



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGÍA

POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudio de la relación entre los estímulos de
estrés nutricional por limitación de fosfato y
luz en el desarrollo asexual de *Trichoderma*
atroviride

Tesis que presenta
Macario Osorio Concepción

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

Directores de Tesis
Dr. Carlos Cortés Penagos
Dr. J. Sergio Casas Flores

Morelia, Michoacán., Abril de 2011

Créditos Institucionales

El presente trabajo 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, así como en el laboratorio de genómica funcional y comparativa de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Bajo la asesoría del Dr. Carlos Cortés Penagos y del Dr. Sergio Casas Flores.

Durante la realización del trabajo se recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Dedicatoria

A: Dios, a mis padres y hermanos.

Agradecimientos

Principalmente a dios por las oportunidades que me ha dado y por permitirme culminar esta etapa de mi vida académica

A mis padres por brindarme siempre su apoyo incondicional, confianza y consejos.

A mi asesor de tesis, el Dr. Carlos Cortés Penagos por haberme dado la oportunidad de realizar la maestría, por el apoyo que me brindó, por la confianza, por la motivación a seguir adelante y por su valiosa amistad.

Al D.C Sergio Casas Flores, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo en el laboratorio de genómica funcional y comparativa, por el apoyo que me brindó en este trabajo de tesis, por sus consejos, paciencia, atención y amistad brindada mil gracias.

A mi comité de sinodales, Dr. Horacio Cano Camacho, Dr. Miguel Martínez, Dr. Juan Carlos Hernández Gonzales, por sus consejos y críticas que han ayudado en la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|---|---------------|
| CRÉDITOS INSTITUCIONALES | I |
| DEDICATORIA | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VI |
| ÍNDICE DE TABLAS | VII |
| ABREVIACIONES | VIII |
| RESUMEN | IX |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | - 1 - |
| 1.1 LA LUZ EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS | - 1 - |
| 1.2 FOTORRECEPTORES DE LUZ EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS | - 3 - |
| 1.3 FOTORRECEPTORES DE LUZ AZUL EN HONGOS | - 5 - |
| 1.4 FOTORRECEPTORES DE LUZ DESCRITOS EN <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 6 - |
| 1.5 CARACTERÍSTICAS DEL GENERO <i>TRICHODERMA</i> | - 8 - |
| 1.6 CONIDIACIÓN EN EL HONGO FILAMENTOSO <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 9 - |
| 1.7 EL FOSFATO Y SU IMPORTANCIA BIOLÓGICA | - 15 - |
| 1.8 LAS PROTEÍNAS BLR REGULAN LA EXPRESIÓN DE GENES EN <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 16 - |
| 1.9 GENES ASOCIADOS A LA CONIDIACIÓN EN <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 17 - |
| II. JUSTIFICACIÓN | - 19 - |
| III. HIPÓTESIS | - 19 - |

| | |
|--|---------------|
| IV. OBJETIVOS..... | - 19 - |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL | - 19 - |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | - 19 - |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS | - 20 - |
| 5.1 MICROORGANISMOS..... | - 20 - |
| 5.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO..... | - 20 - |
| 5.2.1 MEDIO VOGEL´S | - 20 - |
| 5.2.2 CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LAS CEPAS | - 21 - |
| 5.2.3 ENSAYOS DE FOTO INDUCCIÓN | - 21 - |
| 5.2.4 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y SÍNTESIS DE CDNA | - 22 - |
| 5.2.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE CONIDIACIÓN POR PCR..... | - 22 - |
| 5.2.6 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO A PARTIR DE LA FORMACIÓN DE BIOMASA | - 23 - |
| 5.2.7 CUANTIFICACIÓN DE CONIDIAS | - 23 - |
| VI. RESULTADOS..... | - 24 - |
| 6.1 LA LIMITACIÓN DE PI DISMINUYE EL CRECIMIENTO MICELIAL EN <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 24 - |
| 6.2 LA LIMITACIÓN DE PI EN COMBINACIÓN CON LA LUZ INDUCEN CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 25 - |
| 6.3 LA LIMITACIÓN DE PI INDUCE LA FORMACIÓN DE CONIDIÓFOROS EN <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 27 - |
| 6.4 LA LIMITACIÓN DE PI Y LA LUZ ACTÚAN SINÉRGICAMENTE EL LA FORMACIÓN DE CONIDIAS EN <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 30 - |
| 6.5 LA LIMITACIÓN DE PI Y LA LUZ INDUCEN LA EXPRESIÓN DE GENES DE CONIDIACIÓN EN <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 33 - |
| VII. DISCUSIÓN..... | - 37 - |

VIII. CONCLUSIONES..... - 44 -

IX. BIBLIOGRAFÍA..... - 45 -

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| FIGURA 1. ESPECTRO DE LA RADIACIÓN SOLAR. | - 2 - |
| FIGURA 2. DIFERENTES PROTEÍNAS ENCONTRADAS EN EL GENOMA DE DIVERSOS HONGOS QUE PODRÍAN FUNCIONAR COMO FOTORRECEPTORES.. | - 4 - |
| FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE LOS PRINCIPALES FOTORRECEPTORES EN ESPECIES DE <i>TRICHODERMA</i> | - 8 - |
| FIGURA 4. FOTOCONIDIACIÓN DE <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i> | - 9 - |
| FIGURA 5. CAMBIOS MORFOLÓGICOS OBSERVADOS DURANTE LA FOTOCONIDIACIÓN DE <i>TRICHODERMA</i> | - 10 - |
| FIGURA 6. MODELO HIPOTÉTICO MOSTRANDO LA FUNCIÓN DEL COMPLEJO BLR EN SENSIBILIDAD A CARBONO..... | - 13 - |
| FIGURA 7. EFECTO DE LA LIMITACIÓN DE PI EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 25 - |
| FIGURA 8. MORFOLOGÍA COLONIAL DE <i>T. ATROVIRIDE</i> BAJO CONDICIONES LIMITADAS DE PI. | - 27 - |
| FIGURA 9. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LA FORMACIÓN DE CONIDIÓFOROS POR LIMITACIÓN DE PI EN <i>T. ATROVIRIDE</i> | - 29 - |
| FIGURA 10. PRODUCCIÓN DE CONIDIAS EN <i>T. ATROVIRIDE</i> BAJO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PI..... | - 32 - |

FIGURA 11. EXPRESIÓN DE GENES DE CONIDIACIÓN EN *T. ATROVIRIDE* BAJO LIMITACIÓN DE PI. - 36 -

FIGURA 12. MODELO HIPOTÉTICO MOSTRANDO LAS VÍAS DE REGULACIÓN DE LA CONIDIACIÓN POR LUZ Y LIMITACIÓN PI EN *TRICHODERMA ATROVIRIDE*. - 43 -

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|--------|
| TABLA 1. CEPAS DE <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i> | - 20 - |
| TABLA 2. COMPONENTES DEL MEDIO VOGEL'S, PARA UNA CONCENTRACIÓN DE 50X | - 20 - |
| TABLA 3. COMPOSICIÓN DEL MEDIO MÍNIMO VOGEL'S CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PI..... | - 21 - |
| TABLA 4. COMPONENTES DE LA REACCIÓN DE PCR | - 22 - |
| TABLA 5. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE CONIDIACIÓN | - 23 - |

Abreviaciones

| | |
|------|---|
| blr | Blue light regulated |
| Pi | Fosfato inorgánico |
| mM | Milimolar |
| nm | Nanómetros |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| FAD | Flavin adenin dinucleótido |
| FMN | Flavina mononucleótido |
| wc | white collar |
| PAS | Primer dominio identificado en las proteínas Per, Arnt y Sim. |
| LOV | Dominio sensor de luz, oxígeno y voltaje |
| WCC | Complejo white collar |
| UV-A | Luz ultraviolet tipo A |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| AMPc | Adenosin 3'-5' monofosfato cíclico |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| LRE | Elementos de respuesta a luz |
| C | Carbono |
| N | Nitrógeno |
| P | Fosfato |
| MMV | Medio Mínimo Vogel's |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| h | Horas |
| ml | Mililitros |
| μl | Microlitros |
| μg | Microgramos |
| min | Minutos |
| wt | Cepa Silvestre |
| mg | Miligramos |

RESUMEN

Las especies de *Trichoderma* conidian en respuesta a varios factores de estrés tales como luz, estrés nutricional, daño mecánico y pH. La aplicación de un pulso luminoso a una colonia de *Trichoderma* es suficiente para inducir un anillo de conidiación en la periferia de la colonia al momento de la exposición. La percepción del estímulo luminoso en *Trichoderma* esta mediado por las proteínas BLR. Mutantes nulas en los genes *blr* no son capaces de conidiar en respuesta a la luz pero si responden a limitación de N a través de la formación de conidias. En este estudio, se evaluó la respuesta de *T. atroviride* al déficit de Pi en la inducción de la conidiación, utilizando a la cepa silvestre (*wt*), y a las mutantes ciegas a luz ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$). La evaluación de la fotoconidiación en diferentes concentraciones de Pi mostró que una concentración de 0.9mM indujo la máxima formación de conidias ($4.16E+06$ conidias). En ausencia de luz, esta respuesta se vió limitada observándose solo algunos conidióforos, mismos que se hicieron más abundantes en concentraciones menores del nutriente. En las mutantes *blr* no se observaron efectos aparentes en la inducción del anillo de conidias por el efecto combinado de la luz y la limitación de Pi, presentando abundante micelio y presencia esporádica de conidióforos. En oscuridad el crecimiento de las cepas *wt* y mutantes *blr* fue similar. La expresión de genes asociados al proceso de conidiación (*con-1*, *con-10*, *con-13*, *nrc-2*, *pp-1*, *otfc*) utilizando RT-PCR se llevó a cabo durante la conidiación estimulada por un pulso de luz y por la limitación de Pi. La expresión de *con-1* se observó en todas las concentraciones limitantes de Pi e independientemente del estímulo luminoso. Por otra parte, en las mutantes *blr* el transcrito correspondiente a este gen no fue detectado, por lo que su expresión es dependiente de las proteínas BLR.

PALABRAS CLAVE: *Trichoderma atroviride*, Pi, conidiación, fotorreceptores.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La luz en los sistemas biológicos

Todos los sistemas biológicos en el transcurso de la evolución han estado expuestos a radiaciones electromagnéticas provenientes del sol, conocida como luz, radiación que se propaga en forma de ondas. La energía transportada por las ondas es proporcional a su frecuencia, de modo que a mayor frecuencia de la onda, mayor es su energía. Por lo tanto la luz visible por el ojo humano comprende longitudes de onda que van desde 780 nm (rojo lejano) a 380 nm (violeta), rango que perciben todos los seres vivos. (Ríos, 2004; Esquivel, 2007) (**Figura 1**). La luz presenta diferentes longitudes de onda, las de menor energía y mayor longitud de onda son aquellas necesarias para las vibraciones de enlaces moleculares que se transforma en calor, colocándose en el rango de infrarrojo. Las emisiones de mayor energía y menor longitud de onda, están implicadas en reacciones fotoquímicas en moléculas de importancia biológica, corresponde al rango de ultravioleta. La luz tiene propiedades que pueden ser dañinas para muchos organismos vivos, por lo tanto puede ser utilizada como fuente de información o como fuente de energía dependiendo del estado energético de la luz, ejerciendo un control directo sobre el crecimiento y desarrollo (Esquivel y col., 2007; Neff y Col., 2011), siendo un factor crucial para la sobrevivencia en la naturaleza (Tisch y col., 2009; Schmoll y col., 2010).

Toda materia con carga eléctrica puede tomar energía de un campo eléctrico, como electrones y moléculas al interactuar con la luz, un electrón pasa de un estado basal a uno excitado por la energía que absorbe de su entorno y al liberarla regresa a su estado basal (Ríos, 2004). La luz ultravioleta y azul, es percibida como una señal de alerta para muchos organismos activando mecanismos de protección (síntesis de pigmentos), defensa (síntesis de enzimas) y formación de estructuras de reproducción (esporas) ya que afecta moléculas de importancia biológica como el DNA generando mutaciones que pueden ser transmitidas a la siguiente generación por su capacidad de iniciar reacciones de radicales libres descontroladas tales como especies reactivas de oxígeno (ROS). El oxígeno durante su reducción puede liberar gran cantidad de energía y de este modo es un peligroso almacén energético.

Los metabolitos altamente reactivos y reducidos parcialmente, como el anión superóxido, el radical hidróxilo, peróxido de hidrógeno, conocidas como especies reactivas de oxígeno pueden originarse a durante las reacciones de transferencia de electrones, como aquellas en las que interviene la luz. Adicionalmente, la luz visible indirectamente puede generar especies reactivas de oxígeno en reacciones fotosensibilizadas por transferencia de energía de una molécula que se activa por luz visible como una flavina (cromóforos) (Lledias y Hansberg, 2000; Ríos, 2004; Schmoll y col., 2010). Para algunos organismos la luz es benéfica ya que proporciona la energía necesaria para su desarrollo y para otros es muy dañina llegando a causar la muerte. Por lo tanto durante la evolución se han seleccionado mecanismos moleculares para decodificar la información existente en la luz y de esta manera responder de forma rápida a esta señal y contrarrestar sus efectos negativos (Linden H y col., 2002; Tisch y col., 2009) modificando perfiles de transcripción génica para adaptarse ante cambios ambientales (Ma y col., 2001; Linden y col., 1997; Idnurm y col., 2005; Schmoll y col., 2010).

