).....	46
V.12.1. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu5</i> y <i>blu7</i> en la producción de biomasa, por limitación de la fuente de C (sacarosa).....	48
V.13. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu15</i> y <i>blu22</i> en la conidiación por limitación de la fuente de C (glucosa).....	49
V.13.1. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu15</i> y <i>blu22</i> en la producción de biomasa, por limitación de la fuente de C (glucosa).....	51
V.14. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu15</i> y <i>blu22</i> en la conidiación por limitación de la fuente de C (sacarosa).....	51
V.14.1. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes <i>blu15</i> y <i>blu22</i> en la producción de biomasa, por limitación de la fuente de C (sacarosa).....	53
VI. DISCUSIÓN	54
VII. CONCLUSIONES	59
VIII. BIBLIOGRAFÍA	60

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Espectro de luz visible.....	3
Figura 2. Diferentes proteínas encontradas en los genomas de diversos hongos que podrían funcionar como fotoreceptores.....	7
Figura 3. Fotoconidiación de <i>Trichoderma atroviride</i>	11
Figura 4. Cambios morfológicos observados durante la fotoconidiación de <i>Trichoderma atroviride</i>	12
Figura 5. Modelo hipotético mostrando la función del complejo BLR en sensibilidad a carbono.....	14
Figura 6. Modelo hipotético integrando distintos elementos que participan en la percepción de luz azul en <i>Trichoderma atroviride</i>	15
Figura 7. Análisis de la producción de conidición inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2.....	25
Figura 8. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2.....	26
Figura 9. Análisis de la producción de conidición inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (fructuosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2.....	28
Figura 10. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (fructuosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2.....	29
Figura 11. Análisis de la producción de conidición inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2.....	30

Figura 12. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2.....	31
Figura 13. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI y cepas con sobre-expresión de los genes <i>blr</i>	33
Figura 14. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Seblr1-8 y Seblr2-13.....	34
Figura 15. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI y cepas con sobre-expresión de los genes <i>blr</i> ...	35
Figura 16. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Seblr1-8 y Seblr2-13.....	36
Figura 17. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI y cepas con sobre-expresión de los genes <i>blu</i>	39
Figura 18. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Seblu7-10, Seblu17-6 y Seblu17-12A.....	40
Figura 19. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI y cepas con sobre-expresión de los genes <i>blu</i> ..	42
Figura 20. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Seblu7-10, Seblu17-6 y Seblu17-12A.....	43
Figura 21. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido de los genes <i>blu</i>	45
Figura 22. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Asblu5-2, Asblu5-5, Asblu7-1 y Asblu7-7.....	46
Figuras 23. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido de los genes <i>blu</i>	48
Figura 24. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Asblu5-2, Asblu5-5, Asblu7-1 y Asblu7-7.....	49

Figura 25. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido de los genes <i>blu</i>	50
Figura 26. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Asblu15-8, Asblu22-1 y Asblu22-10.....	51
Figura 27. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido de los genes <i>blu</i>	53
Figura 28. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Asblu15-8, Asblu22-1 y Asblu22-10.....	54

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Clasificación taxonómica de <i>Trichoderma atroviride</i>	10
Tabla II. Identidad de los genes <i>blu</i> (<u>blu</u> - <u>light</u> - <u>up</u> regulated) de <i>Trichoderma atroviride</i>	16
Tabla III. Cepas de <i>Trichoderma atroviride</i>	19
Tabla IV. Elementos del Medio Vogel.....	20
Tabla V. Cantidades de medios requeridos para la preparación de 1 litro de Medio Mínimo Vogel.....	21
Tabla VI. Genes <i>blu</i> seleccionados para su análisis por medio de su sobre-expresión o silenciamiento.....	37

ABREVIATURAS

esp.	Espora
F.D.	Factor de dilución
mM	Milimolar
h	Hora
ml	Mililitro
L	Litro
μ M	Micromolar
μ l	Microlitros
C	Carbono
g	Gramo
cm	Centímetro
mg	Miligramo
mm	Milímetros
C/P,C,N	Con fosfato, carbono y nitrógeno
LOV	Dominio presente en proteínas como sensores de Luz, Oxígeno y Voltaje
PAS	Dominio que se identificó primero en las proteínas Per, Arnt y Sim.
AMPc	Adenosin 3'-5'-monofosfato cíclico
aa	Aminoácidos
UV-A	Luz ultravioleta tipo A
cDNA	DNA complementario
cry	Criptocromo
phy	Fitocromo
wc	White collar
wt	Cepa silvestre
FMN	Flavin mononucleótido
FAD	Flavin adenina dinucleótido

RESUMEN

Trichoderma atroviride es un hongo deuteromiceto que se reproduce asexualmente formando conidias de 3 a 5 µm de diámetro con una coloración verde. En varias especies *Trichoderma* la conidiación puede ser inducida por 2 factores: estrés nutricional y exposición a la luz. Cuando la conidiación es inducida por estrés nutricional la formación de conidias tiene lugar principalmente en la parte central de la colonia, donde los nutrientes se han agotado. Cuando la conidiación es inducida por luz, un pulso luminoso es suficiente para inducir la conidiación en una colonia que crece en obscuridad y a las 24 h aproximadamente se forma un anillo de conidias localizado en lo que era la periferia de la colonia al momento del pulso. La esporulación en hongos puede ser estimulada por otros factores, especialmente por aquellos que involucran algún tipo de estrés. En el caso de *Trichoderma*, éste esporula cuando el crecimiento ha cubierto por completo la caja Petri, lo cual es debido posiblemente a la limitación de nutrientes. El metabolismo de los carbohidratos también ha sido relacionado fuertemente con las vías que conducen a la morfogénesis (esporulación). Se ha observado que la limitación de carbono en el medio de cultivo provoca la esporulación. En este trabajo se presenta el efecto del C sobre la conidiación y biomasa de *Trichoderma atroviride* IMI y las mutantes BLR-1, BLR-2 (originadas por interrupción en los genes *blr1* y *blr2*). Así como las mutantes SEBLRs (resultado de una sobre-expresión de los genes *blr1* y *blr2*), ASBLUs (obtenidas del cambio de sentido de la cadena de DNA de algunos genes *blu* llamados antisentido) y SEBLUs (resultado de la sobre-expresión de los genes *blu*). En los ensayos realizados, la limitación de la fuente de C (5 mM) glucosa, fructuosa y sacarosa, promueve la formación de conidias en las mutantes BLR (originalmente reportadas como insensibles a la luz), la limitación de la fuente de fructuosa presenta la mayor producción de conidias. La cepa con sobre-expresión del gen *blr2* (Seblr2-13) presenta mayor conidiación en la concentración estándar de C que la mutante Seblr1-8 (*blr1*). En lo que respecta, la sobre-expresión y expresión con anti-sentido de los genes *blu* estudiados, solo la cepa Seblu7-10 incrementa de forma notoria la conidiación en condiciones limitantes en la fuente de sacarosa con respecto a la cepa IMI, pero disminuye su biomasa. Mientras que la cepa Asblu7-7 bajo la misma condición produce mayor formación de conidias. En general podemos concluir que las mutantes, SEBLU y ASBLU presentan una disminución en la formación de conidias en la fuente limitante de C (glucosa) con respecto a la cepa silvestre.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. La luz y su efecto sobre los seres vivos

La supervivencia de los seres vivos depende de su habilidad para detectar y responder apropiadamente a cambios en su ambiente extracelular. La luz es uno de los factores ambientales más importantes para la existencia de vida en nuestro planeta y su apropiada percepción en los seres vivos es por lo tanto de suma importancia. Este factor ejerce un control directo sobre el comportamiento de prácticamente todos los seres vivos (Esquivel, 2007). Así, la vida depende de una manera muy importante de la luz proveniente del sol, ya que regula una amplia variedad de procesos fisiológicos y del desarrollo, a través de la alteración en la expresión de diversos genes que responden a este estímulo (Ma y col., 2001; Linden y col., 1997). La habilidad de percibir la luz es crucial para lograr la supervivencia de los organismos, ya que esto les permite adaptarse y responder de manera adecuada a los distintos cambios en las condiciones medioambientales (Linden y col., 1997).

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 la célula (Briggs y Huala, 1999). A lo largo de la evolución, la vida en la tierra ha estado expuesta a radiaciones electromagnéticas internas y externas; y de entre las más importantes, se encuentra las provenientes del sol. En el sol se desarrollan reacciones de fusión termonuclear, liberándose grandes cantidades de energía que se encuentra en forma de radiación electromagnética, a la que se le conoce como luz. La luz puede usarse como fuente de energía y como fuente de información; el uso depende de la interacción que tenga con los ecosistemas electrónicos moleculares. Toda materia con carga eléctrica puede tomar energía de un campo eléctrico, como electrones de los átomos y moléculas al interactuar con la luz, un electrón puede pasar de un estado basal a uno excitado absorbiendo la energía de su entorno y liberándola al regresar al estado basal (Ríos, 2004).

Las emisiones solares caen en un amplio rango de longitudes de onda, las de menor energía y mayor longitud de onda concuerdan con la energía necesaria para las vibraciones de enlaces moleculares y al ser absorbida se transforma en calor, a estas emisiones se les coloca en el rango de infrarrojo (Figura 1). Las emisiones de mayor energía y menor longitud de onda, son las que dan inicio a las reacciones fotoquímicas en moléculas de importancia biológica, que es en el rango de ultravioleta (Pérez, 2007).

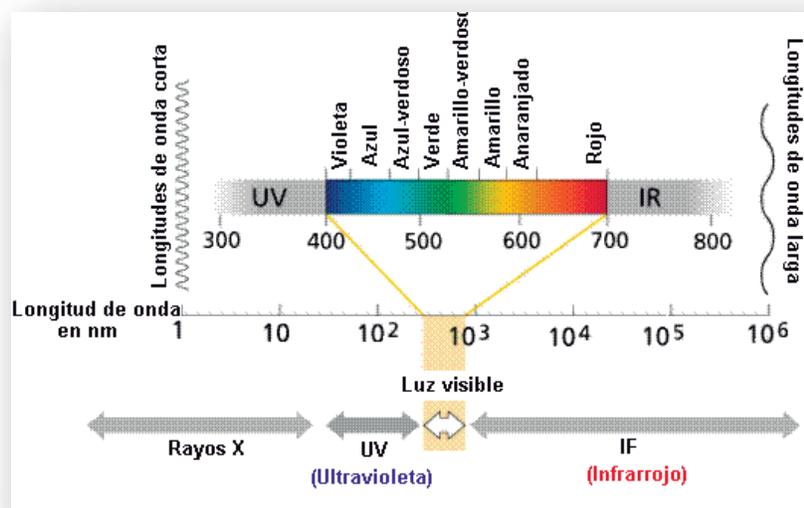


Figura 1. Espectro de luz visible.

(<http://perso.wanadoo.es/frs88/tpn/desc/espectro.htm>).

La luz visible por el ojo humano comprende longitudes de onda que van desde 780 nm (rojo lejano) a 380 nm (violeta), (Esquivel, 2007). La luz ultravioleta del tipo A (UV-A) y azul, entre otros, es percibida en los organismos como una señal de alerta que activa mecanismos de protección (producción de pigmentos), defensa (síntesis de enzimas que brindan protección) y formación de estructuras de resistencia para la perpetuación de la especie (formación de esporas) (Linden y col., 1997; Ma y col., 2001; Rosales-Saavedra y col., 2006; Berrocal-Tito y col., 2007).

1.2. Receptores de luz

En estudios de la percepción de la señal luminosa emergen dos aspectos cruciales: 1) ¿cómo es percibida la luz? y 2) ¿cómo se transmite la señal para generar la respuesta? En los últimos años se ha logrado un gran avance en el conocimiento bioquímico y genético de la percepción luminosa en varios modelos biológicos. Hoy en día se sabe que en eucariotes existen diferentes tipos de fotorreceptores, los cuales son capaces de percibir la luz roja/rojo lejano y azul (Cashmore y col., 1999).

Los seres vivos cuentan con un arreglo de receptores de luz que los capacita para la percepción de prácticamente todas las longitudes de onda del espectro de la luz visible. Todos los receptores de luz (fotorreceptores) que se han descrito consisten de proteínas asociadas a moléculas pequeñas sensibles a la luz (cromóforos) tales como el FMN, FAD y las porfirinas, que son activados por el impacto de un fotón. La energía absorbida causa un cambio conformacional en el cromóforo que lo transmite a la proteína causándole cambios conformacionales que la convierten a un estado activo (Chen y col., 2004; Ko y col., 2007). En el estado activo, el fotorreceptor es capaz de transmitir la señal regulando efectores que desencadenan una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos o directamente regulan la expresión de genes necesarios para respuestas fisiológicas específicas en la célula (Froehlich y col., 2002; Chen y col., 2004; Ko y col., 2007).

La absorción de la luz por estos compuestos es en el rango de la luz visible y debido a ello presentan color, motivo por el cual se les denomina cromóforos. Un claro ejemplo de una respuesta biológica a la luz son las reacciones que llevan a cabo las DNA fotoliasas, enzimas que reparan el daño provocado por la luz UV en el DNA. Estas proteínas llevan a cabo su función captando la energía en forma de fotones mediante un cromóforo cosechador, usualmente una pterina, la cual posteriormente transfiere la energía a una flavina, la cual una vez activa actúa sobre el sitio catalítico de la enzima (Cashmore y col., 1999).

Los fotorreceptores estudiados poseen un dominio de unión al cromóforo y un dominio efector que puede participar en interacciones con proteínas necesarias para la transducción de la señal o pueden incluir una actividad enzimática como la de cinasa presente en los fitocromos y las fototropinas (Chen y col., 2004; Ko y col., 2007).

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

Las plantas en particular tienen una compleja red para la percepción de la luz y la transducción de las señales que permiten detectarla y responder a los cambios de ésta, algunos de los cambios que se detectan son: intensidad, dirección, duración y calidad de la luz. Las plantas emplean al menos tres tipos de fotorreceptores: los criptocromos, las fototropinas (que detectan la región UV cercana/azul del espectro) y los fitocromos (que detectan la región de luz roja/jora lejano del espectro) (Frohlich y col., 2005).

Los criptocromos son flavoproteínas que contienen dos cromóforos, una pterina o una deazoflavina en un sitio y FAD en el dominio amino terminal, el cual posee similitud con DNA fotoliasas. Ambos criptocromos (*cry1* y *cry2*) se ubican de manera constitutiva en el núcleo (Cashmore y col., 1999; Smith, 2000). Las fototropinas también son flavoproteínas que contienen dos cromóforos de FMN, los cuales se encuentran asociados con dos dominios Per-Arnt-Sim (PAS) en el dominio amino terminal de la molécula (Briggs y Onley, 2001; Kagawa y col., 2001; Sakai y col., 2001; Briggs y col., 2002). Existen datos que indican que la fototropina (*phot1*) está asociada a la membrana plasmática como una proteína periférica, mientras que la localización subcelular de *phot2* aún no se determina (Quail, 2002). Los fitocromos son cromoproteínas diméricas que consisten de una subunidad polipeptídica que lleva un cromóforo de tetrapirrol lineal (fitocromobilina) que establece una unión covalente con una cisteína, que se encuentra conservada en el dominio de unión al cromóforo. Estos fotorreceptores se pueden encontrar en dos formas interconvertibles: una forma Pr que absorbe luz roja y una forma Pfr que absorbe luz roja lejana (Chen y col., 2004). Se considera que la forma Pfr es la forma activa del fitocromo debido a que muchas de las respuestas de las plantas son reguladas por la luz roja. (Chen y col., 2004; Jiao y col., 2007).

La forma Pr de los fitocromos se localiza en el citosol, pero se transloca a núcleo después de la fotoconversión a su forma Pfr (Yamaguchi y col., 1999). La fotopercepción de cada una de las tres clases de fotoreceptores dispara una vía de señalización específica que induce cambios selectivos en la expresión genética que conduce a varias respuestas de crecimiento y desarrollo (Ma y col., 2001; Tepperman y col., 2001).

Las tres clases de fotoreceptores realizan distintas funciones fotosensoras y/o fisiológicas en las plantas (Briggs y Huala, 1999; Cashmore y col., 1999; Smith, 2000). Los criptocromos y fitocromos controlan el crecimiento y el desarrollo, dependiendo de las variaciones en la longitud de onda, la intensidad y la duración diurna de la radiación (Cashmore y col., 1999; Smith, 2000), mientras que las fototropinas funcionan principalmente controlando la direccionalidad del crecimiento (fototropismo) en respuesta a la ubicación de la fuente luminosa y/o al movimiento intracelular del cloroplasto en respuesta a la intensidad luminosa (Briggs y Huala, 1999; Kagawa y col., 2001; Sakai y col., 2001; Jarillo y col., 2001).

Algunas de las respuestas reportadas por acción de la luz azul son: El fototropismo en plantas y hongos (Kaufman y col., 1993; Denisson y col., 1979), la inducción de la síntesis de carotenos en hongos (Rau y col., 1985), y el encarrilamiento del ritmo circadiano en diversos organismos (Gerhring y col., 2003). En los hongos, la luz azul-UVA regula al fototropismo, la carotenogénesis, el crecimiento, la reproducción y los ritmos circadianos (Linden y col., 1997; Casas-Flores y col., 2004; Schmoll y col., 2005; Silva y col., 2006; Idnurm y col., 2006).

Son pocos los organismos en los que se ha estudiado el papel de la recepción y respuesta a la luz roja. Esto se debe a que no en todos se ha encontrado una respuesta a este estímulo, por otro lado, aunque en algunos otros organismos como *Neurospora crassa* se han reportados receptores a la luz roja como es el caso de los fitocromos PHY 1 y PHY2, aun no se conoce una respuesta del hongo a este tipo de luz. Mas recientemente, se encontró se encontró que el hongo *Aspergillus nidulans* reprimía su desarrollo sexual por acción de la luz roja (Blumenstein y col., 2005).

1.3. Percepción de la señal luminosa en hongos

Como ocurre en el resto de los organismos, los hongos también responden a las señales provenientes del medio ambiente, incluyendo la luz, y dado que esta desencadena muchas respuestas en ellos como la conidiación, el fototropismo, el desarrollo sexual, el encarrilamiento del ritmo circadiano, etc., no es sorprendente que los hongos sean capaces de responder a diferentes tipos de luz, desde la ultravioleta hasta el rojo lejano. Además de las evidencias fisiológicas de su respuesta, así como los proyectos de secuenciación de genomas han revelado que las cuatro clases de fotoreceptores encontrados en otros reinos, se encuentran conservados en los hongos (Purschwitz y col., 2006) (Figura 2). El hongo cuyas respuestas se han estudiado en mayor detalle es *N. crassa*, donde los mecanismos genéticos y moleculares son mejor conocidos.

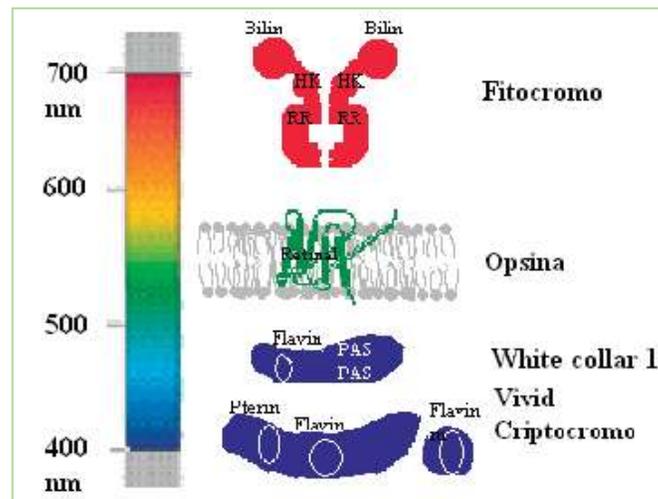


Figura 2. Diferentes proteínas encontradas en los genomas de diversos hongos que podrían funcionar como fotoreceptores (modificado de Purschwitz y col., 2006).

1.4. *Neurospora crassa* como modelo de la percepción de la luz azul

El ascomiceto *N. crassa* tiene un micelio profuso de color blanquecino al crecer en la obscuridad, mas la exposición a la luz provoca que éste adquiera un color naranja intenso. Esta pigmentación se debe a que sintetiza grandes cantidades de β -caroteno en las esporas asexuales (conidias) y en las hifas de micelio (Linden y col., 1997). Todas sus respuestas a la luz caen en el rango de UV/azul y éstas incluyen: la inducción de síntesis de carotenos, el fototropismo de los sacos periteciales, la inducción del crecimiento del micelio y la formación de las esporas asexuales, cambios en el potencial de membrana, inducción de la expresión génica y modificación protéica, y el encarrilamiento del ciclo circadiano (Lauter, 1996). En el modelo de estudio *N. crassa*, mediante un rastreo exhaustivo de mutantes “ciegas a la luz” sólo se identificaron dos proteínas, WC-1 y WC-2 (White Collar-1 y -2), con dominios PAS y un dominio de unión a DNA tipo GATA, que regulan todas las respuestas a la luz azul descritas en este hongo (Ballario y col., 1996; Linden y Macino, 1997). La proteína WC-1 tiene tres dominios PAS (PAS-A, -B, -C) y WC-2 tiene sólo un dominio PAS (Talora y col., 1999). El dominio PAS-A de WC-1 es un dominio especializado llamado LOV (Froehlich y col., 2002; He y col., 2002). 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 y col., 2002; He y col., 2002). En *N. crassa*, las proteínas WC forman heterodímeros y esta interacción se lleva a cabo principalmente entre el dominio PAS-C de WC-1 con el único dominio PAS presente en WC-2, esa interacción es esencial para la función del complejo WC (CWC) y la regulación de todas las respuestas activadas por la luz azul en ese hongo (Cheng y col., 2003). WC-1 actúa como el fotorreceptor a través de la flavina unida en el dominio LOV, y en combinación con WC-2 canaliza la entrada de la luz azul activando directamente la expresión de los genes necesarios para las diferentes respuestas a la luz azul descritas en *N. crassa*. Por lo tanto aunque WC2 no participa directamente en la captación de la luz es esencial para la formación del receptor (Linden y col., 1997; Froehlich y col., 2002; He y col., 2002).