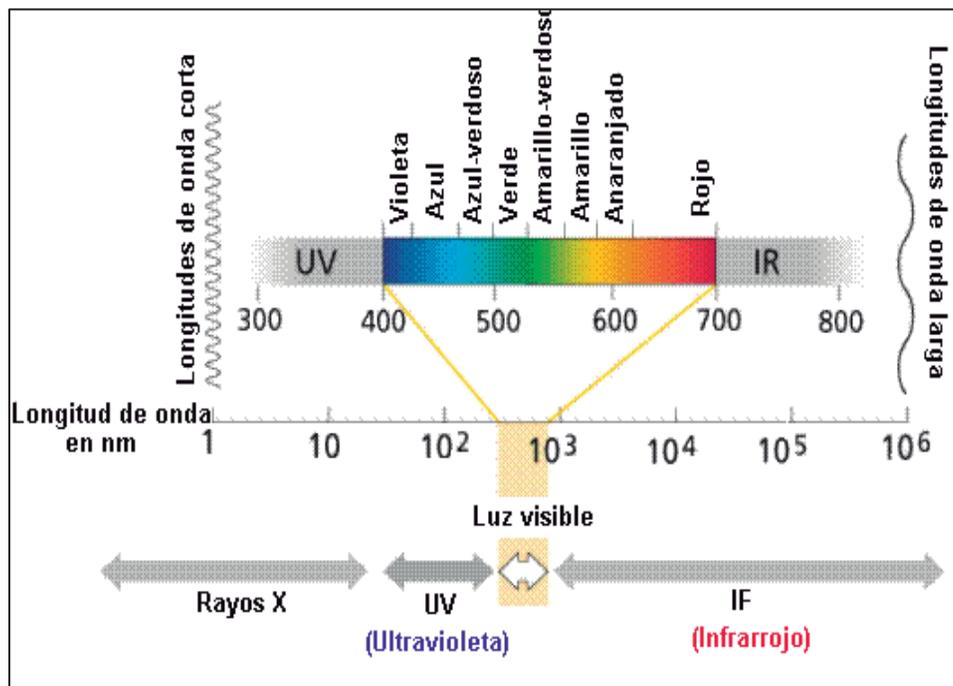


Figura 1. Espectro de la radiación solar. Tomado de: <http://perso.wanadoo.es/frs88/tpn/desc/espectro.htm>

1.2 Fotorreceptores de luz en los sistemas biológicos

La percepción de luz está mediada por proteínas denominadas fotorreceptores, en conjunto con moléculas pequeñas no proteicas sensibles a luz denominadas cromóforos como: retinoides, tetrapirroles, flavinas, porfirinas, pterinas (Herrera y Horwitz., 2007) que los capacita para percibir prácticamente todas las longitudes de onda del espectro de la luz solar. La energía absorbida provoca cambios conformacionales en el cromóforo que se transmite a la proteína fotorreceptora causándole cambios conformacionales pasando a un estado activo (Chen y col., 2004; Ko y col., 2007). El fotorreceptor en su estado activo transforma el estímulo externo en señales a través de proteínas efectoras que desencadenan cambios bioquímicos y fisiológicos o directamente regulan la expresión de genes necesarios para las respuestas fisiológicas específicas en la célula (Froehlich y col., 2002; Chen y col., 2004; Casas-Flores y col., 2004; Ko y col., 2007; Esquivel., 2007), estas moléculas fotorreceptores están presentes en todos los organismos vivos. En eucariontes se han descrito diferentes tipos de fotorreceptores, capaces de percibir la luz roja/rojo lejano y azul (Cashmore y col., 1999). Las plantas presentan una compleja red de percepción de luz y transducción de señales que permiten detectarla y responder a diferentes cambios, entre los que se detectan son: intensidad, dirección, duración y calidad de la luz. Empleando al menos tres tipos de fotorreceptores: fototropinas, criptocromos y fitocromos. Las fototropinas y criptocromos son flavoproteínas que contienen dos cromóforos una pterina y FAD (criptocromos) y dos FMN (fototropinas) que detectan la región UV cercana/azul.

Los fitocromos son cromoproteínas diméricas con una subunidad polipeptídica que une un cromóforo de tetrapirrol que establece una unión covalente con una cisteína detectando la región de luz roja/jora lejano) (Froehlich y col., 2005). En plantas los criptocromos y fitocromos controlan el crecimiento y el desarrollo, en función de la longitud de onda, la intensidad y la duración diurna de la radiación (Cashmore y col., 1999; Smith, 2000), en tanto las fototropinas funcionan controlando la dirección 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; Jarillo y col., 2001). Por otra parte los fotorreceptores existentes en mamíferos están las opsinas asociadas a retinol, los criptocromos asociadas a flavinas y pterinas, ambos están implicados en la percepción de la luz azul (Idnurm y col., 2005). Los

hongos responden a diversas señales del medio ambiente, como la luz, que regula muchas respuestas en ellos como la conidiación, el fototropismo, el desarrollo sexual, el encarrilamiento del ritmo circadiano, etc., además son capaces de responder a diferentes tipos de luz, desde la ultravioleta hasta el rojo lejano (Linden y col., 1997; Casas-Flores y col., 2004; Schmoll y col., 2005; Silva y col., 2006; Idnurm y col., 2006; Herrera-Estrella y Horwitz, 2007; Tisch y Schmoll, 2009). Extensos trabajos han llevado a la identificación y caracterización de fotorreceptores fúngicos, a través proyectos de secuenciación de genomas han revelado que las cuatro clases de fotorreceptores encontrados en otros reinos, se encuentran conservados en los hongos (Purschwitz y col., 2006), tales como las opsinas, fitocromos, criptocromos, fotoliasas (**Figura 2**). Los fotorreceptores presentan un dominio de unión al cromóforo, así como un dominio efector interaccionando con proteínas para la transducción de la señal luminosa. En trabajos anteriores se ha establecido que los fotorreceptores en condiciones de oscuridad tienden a una conformación cerrada, debido a la interacción entre el dominio de unión al cromóforo y el dominio efector, bloqueando toda actividad; en condiciones de luz, los fotorreceptores experimentan cambios estructurales, permitiendo la liberación de las proteínas, que conllevan a generar respuestas a los estímulos extracelulares (Cheng y col., 2004; Ko y col., 2007).

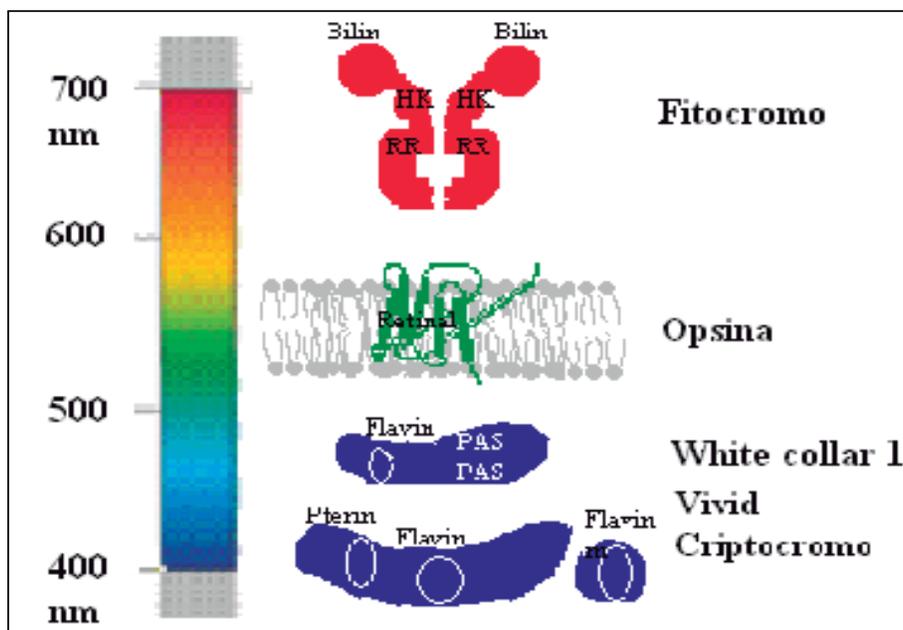


Figura 2. Diferentes proteínas encontradas en el genoma de diversos hongos que podrían funcionar como fotorreceptores. (Modificado de Purschwitz y col., 2006).

1.3 Fotorreceptores de luz azul en hongos

El hongo filamentoso mejor estudiado es *N. crassa*, donde los mecanismos genéticos y moleculares son mejor conocidos. Empleando mutantes “ciegas a la luz” se identificaron dos genes *wc-1* y *wc-2* (*white collar-1* y *white collar-2*) cuyos productos son necesarios para la fotorecepción denominadas WC-1 y WC-2, que regulan todas las respuestas a la luz azul descritas en el hongo ascomiceto *N. crassa* (Ballario y col., 1996; Linden y Macino., 1997). La proteína WC-1 presenta tres dominios PAS, dos de ellos implicados en la interacción proteína-proteína y el tercero es un dominio de unión a cromóforo (dominio LOV), presenta un dominio de unión a DNA tipo gata, un dominio de activación transcripcional y una señal de localización nuclear. Posteriormente, se demostró que WC-1 es el fotorreceptor por poseer una molécula de FAD en el dominio LOV el cual es esencial para la percepción de luz y la fotoadaptación provocando la dimerización del complejo WCC que induce la expresión de VIVID en *N. crassa* (Froehlich y col., 2002; He y col., 2002; Malzahn y col., 2010). En tanto WC-2 presenta un solo dominio PAS, un dominio de unión a DNA tipo gata, un dominio de activación transcripcional, y una señal de localización nuclear (Talora y col., 1999). WC2 no participa directamente en la captación de la luz, pero es esencial para la formación del complejo fotorreceptor con WC-1 a través de la interacción de los dominios PAS, esa interacción es esencial para la función del complejo WC que se une a los promotores de genes inducidos por luz (Linden y col., 1997; Froehlich y col., 2002; He y col., 2002; Cheng y col., 2003). En *N. crassa* se describió un segundo fotorreceptor de luz azul-UVA, necesario para la foto-adaptación que le permite al hongo detectar cambios en la intensidad de luz (Schwerdtfeger y Linden, 2003). VIVID es una proteína de 186 aminoácidos, presenta un solo dominio LOV que une una molécula de FAD ó FMN (Schwerdtfeger y Linden, 2003). Por lo tanto VIVID interactúa con las proteínas WC-1, WC-2 para regular el mecanismo molecular del reloj circadiano de *N. crassa* (Brunner y Schafmeier., 2006; Dunlap y Loros., 2006, Hunt y col., 2010).

Genes similares a *wc-1* se han identificado en todo el reino de los hongos (ascomicetes, basidiomicetes y zigomicetes). Por ejemplo en *Magnaporthe oryzae*, se ha sugerido que requiere la proteína codificada por el gen *wc-1*, así también en *Bipolaris oryzae* es esencial la presencia del producto de este gen, ya que actúa como sensor de luz y

para la expresión de una fotoliasa (Kihara y col., 2007). El ascomiceto *Tuber borchii* presenta el gen *tuber* que codifica una proteína que funciona como fotorreceptor pero no presenta un dominio activador poliglutamina, esto sugiere que no funciona como activador transcripcional (Lombardi y Brody., 2005). Una cepa mutante de *Cryptococcus neoformans* en el gen similar a *wc-1* mostró un fenotipo ciego, además se logró identificar un gen similar a *wc-2* por comparación de secuencia. La proteína WC-1 de *Cryptococcus* presenta un dominio de unión a cromóforo pero carece del dominio de unión a DNA, que esta presenta en la proteína WC-2 (Idnurm y Heitman., 2005; Lu y col., 2005). En *Phycomyces blakesleeanus* se han identificado genes *madA* y *wcoA* homólogos a *wc-1*. La proteína MADA es similar a WC-1 de *N. crassa*, presenta un dominio de unión a flavinas y un dominio de unión a DNA, esto sugiere un papel de activador transcripcional génica tras la recepción de luz azul (Idnurm y col., 2006). La proteína WCOA también es similar a la proteína WC-1 de *N. crassa*, los dominios funcionales sugieren que podría funcionar como factor de transcripción (Idnurm y col., 2006; Rodríguez-Romero., 2006). Dentro de los fotorreceptores de luz azul descritos en sistemas fúngicos están las opsinas, los criptocromos, los fitocromos, fotoliasas, así también las proteínas WC y BLR, estas dos últimas encontradas en *N. crassa* y *T. atroviride* respectivamente (Idnurm y Heitman.,2005; Corrochano y Galland.,2006; Purschwitz y col.,2006).

1.4 Fotorreceptores de luz descritos en *T. atroviride*

En *T. atroviride* se ha identificado genes homólogos a los genes *wc* de *N. crassa*, estos dos genes identificados fueron denominados *blr-1* y *blr-2* que codifican proteínas esenciales para la fotoconidiación y la expresión de genes regulados por luz azul (Casas-Flores y col., 2004; Rosales-Saavedra y col., 2006). Las proteínas BLR funcionan como fotorreceptores y factores de transcripción ya que presentan dominios de unión a DNA tipo GATA y dominios PAS necesarios para interactuar y formar complejos entre ellas (Ballario y col., 1996; Linden y Macino, 1997; Liu y col., 2003; Casas-Flores y col., 2004). La proteína BLR-1 tiene un dominio de unión a DNA y tres dominios PAS, el primer dominio es considerado un LOV, un dominio sensorial que tiene todos los aminoácidos necesarios para interactuar con un cromóforo FAD, incluyendo la cisteína para formar el aducto con la flavina, esto sugiere que BLR-1 es el fotorreceptor de luz azul en *T. atroviride* (**Figura 3**).

En tanto la proteína BLR-2, presenta un dominio PAS, una estructura coiled-coil, un dominio de unión a HDAC, y un dominio de unión a DNA (**Figura 3**). Se sugiere que la proteína BLR-1 y BLR-2 actúan como un complejo, interactuando a través de sus dominios PAS, al igual que en el caso de *N. crassa* (Casas-Flores y col., 2004; Rosales-Saavedra y col., 2006). Mutantes nulos en los genes *blr* de *T. reesie* muestran un fenotipo similar a *T. atroviride* (Castellanos y col., 2010). Cepas de *T. atroviride* que sobreexpresan el gen *blr-2*, son muy sensibles a luz azul (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007). Por otra parte se ha identificado en *T. atroviride* un segundo fotorreceptor homólogo a la proteína VIVID descrito en *N. crassa* (Heintzen y col., 2001; Schwerdtfeger y Linden., 2001, 2003) denominado ENVOY codificado por el gen *env1*, la cual presenta un dominio PAS/LOV, se sugiere como regulador negativo de la expresión de genes regulados por el complejo BLR (Castellanos y col., 2010; Schmoll y col., 2005, 2010; Schuster y col., 2007). En cepas nulas en los genes *blr*, se ha observado que siguen respondiendo a luz, lo cual sugiere que especies de *Trichoderma* (*T. reesie*, *T. atroviride* y *T. virens*) presentan genes adicionales que codifiquen receptores funcionales y esto complemente la pérdida de los genes *blr*.

También se ha identificado en el genoma de *Trichoderma* una CPD fotoliasa (PHR1), una DASH-criptocromo (Ta-12806, Tv-28006 y Tr-59726), y una proteína criptocromo/6-4 fotoliasa (Ta-86846, Tv-37166 y Tr-77473) (**Figura 3**). La proteína CRY-DASH presenta extensiones variables entre las tres especies de *Trichoderma* (Schmoll y col., 2010). Otros fotorreceptores que no perciben la luz azul también se han identificado en especies de *Trichoderma* (*T. reesie*, *T. virens* y *T. atroviride*), tales como un fitocromo, una opsina putativa, así como homólogos de la maquinaria de respuesta a luz en *N. crassa* y *D. melanogaster* (FRQ1, FWD1, BLI1, SHAGGY, TIMELESS), involucrados en el reloj circadiano (Borkovich y col., 2004; Brunner y Kaldi., 2008). *Trichoderma* presenta genes que codifican una gran variedad de proteínas necesarias para la percepción de la señal luminosa. 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).

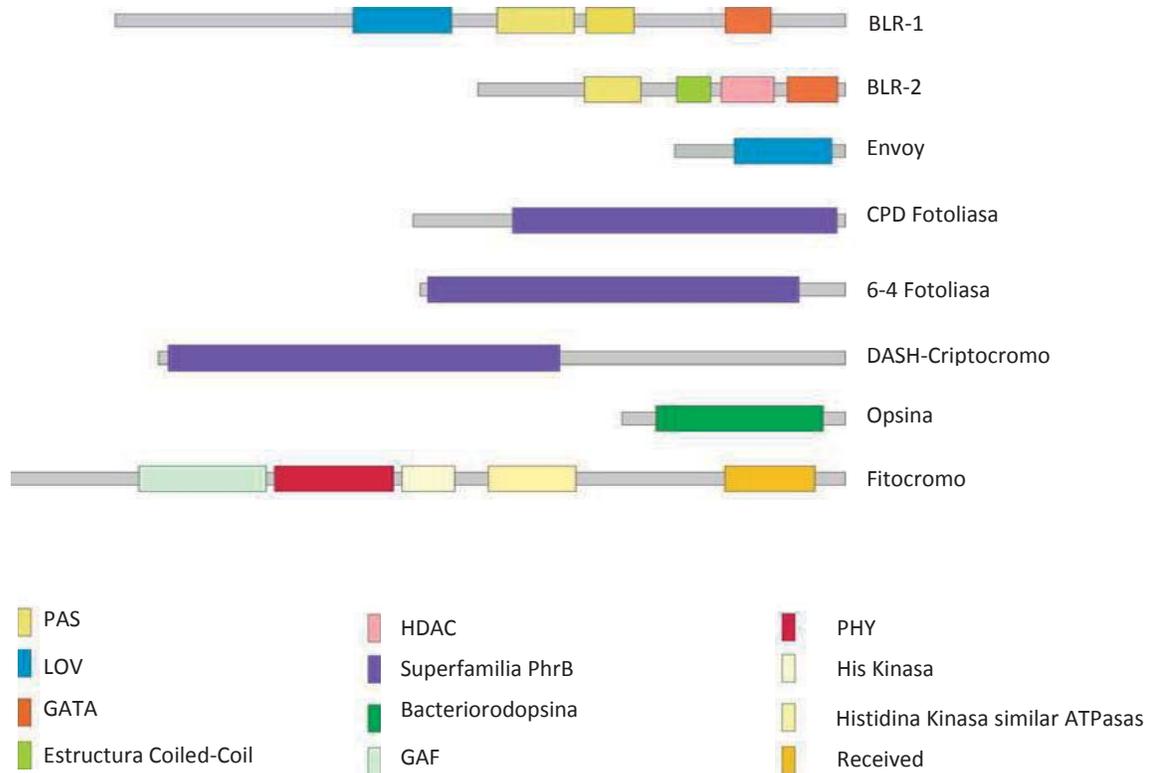


Figura 3. Representación de los principales fotorreceptores en especies de *Trichoderma*. Presentando los dominios conservados en todos los fotorreceptores: HDAC (Dominio Histona Deacetilasa), LOV (Luz, Oxígeno, y Voltaje), PAS (primer dominio encontrado en la proteína del periodo circadiano-Per), GATA (Dedo de zinc tipo- GATA), PHY (característica del dominio fitocromo), GAF (cGMP fosfodiesterasa/Adenilato ciclasa/FhIA, HIS kinasa (dominio Histidina kinasa). Tomado de Schmoll y col., 2006.

1.5 Características del género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* comprende un gran número de hongos filamentosos, clasificados como ascomicetos, orden *Hipocreales*, género *Hypocrea*. A pesar de que se ha descrito la fase sexual de *Trichoderma*, su ciclo de vida sigue siendo prioritariamente asexual, proceso que involucra la transición morfológica de micelio a conidias, conocido como conidiación. Las especies de *Trichoderma* se encuentran en una gran variedad de ecosistemas, en suelos forestales y agrícolas. *Trichoderma* se caracteriza por poseer hifas ramificadas, septadas y una conidiación verde típica. Los conidios formados son hialinos, ovoides, de color verde y se forman sobre estructuras ramificadas llamadas conidióforos que se sitúan sobre células denominadas fiálides y algunas especies producen un olor característico a coco debido a un compuesto volátil biológicamente activo (6-pentil- α -pirona) (Domsch y col., 1993; Hidalgo., 1989; Brotman y col., 2010). Crecen a un ritmo

rápido en cultivo con la producción de numerosas conidias 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 col., 1973).

1.6 Fotoconidiación en *T. atroviride*

En *T. atroviride* la luz azul regula varios procesos fisiológicos y de desarrollo tal es el caso de la fotoconidiación como un proceso de transiciones de micelio a conidias, al recibir un pulso de luz (**Figura 4**), única respuesta observada y por tal razón este hongo filamentoso es usado como modelo fotomorfogénico (Horwitz y col., 1985). Dentro de los primeros eventos fisiológicos inducidos por la luz azul en *T. atroviride* es el incremento de niveles de AMPc, activación de la actividad de la Adenilato ciclasa, fosforilación de proteínas, cambios en el potencial de membrana, variación en las concentraciones de ATP y transcripción de genes (Gresík y col., 1988, 1991; Kolarova y col., 1992; Nemcovic y col., 1998; Sulova y col., 1990; Berrocal-tito y col., 2000). Entre los factores que desencadenan el proceso de conidiación en *Trichoderma* tenemos: la luz, el estado nutricional, el pH del medio, calcio extracelular, daño mecánico y compuestos orgánicos volátiles fúngicos (Steyaert y col., 2010). Cuando la conidiación es inducida por luz, un pulso de luz azul a una colonia que crece en oscuridad, induce la formación de un anillo de conidias en la periferia de la colonia cuando recibió el pulso (**Figura 4**) (Betina, 1984).



Figura 4. Fotoconidiación de *Trichoderma atroviride*. Colonias de la cepa wt donde se observa la formación del anillo de conidias posterior al pulso (Derecha) y en oscuridad (Izquierda) crece con micelio abundante.

Los cambios morfológicos de la fotoconidiación ocurren en 5 pasos siguientes al pulso de luz: a) a las 4 h hay emergencia de hifas aéreas, b) a las 8 h y 9 h las hifas aéreas se ramifican, c) el desarrollo de fiáldes inicia a las 12 h, d) la formación de conidias inicia a las 16 h, e) a las 24 h se observan conidias maduras (**Figura 5**). Cuando la colonia crece en condiciones de luz constante la conidiación ocurre en toda la colonia (Betina., 1984; Horwitz y col., 1990; Steyaert y col., 2010b, c). Steyaert y col., (2010b, c) sugieren que la fotoconidiación es dependiente del estado metabólico de las células hifales en crecimiento y además que el anillo de conidias formado cuando la colonia es expuesta a la luz es también dependiente de la composición del medio, así como de la especie de *Trichoderma* empleada. La respuesta de fotoconidiación en *T. atroviride* inducida por la luz azul es mediada por las proteínas BLR-1 y BLR-2 (**B**lue **L**ight **R**egulator) descritas anteriormente (Casas-Flores y col., 2004; Castellanos y col., 2010).

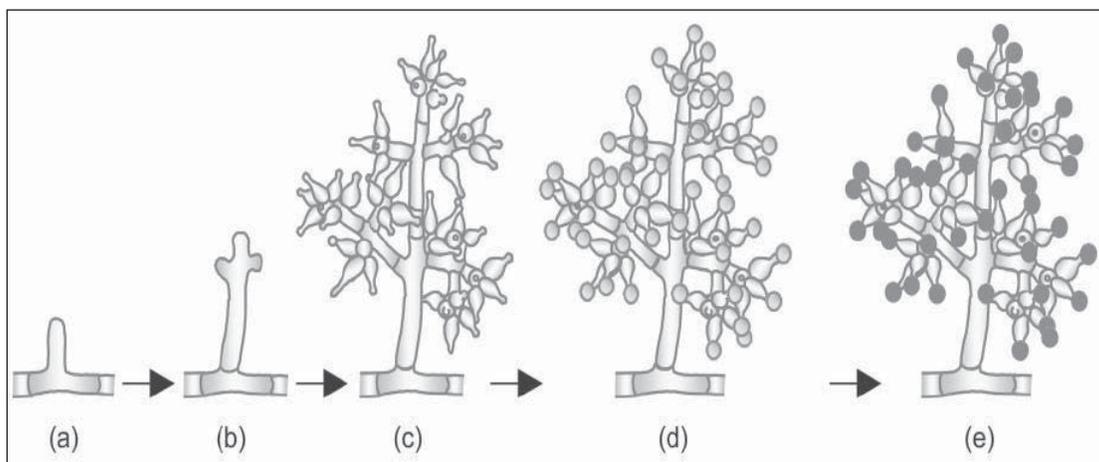


Figura 5. Cambios morfológicos observados durante la fotoconidiación de *Trichoderma*. Tomado de Steyaert y col., 2010.

Los genes *blr-1* y *blr-2* están presentes en una sola copia en el genoma de *T. atroviride* y son ortólogos a los factores de transcripción *wc-1* y *wc-2* bien caracterizados en el hongo ascomiceto *N. crassa* encargados de la regulación de la respuesta a la luz (Ballario y col., 1996; Linden y Macino, 1997; Froehlich y col., 2002; He y col., 2002; Cheng y col., 2003; Herrera-Estrella y Horwitz, 2007;). Como se revisó anteriormente ambas proteínas (BLR y WCC) presentan dominios PAS, la cual tienen un papel importante en la transducción de señales monitoreando la energía celular, interacciones

proteína-proteína y detectar señales ambientales (Taylor y Zhulin 1999; Casas-Flores y col., 2004; Möglich y col., 2009). Con la finalidad de entender el sistema de percepción de la luz y el proceso que implica la conidiación en *T. atroviride* se han enfocado a través del estudio de los genes *blr* (*blr-1* y *blr-2*), parece ser que las vías de percepción de la luz azul son dependiente e independientes del complejo BLR (Berrocal-Tito y col., 2000; Casas-Flores y col., 2006; Rocha-Ramírez y col., 2002; Schmoll y col., 2010). Mutantes nulas en los genes *blr-1* y *blr-2* no son capaces de conidiar en respuesta a la luz, presentan una morfología colonial idéntico a la cepa wt crecida en oscuridad (Casas-Flores y col., 2004). 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*. Se observó que la sobre-expresión de *blr-2* aumenta la fotosensibilidad incrementando la fotoconidiación, indicando que la expresión este gen es un factor limitante en la transducción de luz azul a través del complejo BLR. Caso contrario al sobre expresarse *blr-1*, la fotoconidiación disminuye. Estos resultados sugieren un delicado balance en los niveles de BLR-1/BLR-2 en *T. atroviride*. El pH del medio también tiene un efecto importante en la conidiación, el rango varia de acuerdo a cada especie que va de 4 a 6.8 de pH (Bastos y col., 2001; Steyaert y col., 2010b, c). En *T. virens* la acidificación intracelular ocurre cuando la hifa es expuesta a la luz (Gresík y col., 1991). El calcio extracelular también es considerado como un factor que induce la conidiación, descrito en *T. viride* posterior a las 48 h de incubación independientemente del estado nutricional y presencia de luz (Simkovic y col., 2008). Se ha descrito que la herida micelial también induce la conidiación en especies de *Trichoderma* (Casas-Flores y col., 2004; Steyaert y col., 2010b, c), descubierto durante la caracterización de cepas carentes de genes para la percepción de la luz azul en *T. atroviride*. Estudios recientes señalan que el nitrógeno y el pH ambiental tienen un efecto interactivo en la conidiación inducida por herida micelial posiblemente generando estrés oxidativo (Steyaert y col., 2010b, c). se ha demostrado que compuestos volátiles orgánicos en *Trichoderma* como el compuesto de 8 carbonos 1-octen-3-ol estimula la conidiación, además probablemente genera un sistema de señalización para sincronizar esta respuesta y estos mismo autores sugieren la presencia de receptores específicos sobre la membrana plasmática (Nemcovic y col., 2008; Stoppacher y col., 2010). El factor nutricional es considerado como un factor de estrés que induce la