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). 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).

Las respuestas a luz azul en *N. crassa* son el resultado de la inducción de la transcripción de genes y síntesis de proteínas que participan en diferentes procesos fisiológicos. Por ejemplo, la inducción de la biosíntesis de carotenos es debida a la inducción de la transcripción de los genes albino (*al-1*, *al-2* y *al-3*) (Schmidhauser y col., 1990; Caratolli y col., 1994). Se ha demostrado por métodos tradicionales y por microarreglos de genes utilizando DNA complementario (cDNA) que se transcriben más de 30 genes de una manera dependiente de la luz azul (Linden y col., 1997; Lewis y col., 2002) y se sabe que algunos de estos genes están involucrados en los diferentes procesos anteriormente descritos. De acuerdo a las cinéticas de inducción de la expresión genética por luz podemos encontrar dos tipos de genes: 1) de respuesta temprana y 2) de respuesta tardía (Linden y col., 1997; Lewis y col., 2002). La expresión de estos genes se observa durante los primeros 5 min después del pulso de luz azul y alcanza un pico máximo entre los 15 y los 30 min. Como ejemplo se pueden mencionar a los genes *frecuency* (*frq*), *albino* (*al-1*, *al-2* y *al-3*), genes de conidación (*con-6*, *con-10*), *bli* y varios genes del reloj circadiano (*ccgs*) (*ccg-4*, *ccg-6*) (Linden y col., 1997).

1.5. Características del género *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* están clasificadas como hongos imperfectos dentro de la subdivisión Deuteromycota, ya que no se les conoce reproducción sexual. El micelio es blanquecino en oscuridad y se reproduce asexualmente formando conidias de color verde oscuro. El micelio se caracteriza por poseer hifas más o menos ramificadas, tabicadas y con más de un núcleo por célula. Las conidias poseen un solo núcleo haploide, son ovoides, de color verde y se forman sobre estructuras muy ramificadas o conidióforos que a su vez se sitúan sobre células especiales denominadas fialides (Rosen y col., 1974). En determinadas condiciones nutricionales o frente a la desecación se producen otro tipo de estructuras de resistencia denominadas clamidosporas (Lewis y Papavizas, 1984). Crecen a un ritmo rápido en cultivo con la producción de numerosas esporas de color verde, característica de este género, utilizan un amplio rango de compuestos como fuente de carbono y nitrógeno, entre los que se encuentran monosacáridos o disacáridos (Danielson y Davey, 1973).

1.6. Clasificación taxonómica de *Trichoderma atroviride*

El género *Trichoderma* se encuentra dentro del grupo de los hongos asexuales denominados Deuteromycota (Tabla I). Las primeras clasificaciones taxonómicas de género *Trichoderma* son preliminares y se basan fundamentalmente en las características morfológicas de las especies (crecimiento rápido, esporulación abundante, conidias verdes).

Tabla I. Clasificación taxonómica de *Trichoderma atroviride* (Samuels, 1996; Kuhls y col., 1997).

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hypomycetes
Orden	Hyphales
Familia	Moniliaceae

1.7. Conidiación de *Trichoderma atroviride*

En *Trichoderma* la conidiación puede ser inducida por 2 vías conocidas: estrés nutricional y luz. Cuando la conidiación es inducida por estrés nutricional la formación de conidias tiene lugar principalmente en la parte central de la colonia (Horwitz y col., 1985), donde los nutrientes se han agotado. Cuando la conidiación es inducida por luz, un pulso luminoso es suficiente para inducir la conidiación en una colonia que crece en oscuridad y a las 24 h aproximadamente se forma un anillo de conidias localizado en lo que era la periferia de la colonia al momento de la iluminación (Figura 3) (Betina, 1984).

Este patrón definido y localizado denominado fotoconidiación permite utilizar a *Trichoderma* como modelo fotomorfogénico para estudiar el proceso de percepción de la luz. Así, definimos fotomorfogénesis como todos aquellos cambios morfológicos sufridos por un organismo después de ser expuesto a la luz.

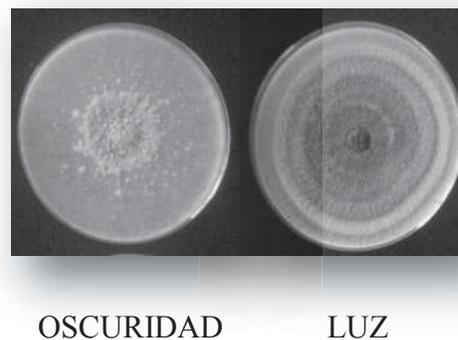


Figura 3. Fotoconidiación de *Trichoderma atroviride*. Se observa la formación del anillo de conidias después del pulso de luz, mientras que el control en la oscuridad crece como micelio vegetativo

La esporulación en hongos puede ser estimulada por otros factores, especialmente por aquellos que involucran algún tipo de estrés. En el caso de *Trichoderma*, éste esporula cuando el crecimiento ha cubierto por completo la caja Petri, lo cual es debido posiblemente a la limitación de nutrientes. Se ha observado que la limitación de carbono en el medio de cultivo provoca la esporulación de *Trichoderma* y otros hongos (Gressel y Rau, 1983).

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

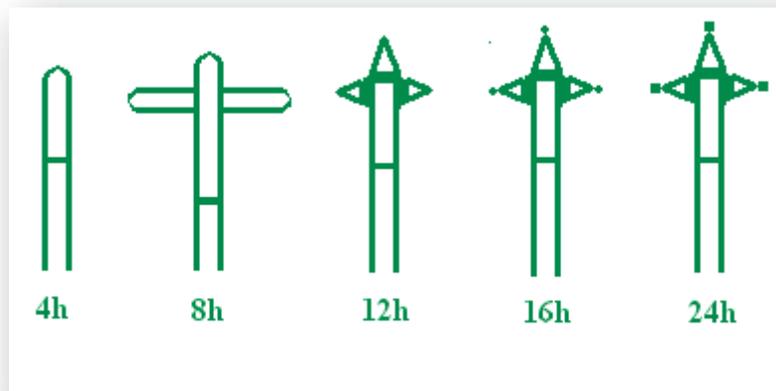


Figura 4. Cambios morfológicos observados durante la fotoconidiación de *Trichoderma atroviride*. Tomado de Betina (1984).

La reproducción asexual es la respuesta más clara, localizada y definida, que es activada por la luz azul-UVA en *Trichoderma*. Un pulso de luz azul-UVA aplicado a una colonia de *T. atroviride*, crecida en la oscuridad, estimula la formación sincronizada en tiempo y espacio de un anillo de conidias (fotoconidiación), que corresponde al perímetro de la colonia en el momento que se aplicó el estímulo. (Betina, 1984).

Como se mencionó antes, en *T. atroviride* se han identificado dos genes que codifican proteínas homólogas a las proteínas WC de *N. crassa* a los que nombró “Blue Light Regulator” (BLR-1 y BLR-2) que son esenciales para la conidiación inducida por la luz azul. BLR-1 tiene 1020 aminoácidos y presenta un 53% de identidad con WC-1, mientras que BLR-2 tiene 484 aminoácidos y es 52% idéntica a WC-2 (Casas-Flores y col., 2004). La proteína BLR-1 tiene 3 dominios PAS mientras que BLR-2 tiene sólo uno, el primer dominio PAS presente en el extremo amino-terminal de la proteína BLR-1, es un dominio LOV, similar al dominio descrito en el fotorreceptor WC-1 de *N. crassa* y en las

fototropinas de plantas. En el dominio LOV de BLR-1 están presentes todos los aminoácidos necesarios para la unión de una molécula de flavina (FAD), lo cual sugiere que BLR-1 es el fotorreceptor de luz azul en *T. atroviride*. La proteína BLR-1 actúa como el fotorreceptor, y asociada con BLR-2 transducen la señal luminosa mediante la regulación de la expresión de los genes de respuesta a la luz azul a través de ERL (elementos de respuesta a la luz) presentes en sus promotores.

Todos los genes regulados a través de las proteínas BLR requieren estrictamente de ambas proteínas funcionales, sugiriendo que BLR-1 y BLR-2 actúan como un complejo, muy probablemente interactuando a través de sus dominios PAS, al igual que en el caso de *N. crassa* (Casas-Flores y col., 2004; Rosales- Saavedra y col., 2006). Ensayos de fotoconidiación con la luz azul en las cepas mutantes de *T. atroviride* Δ BLR-1 y Δ BLR-2 mostraron que ninguna de las cepas mutantes conidia en respuesta a la luz azul. La morfología de las colonias mutantes en presencia de luz es idéntica a la de la cepa silvestre en oscuridad. El análisis genético de las mutantes *blr*, indican que BLR-1 y BLR-2 podrían funcionar como un complejo y activar la expresión de genes regulados por la luz (Casas-Flores y col., 2004).

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*. Esto sugiere un papel dual de estas proteínas, como activadores y represores de la expresión genética. Por otro lado, se han identificado varios genes que responde a la luz de forma independiente de las proteínas BLR. Esta evidencia apoya la existencia de una vía alterna de detección de la luz, independiente de las proteínas BLR (Rosales-Saavedra y col., 2006). Existen datos que sugieren que la vía de fotopercepción independientes de la proteína BLR, puede estar relacionada con la vía de utilización de cAMP, como segundo mensajero (Casas-Flores y col., 2006). Ya que la limitación de carbono no induce la conidiación en las mutantes Δ BLR-1 y Δ BLR-2, puede ser que las proteínas BLR están involucradas en la detección de diferentes señales que permiten la esporulación en el hongo. Se ha propuesto que el complejo BLR-1 y BLR-2, en si mismo, percibe o traduce la señal originada por falta de glucosa. El hecho de que el complejo BLR1/BLR2 este involucrado en el control de la limitación de carbono en *T. atroviride* representa una nueva conexión entre la detección de la luz y la fuente de carbono (Casas-Flores y col., 2006).

La cepa Δ BLR-2 conidia cuando se limita el nitrógeno al igual que la cepa IMI, pero no en la limitación de carbono (glucosa). Por ello se planteó la posibilidad de que BLR-2 mantuviera alguna relación con los componentes de las vías que sensan y transportan este azúcar o bien que forme parte de la vía y como resultado no se presente la conidiación por limitación de carbono en la mutante. Es posible que los genes de conidiación no se expresen en la mutante por la falta de BLR-2, donde posiblemente esté interrumpida la señal que debería darse por la ausencia de carbono en el medio (Casas y col., 2004). Por otra parte se ha sugerido que BLR-1 podría tener la función de unir uno o varios ligandos diferentes y responder a la presencia o ausencia de fuentes de carbono. De forma alternativa, cualquiera de los dominios PAS de BLR-1 ó BLR-2 podrían tener capacidades duales de detección, integración redox (limitación de carbono) y luz (Figura 5) (Pérez., 2007).

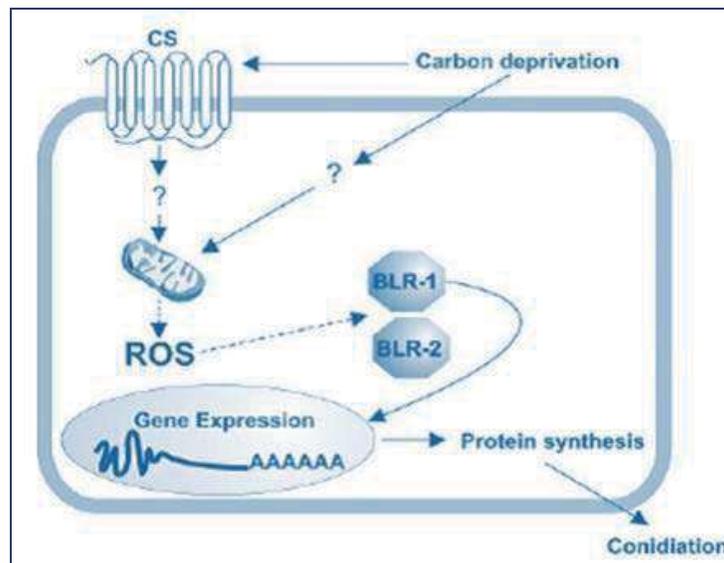


Figura 5.- Modelo hipotético mostrando la función del complejo BLR en sensibilidad a carbono. La BLR-1 y/o BLR-2 podrían percibir o transducir la señal originada de la falta de glucosa detectada por un sensor/receptor (CS) o debido a la falta de la capacidad reductiva en la célula, vía especies reactivas de oxígeno (ROS) originada de la mitocondria resultante en la inducción de la expresión génica. Líneas continuas indican pasos hipotéticos. Tomado de Casas y col., 2006.

En estudios recientes, para abordar la hipótesis de que BLR-2 es un factor limitante en el sistema de percepción de luz azul a través de las proteínas BLR, se realizó la sobre-expresión de *blr-2* en *T. atroviride*. En los resultados se observaron que la sobre-expresión aumenta la fotosensibilidad, la conidiación fue exacerbada, indicando de forma clara que la expresión de *blr-2* es un factor limitante en la transducción de luz azul a través del complejo BLR. Caso contrario a la sobre-expresión de *blr-1*, con una disminución en la fotoconidiación. Estos resultados sugieren un delicado balance en los niveles de BLR-1/BLR-2 es un factor importante para la apropiada percepción y transducción de la señal luminosa en *T. atroviride*. Algunos genes regulados por la luz siguen siendo inducidos en las cepas Δ BLR y se ha considerado que su regulación ocurre por un sistema de percepción alternativo a las BLR (Rosales y col., 2006). Por otra parte y a través de un estudio exhaustivo de microarreglos de cDNA se reportó que para *Trichoderma atroviride* 2,8% de sus genes responden a la luz azul, de los cuales, el 2% se activan, a estos genes se les denominó genes **blu** (**blu**-light-**u**pregulated), mientras que el 0.8% restante se ve reprimido bajo esa condición y fueron llamados genes **blu** (**blu**-light-**d**ownregulated). Se han encontrado que son aproximadamente treinta genes (**blu**) upregulated y diez genes (**blu**) downregulated (Rosales-Saavedra y col., 2006). La identidad y participación de estos genes esta aun en estudio.

Tabla II. Identidad de los genes **blu** (**blu**-light-**u**pregulated) de *Trichoderma atroviride*

Gene	Fold change	Hit (score in bits)	BLAST match (GenBank no.)	Organism
blu-5	10.47	–	No hits found	–
blu-7	8.85	2.00E–11 (72.8)	Predicted protein (gi 42548056)	<i>Gibberella zeae</i> PH-1
blu-15	4.18	0(506)	Amino acid permease (gi 462414)	<i>T. atroviride</i>
blu-17	3.59	6.00E–50 (199)	Geranylgeranyl pyrophosphate synthetase (gi 42545480)	<i>Gibberella zeae</i> PH-1
blu-22	2.68	2.00E–96 (354)	Hypothetical protein FG10190.1 (gi 42547190)	<i>Gibberella zeae</i> PH-1

(Modificado de Rosales-Saavedra y col., 2006).

II. JUSTIFICACIÓN

En *Trichoderma atroviride* el complejo formado por las proteínas BLR-1/BLR-2 parece jugar un papel esencial como receptor de luz y como factor transcripcional durante la fotoconidiación. Se ha demostrado recientemente que el complejo BLR es necesario para la inducción de la conidiación por limitación de carbono, aún en ausencia de la luz, indicando la posible existencia de una comunicación cruzada entre la vía de señalización de la luz y la detección de carbono. El presente trabajo se realizó con la finalidad de determinar el efecto que tiene la concentración y naturaleza de la fuente de carbono sobre la conidiación inducida por su limitación en las mutantes ($\Delta blr-1$ y $\Delta blr2$). Este estudio se hizo extensivo para aquellas mutantes generadas por antisentido de los genes *blu* a fin de obtener los primeros datos fisiológicos asociados a su papel en la fotoconidiación.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

- Establecer el efecto de la limitación en la fuente de carbono sobre el desarrollo asexual y crecimiento de *Trichoderma atroviride* y mutantes BLR y BLU.

3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de conidias en *T. atroviride* y mutantes afectadas en la respuesta a la luz.
- Evaluar la influencia de la fuente de carbono y su limitación sobre el crecimiento de *T. atroviride* y mutantes BLR y BLU.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Microorganismos

Se utilizaron las siguientes cepas, (Tabla III) de la especie *Trichoderma atroviride*, mismas que fueron proporcionadas por el CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

Tabla III. Cepas de *Trichoderma atroviride* que fueron utilizadas en el presente trabajo

CLAVE DE IDENTIFICACION	GENOTIPO
Grupo I	
IMI-206040	Wild Type
ΔBLR1	Delección del gen blr1
ΔBLR2	Delección del gen blr2
Grupo II	
Seblr1-8	Sobre expresión del gen blr1
Seblr2-13	Sobre expresión del gen blr2
Asblu5-2	Anti sentido del gen blu-5
Asblu5-5	Anti sentido del gen blu-5
Asblu7-1	Anti sentido del gen blu-7
Asblu7-7	Anti sentido del gen blu-7
Asblu15-8	Anti sentido del gen blu-15
Asblu22-1	Anti sentido del gen blu-22
Asblu22-10	Anti sentido del gen blu-22
Seblu7-10	Sobre expresión del gen blu-7
Seblu17-16	Sobre expresión del gen blu-17
Seblu17-12A	Sobre expresión del gen blu-17

4.2. Medios de cultivo

PDA (Papa Dextrosa Agar, BD DIFCO). Medio Vogel (VM) (H. J. Vogel. Microbial Genetics Bulletin 13:42-43,1956). Se utilizó fructuosa (Jalmek) (180.16g/L), glucosa (MERCK) (180.16g/L), sacarosa (Jalmek) (342.30g/L) como fuente de carbono, NH₄NO₃ (J.T. Baker) (80.04g/L) como fuente de nitrógeno y agar bacteriológico (BD Bioxon) (15g/L).

4.2.1. Medio PDA

El medio PDA se preparo de la siguiente manera, disolver 39g de polvo de PDA en un 1 litro de agua destilada, mezclar bien y esterilizar por calor húmedo mediante la utilización de auto clave a 120°C por 15 min.

4.2.2. Medio Vogel

El VM fue preparado como un stock 50X. Brevemente se disuelve sucesivamente cada uno de los elementos (Tabla IV) en 750 ml de agua destilada a temperatura ambiente, aforar la solución hasta 1 litro y posteriormente adicionar 2 ml de cloroformo como conservador. El medio fue utilizado a una concentración 1X y las fuentes de C y N se adicionaron a partir de las soluciones stock.

Tabla IV. Elementos del Medio Vogel, a una concentración de 50X

Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	150 g
KH_2PO_4 , Anhidro	250 g
NH_4NO_3 , Anhidro	100 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 g
*SOLUCION DE ELEMENTOS TRAZA	5 ml
**SOLUCION DE BIOTINA	2.5 ml

**Se mantuvo a 4°C y protegida de luz.

*SOLUCION DE ELEMENTOS TRAZA

Ácido cítrico. $1\text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
H_3BO_3	0.05 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g

Se disolvió en 100ml de agua destilada.
(H.J.Vogel. Microbial Genetics Bulletin)

4.2.3. Medio Mínimo Vogel

Para los ensayos se preparo el Medio Mínimo Vogel, agregando Vogel 50X con P, C y N; agar bacteriológico y agua destilada, de acuerdo a la (Tabla V). Todos los medios se esterilizaron a 120°C durante 15 minutos. Posteriormente se agrego las soluciones stock de nitrato de amonio y la fuente de carbono según sea el caso, previamente estériles.

Tabla V. Cantidades de medios requeridos para la preparación de 1 litro de Medio Mínimo Vogel

	FRUCTUOSA (C ₆ H ₁₂ O ₆)		GLUCOSA (C ₆ H ₁₂ O ₆)		SACAROSA (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	
	100 mM	5 mM	100 mM	5 mM	100 mM	5 mM
Agua destilada	867.5 ml	962.5 ml	867.5 ml	962.5 ml	867.5 ml	962.5 ml
Agar	15 gr	15 gr	15 gr	15 gr	15 gr	15 gr
Vogel C/P,N,C	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
Stock NH ₄ NO ₃	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml	12.5 ml
Stock (fuente de carbono)	100 ml	5 ml	100 ml	5 ml	100 ml	5 ml

4.2.4. Soluciones stock

Los azúcares utilizados como fuente de carbono se prepararon como soluciones stock (1M). El NH₄NO₃ se preparó como una solución stock (2M).