formación de conidias en *Trichoderma* (Casas-Flores y col., 2006). *Trichoderma* conidia cuando el crecimiento ha cubierto completamente la caja Petri, debida posiblemente a la limitación de nutrientes. A través del estudio morfogenético con las mutantes *blr* de *T. atroviride*, se han obtenido evidencias de una posible relación entre la conidiación por limitación de nutrientes y la respuesta a la luz azul. Se ha observado que la limitación de carbono provoca la conidiación de *T. atroviride* en ausencia de luz, al evaluarse a las mutantes *blr-1* y *blr-2* en estas mismas condiciones, no generó ninguna respuesta, sugiriendo que las proteínas BLR-1 y BLR-2 tiene un papel independiente de luz y que son necesarios para sensor este azúcar ó bien que forme parte de la vía en inducir la conidiación (Casas-Flores y col., 2006; Friedl y col., 2008) (**Figura 6**). Con este resultado Casas-Flores y col., (2006) sugiere dos posibles funciones de las proteínas BLR, la primera es que puede unir ligandos diferentes y responder a la presencia o ausencia de fuentes de carbono, la segunda es que respondan al estado redox de la célula. Friedl y col., (2008), sugiere que esta función podría ser explicado empleando diferentes fuentes de carbono alterando el estado redox de las células (**Figura 6**). Cuando la limitación de nitrógeno fue evaluada bajo un fondo genético nulo para las proteínas BLR se pudo observar la formación de conidias y se ha descrito que la fotoconidiación también depende fuertemente de fuentes primarias de nitrógeno, evaluadas en *T. asperellum*, *T. atroviride* y *T. pleuroticola* (Casas-Flores y col., 2006; Steyaert y col., 2010c).

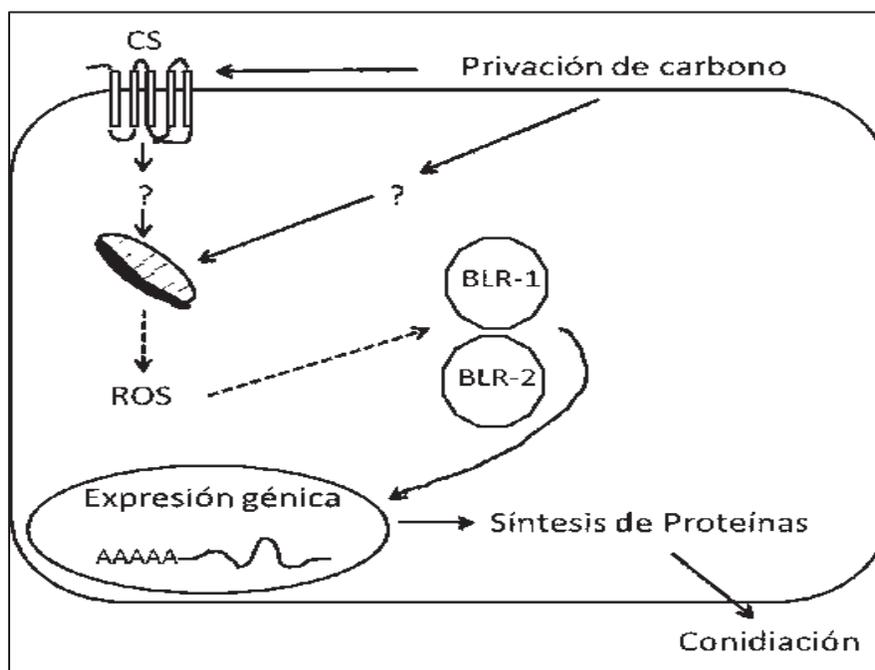


Figura 6. Modelo hipotético mostrando la función del complejo BLR en sensibilidad a carbono. La BLR-1 y/o BLR-2 podrían percibir o transmitir la señal originada de la falta de glucosa detectada por un sensor/receptor (CS) o debido a la falta de la capacidad reductiva en la célula, vía especies reactivas de oxígeno (ROS) originada de la mitocondria resultante en la inducción de la expresión génica. Líneas continuas indican pasos hipotéticos. Tomado de Casas-Flores y col., 2006.

Los organismos vivos responden a señales por medio de complejos reguladores a través de cascadas de señalización donde podrían estar implicados el AMP y las proteínas G, proteínas cinasas ó proteínas activadoras de mitógenos (MAPK). El AMPc es un segundo mensajero de vías de señalización en todos los organismos, incluyendo a *Trichoderma*. Se ha descrito en *T. viride* que los niveles de AMPc aumentan durante la fotoconidiación y esta respuesta es incrementada al aplicarse un inhibidor de degradación de AMPc (Sulova y Farkas, 1991; Gresík y col., 1988). La adición de un análogo del AMPc, ensayos realizados en *T. atroviride* y *T. viride*, induce la conidiación en presencia ó ausencia de luz (Gresík y col., 1988; Casas-Flores y col., 2006; Friedl y col., 2008), este efecto fue pronunciado al adicionarse glucosa solo en *T. viride* (Nemcovic y Farkas, 1998), al utilizarse diferentes fuentes de carbono solo algunas fuentes en presencia de AMPc inducen la conidiación y otras la reprimen (Friedl y col., 2008). Ensayos en cepas carentes del gen *tac1* que codifica una Adenilato ciclasa solo conidian en presencia de luz, lo cual sugiere que la conidiación depende del AMPc en ausencia de luz (Mukherjee y col., 2007). Al evaluarse las cepas $\Delta blr-1$ y $\Delta blr-2$ de *T. atroviride* que no conidian en presencia de luz

y privación de carbono, al crecer en presencia de AMPc, el fenotipo silvestre fue restaurado, sugiriendo la participación de AMPc en la respuesta a carbono asociado a BLR (Casas-Flores y col., 2006). En otros trabajos se observaron un incremento en la actividad de proteínas cinasas dependientes de AMPc (PKA) después de un pulso de luz azul. Esta activación ocurría aún en las cepas Δ BLR-1 y Δ BLR-2, confirmando la existencia de un sistema de percepción de luz que actúa a través de la vía del AMPc (Casas-Flores y col., 2006; Esquivel y col., 2007). Por otra parte existen reportes en *T. atroviride* de la participación de proteínas G, a través de la identificación de receptores acoplados a estas proteínas (Brunner y col., 2008). La pérdida del gen que codifica la subunidad α de la proteína G (*tga1*), *T. atroviride* presenta una mayor fotoconidiación, caso contrario al sobre expresarse este gen, este efecto se pierde (Rocha-Ramírez y col., 2002), mutaciones en ortólogos del gen *tga1* en *T. virens* no muestran diferencias de conidiación con la cepa silvestre (Mukherjee y col., 2004), en este mismo sentido al evaluarse a *T. reesie* no se observó efecto alguno sobre la conidiación (Seibel y col., 2009). En tanto las señalizaciones mediadas por las MAPK también podrían estar implicadas en la conidiación de *Trichoderma* ya que regula varias respuestas celulares (crecimiento, virulencia y proliferación) (Schaeffer y Weber, 1999; Xu, 2000). Se ha descrito en *T. virens* el papel de dos genes MAPK (*tmka* y *tvk1*), la delección del gen *tmkA* resulta un fenotipo de hiperconidiación en presencia o ausencia de luz, caso contrario con la delección del gen *tvk1*, donde la producción de conidias se reduce cuando crece en medio sólido así como la pigmentación característica en relación a la cepa silvestre, pero en cultivos líquidos la producción de conidias aumenta y correlaciona con el incremento de hidrofobinas, esto sugiere que *tvk1* regula positivamente (medio sólido) y negativamente (medio líquido) (Mendoza-Mendoza y col., 2003, 2007). Se ha descrito una proteína reguladora global de la morfogénesis y del metabolismo secundario en hongos filamentosos denominado VELVET (Calvo y col., 2008). Cepas nulas de este gen en *N. crassa*, *A. nidulans* y *Penicillium chrysogenum*, incrementa la formación de conidias en forma dependiente de la luz (Mooney y Yager, 1990; Calvo y col., 2004; Krappmann y col., 2005; Bayram y col., 2008; Hoff y col., 2010). En *T. virens* la delección del gen *vel1* que codifica una proteína homóloga a VELVET, pierde la capacidad de conidiación en medio sólido, en tanto en medio líquido incrementa la producción de clamidosporas, actuando como regulador

negativo para la formación de clamidosporas en cultivo sumergido (Mukherjee y Kenerley, 2010; Wiemann y col., 2010). Además de los carbohidratos como fuente de carbono y el nitrógeno, otro elemento primordial, que pudiese tener una participación importante en la inducción de la formación de conidias de *T. atroviride*, es el ión fosfato como fuente de fósforo (P).

1.7 El Fosfato y su importancia biológica

El Pi es un elemento importante para el crecimiento de todos los organismos, sus funciones biológicas básicas son: **a)** elemento estructural en ácidos nucleicos y fosfolípidos; **b)** activación de metabolitos intermediarios; **c)** componente en la cascada de transducción de señales, **d)** regulación de enzimas (Rausch y col., 2002). Sin embargo del 90 al 95% de Pi se encuentra en forma de fosfato insoluble en la naturaleza y por lo tanto no puede ser asimilado y utilizado por los organismos (Kang y col., 2002). Por tal razón la disponibilidad de este elemento para muchos organismos es un factor limitante, incluyendo a los hongos. Los sistemas biológicos tienen la capacidad de crecer y dividirse, para ello necesitan de nutrientes presentes en el medio, compuestos orgánicos e inorgánicos que son asimilados y transformados en elementos constituyentes de la célula. El Pi es uno de los elementos importantes en las diversas funciones biológicas celulares. Por ello su mecanismo de asimilación puede darse mediante dos sistemas de afinidad: **a)** Un sistema de baja afinidad que opera en altas concentraciones de Pi y se expresa de forma constitutiva, **b)** Un sistema de alta afinidad que actúa a bajas concentraciones de Pi. La expresión de genes es regulado mediante la concentración de Pi extracelular a partir del regulón PHO, constituido por promotores que se regulan por la disponibilidad de Pi en el medio de cultivo, por tal razón todos los genes de un regulón están sujetos a un sistema de dos componentes, constituido por una proteína sensora y una proteína activadora de la transcripción. En la actualidad existen reportes de organismos tales como *S. cerevisiae*, *E. coli* y *A. nidulans*, que expresan genes implicados en la asimilación y transporte de fosfato disponible en su entorno. Así también existen reportes que indican que *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 (T-22) tiene la capacidad de solubilizar y asimilar rocas de fosfato (Altomare y col., 1999). Rawat y col., (2011) reportan que varias especies de *Trichoderma* presentan crecimiento micelial abundante, apariencia granular homogénea, crecimiento

micelial suspendida al crecer en fuentes de P insolubles. El proceso de solubilización y el transporte intracelular de fosfato es fundamental, en este sentido los sistemas biológicos juegan un papel importante, ya que mediante la producción de enzimas pueden degradar compuestos de origen biológico que contienen fosfato, generando así altas concentraciones de Pi libre alrededor de las células.

1.8 Las proteínas BLR regulan la expresión de genes en *T. atroviride*

En *T. atroviride* el 2,8% de sus genes responden a la luz azul, donde el 2% se activan, denominados genes ***blu*** (**blu-light-upregulated**), mientras que el 0.8% restante se reprimen bajo esta condición y fueron llamados genes ***bld*** (**blu-light-downregulated**) identificados por el método de microarreglos. Se han encontrado que son aproximadamente treinta genes (***blu***) upregulated y diez genes (***bld***) downregulated (Rosales-Saavedra y col., 2006). Interesantemente muchos genes de respuesta a luz no son regulados por las proteínas BLR, ya que en mutantes de esta proteína (Δ BLR) siguen siendo inducidos algunos genes de respuesta a luz y se ha considerado que su regulación ocurre por un sistema de percepción alterno a las BLR. Se ha reportado que la mayoría de los genes responsivos a luz (***blu***) contienen LRE similares a los descritos en genes responsivos a luz de *N. crassa*, así como una secuencia consenso GATA en la región promotora de los genes que son dependientes de BLR. Esto sugiere una actividad más compleja de las proteínas BLR para controlar la actividad transcripcional en especies de *Trichoderma* (He y col., 2005; Rosales-Saavedra y col., 2006). A través del método de pirosecuenciación se lograron identificar 331 genes de respuesta temprana a luz y 70 genes fueron independientes de BLR, esto confirma la idea de la existencia de un sistema de percepción de luz alterna a las proteínas BLR. Muchos de estos genes inducidos por luz ya sean dependientes ó independientes de BLR incluyen genes que codifican factores de transcripción, enzimas de reparación de DNA, genes relacionados a la respuesta a estrés, tales como componentes de la cascada de la MAPk. Adicionalmente a las mutantes Δ BLR, se inició un análisis funcional masivo para identificar genes asociados a la regulación en la conidiación, a partir de mutantes que expresan en anti-sentido de un grupo de genes regulados por la luz (***Asblu***), y otras que sobre-expresión sólo de algunos de esos genes (***Seblu***). Algunas mutantes muestran fenotipos sutiles o ningún aparente defecto en la formación del anillo de conidiación. Esto

posiblemente que algunos genes sean indispensables para la fotoconidiación ó que niveles bajos de expresión de estos genes sean suficientes para sostener la formación del anillo de conidiación (Esquivel-Naranjo., 2007)

1.9 Genes asociados a la conidiación en *T. atroviride*

La fase asexual de hongos filamentosos involucra la transición de micelio a conidias sobre estructuras especializadas denominados conidióforos, evento determinado por varios factores ambientales. La fase asexual involucra la diferenciación de estructuras celulares tales como: hifa vegetativa, hifa aérea, conidióforo y conidias. En *N. crassa* al igual que en otros hongos filamentosos la conidiación está sujeta por un complejo de regulación (WCC). Por otra parte se ha identificado genes que están sujetas a fotoinducción por la luz azul durante la conidiación, denominados genes *con* (Lauter y Russo 1991; Lauter y Yanofsky 1993; Carattoli y col., 1995). La expresión de los genes *con* ha sido monitoreada durante el desarrollo conidial y fueron clasificados como genes tempranos o tardíos dependiendo del tiempo de su expresión. Entre los de expresión temprana tenemos al gen *con-3*, *con-4* y *con-5*, en tanto *con-10* y *con-13* son de etapa tardía por mencionar algunos (Berlin y Yanofsky 1985a, Bieszke y col., 2007). Otros genes como *nrc-2* implicadas en la conidiación, se encuentra dentro del grupo de las cinasas que codifica una cinasa serin/Treonina, que regula la entrada al proceso de conidiación.

En *A. nidulans* se han identificado genes tales como *brlA*, *abaA*, *wetA*, *dewA*, *roda* y *stuA* altamente regulados en cultivos en conidiación y algunos de estos genes son diferencialmente regulados en etapas tempranas del crecimiento (Boylan y col., 1987; Miller y col., 1992; Stringer y col., 1991, 1995; Breakspear y col., 2007). A través de estudios moleculares y gracias a la disponibilidad de genomas de tres especies de *Trichoderma* (*T. reesie*, *T. atroviride* y *T. virens*) se han sugerido un gran número de genes marcadores para la conidiación, pero no se ha confirmado como genes específicos de cada etapa de la conidiación. Entre los genes sugeridos encontramos al gen *cmp1* (conidial multidomain protein) (Baum y Horwitz, 1991; Puyesky y col., 1997), que se expresa a las 12 h, cuando las conidias empieza a aparecer con una máxima expresión a las 16-24 h, por lo que se sugiere que la expresión de este gen está asociada a conidióforos y conidias. El gen *spo14* (codifica una fosfolipasa D), *spo75* (proteína específica de meiosis), *stuI*

(codifica una proteína asociada a la formación de la pared celular), *wet1* (proteína reguladora del desarrollo) y genes de hidrofobina *srh1* (*hfb2*) (Mikus y col., 2009; Muñoz y col., 1997; Seidl y col., 2009). Por lo tanto a partir de genes ortólogos descritos en otros hongos filamentosos tal es el caso de *N. crassa* podrían identificarse genes que son expresados durante la reproducción asexual de *Trichoderma*.

II. JUSTIFICACIÓN

Existen evidencias que establecen una conexión entre los sistemas de percepción de estímulos físicos (luz) y químicos (limitación de la fuente de C y N) que conducen al desarrollo asexual del hongo *T. atroviride*. Sin embargo, el ión fosfato como factor nutricional no ha sido relacionado con los sistemas conocidos.

III. HIPÓTESIS

La reproducción asexual de *T. atroviride* está controlada por sistemas de percepción de estímulos luminoso y nutricional (limitación de Pi) a través de elementos compartidos.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la conexión entre las vías de percepción de un estímulo por limitación del ión fosfato y luz en el desarrollo asexual de *T. atroviride*.

4.2 Objetivos específicos

- A. Evaluar la influencia del ión fosfato sobre el programa de desarrollo asexual de *T. atroviride* y mutantes *blr*
- B. Analizar la expresión de genes de conidiación en mutantes ciegas a luz (Δ blr-1 y Δ blr-2) sometidas a un estrés nutricional por Pi.
- C. Establecer la relación entre el complejo BLR que conlleva al proceso de conidiación y los elementos de respuesta a la limitación de Pi.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismos

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron las cepas del hongo ascomiceto *T. atroviride* que se enlistan a continuación (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *Trichoderma atroviride*

| CLAVE DE IDENTIFICACIÓN | GENOTIPO |
|-------------------------|----------------------------------|
| <i>IMI 206040</i> | Silvestre (wt) |
| <i>blr-1</i> | $\Delta\text{blr-1}::\text{hph}$ |
| <i>blr-2</i> | $\Delta\text{blr-2}::\text{hph}$ |

5.2 Medios y Condiciones de Cultivo

5.2.1 Medio Vogel's

El Medio Vogel's se prepara como una solución stock 50X según un protocolo estándar (Vogel, 1956), brevemente: en 750ml de agua destilada, se disuelve sucesivamente cada uno de los elementos enlistados en la Tabla 2 y finalmente se afora a 1L. A esta solución stock se le adicionan 2 ml de cloroformo para conservarla. El medio fue utilizado a una concentración final 1X y las fuentes de P, C y N se adicionaron a partir de las soluciones stock. Se utilizó KH_2PO_4 136.09g/L, (MERCK) como fuente de fosfato inorgánico (stock 1M); Dextrosa 180.16g/L, (BD Bioxon) como fuente de C (stock 1M) y NH_4Cl 53.49g/L (J.T. Baker) como fuente de N (stock 2M).

Tabla 2. Componentes del Medio Vogel's, para una concentración de 50X

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

El Medio Mínimo Vogel's (MMV) utilizado se preparó para 1L de medio agregando 20 ml de la solución 50X, agar bacteriológico (BD Bioxon) y agua destilada, de acuerdo a las especificaciones de la Tabla 3. Las fuentes de C, N y P como Dextrosa, NH₄Cl, y KH₂PO₄ respectivamente se agregaron al medio después de esterilizado. Los medios se esterilizaron a 115-120 °C durante 15-20 minutos.

Tabla 3. Composición del Medio Mínimo Vogel's con diferentes concentraciones de Pi

| Solución/ concentración de P | 36.7 mM | 1.8 mM | 0.9mM | 0.45mM | 0.1mM |
|---------------------------------|----------|---------|----------|---------|---------|
| Vogel S/P Stock | 20 ml | 20ml | 20ml | 20ml | 20ml |
| Stock P | 36.7ml | 1.8 ml | 0.9 mlml | 0.45 ml | 0.1ml |
| Stock dextrosa | 100 ml | 100 ml | 100 ml | 100 ml | 100 ml |
| NH ₄ Cl | 25ml | 25 ml | 25 ml | 25 ml | 25 ml |
| Agar | 15 g | 15 g | 15 g | 15 g | 15g |
| Agua destilada | 818.3 ml | 853.2ml | 818.3 ml | 853.2ml | 854.9ml |

Cantidades necesarias para preparar 1L de MMV

5.2.2 Cultivo y propagación de las cepas

Para todos los ensayos se prepararon preinóculos de las diferentes cepas de *T. atroviride* (Tabla 1) colocando un bloque de micelio de cada cepa en medio PDA, incubándolas en oscuridad por un periodo de 48 h a 28 °C. Bloques circulares de micelio de estos preinóculos se transfirieron al centro de las cajas de Petri que contenían el MMV con las diferentes concentraciones de Pi (Tabla 3), con o sin papel celofán dependiendo del ensayo a realizar (cuantificación de conidias, producción de biomasa, extracción de RNA).

La manipulación de las cepas se realizó con luz roja de seguridad utilizando un filtro LEE # 183. Los cultivos se incubaron a 28°C en condiciones de oscuridad por 48 h.

5.2.3 Ensayos de Foto inducción

Colonias de *Trichoderma* con 48 h de crecimiento en oscuridad fueron expuestas a un pulso de luz blanca con una duración de 15 min, proveniente de un dispositivo que contiene dos lámparas fluorescentes de luz blanca fría. Para los ensayos de expresión génica, los micelios se colectaron a los tiempos 6, 12, 18 y 24 h, incluyendo un control en

oscuridad. Para los ensayos de conidiación los cultivos se incubaron a 28°C por 36 h posterior al pulso de luz.

5.2.4 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

La extracción de RNA total se llevó a cabo utilizando el método del Trizol® a partir del micelio de las cepas de *T. atroviride* fotoinducidas. Para eliminar el DNA genómico, 3µg de RNA total se trató con 2 U de DNasa I (Ambion) durante 30 min a 37°C. La DNasa I se inactivó con EDTA 25mM a 72°C por 5 min. Tres microgramos de RNA total fueron empleados para sintetizar el cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa SuperScript™ II (invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

5.2.5 Análisis de la expresión de los genes de conidiación por PCR punto final

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl de acuerdo a la Tabla 4. El programa utilizado para la amplificación consistió en: 1 ciclo 94°C/5min, 30 ciclos 94 °C /30s, 60 °C /30s, 72 °C /30s, 1 ciclo 72 °C /7min. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes de interés (asociados a conidiación) se en listan en la Tabla 5. Los genes seleccionados fueron identificados por análisis tipo BLAST utilizando el genoma de *T. atroviride* (<http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html>) y como referencia las secuencias de los correspondientes genes ortólogos descritos para *Neurospora crassa* y *Fusarium oxysporum*.

Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR

| Reactivo | Concentración |
|-------------------|---------------|
| Buffer 10X | 2.5µl |
| MgCl ₂ | 1.5µl |
| dNTPs | 0.5µl |
| Oligo reverse | 0.5µl |
| Oligo Forward | 0.5µl |
| DNA polimerasa | 0.3µl |
| cDNA | X µl |
| Agua | hasta 25 µl |

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de conidiación

| Nombre del primer | Secuencia (5'-3') | Gene amplificado | Número de acceso (Proteína ID) ^a |
|--|--|------------------|---|
| CON1-SC-F CON1-SC-R | 5'CGCCGGCGTACTCTGCTCCTTC3' 5'GGTGGTGGCCTTTGTGACGGGTGTA3' | <i>con-1</i> | 32173 |
| CON10-SC-F CON10-SC-R | 5' GACAACCCCGGCAATTCGCTAAC 3' 5' CTCACTGCCGGGTTCAAAAGAT 3' | <i>con-10</i> | 45149 |
| CON13-SC-F CON13-SC-R | 5' CAGTTCGCATGCGCTCTTACACA 3' 5' GTCGTGGAACCGGTTAGCACAA 3' | <i>con-13</i> | 54932 |
| NRC2-SC-F NRC2-SC-R | 5' GTTTTACGCCGCTGAAGTTACG 3' 5' GAATGTCCTCGCGCAAGATGTT 3' | <i>nrc-2</i> | 152649 |
| OTFC-SC-F OTFC-SC-R | 5'GCCAAGCCCAGTACGTCCGATTTC 3' 5' CGGGATTTCGCGCTAGGATGATACA 3' | <i>otfc</i> | 151848 |
| PP1-SC-F PP1-SC-R | 5' CCCCCTGAGGCCAACTACC 3' 5' ACGTCGGGACCAAATGTGAAG 3' | <i>pp-1</i> | 145607 |

^a <http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html>

5.2.6 Determinación del crecimiento a partir de la formación de biomasa

La determinación de la biomasa se llevó a cabo por el método de peso seco. El micelio de las colonias de *T. atroviride* crecidas sobre papel celofán en MMV se colectó cada 24 h de hasta completar 96 h y se secó en un papel filtro hasta peso constante. El peso seco de la biomasa expresado en mg se obtuvo por diferencia.

5.2.7 Cuantificación de conidias

La cuantificación del número de conidias totales, se llevó a cabo a los 36 h después del pulso de luz. Para cosechar las conidias se agregó a cada colonia 5 ml de agua destilada estéril y se procedió a raspar suavemente el micelio con ayuda de una espátula estéril. Esta suspensión se filtró a través de gasa estéril permitiendo separar conidias de micelio. La cuantificación se llevó a cabo en una cámara de Neubauer contando las conidias contenidas en 5 de los 25 cuadrangulares (esquinas y centro). La concentración final se calculó utilizando la siguiente formula: (No. Conidias) (10) (5) (10000) = No. Total de conidias/ml.

VI. RESULTADOS

6.1 La limitación de Pi disminuye el crecimiento micelial en *T. atroviride*

Con la finalidad de evaluar la respuesta de *T. atroviride* a la limitación de Pi, se determinó la concentración limitante a través de la medida del crecimiento micelial utilizando dos concentraciones de Pi menores a la considerada como estándar reportada para el Medio Mínimo Vogel's (MMV) (Vogel, 1956).