4.2.5. Condiciones de esterilización

Los medios de cultivo, soluciones stock y material utilizado en el cultivo de las cepas de hongos se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 120°C por 15 min.

4.3. Preparación del papel celofán

Se recortaron en forma circular del diámetro de una caja Petri de (8cm) papel celofán; lavándose con agua destilada caliente dos veces. Cada hoja de papel celofán húmeda se extendió una a una sobre servitoallas y se taparon con papel aluminio, una vez esterilizado el papel celofán se coloca sobre la superficie del Medio Mínimo Solido.

4.4. Determinación de crecimiento por peso seco

Para los ensayos se prepararon preinóculos de las diferentes cepas (Tabla III), colocando un bloque de micelio de cada cepa en medio PDA, incubándolas en oscuridad por un periodo de 48 h a 25°C. Los bloques extraídos de los preinóculos, se transfirieron al centro de las cajas Petri que contenían los diferentes Medios Mínimos (TablaV). La inoculación se realizo en oscuridad (luz roja), incubándose a una temperatura 25°C en condiciones de luz y oscuridad.

Esta determinación de biomasa se llevo acabo por el método de peso seco utilizando para ello las placas de Medio Mínimo antes mencionadas que contenían papel celofán. De cada colonia formada a los 5 días (grupo II) y 7 días (grupo I) de acuerdo a la (Tabla III), se raspo con la ayuda de una espátula y el micelio desarrollado se colecto en un papel filtro, que previamente se coloco a peso constante. El papel filtro con el micelio del hongo se secó a 80°C por 48 h en la estufa. Los valores se obtienen por diferencia entre el peso del papel con muestra y el peso del papel sin muestra a peso constante en mg.

4.5. Cuantificación de la producción de conidias

La cuantificación del número de conidias totales, se llevo acabo a 5 días para las cepas del (grupo II) y 7 días (grupo I) de la (Tabla III). Utilizando previamente las cajas Petri inoculadas con los preinoculos. Para la posterior cosecha, a cada colonia sele agrega 5ml de agua destilada estéril, se raspo cuidadosamente el micelio con la ayuda de una espátula estéril y se filtra la suspensión. Permitiendo recolectar la mayor producción de conidias en un tubo falcón.

Dependiendo de la concentración obtenida del filtrado se realizara diluciones para su posterior conteo, de no ser necesario, se realizara de forma directa. La lectura de conidias se lleva acabo en la cámara de Neubauer utilizando 10 µl de la suspensión de conidias, dejando reposar 1-2 minutos para su lectura. El conteo se realiza en los cuatro cuadrantes correspondientes a las esquinas y cuadrante central.

Para la cuantificación del número de conidias totales se aplica la siguiente formula:

$$(\text{No. de esporas})(\text{No.de cuadrantes})(\text{F.D})(10000) = \text{esporas/ml}$$

Donde: No. de esporas corresponde al número de esporas que se localizan en los 5 cuadrantes de la cámara, cuatro a cada una de las esquinas y el cuadrante central de la cámara; el No. de cuadrantes (5) corresponde a el total de cuadrantes leídos; F.D es el Factor Dilución; 10000 es una constante; esporas/ml es el numero de conidias que se encuentran presentes en 1 ml de suspensión evaluada.

4.6. Equipos

Campana de flujo laminar (MINIHELIC® DWYER INSTRUMENT INC), Incubadora, Estufa (Kiflab), Bascula analítica (Sartorius® BL120s), Microscopio (ZEISS).

4.7. Estadística empleada en los ensayos

Respecto a las estadísticas reportadas cabe mencionar que todas las cepas cultivadas (Tabla III) se realizaron por cuadruplicado en los ensayos por limitación de la fuente de C tanto en condiciones de luz y de oscuridad.

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

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

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

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

V. RESULTADOS

5.1. Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de carbono (C)

Las mutantes con interrupción en los genes *blr-1* o *blr-2* pierden la capacidad de fotoconidiar y de regular la expresión de genes de respuesta a la luz azul. En la fotoconidiación el complejo BLR-1/BLR-2 serían los implicados en percibir la señal luminosa para posteriormente unirse a los promotores de genes inducidos por la luz y con ello llevar a la conidición. En el caso de *Trichoderma*, el metabolismo de los carbohidratos ha sido relacionado fuertemente con las vías que conducen a la morfogénesis (conidiación) por lo que se decidió verificar si las proteínas BLR juegan un papel importante en la inducción de conidias por déficit de nutrientes, evaluando la respuesta de las mutantes respectivas a limitación de la fuente de C (glucosa, fructuosa y sacarosa).

5.2. Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de C (glucosa)

En la cuantificación de la producción de conidias de la cepa IMI, se observó un decremento en un 94.8% cuando se limito el C como fuente de glucosa ($1.67E+07$ conidias/ml), en relación a la concentración normal ($3.26E+08$ conidias/ml), en presencia de luz (Figura 6A). Las mutantes (Δ BLR-1 y Δ BLR-2) al crecer bajo condiciones limitadas de glucosa (5mM) mostraron presencia de conidias bajo condiciones de luz, en cambio en oscuridad Δ BLR-1 genero un número mayor de conidias (Figura 6C, D). ($1.48E+07$ conidias/ml) comparado con Δ BLR-2 ($1.11E+07$ conidias/ml), siendo mayor la producción de conidias en la concentración limitante bajo luz. En la concentración normal (100mM), no se observo conidiación alguna como había sido originalmente reportado.

Al establecer la relación de IMI y las mutantes BLR, la cepa silvestre ($1.67E+07$ conidias/ml) presenta un incremento en un 31% en la cantidad de conidias con respecto a la Δ BLR-1 ($1.48E+07$ conidias/ml) y Δ BLR-2 ($1.11E+07$ conidias/ml) en la fuente limitante en presencia de luz. Presentando en oscuridad IMI ($1.35E+07$ conidias/ml) un incremento en un 5% con respecto a Δ BLR-1 ($1.28E+07$ conidias/ml) bajo las condiciones anteriormente mencionadas, Δ BLR-2 no produjo conidiación alguna.

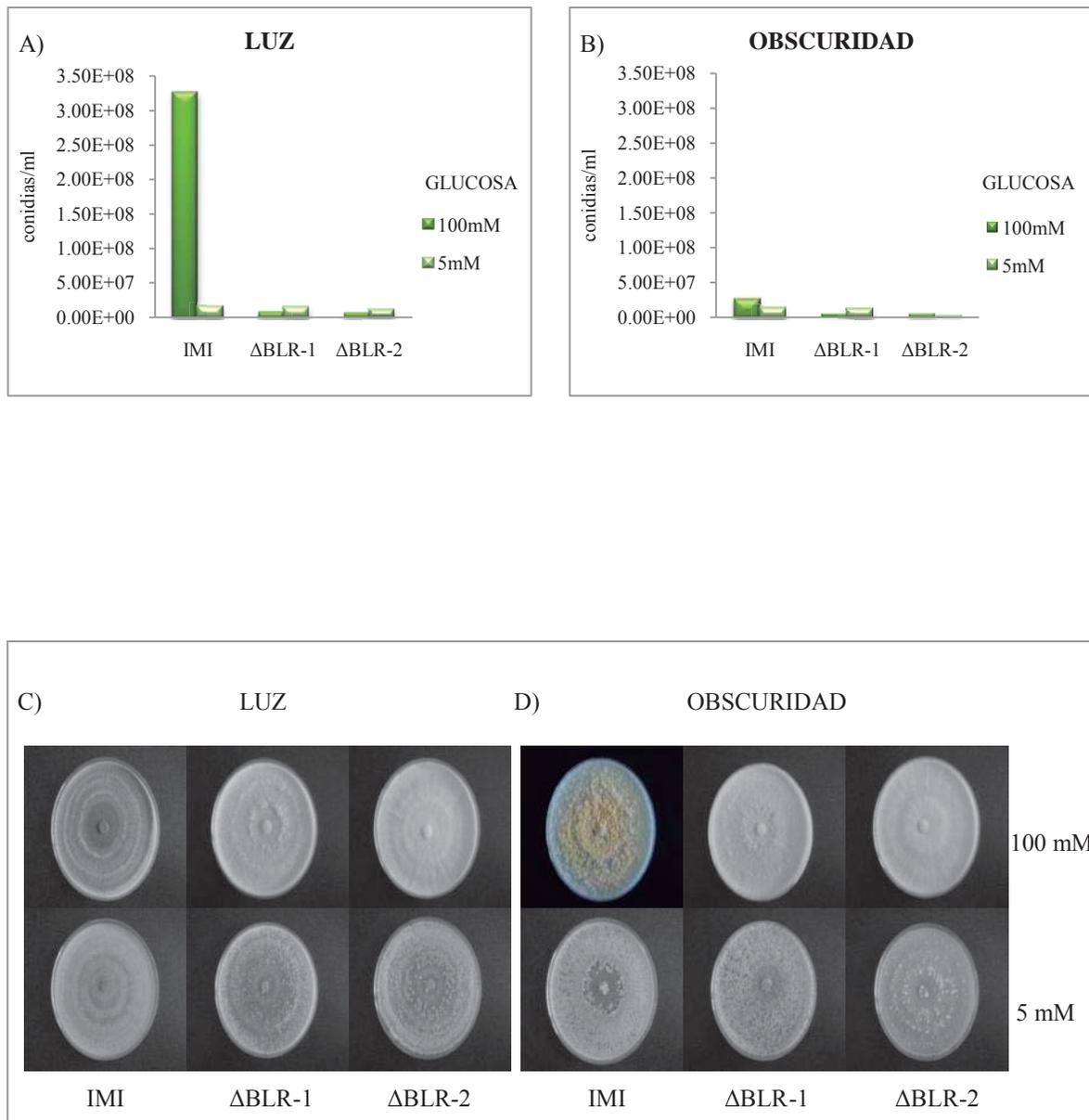


Figura 6. Análisis de la producción de conidación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2 en presencia de luz o en oscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 7 días a temperatura de 25 °C.

5.2.1. Determinación de la producción de biomasa generada por limitación de C (glucosa) en la cepa IMI y mutantes BLR

La cepa IMI presenta una disminución en la cantidad de biomasa en la concentración limitante de glucosa (5 mM) en relación a la concentración normal, en presencia de luz en un 72.9% (45.5 mg) y oscuridad en un 65.1% (61.15mg) (Figura 7A, B). Las mutantes BLR generaron mayor cantidad de biomasa respecto a la silvestre (IMI) en la concentración normal de glucosa independientemente de la presencia de luz (Δ BLR-1 226.8 mg, Δ BLR-2 129.7 mg) ó su ausencia (Δ BLR-1 185.9 mg, Δ BLR-2 119.4 mg), generando la Δ BLR-1 mayor cantidad de biomasa que Δ BLR-2 en un 74% en luz y 55.6% en oscuridad. Al realizar la comparación entre las mutantes BLR y la cepa IMI, la Δ BLR-1 (63.7 mg) y Δ BLR-2 (66.9 mg) generan mayor cantidad de biomasa en un 43.5%, en la concentración limitante con respecto a la cepa IMI (45.5 mg) en presencia de luz.

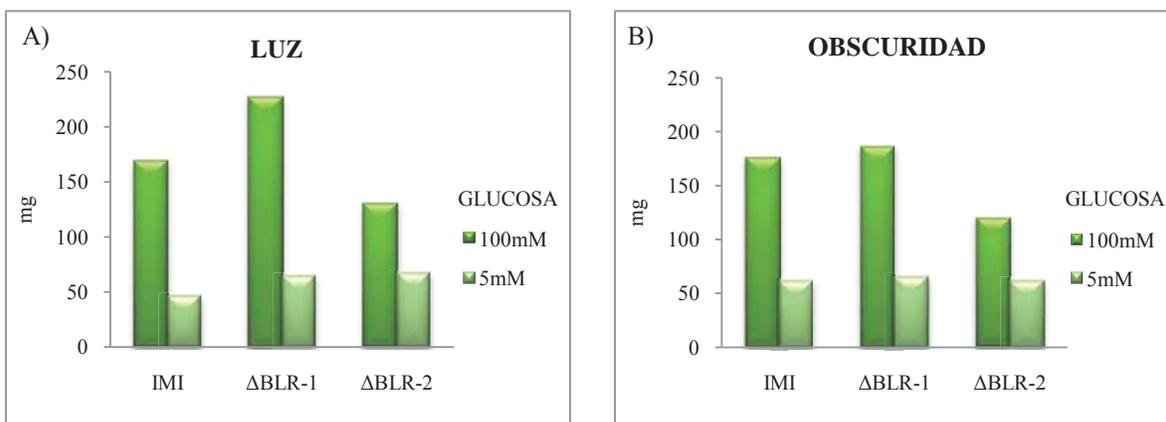
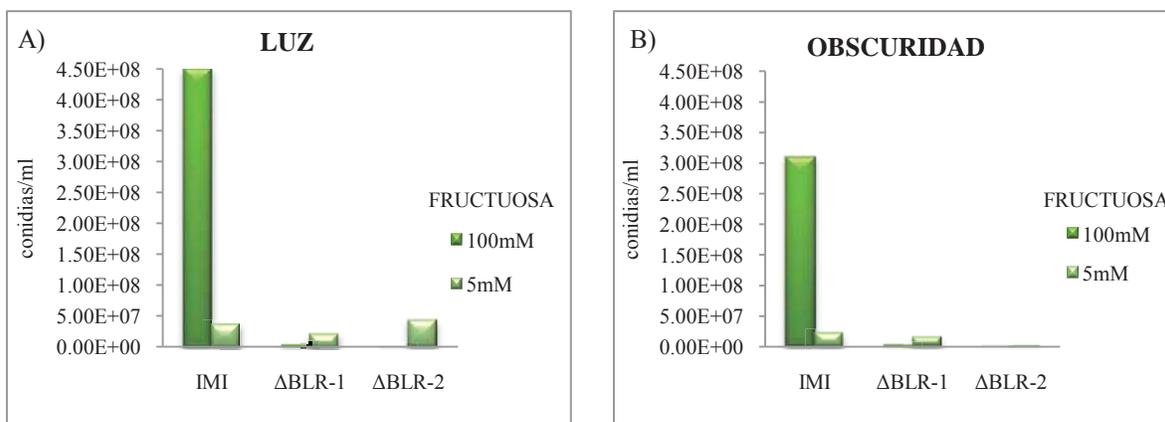


Figura 7. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2 en presencia de luz A) o en oscuridad B). Con un periodo de incubación de 7 días a temperatura de 25 °C.

5.3. Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de C (Fructuosa)

En la cuantificación de conidias de la cepa IMI, se observó un decremento en un 91.7% del número de conidias cuando se limitó la fuente de fructuosa ($3.70E+07$ conidias/ml), en relación a la concentración normal ($4.50E+08$ conidias/ml), en presencia de luz. Presentándose en obscuridad el mismo efecto bajo las condiciones anteriormente mencionadas, en la fuente limitante en un 92.7% (Figura 8A, B). Las mutantes (BLR-1 y BLR-2) al crecer bajo concentraciones limitadas de fructuosa (5mM) mostraron presencia de conidias, independientemente de las condiciones de luz y de obscuridad (Figura 8C, D). Al relacionar la cepa IMI con las mutantes BLR, la cepa IMI en la concentración limitante (5 mM) ($3.70E+07$ conidias/ml) genera mayor cantidad de conidias en un 70% para la Δ BLR-1 ($2.17E+07$ conidias/ml), siendo la Δ BLR-2 ($4.25E+07$ conidias/ml) en un 14.8% mayor para IMI en presencia de luz. En obscuridad bajo la concentración limitante la cepa IMI ($2.25E+07$ conidias/ml) presenta un aumento en un 59.5% para la Δ BLR-1 ($1.41E+07$ conidias/ml).



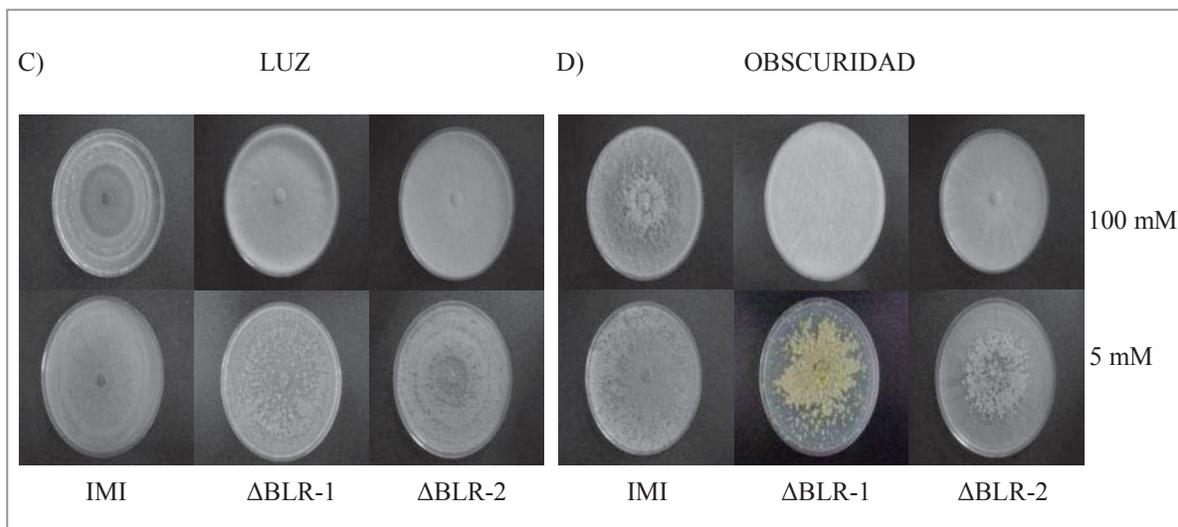


Figura 8. Análisis de la producción de conidación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (fructuosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2 en presencia de luz o en obscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de obscuridad, con un periodo de incubación de 7 días a temperatura de 25 °C.

5.3.1. Determinación de la producción de biomasa generada por limitación de C (Fructuosa) en la cepa IMI y mutantes BLR

La cepa IMI produjo una menor cantidad de biomasa cuando se limitó la fuente de fructuosa (5 mM) en relación a la concentración normal (100 mM), en un 92.4% en presencia de luz (145 mg) y 80% en obscuridad (152 mg) (Figura 9A, B). La cantidad de biomasa generada por la cepa Δ BLR-2 (80.1 mg) fue favorecida en un 20.9% en la concentración limitante (5 mM), con respecto a la Δ BLR-1 (66.2 mg) en condiciones de luz, en tanto en obscuridad la Δ BLR-2 (68.5 mg) disminuye en un 14.5% con respecto a la Δ BLR-1 (80.2 mg) en la condición limitada. Al relacionar las dos mutantes BLR, con respecto a la cepa IMI se observó que las mutantes generaron mayor cantidad de biomasa en la fuente limitante de fructuosa, en presencia de luz en un 84.9% y 59.2% en obscuridad.

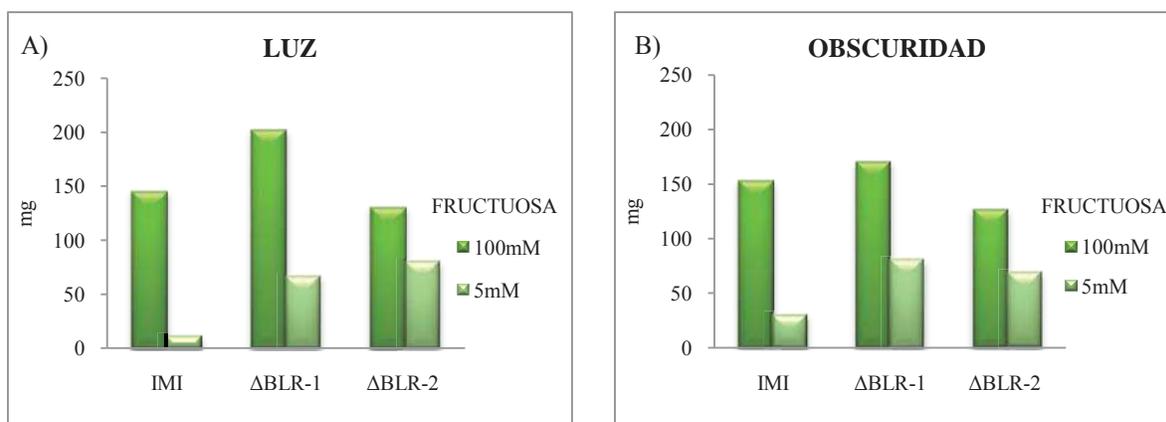


Figura 9. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (fructuosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2 en presencia de luz A) o en oscuridad B). Con un periodo de incubación de 7 días a temperatura de 25 °C.

5.4. Conidiación en la cepa IMI, Δ BLR-1, Δ BLR-2 por limitación de C (Sacarosa)

En la fuente de sacarosa, en la concentración normal (100 mM) la cepa IMI ($4.33E+08$ conidias/ml) presenta mayor conidiación en un 88.2% con respecto a la concentración limitante ($5.08E+07$ conidias/ml) en presencia de luz. Las mutantes BLR al crecer en la concentración limitada de sacarosa (5 mM) mostraron un indicio de la producción de conidias en presencia de luz (Figura 10C). En tanto en condiciones de oscuridad, no presentaron formación de conidias (Figura 10D). La diferencia en relación a la cepa Δ BLR-1 ($4.20E+07$ conidias/ml) y Δ BLR-2 ($2.05E+07$ conidias/ml) (Figura 10A) fue del 17.3% menos para Δ BLR-1 y 59.6% menos para Δ BLR-2 en relación a la IMI ($5.08E+07$ conidias/ml), cuando se limitó la fuente de sacarosa. Cuando las mutantes fueron crecidas en oscuridad, no se observó la formación de conidias (Figura 10B).

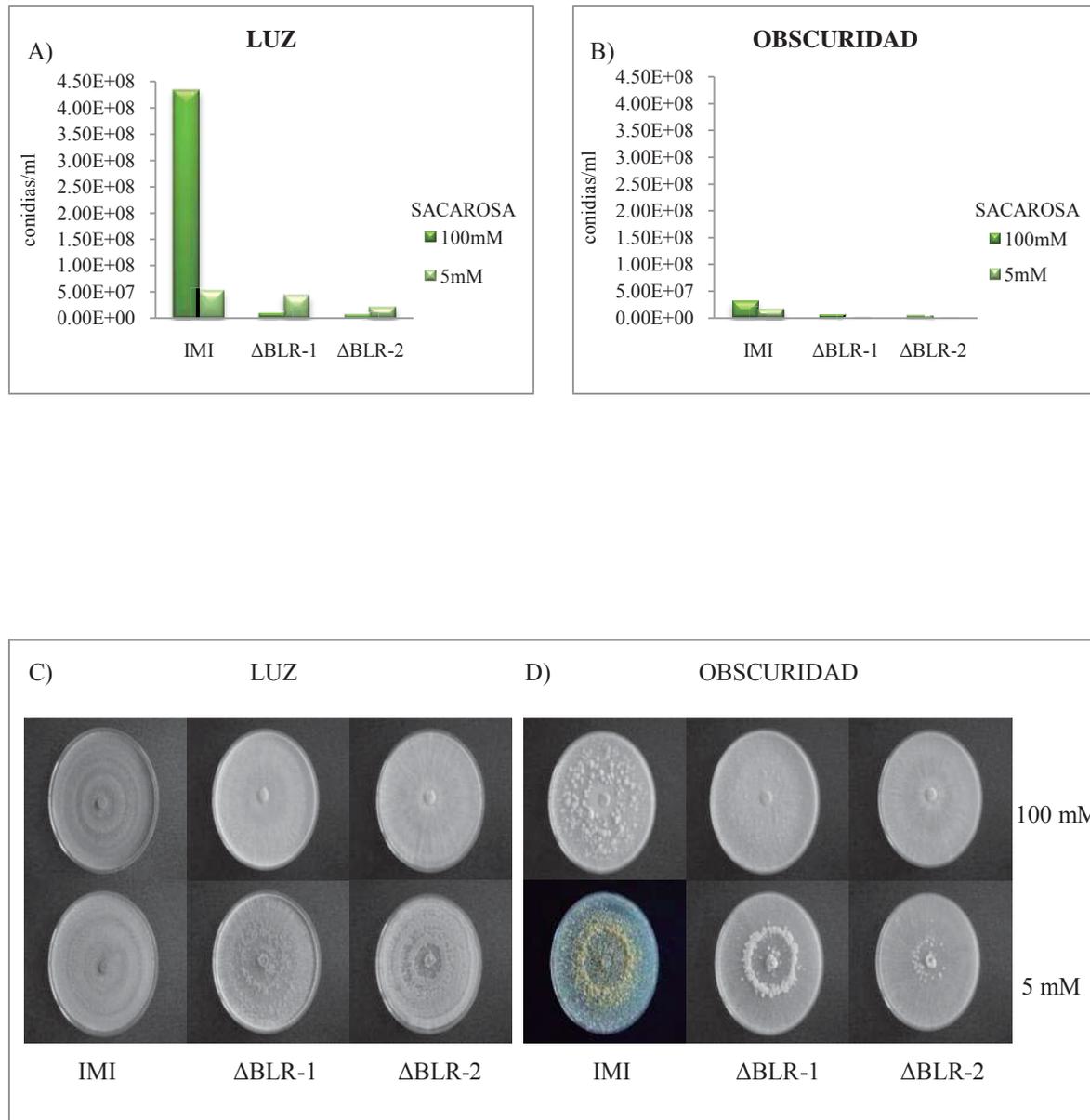


Figura 10. Análisis de la producción de conidación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2 en presencia de luz o en oscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 7 días a temperatura de 25 °C.

5.4.1. Determinación de la producción de biomasa generada por limitación de C (Sacarosa) en la cepa IMI y mutantes BLR

La cepa IMI produjo una menor cantidad de biomasa cuando se limitó la fuente de sacarosa (5 mM) en relación a la concentración normal (100 mM), en un 87% en presencia de luz (127 mg) y 65.7% en obscuridad (192.1 mg) (Figura 11A, B). En la producción de biomasa la Δ BLR-1, presentó mayor número de biomasa en la concentración normal, independientemente de las condiciones de luz en un 47% (183.7 mg) y oscuridad 39.8% (150.8 mg), en relación a la Δ BLR-2 donde se obtuvo una cantidad de biomasa en luz (124.9 mg) y en oscuridad (107.8 mg). La cepa IMI (22.3 mg) presenta una disminución en la fuente limitante en relación con la Δ BLR-1 en un 75% (89.2 mg) y en un 58% para la Δ BLR-2 (53.6 mg) en presencia de luz. En oscuridad la cepa IMI (65.7 mg) en la concentración limitante disminuye en un 24.2% (74.9 mg) en relación a la Δ BLR-1 y aumenta en un 27% con respecto a la Δ BLR-2 (51.6 mg).

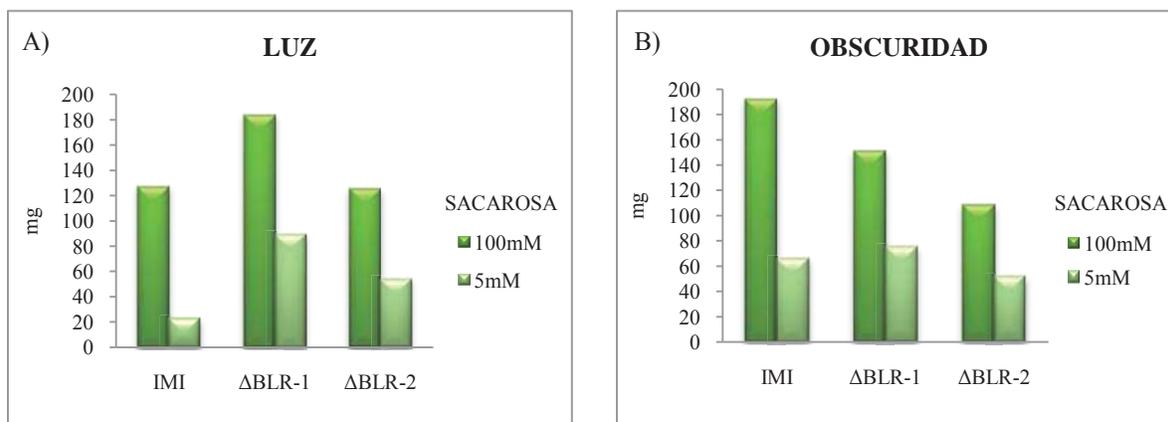


Figura 11. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Δ BLR-1 y Δ BLR-2 en presencia de luz A) o en oscuridad B). Con un periodo de incubación de 7 días a temperatura de 25 °C.

5.5. Conidiación en las cepas con sobre-expresión en los genes *blr* por limitación de carbono (C)

Investigaciones sobre la importancia de BLR-2 en las respuestas activadas por luz se han centrado en la estrategia de la sobre-expresión de la proteína. Para ello se ha generado transformantes que sobre-expresan *blr2* bajo el control de un promotor constitutivo. Todas las transformantes que mostraron altos niveles de expresión de *blr2* mostraron una respuesta exacerbada a la luz. El aumento en la producción de conidias coincide con la sobre-expresión de genes de respuesta rápida a la luz azul en estas transformantes, indicando que estos genes son necesarios para la fotoconidiación. Además, la acumulación del RNA mensajero (mRNA) para estos genes es más rápida que la observada en la cepa silvestre, indicando que BLR2 es un factor limitante en la transducción de la señal luminosa. Mediante PCR en tiempo real se ha corroborado que en la cepa silvestre los niveles de mRNA de *blr1* son aproximadamente de 2.5 veces más altos que *blr2*. Además, los niveles de mRNA para los genes *blr1* se incrementan después de un pulso de luz azul (alrededor del 30%), siendo mas pronunciado por la sobre-expresión de *blr2* (hasta un 90%). Interesantemente, las sobre-expresantes son 3 veces más fotosensibles a la luz azul que la cepa silvestre. Esto sugiere que *blr2* tiene una función esencial en la percepción de luz (Esquivel-Naranjo y col, 2007).

5.6. Efecto de la sobre-expresión de los genes *blr-1* y *blr-2* en la conidiación por limitación de C (glucosa)

En la cuantificación de producción de conidias de la cepa IMI, se observó un decremento en un 89.9% cuando se limito el C como fuente de glucosa ($1.22E+07$ conidias/ml), en relación a la concentración normal ($1.21E+08$ conidias/ml), en presencia de luz (Figura 12A). Las mutantes que sobre-expresan los genes *blr1* y *blr2* (Seblr1-8 y Seblr2-13), al crecer bajo condiciones limitadas de glucosa (5mM) mostraron presencia de conidias, independientemente de las condiciones de luz y de obscuridad (Figura 12C, D). Las cepas Seblr1-8 ($1.23E+08$ conidias/ml) y Seblr2-13 ($1.60E+08$ conidias/ml), generaron mayor cantidad de conidias en un 93% para Seblr1-8 y 94.8% para Seblr2-13, en la concentración normal, en relación a la concentración limitante (Seblr1-8 de $8.54E+06$ conidias/ml) y Seblr2-13 ($8.25E+06$ conidias/ml) en presencia de luz.

Al relacionar la cepa IMI con las sobre-expresantes Seblr1-8 y Seblr2-13, se observó que las cepas sobre-expresantes generan mayor cantidad de conidias en la fuente normal de glucosa siendo para Seblr1-8 ($1.23\text{E}+08$ conidias/ml) en un 2.4% y Seblr2-13 ($1.60\text{E}+08$ conidias/ml) 24.3% en relación con la cepa IMI ($1.21\text{E}+08$ conidias/ml), en presencia de luz. Presentando en obscuridad la cepa IMI bajo las condiciones anteriormente mencionadas un aumento en un 87.6% en con respecto a las sobre-expresantes Seblr1-8 y seblr2-13(Figura 12A, B).

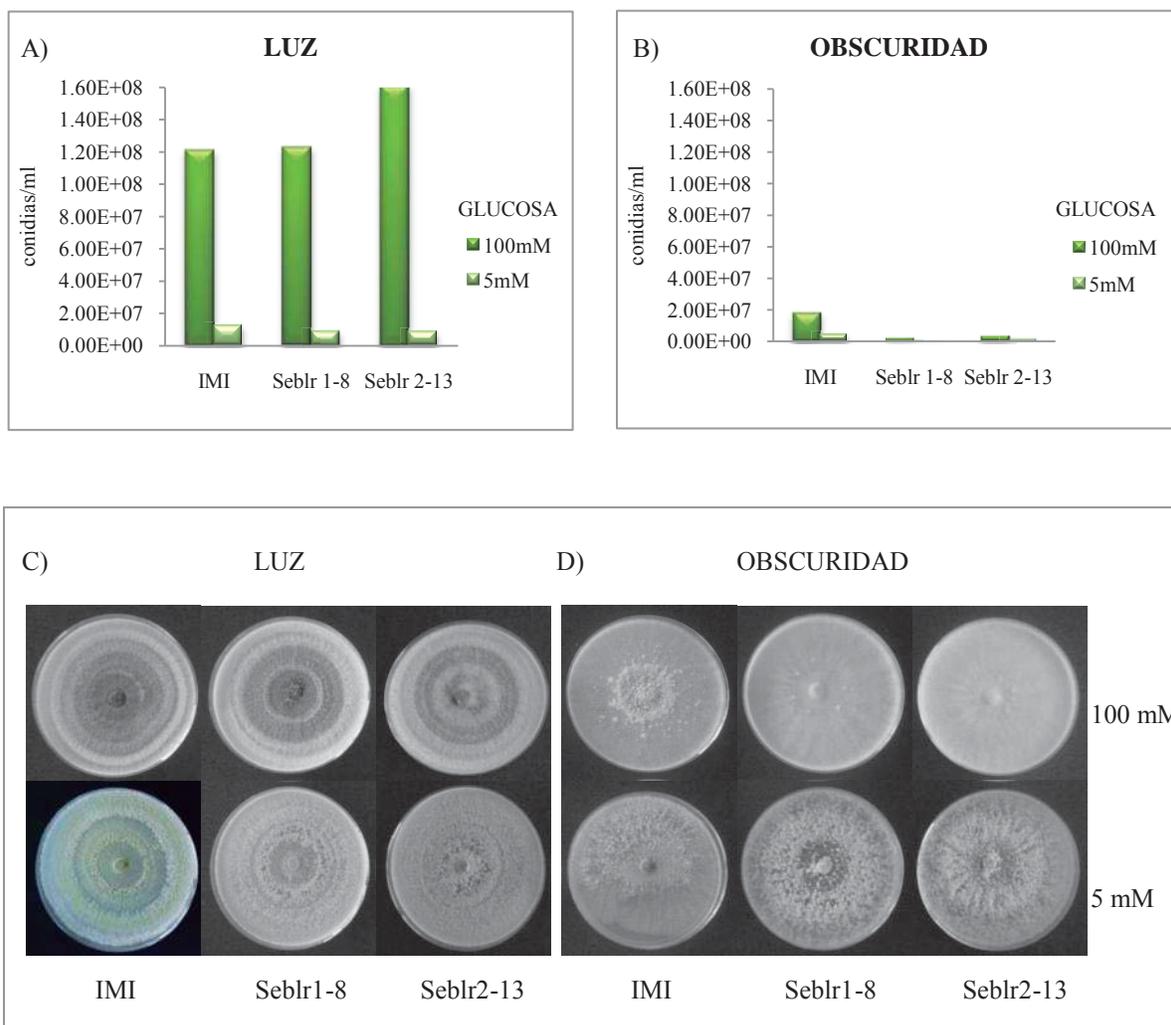


Figura 12. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI y cepas con sobre-expresión de los genes *blr*, en presencia de luz o en obscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Seblr1-8, Seblr2-13. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de obscuridad, con un periodo de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.6.1. Efecto de la sobre-expresión de los genes *blr-1* y *blr-2* en la producción biomasa, por limitación de la fuente C (glucosa)

La cepa IMI produjo una menor cantidad de biomasa cuando se limitó la concentración de glucosa (5 mM) en relación a la concentración normal, en un 74.7% en presencia de luz (45.1 mg) y 67.4% en oscuridad (53.9 mg) (Figura 13A, B). Las sobre-expresantes *blr* generaron mayor cantidad de biomasa en la concentración normal de glucosa independientemente de la presencia de luz (Seblr1-8 169.3 mg, Seblr2-13 191.1 mg) o su ausencia (Seblr1-8 192.4 mg, Seblr2-13 196.9 mg), generando Seblr2-13 mayor cantidad de biomasa que Seblr1-8 en un 11.4% en luz y 2.2% en oscuridad. Al relacionar las cepas Seblr1-8 y Seblr2-13 con la cepa IMI, se observó que las cepas Seblr1-8 (64.3 mg) y Seblr2-13 (50 mg) generan mayor cantidad de biomasa en un 29.8% (Seblr1-8) y 9.8% (Seblr2-13) en concentración limitante con respecto a IMI (45.1 mg), en presencia de luz. Presentándose en oscuridad caso similar, un aumento en un 42.1% para Seblr1-8 (93.1 mg) y 18% para Seblr2-13 (65.8 mg) respecto a IMI (53.9 mg).

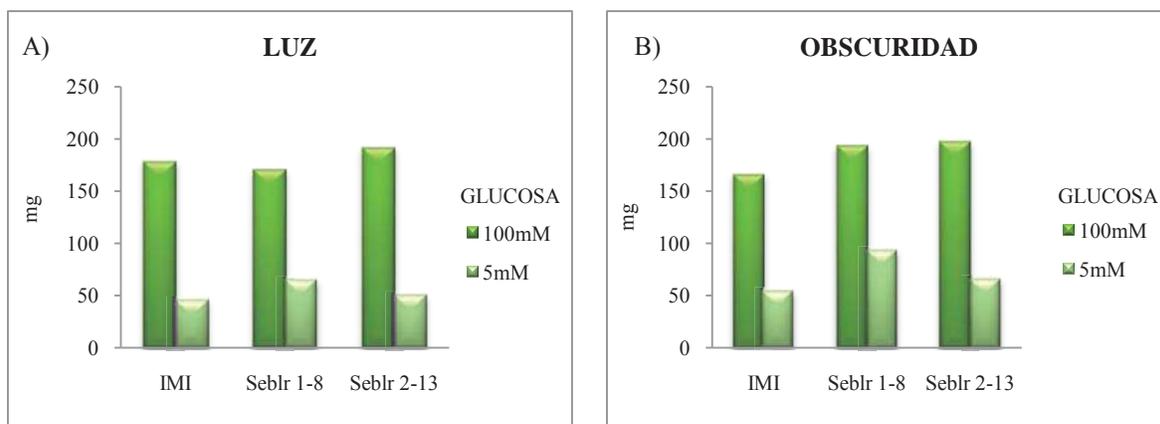


Figura 13. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Seblr1-8 y Seblr2-13, en presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.7. Efecto de la sobre-expresión de los genes *blr-1* y *blr-2* en la conidiación por limitación de C (sacarosa)

En la cuantificación de conidias de la cepa IMI, se observó un decremento en un 77.7% del número de conidias cuando se limitó la concentración de sacarosa ($1.21E+07$ conidias/ml), en relación a la concentración normal ($5.43E+07$ conidias/ml), en presencia de luz (Figura 14A).

Las sobre-expresantes Seblr1-8 y Seblr2-13 al crecer bajo concentraciones limitadas de sacarosa (5mM) mostraron presencia de conidias en luz, en obscuridad no se mostraron de conidias (Figura 14C, D). Al relacionar la cepa IMI con las sobre-expresantes *blr*, las cepas Seblr1-8 y Seblr2-13 generaron mayor cantidad de conidias en la concentración limitante (5 mM), en un 50% para Seblr1-8 ($2.43\text{E}+07$ conidias/ml) y 63.9% para Seblr2-13 ($3.36\text{E}+07$ conidias/ml) en relación con la cepa IMI ($1.21\text{E}+07$ conidias/ml), en presencia de luz.

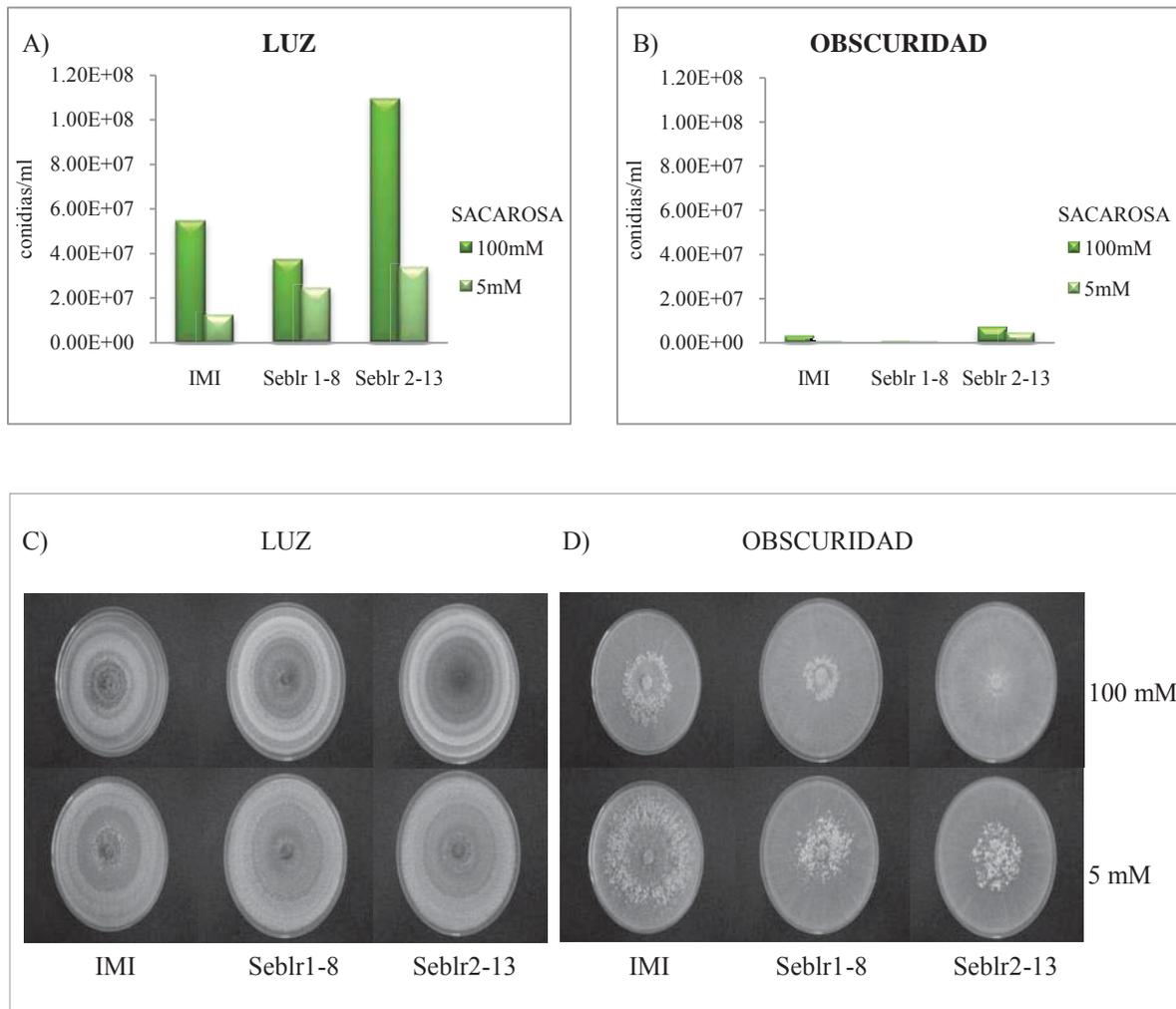


Figura 14. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI y cepas con sobre-expresión de los genes *blr*, en presencia de luz o en obscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografía de las colonias generadas de las cepas IMI, Seblr1-8, Seblr2-13. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de obscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.7.1. Efecto de la sobre-expresión de los genes *blr-1* y *blr-2* en la producción biomasa, por limitación de la fuente C (sacarosa)

La cepa IMI produjo una menor cantidad de biomasa cuando se limitó la concentración de sacarosa (5 mM) en relación a la concentración normal (100 mM), en un 53.4% en presencia de luz (17.4 mg) y 65% en oscuridad (47.5 mg) (Figura 15A, B).