El crecimiento de la cepa wt en MMV con 1.8mM de Pi (20 veces menos con respecto a la condición estándar) medido como producción de biomasa, fue similar (147.46 mg) a la producida en la condición estándar (36.7mM), sin importar la presencia o ausencia de luz (**Figura 7A y 7B**). Al evaluar el crecimiento de las mutantes *blr* ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$) en estas mismas condiciones de Pi (1.8mM), se observó que la biomasa producida a las 96 h fue de 156 mg similar a la producida en la condición control para ambas mutantes *blr*. Este resultado fue independiente de la presencia de luz, (**Figura 7C, 7D, 7E, 7F**). Cuando se evaluó el crecimiento a una concentración de 0.1mM de Pi (40 veces menos respecto a la estándar), *T. atroviride* wt generó 26.79 mg de biomasa, que representa un 17% respecto al valor obtenido con 36.7mM de Pi. Una cantidad similar (160.2 mg) fue obtenida en ausencia de luz (**Figura 7A y 7B**). Para las mutantes *blr* ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$), en esta misma condición de Pi, se observó una reducción en la producción de biomasa en un 86% (7 veces menor) en presencia de luz (**Figura 7D y 7F**), mientras que en oscuridad, la biomasa producida fue 6 veces menor (**Figura C y 7E**), comparado con la concentración de referencia. Con los datos de biomasa expresados como peso seco permitió determinar que la concentración 0.1mM de Pi es la condición limitante para el desarrollo colonial de la cepa wt y para las mutantes *blr* ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$) por la disminución notable en la producción de biomasa representando en promedio un 80% respecto al valor estándar (**Figura 7C-7F**).

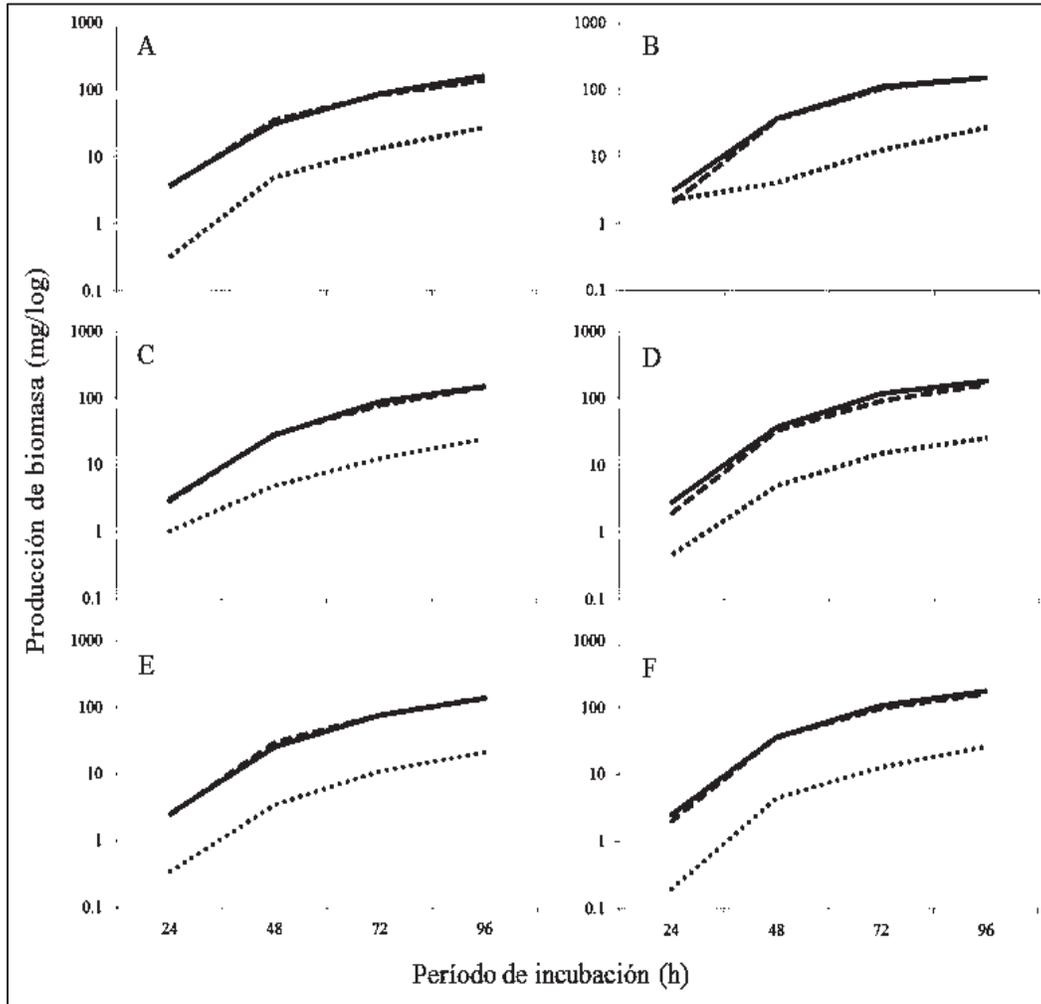


Figura 7. Efecto de la limitación de Pi en la producción de biomasa en *T. atroviride*. Las cepas WT (A, B) y mutantes $\Delta blr-1$ (C, D) y $\Delta blr-2$ (E, F), fueron crecidas en MMV con diferentes concentraciones de Pi (0.1, 1.8 y 36.7 mM) por 24, 48, 72 y 96 h a 28 °C en presencia de luz (B, D, F) o en oscuridad (A, C, E). La cantidad de biomasa se expresa en mg de micelio producido en los diferentes tiempos y concentraciones de Pi. Las líneas con punto redondo (0.1mM), líneas con punto cuadrado (1.8mM) representan la biomasa producida en condiciones limitadas de Pi respectivamente y las líneas sólidas representan la biomasa generada en la condición control (36.7mM Pi).

6.2 La limitación de Pi en combinación con la luz inducen cambios morfológicos en *T. atroviride*

El proceso de conidiación en hongos filamentosos puede ser estimulado por varios factores que propician un ambiente estrés (daño mecánico, pH, pulso de luz y el estrés nutricional). Con la finalidad de evaluar la respuesta de *T. atroviride* a la limitación de Pi en la inducción del anillo de conidiación, se evaluaron varias concentraciones de Pi (Tabla 3). La colonia de la cepa wt crecida en la condición estándar (36.7mM) y 1.8 mM de Pi, se

observó la inducción del anillo de conidiación solamente acompañado de un pulso de luz (**Figura 8D**). En contraste, bajo una condición de oscuridad el crecimiento es exclusivamente micelial (**Figura 8A**), como ha sido reportado en trabajos previos (Casas-Flores y col., 2004).

Al evaluar el crecimiento colonial de las mutantes *blr* en las mismas condiciones de Pi, éstas no presentaron la formación del anillo de conidiación en presencia o ausencia del estímulo luminoso (**Figura 8B, 8C, 8E, 8F**). Al evaluar el efecto de las concentraciones 0.9 mM y 0.45 mM de Pi en presencia de luz para la cepa wt, se observó la presencia de un anillo de conidiación bien definido y con la pigmentación verde que caracteriza al proceso de conidiación, claramente diferenciado del anillo formado en la condición estándar, en presencia de un pulso de luz (**Figura 8D**). Este anillo no fue evidente en condiciones de oscuridad para ambas concentraciones de Pi (**Figura 8A**). En tanto en las mutantes *blr* no se observaron efectos aparentes en la inducción del anillo de conidias, presentando abundante micelio en luz y oscuridad (**Figura 8B, 8C, 8E, 8F**). En la concentración 0.1 mM de Pi la cepa wt más un pulso de luz indujo la formación del anillo de conidiación con ligera disminución de la pigmentación verde característica de este proceso (**Figura 8D**), mientras que en oscuridad no se observó evidencia alguna de la formación del anillo de conidias (**Figura 8A**). Al exponer a las mutantes *blr* a condiciones limitadas de Pi (0.1 mM), no se observó la formación del anillo de conidiación en presencia o ausencia de luz (**Figura 8B, 8C, 8E, 8F**). Estos resultados confirman la participación y la importancia de las proteínas BLR en la percepción luminosa y detectar otros tipos de estrés tales como la limitación nutricional en *T. atroviride*.

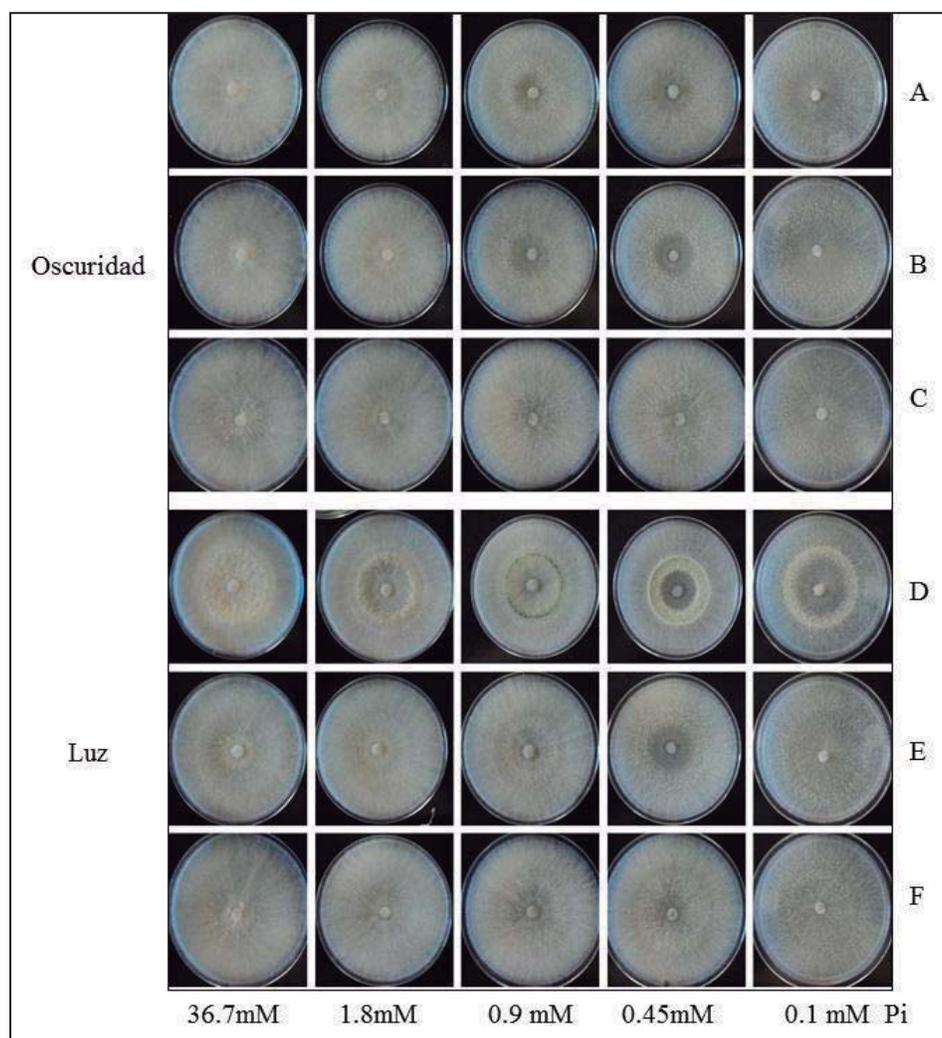


Figura 8. Morfología colonial de *T. atroviride* bajo condiciones limitadas de Pi. A, B, C, D, F) Fotografías de las colonias generadas de las cepas wt (A, D), mutante *blr-1* (B, E) y mutante *blr-2* (C, F), crecidas en MMV a diferentes concentraciones limitadas de Pi (1.8, 0.9, 0.45 y 0.1 mM) en condiciones de oscuridad ó después de un pulso de luz. La concentración 36.7 mM de Pi fue utilizada como control. Los cultivos se incubaron por 5 días a 28°C.

6.3 La limitación de Pi induce la formación de conidióforos en *T. atroviride*

Una vez evaluado el efecto de la limitación de Pi y la aplicación de un pulso de luz en la formación del anillo de conidiación de las cepas de *Trichoderma*, se indagó la formación de estructuras especializadas en la producción de conidias (**Figura 9A**) (conidióforos) y se realizó un análisis a nivel microscópico del micelio en las cepas wt y mutantes *blr* ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$) (**Figura 8**). Para la cepa wt se observó que bajo la condición control de Pi y en presencia de luz hubo la formación de conidióforos, por el contrario cuando creció en oscuridad solo se observó la formación hifas hialinas septadas típicas del género (**Figura 9**).

Las mutantes *blr* ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$) en esta misma condición de Pi, no presentaron formación de conidióforos, ya fuera aplicando un pulso de luz o en oscuridad, similar a la cepa wt cuando creció en oscuridad (**Figura 9**). Al evaluar las concentraciones limitadas de Pi (**Figura 9**), la cepa wt presentó formación de conidióforos cuando recibió un pulso de luz blanca, mientras que en condiciones de oscuridad se observó la presencia de estas estructuras, aunque en menor número (**Figura 9B**). Al evaluar las mutantes ciegas a la luz en estas mismas condiciones, se logró identificar la formación de conidióforos en las concentraciones limitantes de Pi excepto para la condición 1.8 mM de Pi, independientemente de luz (**Figura 9B**).