La cantidad de biomasa generada por la cepa Seblr2-13 (34.5 mg) fue favorecida en la concentración limitante en un 20% en relación a la cepa Seblr1-8 (27.5 mg). En oscuridad bajo las condiciones anteriormente mencionadas Seblr2-13 (60.3 mg) presenta un aumento del 24% en relación a la cepa Seblr1-8 (45.7 mg). Al relacionar la cepa IMI con las mutantes Seblr1-8 y Seblr2-13, se observó que la cepa IMI genera una disminución en la cantidad de biomasa independientemente de las concentraciones normal y limitante en presencia de luz, siendo menor la cepa IMI en un 76% en la concentración normal respecto a las sobre-expresantes *blr* (Seblr1-8 117.9 mg y Seblr2-13 111.8 mg) y un 43.1% menor en la concentración limitante respecto a las sobre-expresantes *blr* (Seblr1-8 27.5 mg y Seblr2-13 34.5 mg), en presencia de luz. Presentando en oscuridad IMI (136 mg) una mayor cantidad de biomasa en la concentración normal en un 28.8% respecto a la cepa Seblr1-8 (96.7 mg) y 14.1% respecto a Seblr2-13 (116.7 mg).

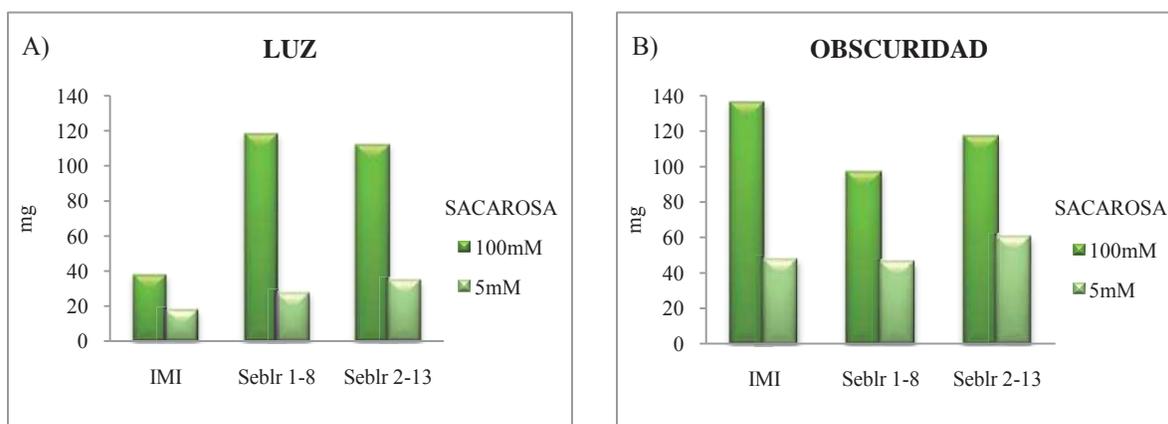


Figura 15. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Seblr1-8 y Seblr2-13, en presencia de luz A) o en oscuridad B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.8. Conidiación en las cepas con sobre-expresión de los genes *blu* por limitación de carbono (C)

Previamente, se identificaron genes regulados por luz azul (Tabla VI), que son tanto dependientes como independientes de las proteínas BLR (Rosales., y col., 2006). Además, se estableció una función dual para las proteínas BLR, que actúan tanto en la activación como en la represión de genes regulados por luz azul. Con el fin de realizar un análisis de la participación de los genes regulados por luz en la fotoconidiación, se generaron mutantes sobre-expresantes y silenciadas de dichos genes.

Tabla VI. Genes *blu* seleccionados para su análisis por medio de su sobre-expresión o silenciamiento

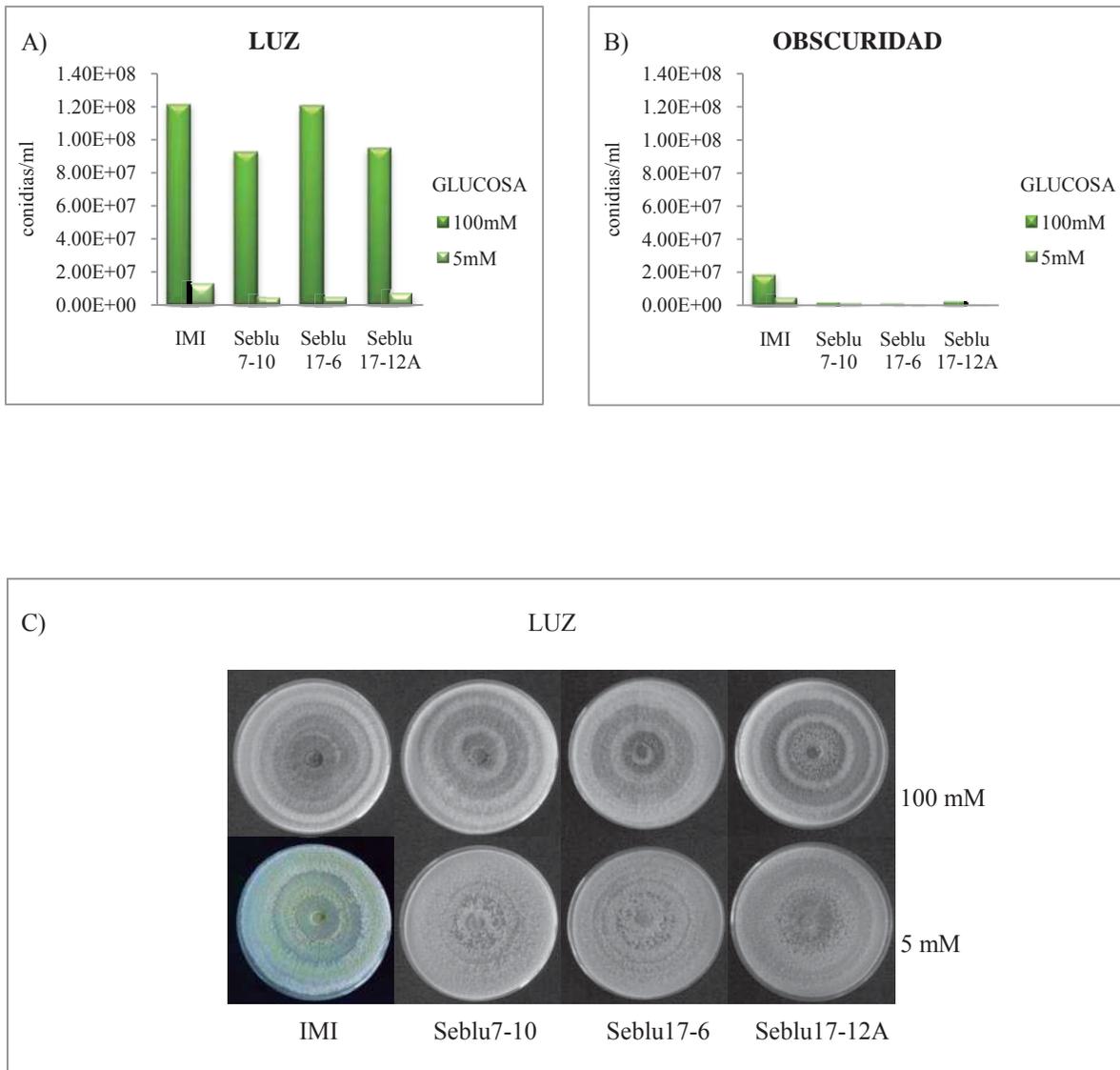
Gen	Posible función
<i>blu -5</i>	-----
<i>blu-7</i>	Regulador de la transcripción con un dedo de zinc C ₂ H ₂
<i>blu-15</i>	Permeasa de aminoácidos
<i>blu-17</i>	Geranilgeranil pirofosfato sintetasa
<i>blu-22</i>	Metil transferasa

5.9. Efecto de la sobre-expresión de los genes *blu7* y *blu17* en la conidiación por limitación de la fuente de C (glucosa)

En la cuantificación de conidias de la cepa IMI, se observó un decremento en un 89.9% del número de conidias cuando se limitó la fuente de glucosa (1.22E+07conidias/ml), en relación a la concentración normal (1.21E+08 conidias/ml), en presencia de luz. Presentándose en oscuridad el mismo efecto bajo las condiciones anteriormente mencionadas, en la fuente limitante en un 76% (Figura 16A, B).

Las cepas que sobre-expresan los genes *blu7* y *blu17*, al crecer bajo concentraciones limitadas de glucosa (5mM) mostraron formación de conidias, independientemente de las condiciones de luz y de oscuridad (Figura 16C, D).

La cepa Seblu17-6 ($1.20E+08$ conidias/ml) presento mayor cantidad de conidias en la concentración normal en un 22.5% respecto a las cepas Seblu17-12A ($9.41E+07$ conidias/ml) y Seblu7-10 ($9.18E+07$ conidias/ml), en presencia de luz. Al igual que las cepas sobre-expresantes de los genes *blu7* y *blu17*, IMI ($1.21E+08$ conidias/ml) genera mayor cantidad de conidias en la concentración normal, en un 0.8% respecto a Seblu17-6 ($1.20E+08$ conidias/ml) y en un 23% respecto a Seblu17-12A ($9.41E+07$ conidias/ml) y Seblu7-10 ($9.18E+07$ conidias/ml) en presencia de luz (Figura 16A).



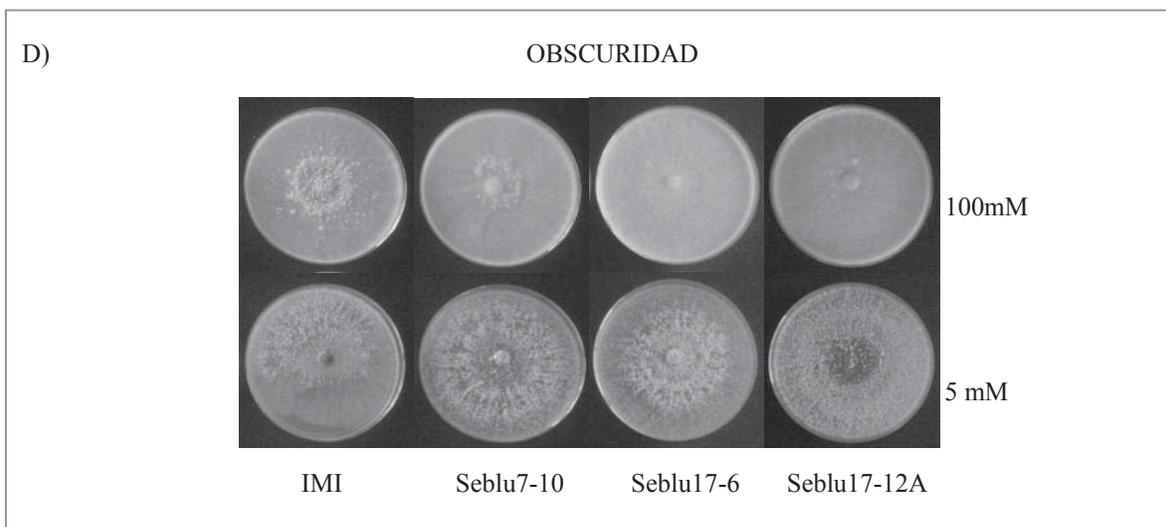


Figura 16. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI y cepas con sobre-expresión de los genes *bla*, en presencia de luz o en oscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Seblu7-10, Seblu17-6, Seblu17-12A. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.9.1. Efecto de la sobre-expresión de los genes *bla7* y *bla17* en la producción de biomasa, por limitación de la fuente de C (glucosa)

La biomasa de la cepa IMI disminuyó cuando se limitó la concentración de glucosa tanto en luz en un 74% como en oscuridad en un 67.4%, respecto a la concentración normal. Para las cepas Seblu7-10, Seblu17-6 y Seblu17-12A, la concentración normal de glucosa (100 mM), promovió una mayor producción de biomasa, independientemente de las condiciones de luz u oscuridad. Presentando menor producción de biomasa las cepas Seblu7-10 (174.6 mg), Seblu17-6 (183.5 mg) y Seblu17-12A (169.9 mg) en presencia de luz en un 6.8 % respecto a las cepas Seblu7-10 (188.7 mg), Seblu17-6 (190.9 mg) y Seblu17-12A (187.3 mg) en oscuridad (Figura 17A, B). Haciendo una comparación en la cantidad de biomasa entre las mutantes y la cepa IMI, se observó que la cepa Seblu17-6 presento mas biomasa en la concentración normal tanto en luz en un 2.8% Seblu17-6 (183.5 mg) como en oscuridad en un 13% Seblu17-6 (190.9 mg) respecto a IMI.

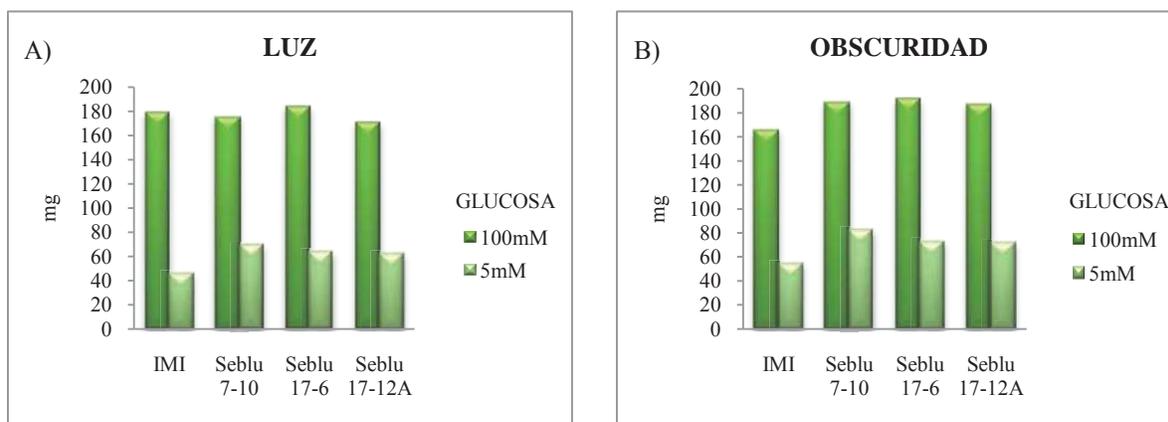


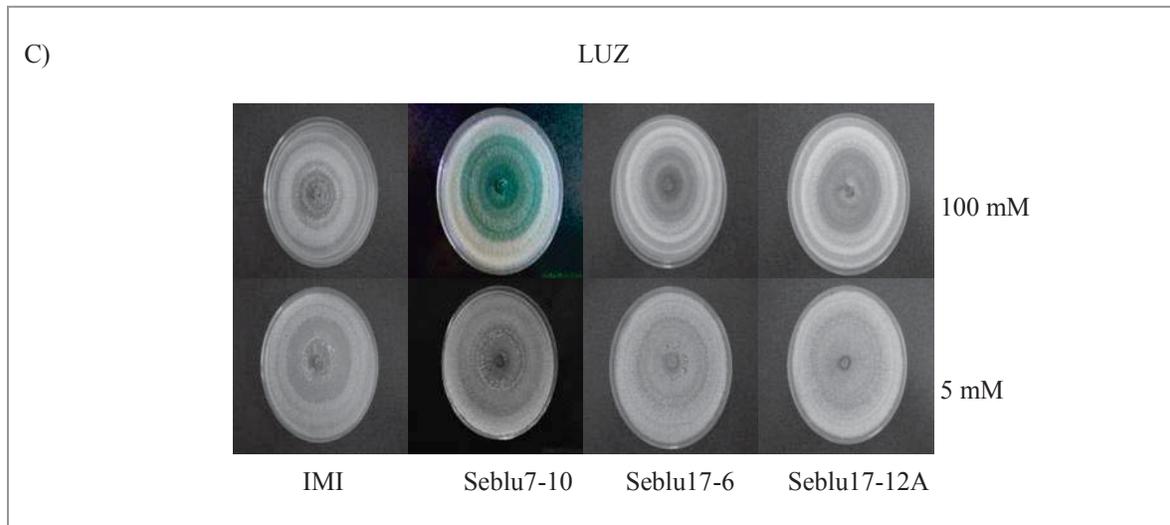
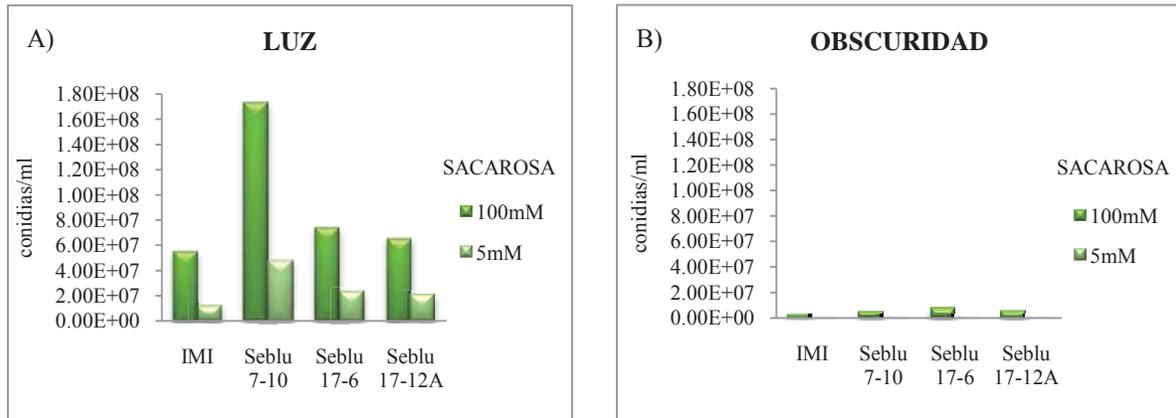
Figura 17. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Seblu7-10, Seblu17-6, Seblu17-12A, en presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.10. Efecto de la sobre-expresión de los genes *blu7* y *blu17* en la conidiación por limitación de la fuente de C (sacarosa)

En la fuente de sacarosa, en la concentración normal (100 mM) la cepa IMI ($5.43E+07$ conidias/ml) presenta mayor conidiación en un 77.7% con respecto a la concentración limitante ($1.21E+07$ conidias/ml) en presencia de luz. Las sobre-expresantes de los genes *blu7* y *blu17*, al crecer en la concentración limitada de sacarosa (5 mM) mostraron un indicio de la producción de conidias en presencia de luz (Figura 18C). En tanto en condiciones de oscuridad, no presentaron formación de conidias (Figura 18D).

Al relacionar las mutantes Seblu7-10, Seblu17-6 y Seblu17-12A con la cepa IMI, se observó que la mutante Seblu7-10 genera mayor cantidad de biomasa independientemente de la concentración normal y limitante en relación a IMI, Seblu17-6 y Seblu17-12A en presencia de luz. Siendo la concentración normal de la mutante Seblu7-10 ($1.72E+08$ conidias/ml) mayor en un 62.6% respecto a IMI ($5.43E+07$ conidias/ml) y las mutantes Seblu17-6 ($7.35E+07$ conidias/ml) y Seblu17-12A ($6.50E+07$ conidias/ml). En la concentración limitante de la mutante Seblu7-10 ($4.75E+07$ conidias/ml) la biomasa es

mayor en un 60.2% respecto a IMI ($1.21E+07$ conidias/ml) y las mutantes Seblu17-6 ($2.32E+07$ conidias/ml) y Seblu17-12A ($2.21E+07$ conidias/ml) (Figura 18A).



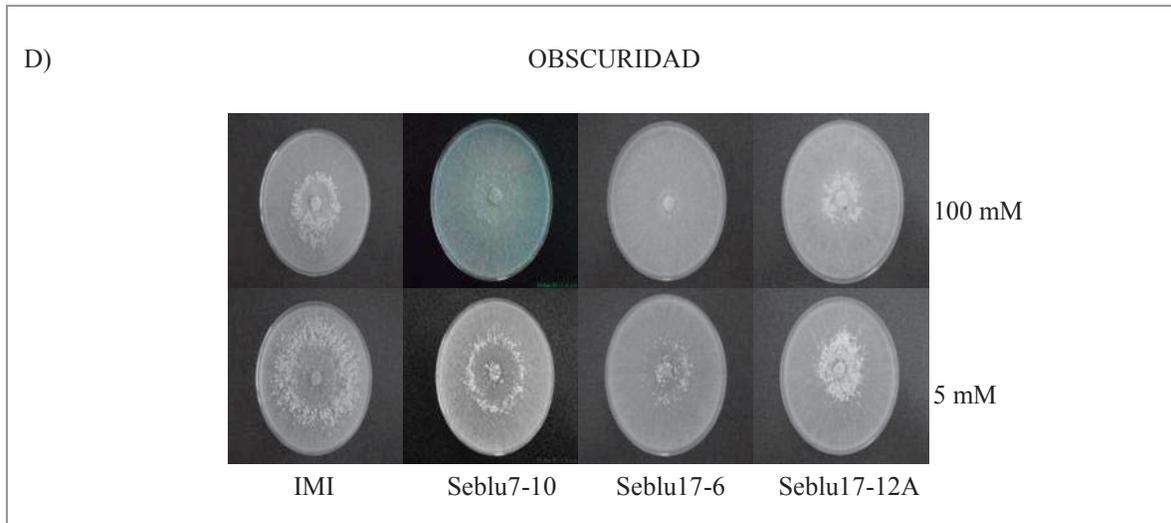


Figura 18. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI y cepas con sobre-expresión de los genes *blu*, en presencia de luz o en oscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografía de las colonias generadas de las cepas IMI, Seblu7-10, Seblu17-6, Seblu17-12A. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.10.1. Efecto de la sobre-expresión de los genes *blu7* y *blu17* en la producción de biomasa, por limitación de la fuente de C (sacarosa)

La biomasa de la cepa IMI disminuyó cuando se limitó la fuente de sacarosa tanto en luz como en oscuridad. La mutante Seblu7-10 produce mayor cantidad de conidias en la concentración normal respecto a las mutantes Seblu17-6 y Seblu17-12A, independientemente de las condiciones de luz y oscuridad. En un 30.3% respecto a las mutantes Seblu17-6 (98.9 mg) y Seblu17-12A (106.3 mg) en luz y un 13.4% en oscuridad Seblu17-6 (121.2 mg) y Seblu17-12A (95.3 mg) (Figura 19A, B).

Para las cepas Seblu17-6 y Seblu17-12A, la concentración limitante de sacarosa (5 mM), promovió una mayor producción de biomasa tanto en condiciones de luz en un 57% Seblu17-6 (41.1 mg) y Seblu17-12A (41 mg), como de oscuridad en un 37.2% Seblu17-6 (59 mg) y Seblu17-12A (56.2 mg) en relación a la cepa IMI.

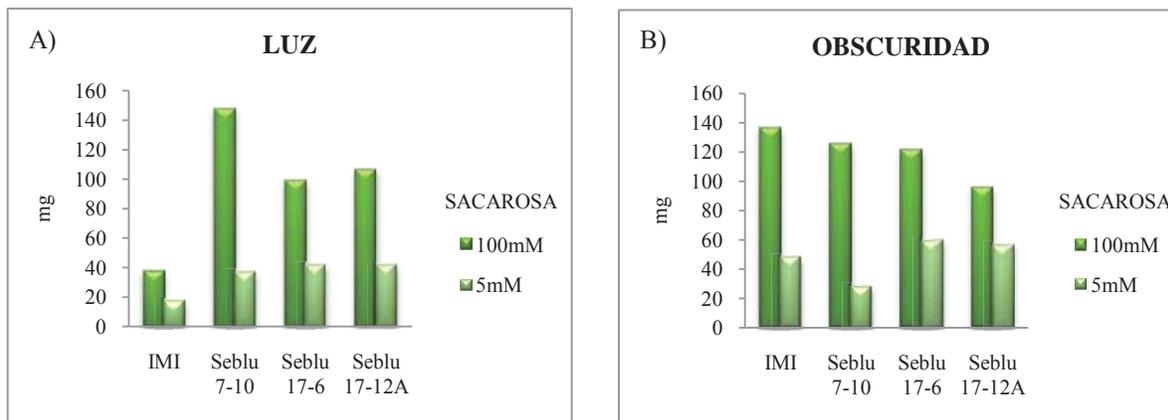
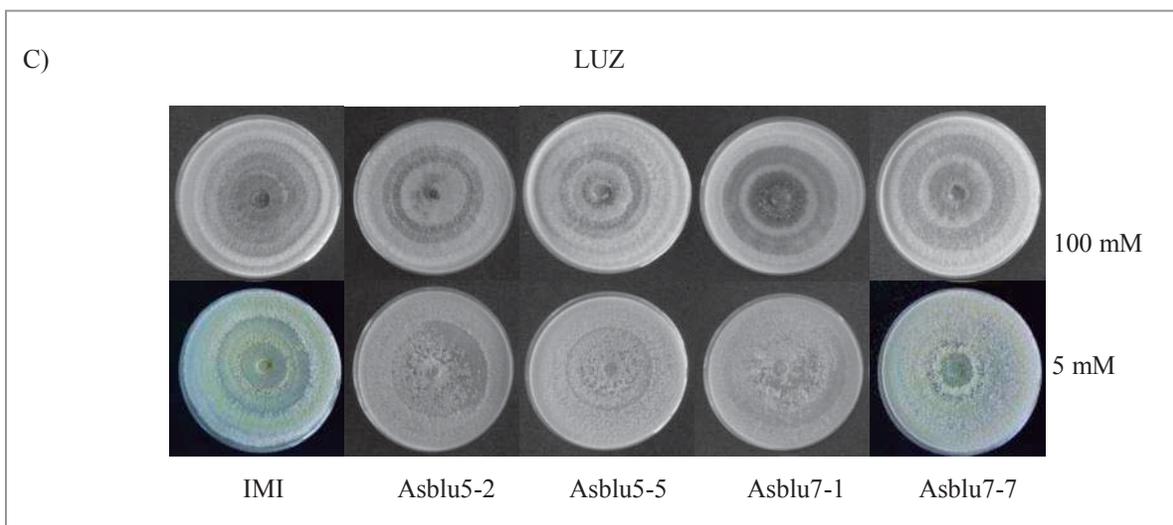
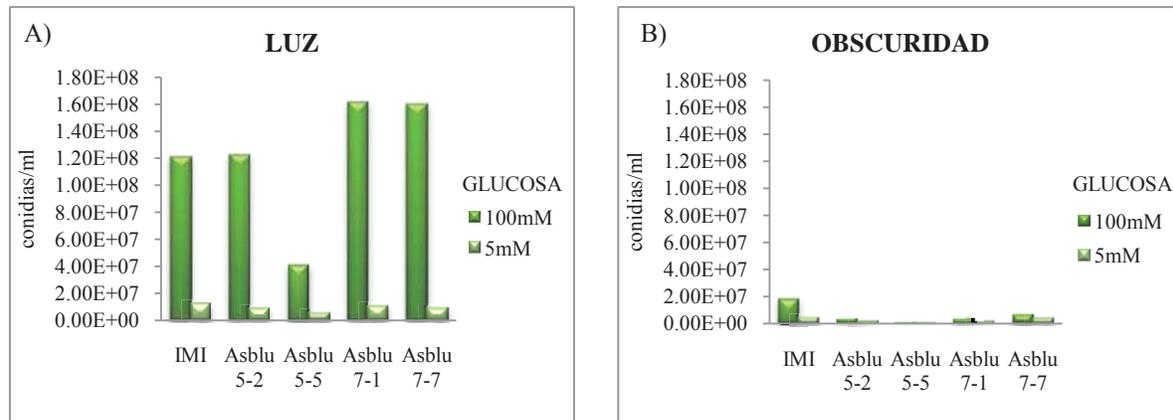


Figura 19. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Seblu7-10, Seblu17-6 y Seblu17-12A, en presencia de luz A) o en obscuridad B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.11. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu5* y *blu7* en la conidiación por limitación de la fuente de C (glucosa)

En los ensayos de este trabajo se pretende estudiar el efecto del silenciamiento de los genes *blu*, de los resultados obtenidos se observó que las cepas mutantes *Asblu7-1* ($1.61E+08$ conidias/ml) y *Asblu7-7* ($1.60E+08$ conidias/ml), generan mayor cantidad de conidias en la concentración normal en un 24.3% en relación a la cepa IMI ($1.21E+08$ conidias/ml), en presencia de luz. La mutante *Asblu5-2* ($1.22E+08$ conidias/ml) bajo condiciones normales de glucosa se comporta de igual manera que la cepa IMI ($1.21E+08$ conidias/ml), en cambio la mutante *Asblu5-5* ($4.08E+07$ conidias/ml) bajo las condiciones anteriormente mencionadas disminuye en un 66.2% en presencia de luz (Figura 20A). En obscuridad la cepa IMI ($1.77E+07$ conidias/ml) genera mayor cantidad de biomasa en la concentración normal en un 79.35% en relación a las mutantes *Asblu5-2* ($2.58E+06$

conidias/ml), Asblu5-5 ($8.50E+05$ conidias/ml), Asblu7-1 ($3.46E+06$ conidias/ml) y Asblu7-7 ($6.41E+06$ conidias/ml) (Figura 20B).



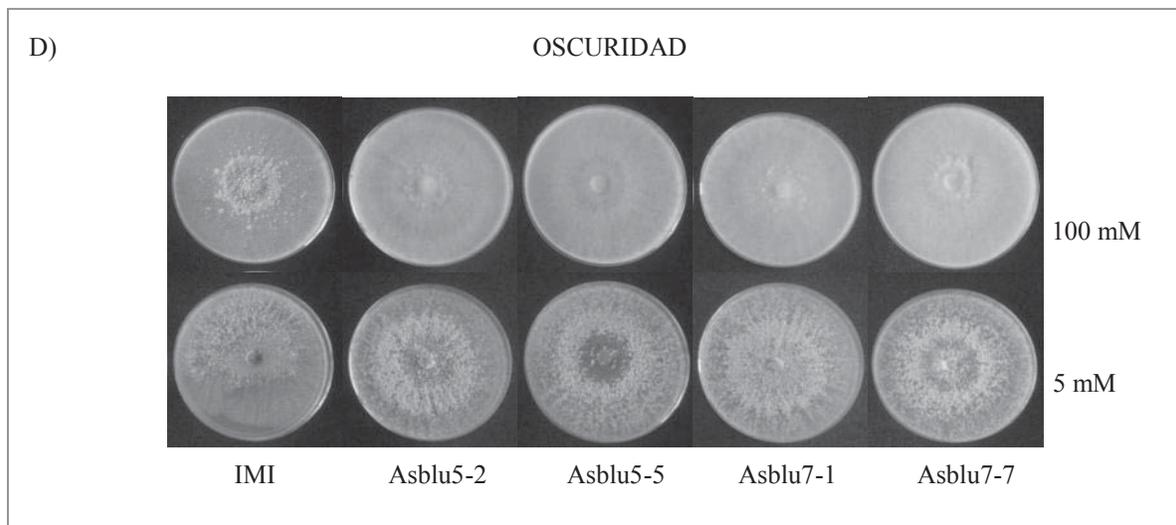


Figura 20. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido de los genes *blu*, en presencia de luz o en oscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Asblu5-2, Asblu5-5, Asblu7-1, Asblu7-7. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.11.1. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu5* y *blu7* en la producción de biomasa, por limitación de la fuente de C (glucosa)

Las mutantes que generaron mayor cantidad de biomasa en la concentración normal de glucosa (100 mM), fueron las mutantes Asblu5-2 y Asblu5-5, independientemente de las condiciones de luz (Asblu5-2 de 184.1 mg y Asblu5-5 de 183.6 mg) y oscuridad (Asblu5-2 de 201.1 mg y Asblu5-5 de 192.1 mg) (Figura 21A, B).

Las mutantes (Asblu7-1 de 57.75 mg y Asblu7-7 de 61.4 mg), generaron menor cantidad de biomasa en la concentración limitante en un 3.4% en relación a la cepa Asblu5-2 (61.7 mg), en presencia de luz. En cambio en oscuridad aumenta la biomasa (Asblu7-1 de 66.55 mg y

Asblu7-7 de 74.3 mg) en un 5.15% respecto a la mutante Asblu5-2 (66.3 mg). La cepa IMI genera una disminución en la cantidad de biomasa en la fuente limitante, en relación a las mutantes en un 24.4% en presencia de luz (IMI de 45.1 mg) y un 23% en obscuridad (IMI de 53.9 mg).

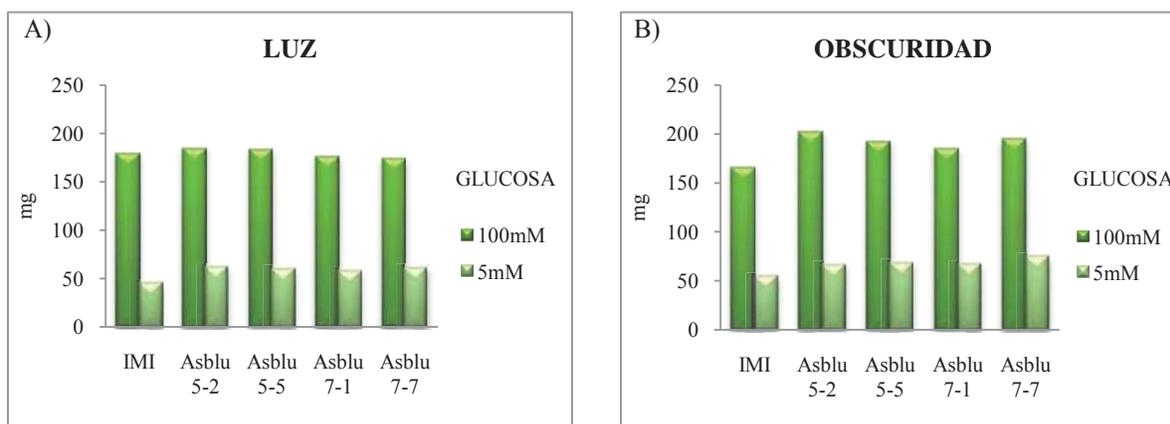
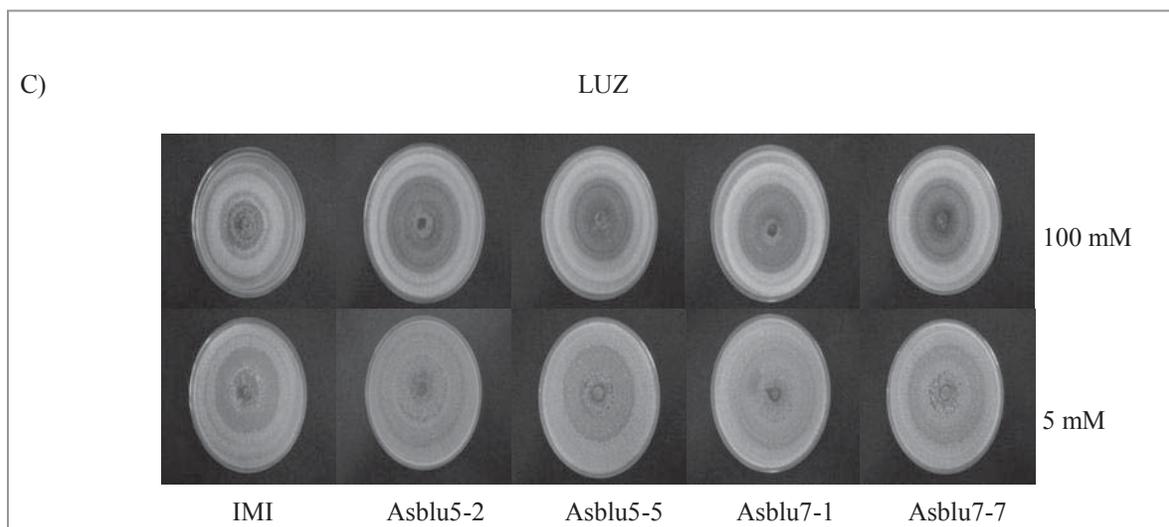
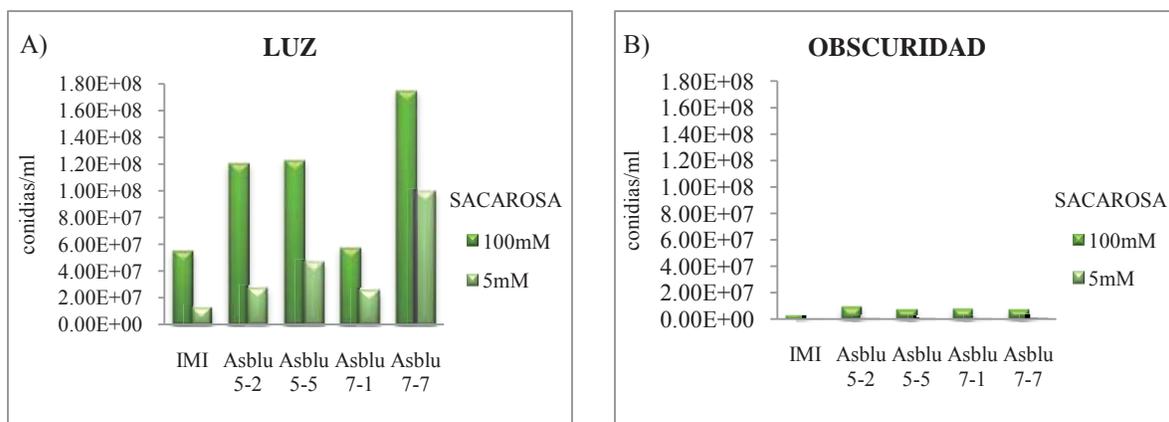


Figura 21. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Asblu5-2, Asblu5-5, Asblu7-1 y Asblu7-7, en presencia de luz (A) o en obscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.12. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu5* y *blu7* en la conidiación por limitación de la fuente de C (sacarosa)

Las mutantes anti-sentido de los genes *blu5* y *blu7*, al crecer en la concentración limitada de sacarosa (5 mM) mostraron un indicio de la producción de conidias en presencia de luz. En tanto en condiciones de oscuridad, no presentaron formación de conidias (Figura 22C, D). La mutante Asblu7-7 genera más cantidad de conidias tanto en la concentración normal (Asblu7-7 de 1.74E+08 conidias/ml) en un 68.7% como en la limitante (Asblu7-7 de 9.90E+07 conidias/ml) en un 87.7%, en relación a la cepa IMI. En cambio la mutante Asblu7-1 (2.47E+07 conidias/ml) aumenta la cantidad de conidias en la fuente limitante en un 51% respecto a la cepa IMI (1.21E+07 conidias/ml) en presencia de luz. En la fuente limitante la mutante Asblu5-2 (2.68E+07 conidias/ml) disminuye en un

41.8% en relación a la mutante Asblu5-5 ($4.61E+07$ conidias/ml). La cepa IMI presenta una disminución en la cantidad de conidias en un 69.35% en la fuente limitada (IMI de $1.21E+07$ conidias/ml), en relación a las mutantes (Figura 22A, B).