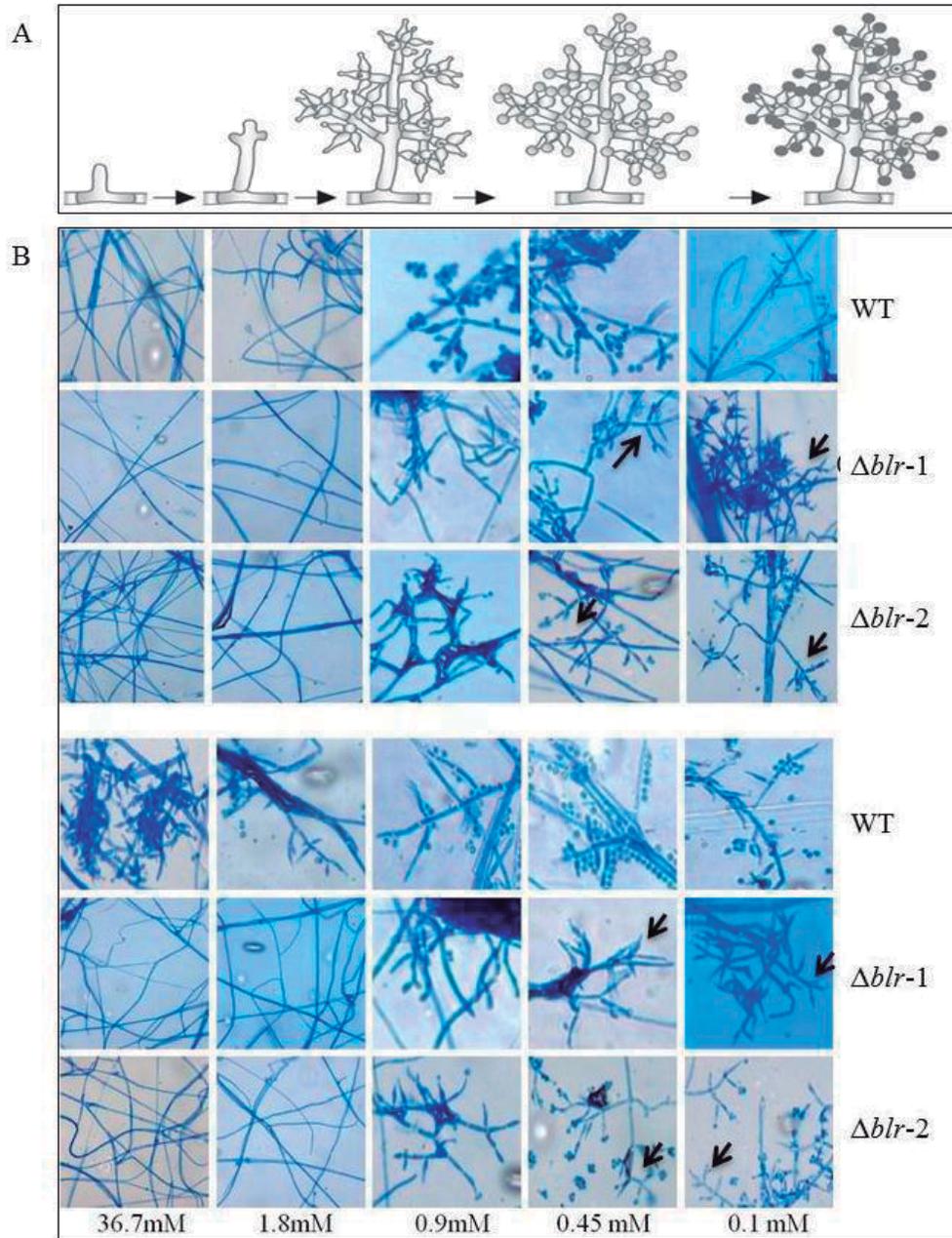


Figura 9. Análisis microscópico de la formación de conidióforos por limitación de Pi en *T. atroviride*. A) Transición de micelio a conidias observados durante la fotoconidiación de *Trichoderma*, Tomado de Steyaert y col., 2010. B) Microfotografías de conidióforos formados en cepas wt y mutantes *blr* crecidas en MMV con diferentes concentraciones de Pi (1.8, 0.9, 0.45 y 0.1mM) en condiciones de oscuridad (parte superior) ó después de un pulso de luz (parte inferior). Las flechas indican la presencia de conidióforos en mutantes *blr* solo en condiciones limitadas de Pi (0.9, 0.45, y 0.1mM). La concentración 36.7 mM de Pi fue incluida como control.

6.4 La limitación de Pi y la luz actúan sinérgicamente en la formación de conidias en *T. atroviride*

Con la finalidad de establecer una comparación más fina sobre el efecto de la concentración de Pi y la aplicación de un pulso de luz sobre el desarrollo asexual de *T. atroviride*, se cuantificaron las conidias producidas de cada una de las condiciones establecidas. En la condición control la cepa wt presentó formación de $6.75E+05$ conidias posterior al pulso de luz, caso contrario en oscuridad, donde no hubo formación de conidias (**Figura 10A**). En las condiciones 1.8mM de Pi el número de conidias generadas por la cepa wt, fue de $1.38E+06$ conidias, 2 veces mayor en relación al número de conidias producidas en la condición control en presencia de luz, en tanto en oscuridad las conidias producidas fueron casi nulas ($1.25E+04$ conidias) (**Figura 10A**). Las mutantes *blr* ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$) al ser expuestas a esta condición de Pi, la formación de conidias fue ($2.50E+04$ conidias) casi nula independientemente de la presencia o ausencia de luz (**Figura 10B y 10C**). En 0.9mM de Pi en el medio, la cepa wt formó mayor cantidad de conidias ($4.16E+06$ conidias), 4 veces mayor en relación a la condición control en presencia de luz, mientras tanto en oscuridad el número de conidias fue menor ($7.50E+04$ conidias) (**Figura 10A**). En las mutantes *blr* ($\Delta blr-1$ ($6.25E+04$ conidias), $\Delta blr-2$ ($8.75E+04$ conidias) esta condición de Pi, incrementó ligeramente el número de conidias (2 veces mayor) en relación a la condición control de estas cepas en presencia de luz. En oscuridad el número de conidias fue similar para ambas cepas (**Figura 10B y 10C**). En las condiciones 0.45 y 0.1 mM de Pi el número de conidias fue 3 y 4 veces menor respectivamente, en relación a la condición control para la cepa wt (**Figura 10A**). En oscuridad y en las condiciones control de Pi, el número de conidias producidas por la cepa wt incrementó ligeramente conforme se fue disminuyendo la disponibilidad de Pi, siendo mayor en la condición 0.1mM (**Figura 10A**). Al evaluar a la cepa $\Delta blr-1$ en estas dos condiciones (0.45 y 0.1 mM Pi), el número de conidias incrementa en función de la limitación de Pi siendo mayor en 0.1mM Pi, comparada con la condición control y la de 1.8mM Pi (**Figura 10B**), donde la formación de conidias fue casi nula, sin importar la presencia o ausencia de luz. Bajo estas mismas dos condiciones de Pi (0.45 y 0.1 mM Pi) la mutante $\Delta blr-2$, incrementó el número de conidias ligeramente teniendo una mínima diferencia entre las mutantes comparadas con la condición control donde la producción de conidias fue nula (**Figura 10C**). Aun cuando en

esta condición hubo un ligero incremento en la producción por la presencia de luz, en oscuridad el comportamiento de la mutante $\Delta blr-2$ fue similar (**Figura 10C**). Al realizar la comparación del número de conidias producidas en ambas condiciones (luz y oscuridad), se observó que en presencia de luz hubo ligeramente mayor cantidad que en oscuridad para las mutantes *blr* ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$) (**Figura 10B y 10C**). La comparación entre ambas mutantes *blr* ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$) el número de conidias producidas fueron similares, pero es inferior al número de conidias producidas por la cepa wt tanto en presencia o ausencia de luz (**Figura 10A y 10B, 10C**).

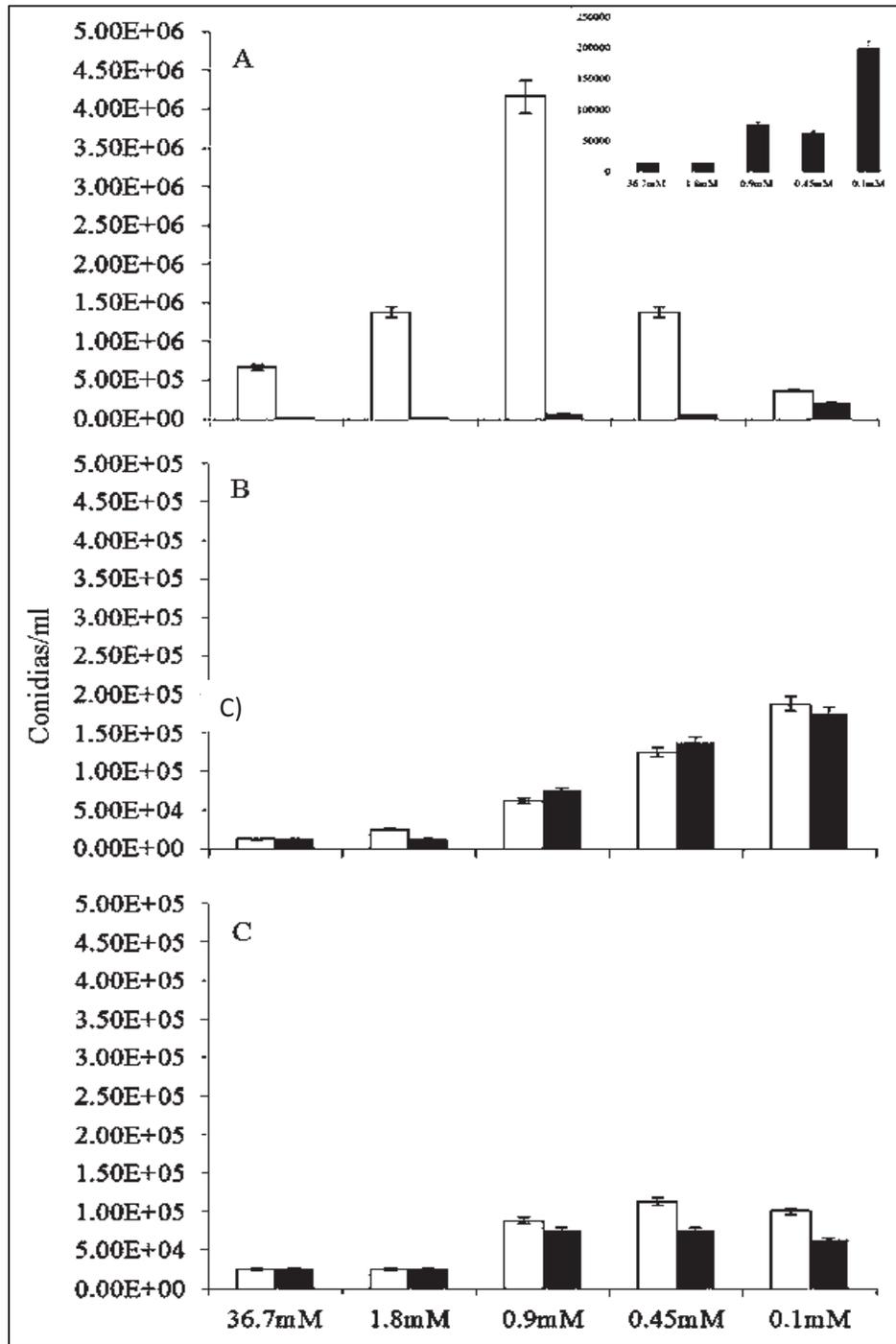


Figura 10. Producción de conidias en *T. atroviride* bajo diferentes concentraciones de Pi. Las distintas cepas, A) WT, B) $\Delta blr-1$, C) $\Delta blr-2$. Fueron crecidas en MMV con diferentes concentraciones de Pi (36.7, 1.8, 0.9, 0.45 y 0.1 mM). Las barras blancas representan la cantidad de conidias en presencia de luz y las barras negras en oscuridad. La concentración 36.7mM fue incluida como control. El recuadro en la parte superior derecha indica las conidias producidas en oscuridad de la cepa WT, para una mejor comparación con las mutantes blr.

6.5 La limitación de Pi y la luz inducen la expresión de genes de conidiación en *T. atroviride*

En hongos ascomicetos filamentosos se han identificado varios genes asociados al proceso de conidiación determinado por la interacción de varios factores ambientales. Con el fin de determinar el nivel de expresión de estos genes, previamente asociados a la conidiación, bajo condiciones de limitación de Pi en *T. atroviride* se llevaron a cabo ensayos de fotoinducción en MMV con diferentes concentraciones de Pi (**ver materiales y métodos**) utilizando a la cepa silvestre IMI y las mutantes $\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$. Los genes seleccionados fueron, *con-10* y *con-13* genes específicos de conidiación, *nrc-2* codifica una cinasa serin/Treonina y *pp-1* codifica una fosfatasa en *N. crassa*. El gen *otfc* codifica un factor de transcripción involucrado en conidiación en *Fusarium oxysporum*. *Con-1* es el único gen específico de conidiación identificado en *T. atroviride*.

La expresión del gen *con-1*, no se observó en la cepa wt en condiciones controles de Pi (36.7mM) en oscuridad, pero después de un pulso de luz se logró detectar el transcrito a las 12 h, hasta alcanzar la máxima expresión a las 24 h (**Figura 11**). Al evaluar la expresión de este gen en la mutante *blr-1* no se detectó su expresión aun después del pulso de luz (**Figura 11**). En la condición 0.9 mM de Pi, la expresión de este gen se observó incluso en oscuridad y después del pulso de luz el nivel de expresión del gen *con-1* incrementó de forma gradual hasta alcanzar máxima expresión a las 24 h en la cepa wt (**Figura 11**). En la mutante *blr-1*, en esta misma condición de Pi, no se detectó el transcrito en oscuridad, ni después del pulso de luz (**Figura 11**). En la condición limitante 0.1mM de Pi, la expresión de *con-1* en la cepa wt tuvo el mismo comportamiento que en la concentración 0.9 mM de Pi, pero con un nivel de expresión menor (**Figura 11**). Al evaluar la expresión del gen *con-1* en la mutante *blr-1* en esta condición limitante de Pi, no se detectó el transcrito ni en oscuridad, ni después del pulso de luz (**Figura 11**). Para el gen *con-10*, se observaron dos transcritos en la cepa wt en condiciones controles de Pi (36.7mM). El transcrito de menor tamaño se observó en oscuridad, mientras que el transcrito de mayor tamaño fue ausente en esta misma condición. Después de un pulso de luz el transcrito de mayor tamaño se identificó a las 12 h, después de este tiempo el transcrito no fue detectado. El transcrito de menor tamaño incrementó gradualmente con un nivel de expresión máximo a las 18 h, después de este tiempo, el nivel de transcrito disminuyó ligeramente (**Figura 11**). En la

mutante *blr-1* la expresión de *con-10*, se observó en oscuridad, y al recibir el pulso de luz incrementó paulatinamente en función del tiempo alcanzando una máxima expresión a las 24 h en la condición control de Pi (**Figura 11**).