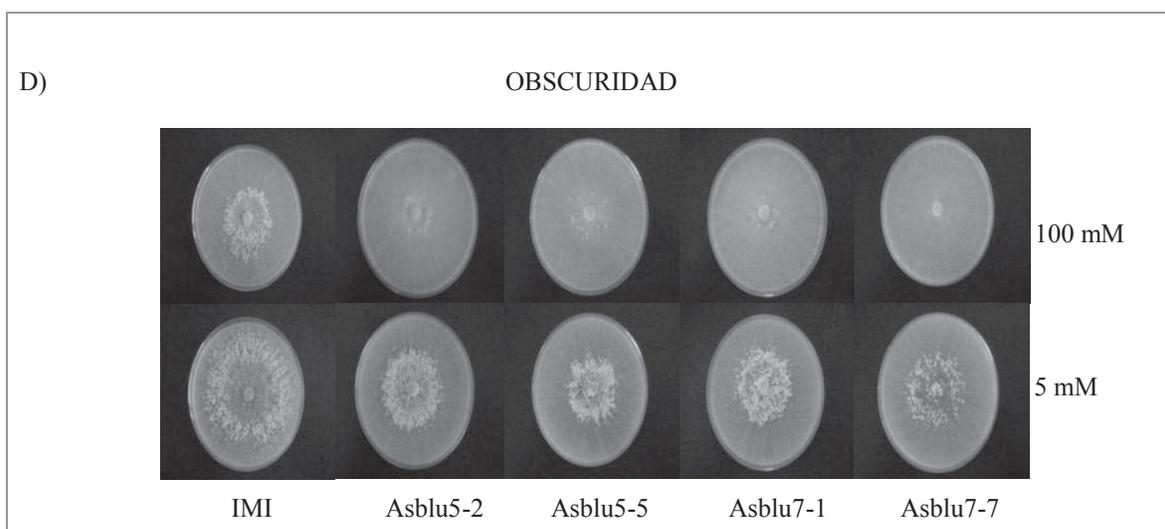


Figura 22. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido de los genes *bla*, en presencia de luz o en oscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografía de las colonias generadas de las cepas IMI, Asblu5-2, Asblu5-5, Asblu7-1, Asblu7-7. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.12.1. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *bla5* y *bla7* en la producción de biomasa, por limitación de la fuente de C (sacarosa)

Las mutantes que generaron mayor cantidad de biomasa en la concentración normal de sacarosa (100 mM), fueron las mutantes Asblu5-2 y Asblu7-7, independientemente de las condiciones de luz (Asblu5-2 de 156.2 mg y Asblu7-7 de 148.3 mg) y oscuridad (Asblu5-2 de 143.2 mg y Asblu7-7 de 164.7 mg). Presentando la mutante Asblu5-2 un aumento en un 5% en luz y una disminución en un 13% en oscuridad, en relación a la mutante Asblu7-7 (Figura 23A, B). En cambio las mutantes Asblu5-5 y Asblu7-1 presentan

una disminución en la fuente normal tanto en luz en un 15.7% (Asblu5-5 de 133.8 mg y Asblu7-1 de 129.2 mg) como en obscuridad en un 14.6% (Asblu5-5 de 125.3 mg y Asblu7-1 de 119 mg), en relación a la mutante Asblu5-2. La cepa IMI genera una disminución en la cantidad de biomasa tanto en la condición normal (37.4 mg) como en la limitante (17.4 mg), en relación a las mutantes (Asblu5-2, Asblu5-5, Asblu7-1 y Asblu7-7) en luz.

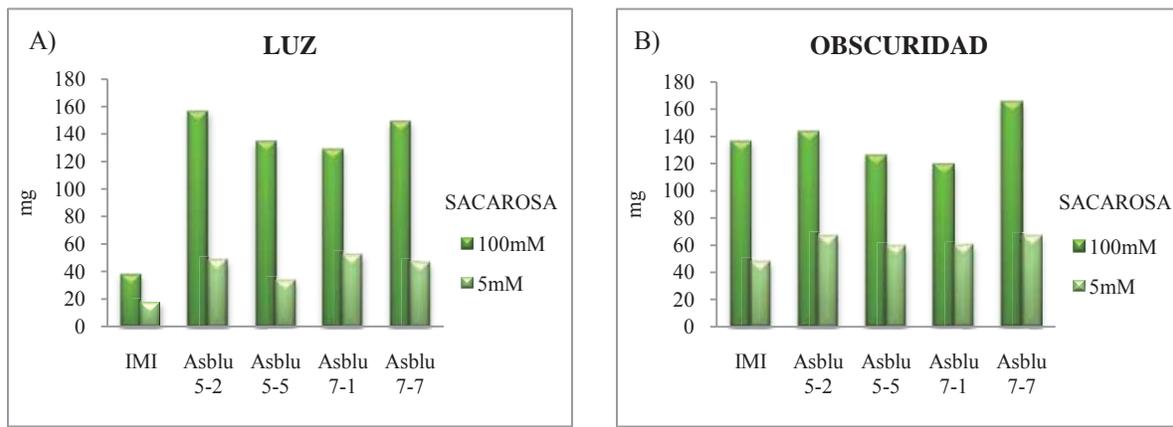
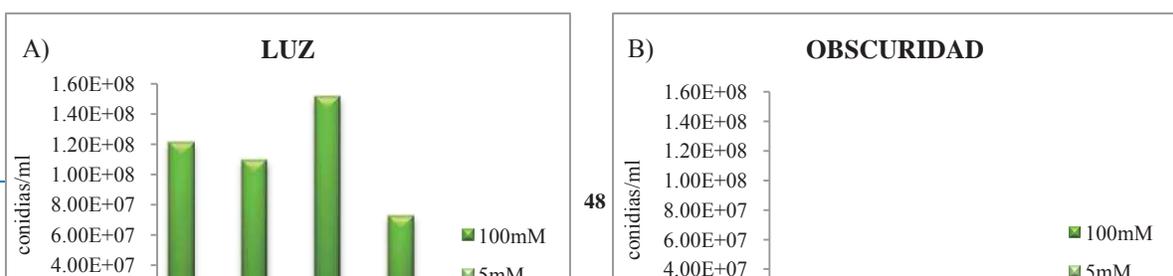


Figura 23. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Asblu5-2, Asblu5-5, Asblu7-1 y Asblu7-7, en presencia de luz A) o en obscuridad B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.13. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu15* y *blu22* en la conidiación por limitación de la fuente de C (glucosa)

La mutante Asblu22-1 ($1.51E+08$ conidias/ml) genera mayor cantidad de conidias en la fuente normal de glucosa en un 19.8%, en tanto las mutantes Asblu15-8 ($1.90E+08$ conidias/ml) y Asblu22-10 ($7.20E+07$ conidias/ml), se ven disminuidas en un 9.9% y un 40% en relación a la cepa IMI ($1.21E+08$ conidias/ml) en presencia de luz. En obscuridad la cepa IMI ($1.77E+07$ conidias/ml) genera mayor cantidad de conidias en la fuente normal en un 88.5% en relación a las mutantes Asblu15-8 ($1.65E+06$ conidias/ml), Asblu22-1 ($2.40E+06$ conidias/ml), y Asblu22-10 ($2.26E+06$ conidias/ml) (Figura 24A, B).



GLUCOSA

GLUCOSA

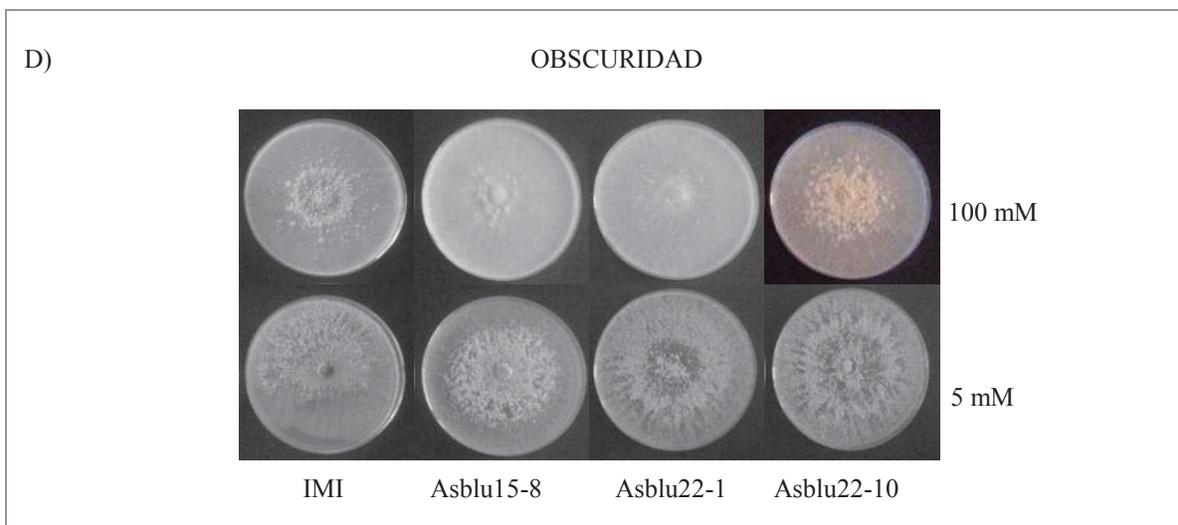
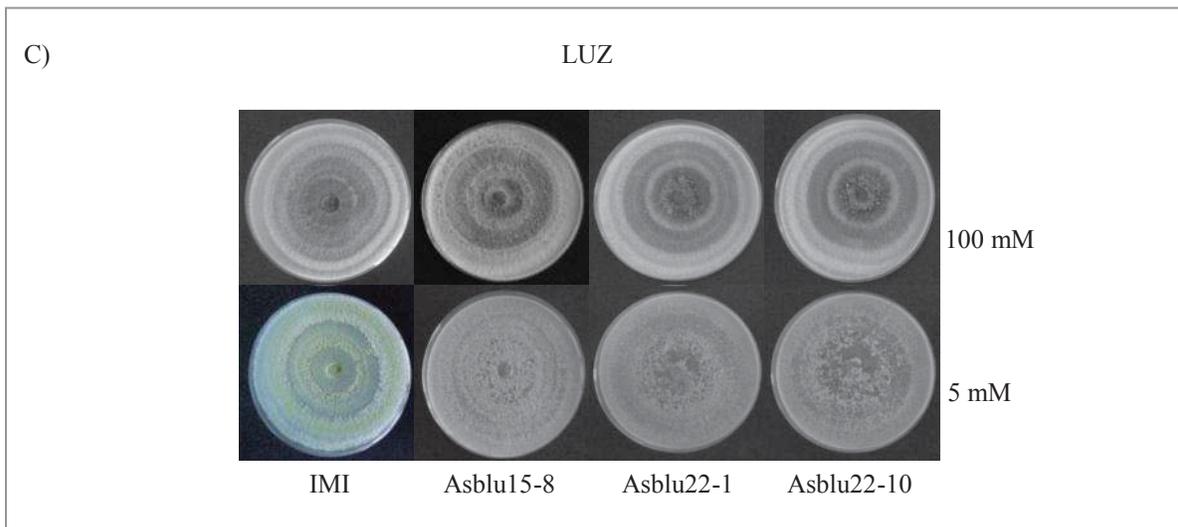


Figura 24. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido de los genes *blu*, en presencia de luz o en oscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografías de las colonias generadas de las cepas IMI, Asblu15-8, Asblu22-1, Asblu22-10. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de oscuridad, con un periodo de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.13.1. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu15* y *blu22* en la producción biomasa, por limitación de la fuente de C (glucosa)

La mutante Asblu22-10 (211.7 mg) genera mayor producción de biomasa en la fuente normal en un 15.7%, en cambio las mutantes Asblu15-8 (179.3 mg) y Asblu22-1 (173 mg) disminuyen en un 1.75% respecto a la cepa IMI (178.3 mg), en presencia de luz. En oscuridad la cepa IMI disminuye la cantidad de biomasa tanto en la fuente normal en un 17.2% como en la limitada en un 26% en relación a las mutantes Asblu15-8, Asblu22-1 y Asblu22-10 (Figura 25A, B).

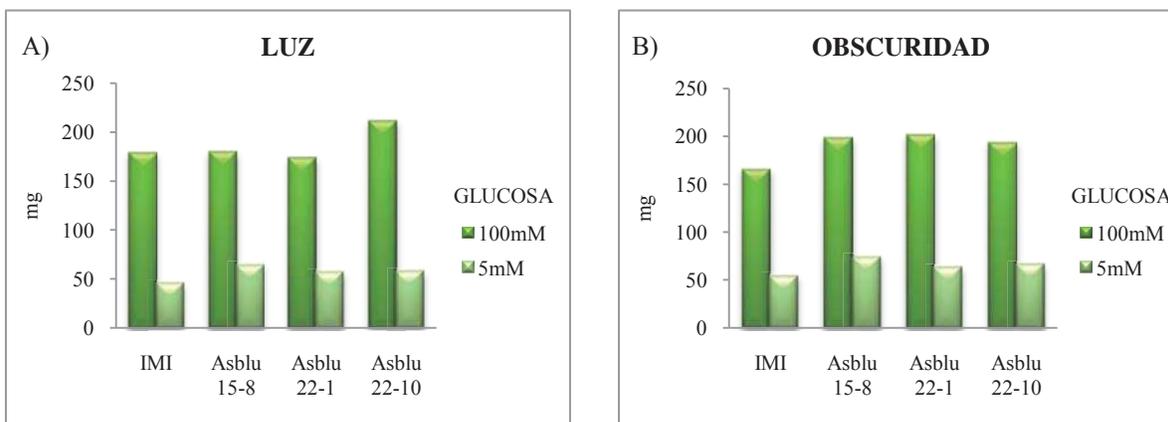
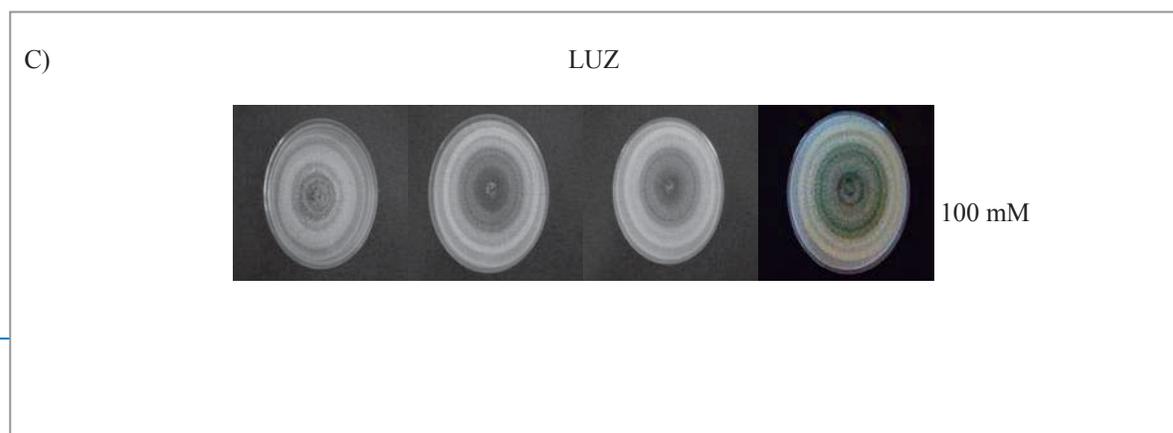
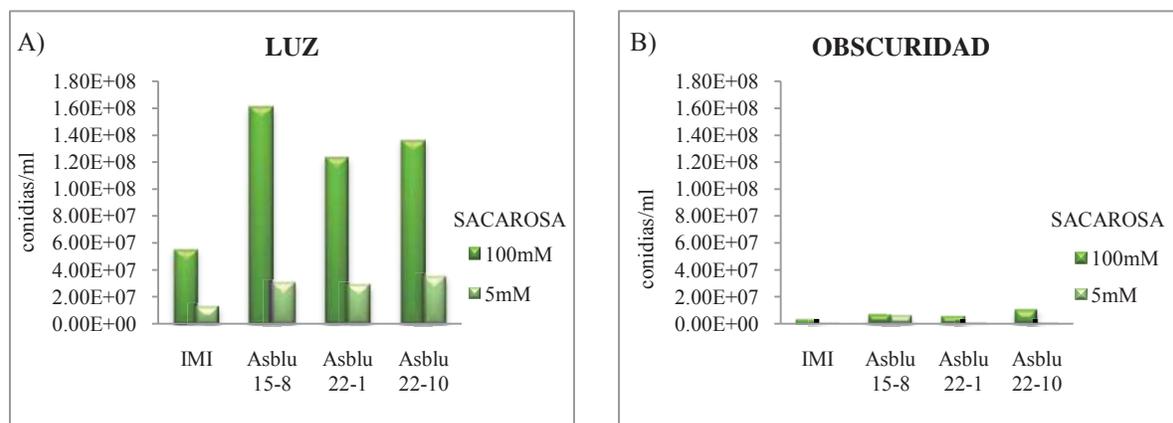


Figura 25. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (glucosa) en las cepas IMI, Asblu15-8, Asblu22-1 y Asblu22-10, en presencia de luz (A) o en oscuridad (B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.14. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu15* y *blu22* en la conidiación por limitación de la fuente de C (sacarosa)

Las mutantes anti-sentido de los genes *blu15* y *blu22*, al crecer en la concentración limitada de sacarosa (5 mM) mostraron un indicio de la producción de conidias en presencia de luz. En tanto en condiciones de oscuridad, no presentaron formación de conidias (Figura 26C, D). La mutante Asblu15-8 (1.61E+08 conidias/ml), genera mayor cantidad de biomasa en la fuente normal de sacarosa en un 19.85% en relación a las mutantes Asblu22-1 (1.22E+08 conidias/ml) y Asblu22-10 (1.36E+08 conidias/ml).

En cambio en la concentración limitante las mutantes aumentan la producción de conidias, en un 5.7% para Asblu15-8 (2.97E+07 conidias/ml) y un 18.8% para Asblu22-10 (1.36E+07 conidias/ml) en relación a la mutante Asblu22-1 (2.80E+07 conidias/ml). La cepa IMI genera una disminución en la cantidad de conidias, tanto en la fuente normal (IMI 5.43E+07 conidias/ml) como en la fuente limitante (IMI 1.21E+07 conidias/ml) en un 60.8% en relación a las mutantes (Asblu15-8, Asblu22-1, Asblu22-10) (Figura 26A, B).



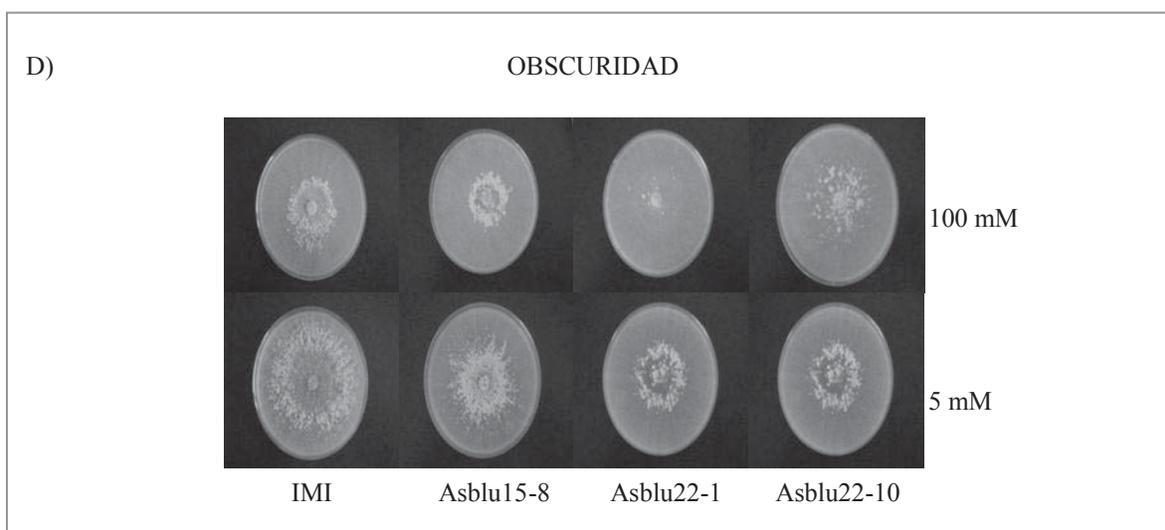
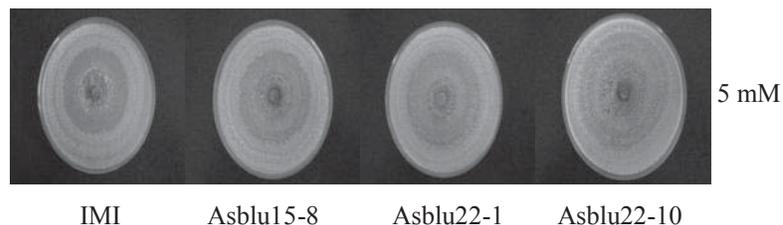


Figura 26. Análisis de la producción de conidiación inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI y cepas con anti-sentido de los genes *blu*, en presencia de luz o en obscuridad. (A y B) Determinación de la cantidad de conidias producidas. (C y D) Fotografía de las colonias generadas de las cepas IMI, Asblu15-8, Asblu22-1, Asblu22-10. (C) Colonias crecidas en condiciones de luz, (D) Colonias crecidas en condiciones de obscuridad, con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

5.14.1. Efecto de la expresión con anti-sentido de los genes *blu15* y *blu22* en la producción biomasa, por limitación de la fuente de C (sacarosa)

Al determinar la producción de biomasa, de la cepa IMI y de todas las mutantes con anti-sentido, disminuyó cuando se limitó la fuente de sacarosa, independientemente de las condiciones de luz y de obscuridad, pero la cantidad de biomasa de las mutantes fue mayor en condiciones limitadas de sacarosa en relación a la cepa IMI (Figura 27A y B).

La mutante Asblu22-1 genero mayor producción de conidias en la fuente normal, independientemente de las condiciones de luz y oscuridad, teniendo mayor contenido en presencia de luz (Asblu22-1 de 170 mg) en un 9.2% en relación a la condición de oscuridad (Asblu22-1 de 155.55 mg). La mutante Asblu15-8 disminuye la cantidad de biomasa generada en la fuente normal, en un 19% en luz (Asblu15-8 de 130.4 mg) y en un 5.5% en oscuridad (Asblu15-8 de 123 mg), en relación a la mutante Asblu22-10 (161 mg).

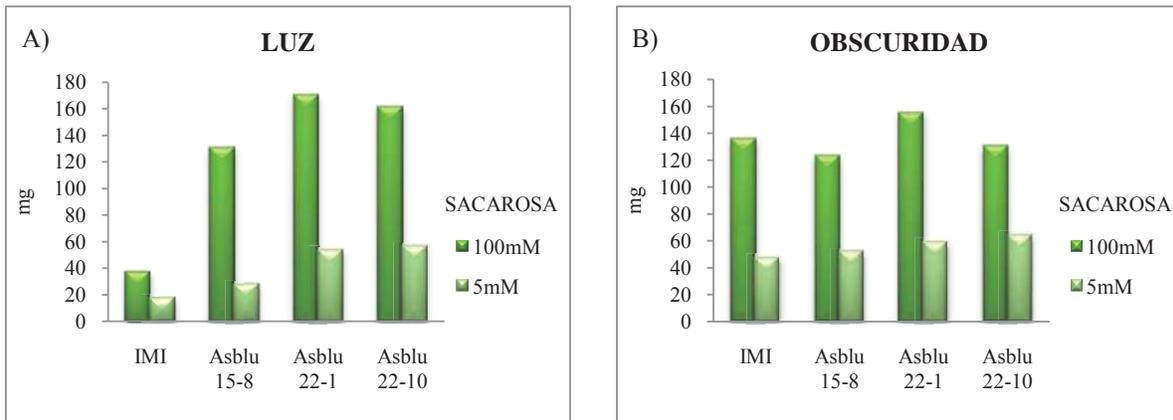


Figura 27. Análisis de la cantidad de biomasa inducida por limitación nutricional de la fuente de carbono (sacarosa) en las cepas IMI, Asblu15-8, Asblu22-1 y Asblu22-10. En presencia de luz A) o en oscuridad B). Con un periodo de incubación de 5 días a temperatura de 25 °C.

VI. DISCUSIÓN

Estudios exhaustivos sobre la respuesta a la luz en el hongo *Trichoderma atroviride* han identificado dos genes (*blr-1* y *blr-2*) que codifican para proteínas homólogas a las proteínas *white collar* (WC-1 y WC-2) que regulan todas las respuestas activadas por luz azul en el ascomiceto *Neurospora crassa* (Casas y col., 2004). Así, los productos de los genes *blr-1* y *blr-2* (**blue light regulator**) de *T. atroviride* regulan el sistema de percepción y transducción de la luz azul, a través de la formación de un complejo proteico que promueve la diferenciación hacia un estado de reproducción asexual que se hace evidente a través de la formación de un anillo de conidiación en el perímetro de la colonia, al momento de ser expuesta a este estímulo. La presencia de un dominio LOV de BLR-1 sugiere que esta proteína es el fotoreceptor, mientras que la proteína BLR-2 es un elemento esencial para la formación del complejo en la respuesta a luz azul. La formación del complejo, entre BLR-1 y BLR-2 es importante para la fotorecepción luminosa, y con ello la inducción de la fotoconidiación (Casas y col., 2004).

La interrupción de los genes *blr-1* o *blr-2* en *T. atroviride*, hace que pierda la actividad sensorial y la regulación transcripcional en la fotoconidiación en condiciones nutricionales favorables e iluminación constante. Se ha propuesto un modelo de la respuesta a la luz y de la esporulación por limitación de nutrientes, tomando en cuenta que la limitación de nutrientes es considerado como un mecanismo más que induce la formación de conidias en hongos. En *T. atroviride* una repentina privación de carbono, simula el efecto de luz, impulsando un discreto desarrollo del anillo de conidias en la orilla del crecimiento de la colonia (Casas y col., 2004).

En este trabajo se presentan evidencias sobre la respuesta de la limitación nutricional en la fuente de C y la inducción de conidiación en las mutantes BLR-1 y BLR-2. Para esto se determino el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de conidias y la cantidad de biomasa formada, utilizándose diferentes fuentes de C: glucosa (C₆H₁₂O₆), fructuosa (C₆H₁₂O₆), y sacarosa (C₁₂H₂₂O₁₁).

Al comparar el efecto de la fuente de C sobre la producción de conidias en la cepa silvestre IMI, se observó que la fructuosa indujo la mayor cantidad alcanzando hasta 4.50E+08 conidias/ml. Este comportamiento solo se hizo evidente cuando se utilizó una

concentración estándar (no limitante) de la hexosas en presencia de luz (Figura 8A). En oscuridad la cepa silvestre no desarrolla estructuras reproductivas como había sido previamente reportado. Por otra parte, cuando se ensayaron condiciones limitantes de las diferentes fuentes de C hubo en todos los casos la producción de conidias en la cepa silvestre ($1.67E+07$ conidias/ml en glucosa, $3.70E+07$ conidias/ml en fructuosa y $5.08E+07$ conidias/ml en sacarosa) aun en oscuridad. La presencia del estímulo luminoso incrementó significativamente la cantidad de conidias producidas (Figuras 6A, 8A, 10A).

En la fotoconidiación el complejo BLR-1/BLR-2 serían los implicados en percibir la señal luminosa para posteriormente funcionar como factores de transcripción uniéndose a los promotores de genes inducidos por luz y con ello promover la fotoconidiación. Cuando se ensayaron las cepas mutantes BLR-1 y BLR-2 en condiciones estándar la conidiación resulto ser nula llegando a ser hasta 100 veces menor que la cepa IMI en presencia de luz. Este resultado es consistente con lo reportado ya que estas cepas mutantes son consideradas “ciegas” al no contener los genes *blr-1* o *blr-2*, reguladores maestros del sistema de percepción y transducción de la luz azul en *Trichoderma* (Casas-Flores y col, 2004).

Los resultados de los ensayos con las cepas mutantes (BLR-1 y BLR-2) bajo condiciones de limitación de las diferentes fuentes de C mostró que las cepas son capaces de generar estructuras reproductivas y que esta diferenciación hacia la formación de conidias es dependiente de la presencia de luz obteniéndose un incremento para BLR1 y BLR2 respectivamente de: 49.9% y 45.3% en glucosa (Figura 6A); de 82.9% y 97.6% en fructuosa (Figura 8A) y de 81% y 77.7% en sacarosa (Figura 10A). Estos resultados nos hacen suponer que el mecanismo de percepción de la fuente de carbono se encuentra inalterado en las cepas mutantes, pudiendo no estar relacionado a nivel molecular con los productos de los genes *blrs*.

Por otra parte, cuando se analizó la producción de biomasa entre las cepas silvestre IMI y mutantes BLR no se observó ninguna variación cuando las concentraciones de las fuentes de C fueron suficientes (estandar) en presencia o ausencia de luz. Sin embargo, cuando se utilizan fuentes limitantes de fructuosa como fuente de C hay una reducción significativa del crecimiento en la cepa silvestre IMI (Figura 9A). Es de llamar la atención que la cepa

mutante BLR-1, quien presentó en todos los casos la mayor producción de biomasa, tuvo un comportamiento diferencial dependiente de la luz, esto es, que el crecimiento fue significativamente mayor en presencia del estímulo luminoso comparado con el de oscuridad total (Figura 9A, B). Esto permite suponer que existe una respuesta a la luz que se traduce en el crecimiento, demostrando que para el caso de esta mutante y bajo la condiciones antes descritas no es ciega en su totalidad (Casas-Flores y col, 2004).

Previamente y con el fin de establecer si BLR-2 era un factor limitante en el sistema de percepción de luz azul en *Trichoderma*, se realizó la sobre-expresión de *blr-2* en *T. atroviride* IMI. Esta mutante mostró una respuesta aumentada a la luz azul, medida como una sobreproducción de conidias en presencia del estímulo. Por otra parte, cuando se sobre expresó el gen *blr-1* en *Trichoderma*, esta mutante mostró a diferencia de la anterior, una disminución en la respuesta de fotoconidiación en condiciones nutricionales favorables (Esquivel., 2007).

Cuando se analizó la respuesta de las mutantes sobreexpresantes de BLR-1 y BLR-2 se confirmó el fenotipo de sobre producción de conidias de la cepa Seblr-2, llegando hasta $1.60E+08$ conidias/ml independientemente de la fuente de carbono (Figura 12A y 14A). Sin embargo, esta respuesta de hiperconidiación depende totalmente de la luz. Cuando se ensayaron estas cepas para la condición limitante de la fuente de C, solo en presencia de sacarosa se observa con claridad la producción de conidias no así en glucosa. Esta inducción aunque discreta, fue mayor en la cepa Seblr2 comparada con la obtenida en la cepa silvestre IMI. Con estos resultados se ratifica que la sobre-expresión de *blr-2* es un factor limitante tanto en la transducción de la luz y más aun, con los datos aquí presentados lo es también para la percepción de la limitación de la fuente de C (particularmente sacarosa).

Cuando se analizó el crecimiento de las mutantes Seblr en condiciones estándar de la fuente de C, no se observó diferencia respecto a la cepa silvestre (Figura 13A y 15A). Por otra parte, cuando las condiciones fueron limitantes de sacarosa o glucosa las tres cepas

disminuyeron en más del 50% la producción de biomasa independientemente de la presencia de luz.

Los genes *blu* de *Trichoderma atroviride* pertenecen a un grupo de aquellos genes cuya expresión esta regulada por el complejo BLR1-BLR2 (Rosales y col., 2006). Con esto en mente se generaron mutantes que sobre expresan alguno de estos genes (Tabla VI) lo que en teoría podría suponer un fenotipo de incremento en la conidiación independientemente de la luz. Cuando se estudio el efecto de la fuente de C sobre la fisiología de estas mutantes se observó que en las sobre-expresantes *blu7* y *blu 17* solo se induce la formación de conidias en presencia de luz lo que supone una actividad de éstos totalmente dependiente del complejo BLR (Figura 16A, B y 18A, B). El análisis del crecimiento sobre las mutantes que sobre expresan los genes *blu* ensayados no se ve afectado respecto a la cepa silvestre.

Por otra parte y con el fin de determinar si la interrupción de los genes *blu* pudiera generar una disminución en el patrón de conidiación se generaron las mutantes antisentido de algunos de lo genes *blu* previamente identificados (Rosales-Saavedra y col., 2006). La mutante que no expresa el gen *blu5* no presenta ningún cambio en el patrón de conidiación y su producción sigue siendo dependiente de la luz.

Por otra parte para el gen *blu7*, su interrupción tiene un efecto sobre la fotoconidiación, aumentando en un 64.4% en condiciones estándar respecto a la cepa silvestre y siendo más evidente cuando glucosa se utilizó como fuente de carbono (Figura 20A). La biomasa producida por las mutantes que no expresan los genes *blu5* y *blu7* analizados no presentó diferencia tanto en la condición estándar como en la limitante.

Sobre este mismo panel de mutantes, la conidiación de las correspondientes a los genes *blu15* y *blu22* se vió incrementada en presencia de sacarosa como fuente de C tanto en la concentración estándar como en la limitante en presencia de luz (Figura 26A). Este efecto no se observó cuando se utilizó glucosa, donde la producción de conidias en ambas mutantes depende de la presencia de una concentración estándar (no limitante) y del estímulo luminoso (Figura 25A, B).

En general se puede mencionar que mediante la utilización de las diferentes fuentes de C se pusieron en evidencia diferentes vías de respuestas y adaptación a las condiciones nutricionales, evidenciado por cambios en el desarrollo como la formación de anillos de conidiación en *T. atroviride*.

VII. CONCLUSIONES

- La limitación de la fuente de C induce la conidiación en *T. atroviride* y este sistema resulto independiente de aquel que induce la fotoconidiación, esto es del complejo de proteínas BLR1-BLR2.
- La proteína BLR1 pudiera estar actuando como un regulador negativo dependiente de luz en el crecimiento vegetativo de *T. atroviride*.
- Las variaciones observadas en el crecimiento de las mutantes de *Trichoderma* Blr-1 y Blr-2 sugiere la presencia de otros mecanismos de recepción para longitudes de onda diferentes a las de la luz azul.
- La hiperfotoconidiación reportada en la sobre-expresante del gen *blr-2* es dependiente de la presencia de una concentración estándar (no limitante) de la fuente de C.
- El gen *blu-7* parece tener una participación más directa sobre la respuesta de fotoconidiación que el resto de los genes *blu*, actuando como un regulador negativo.

VIII. BIBLIOGRAFÍAS

- * **Ballario, P.**, Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. and Macino G. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.* 15:1650-1657.
- * **Berrocal-Tito, G. M.**, Esquivel-Naranjo, E. U., Horwitz, B. A. and Herrera Estrella, A. (2007). *Trichoderma atroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. *Eukaryot. Cell* 6:1682-1692.
- * **Berrocal-Tito, G.**, Rosales Saavedra, M. T., Herrera-Estrella, A. and Horwitz, B. A. (2000). Characterization of blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr-1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochem. Photobiol.* 71:662-668.
- * **Betina, V.** (1984) Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Int J Microbiol* 2, 55-68.
- * **Blumenstein A**, Vienken K, Tasler R, Purschwitz J, Veith D, Frankenberg-Dinkel N. y Fischer R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome *FphA* represses sexual development in red light. *Curr Biol.* 15:1833-1838.
- * **Briggs W. R.** y Huala E. (1999). Blue Light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 15:33-62.
- * **Briggs, W.** and Onley., M (2001). Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant physiol* 125, 85-88.
- * **Briggs, W. R. and Christie, J. M.** (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* 7, 204–210.
- * **Carattoli A.**, Cogoni C., Morelli G. y Macino G. (1994). Molecular characterization of upstream regulatory sequences controlling the photoinduced expression of the *albino-3* gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, 13:787-795.
- * **Casas-Flores, S.** (2004). Obtención y caracterización de mutantes de *Trichoderma atroviride* alteradas en la respuesta a la luz azul. Tesis de Doctor en ciencias, especialidad en Biología, CINVESTV Irapuato.
- * **Casas-Flores, S.**, Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce Noyola, P. and Herrera-Estrella, A. (2004). BLR-1 and BLR-2 are key regulatory elements for photoconidiation and mycelial growth in *T. atroviride*. *Microbiology* 150:3561-3569.
- * **Casas-Flores, S.**, Rios-Momberg, H.M., Rosales-Saavedra, T., Martínez-Hernández, P., Olmedo-Monfil, V. and Herrera-Estrella, A. (2006). Cross Talk between a Fungal Blue-

- Light Perception System and the Cyclic AMP Signaling Pathway. *Eukaryot. Cell* 5:499-506.
- * **Cashmore, A.**, Jarillo, J., Wu, Y., and Liu, D. (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760-765.
 - * **Chen, M.**, Chory, J. and Fankhauser, C. (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* 38:87-117.
 - * **Cheng, P.**, He, Q., Yang, Y., Wang, L., and Liu, Y. (2003) Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5938-5943.
 - * **Corrochano, L. M.** (2007). Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behavior. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, 6, 725-736.
 - * **Crosson, S.**, Rajagopal, S., and Moffat, K. (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42:2-10.
 - * **Danielson, R.M.** Y DAVEY, C.B. (1973). Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biol. Biochem.* 5:505-515.
 - * **Dennison, D.** (1979) Phototropism. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, **Vol. 7**. Haupt, W., and Feinleib, M.E. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 506–566.
 - * **Esquivel Naranjo E. U.** (2007). Análisis molecular de la percepción de luz en *Trichoderma atroviride*. Tesis de Doctor en ciencias, especialidad de Biotecnología de plantas. CINVESTAV Irapuato.
 - * **Froehlich, A. C.**, Liu, Y., Loros, J. J. and Dunlap J. C. (2002). White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the *frequency* promoter. *Science* 297:815-819.
 - * **Froehlich A. C.**, Noh B., Vierstra R. D., Loros J.J. y Dunlap J. C. (2005). Genetic and Molecular Analysis de Phytochromes from the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 4:2140-2152.
 - * **Gehring, W.**, and **Rosbash, M.** (2003). The coevolution of blue-light photoreception and circadian rhythms. *J. Mol. Evol.* 57:S286-S289.
 - * **Gresik, M.**, Kolarova, N. and Farkas, V. (1988). Membrane potential, ATP, and cyclic AMP changes induced by light in *Trichoderma viride*. *Exp. Mycol.* 12:295-301.
 - * **Gressel J. y Rau W.** (1983). Photocontrol of Fungal Development. *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Mohr H y Shropshire Jr. W. (editors). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg New York, Tokio., vol 16B:603-639.

- * **H. J. Vogel.** *Microbial Genetics Bulletin* 13:42-43, 1956.
- * **He Q.,** Cheng P., Yang Y., Wang L., Garden K. H. and Liu Y. (2002). White Collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297, 840-843.
- * **Herrera-Estrella,** A. and Horwitz, B. (2007). Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol. Microbiol.* 64:5-15.
- * **Horwitz, B. A.,** Gressel, J., and Malkin, S. (1985). Photoperception mutants in *Trichoderma*: mutants that sporulate in response to stress but not light. *Curr. Genet.* 9:605-613.
- * **Idnurm, A.,** Rodríguez Romero, J., Corrochano, L. M., Sanz, C., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P. and Heitman, J. (2006). The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4546-4551.
- * **Jarillo, J.,** Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J., Ecker, J. and Cashmore, A. (2001). Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410, 952-954.
- * **Jiao, Y.,** Lau, O.S. and Deng, X.W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat. Rev. Genet.* 8:217-230.
- * **Kagawa, T.,** Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., and Wada, M. (2001). *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291, 2138-2141.
- * **Kaufman, L.** (1993). Transduction of blue light signals. *Plant Physiol.* 102:333-337.
- * **Ko, W. H.,** Nash, A. I. and Gardner, K. H. (2007). A LOVely view of blue light photosensing. *Nat. Chem. Biol.* 3:372-374.
- * **Lauter F. R.** (1996). Molecular genetics on fungal photobiology. *J. Genet.,* 75:375-386.
- * **Lewis, Z.,** Correa, A., Schwerdtfeger, C., Link, K., Xie, X., GGomer, R. (2002). Overexpression of White Collar-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 45, 917-931.
- * **Linden, H. and Macino, G.** (1997). White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* 16:98-109.
- * **Linden, H.,** Ballario, P., and Macino, G. (1997). Blue Light Regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 22:141-150.

- * **Ma, L.,** Li, L., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H. and Deng, X. W. (2001). Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 13:2589-2607.
- * **Pérez Aguilar S.** (2007). Determinación de la función del Dominio LOV de la proteína BLR-1 de *Trichoderma atroviride*. Tesis de Maestra en ciencias, especialidad de Biología Molecular. IPICYT.
- * **Purschwitz, J.,** Muller, S., Kastner, C., and Fischer, R. (2006). Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol.* 9:566-571.
- * **Quail, P.** (2002). Photosensory perception and signaling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* 14, 180-188.
- * **Rau, W. &** Mitzka-Schnabel, U. (1985). Carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol* 110:253-267.
- * **Ríos-Momberg H. M.** (2004). Papel de una proteína homóloga a WC-1 de *Neurospora crassa* en las respuestas a luz de *Trichoderma atroviride*. Tesis de Doctor en ciencias, especialidad de Biotecnología de plantas. CINVESTAV Irapuato.
- * **Rosales-Saavedra, T.,** Esquivel Naranjo E. U., Casas Flores, S., Martínez Hernández P., Ibarra Laclette E., Cortes-Penagos C. and Herrera Estrella A. (2006). Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* 152:3305-3317.
- * **Rosen, D.,** M. Edelman, E. Galun, and D. Danon. (1974). Biogenesis of mitochondria in *Trichoderma atroviride*: structural changes in mitochondria and other spore constituents during conidium maturation and germination. *J. Gen. Microbiol.* 83. 31-49.
- * **Samuels, G.J.** (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research*, 100, 923-935 (el género *Trichoderma*), 7:249-260.
- * **Sakai, T.,** Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, E., Christie, M., Briggs, R., Wada, M. and Okada, K. (2001). *Arabidopsis* *nph1* and *npl 1*: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6969-6974.
- * **Schmidhauser, T.,** Lauter F., Russo, V. and Yanofsky, C. (1990). Cloning, sequence and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol* 10, 5064-5070.
- * **Schmoll M.,** Franchi L. y Kubicek C. P. (2005). Envoy, a PAS/LOV Domain Protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), Modulates Cellulase Gene Transcription in Response to Light. *Eukaryotic Cell*, 4:1998-2007.

- * **Schwerdtfeger C. y Linden H.** (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J.*22:4846-4855.
- * **Smith, H.** (2000). Phytochromes and light signal perception by plants an emerging synthesis. *Nature* 407, 585-591.
- * **Sommer, T.,** Chambers, J., Eberle, J., Lauter, F. and Russo, V. (1989). Fast light-regulated genes of *Neurospora crassa*. *Nucleic Acid Res* 17, 5713-5723.
- * **Silva, F.,** Torres-Martínez, S. and Garre, V. (2006). Distinct *White collar-1* genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol* 61, 1023-1037.
- * **Talora, C.,** L. Franchi, H. Linden, P. Ballario, and G. Macino. 1999. Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J.* 18:4961-4968.
- * **Tepperman, M.,** Zhu, T., Chang, S., Wang, X and Quail, H (2001). Multiple E transcription factor genes early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9437-9442.
- * **Yamaguchi, R.,** Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, A. and Nagatani, A. (1999). Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J Cell Biol* 145, 437-445.

ESPECTRO DE LA LUZ (CITADA EN INTERNET) AGOSTO 2009.

- * <http://perso.wanadoo.es/frs88/tpn/desc/espectro.htm>