En la concentración 0.9mM de Pi la expresión del transcrito de mayor tamaño de *con-10* se observó en oscuridad, y al recibir el pulso de luz, la cantidad de transcrito incrementó ligeramente, alcanzando su máximo a las 18 h. Para el transcrito de menor tamaño en la cepa wt, se detectó en oscuridad y después del pulso de luz su expresión alcanzó un máximo a las 12 h (**Figura 11**). En esta misma condición de Pi, la expresión de *con-10* en la mutante *blr-1*, fue observada en oscuridad y su nivel de expresión aumentó transitoriamente después del pulso de luz alcanzando su máximo a las 18 h, posterior a este tiempo ya no se detectó (**Figura 11**). La expresión de ambos transcritos de *con-10* en la cepa wt, en la condición de 0.1mM Pi se observaron en oscuridad en niveles basales y después del pulso de luz el nivel de expresión para ambos transcritos aumentó gradualmente hasta las 24 h (**Figura 11**). En esta misma condición de Pi (0.1mM) la expresión de *con-10* en la mutante *blr-1*, disminuye ligeramente, pero fue observada en oscuridad y su nivel de expresión aumentó gradualmente alcanzando su máximo a las 18 h (**Figura 11**). La expresión del gen *con-13* en la cepa wt en la condición control (36.7mM) de Pi, no fue detectado en oscuridad, incluso después de aplicar el pulso de luz (**Figura 11**). Al evaluar la expresión del gen *con-13* en la cepa Δ *blr-1* en condiciones control de Pi (36.7mM) mostró una expresión basal en oscuridad, y posterior al pulso de luz la cantidad de transcrito aumentó transitoriamente hasta las 24 h (**Figura 11**).

En las concentraciones de 0.9mM de Pi en la cepa wt no se detectó la expresión de *con-13* en ausencia o presencia de luz (**Figura 11**). En tanto en la cepa Δ *blr-1* en esta misma condición de Pi (0.9 mM), el gen *con-13* fue observada en oscuridad y posterior al pulso de luz presentó mayor expresión a las 12h, y a las 18 h la cantidad de transcrito disminuyó (**Figura 11**). En la condición 0.1mM de Pi la expresión de *con-13* no se detectó en ninguna condición en la cepa wt (**Figura 11**). En tanto en la mutante *blr-1* en condiciones de 0.1 mM de Pi la expresión de este gen se observó incluso en oscuridad, y con una máxima expresión a las 18h posterior al pulso de luz (**Figura 11**). Para el gen *nrc-2* en la condición control de Pi (36.7mM), no fue observada en oscuridad, pero después del pulso se detectó a las 18 h, presentando máxima expresión a las 24 h en la cepa wt (**Figura**

11). Al evaluarse en la mutante *blr-1*, la expresión del gen *nrc-2* en la condición control de Pi (36.7mM Pi) fue detectada en oscuridad en nivel basal, en tanto el nivel de expresión incrementó gradualmente posterior al pulso de luz, hasta las 24h, (**Figura 11**). En la concentración 0.9 mM de Pi en la cepa wt se observó una ligera expresión del gen *nrc-2* en oscuridad, en tanto después del pulso de luz el transcrito incrementó a las 12h, y posteriormente disminuyó a las 18 h (**Figura 11**). En esta misma condición de Pi la expresión del gen *nrc-2* fue detectada en oscuridad en niveles basales en la mutante *blr-1*, después del pulso de luz la cantidad de transcrito aumentó gradualmente alcanzando expresión máxima a las 24 h (**Figura 11**). En la condición 0.1mM de Pi el gen *nrc-2* no se expresó en oscuridad, pero a las 12 h posterior al pulso de luz presentó su mayor nivel de expresión, a las 18 y 24 h no se observó transcrito del gen en la cepa wt (**Figura 11**). En tanto la expresión de *nrc-2* en la mutante *blr-1* en esta condición de Pi (0.1mM), fue detectada en oscuridad en niveles basales, en tanto se vió favorecida por el pulso de luz, con nivel de expresión máximo a las 18h, disminuyendo a tiempos más largos (**Figura 11**). Los genes *otfc* y *pp-1* no presentaron un cambio notorio en su nivel de expresión, para todos los tiempos y concentraciones empleadas, así como en oscuridad ó en presencia de luz en la cepa wt (**Figura 11**). En la mutante *blr-1*, los genes *otfc* y *pp1* fueron observados en oscuridad y después del pulso de luz, sin cambios notorios en los niveles de transcrito en todos los tiempos empleados, así como las concentraciones limitantes de Pi empleadas (**Figura 11**).

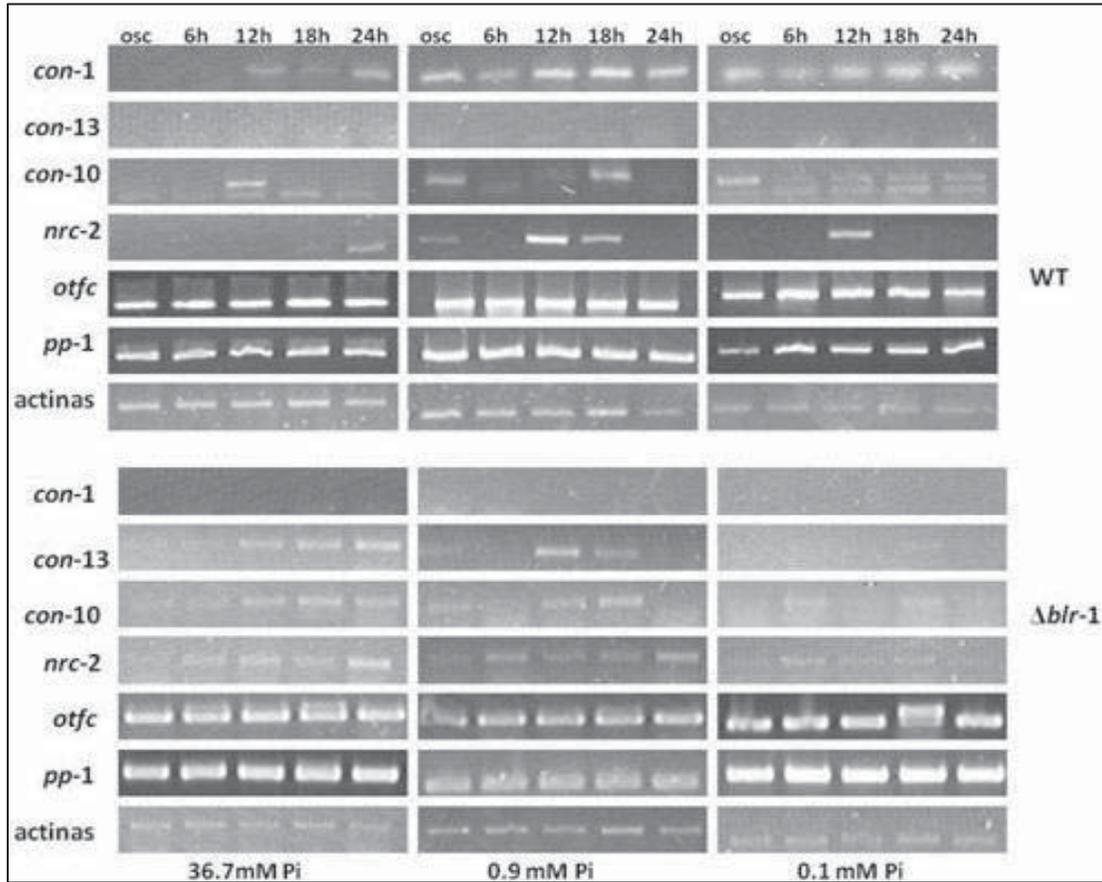


Figura 11. Expresión de genes de conidiación en *T. atroviride* bajo limitación de Pi. Las diferentes cepas (WT, $\Delta blr-1$ y $\Delta blr-2$) fueron crecidas en la oscuridad en las diferentes concentraciones de Pi (A) 36.7mM, B) 0.9mM y C) 0.1mM). Posteriormente se aplicó un pulso de luz blanca y el micelio fue colectado en los tiempos indicados el análisis de expresión de los genes *con-1*, *con-10*, *con-13*, *nrc-2*, *otfc* y *pp-1* mediante RT-PCR. El gen de actina fue utilizado como control de carga.

VII. DISCUSIÓN

En *Trichoderma atroviride* se ha logrado identificar genes denominados *blr-1* y *blr-2* (**blue light regulator**) que regulan todas las respuestas activadas por la luz azul, formando un anillo de conidiación en el perímetro de la colonia, al momento de ser expuesta a este estímulo (Casas-Flores y col., 2004; Castellanos y col., 2010). Cepas nulas en los genes *blr*, no son capaces de fotoconidiar, presentando solamente crecimiento micelial rápido y abundante (Casas-Flores y col., 2004; Castellanos y col., 2010). Los genes *blr-1* y *blr-2* en *T. atroviride* tienen un papel muy importante en la fotoconidiación y en la esporulación por limitación de carbono, sin embargo, no parece tener un papel importante en la esporulación cuando se limita nitrógeno en el medio (Casas-Flores y col., 2004). Estas evidencias sugieren una comunicación cruzada entre la esporulación por limitación de carbono y la respuesta a la luz azul.

La plasticidad genética de los microorganismos juega un papel importante para su sobrevivencia ante cambios nutricionales en el medio donde crecen. En respuesta a la limitación de Pi los microorganismos modulan su metabolismo, fisiología, a través de una compleja red de señalización, siendo un elemento limitante para el crecimiento. En organismos como *N. crassa* y *S. cerevisiae* las vías de regulación que controlan las adaptaciones a los diferentes niveles de Pi han sido bien caracterizadas (Vogel y col., 1990; Oshima 1991). El Pi forma parte estructural de biomoléculas como ácidos nucleicos, por tal razón la asimilación y el metabolismo de este elemento son procesos altamente regulados ya que compromete el crecimiento. En muchos organismos la limitación de este elemento conduce a la expresión de enzimas para su asimilación, proteínas reguladoras como nucleasas, fosfatasas, transportadores de Pi de alta afinidad, proteínas de unión a Pi, proteínas cinasas, entre otras (Lenburg y col., 1996). En bacterias, el Pi es uno de los constituyentes principales de la célula, representando del 1.5 al 2.1% del peso seco celular (Santos-Beneit y col., 2008).

La evaluación del crecimiento de *T. atroviride* en una condición de estrés (limitación de Pi) mostró cambios en su desarrollo micelial. La biomasa producida en MMV en la condición estándar o no limitante (36.7mM) fue de 148 mg similar a la obtenida cuando se utilizó 1.8mM de Pi presente en el medio. Este resultado parece indicar que el Pi adicionado al medio estándar parece estar en exceso. Sin embargo, al disminuir la

cantidad de Pi, 40 veces menos (0.1mM) en el medio de crecimiento, claramente afectó el crecimiento micelial, disminuyendo drásticamente la cantidad de biomasa a un 80% en condiciones de luz y oscuridad. Con los datos de biomasa expresados como peso seco la concentración 0.1mM de Pi es la condición limitante para el desarrollo colonial de la cepa wt y mutantes *blr* ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$) por la disminución notable en la producción de biomasa representando en promedio un 80% respecto al valor máximo obtenido. Reportes en fuentes de P insoluble *Trichoderma* presenta crecimiento micelial abundante, apariencia granular homogénea, crecimiento micelial suspendida datos reportados por Rawat y col., (2011), las fuentes de P insolubles estarían simulando un ambiente de déficit de Pi, por lo difícil de asimilar y es reflejada en el desarrollo de *Trichoderma*. También otros datos en *Saccharomyces* indican que al transferirse de medios con nutrientes favorables a medios limitados de Pi, presentan un crecimiento rápido por que utilizan en primer lugar el Pi intracelular, el crecimiento disminuye gradualmente conforme se consume este elemento en el medio de crecimiento, llegando a detenerse completamente cuando la deficiencia de Pi es severa debido a que el metabolismo fue bloqueado (Freese y col., 1981). Nuestros resultados indican que el Pi es un elemento importante para el crecimiento de *T. atroviride*, así como se ha demostrado para otros organismos donde el crecimiento se detiene por déficit de Pi. El presente estudio es el primer reporte del papel de este elemento en el desarrollo de *T. atroviride*. La disminución de micelio en las condiciones empleadas, sugiere que la luz como factor de estrés para muchos organismos, no tiene un efecto sobre la producción de biomasa por el comportamiento similar presentado en oscuridad y en luz. Así, la disminución de biomasa es atribuida solo a la limitación de Pi. Es probable que la disminución de la cantidad de biomasa en *T. atroviride* se deba a la escasa fosforilación de proteínas implicadas en procesos metabólicos que regulan el desarrollo celular por la poca disponibilidad de Pi en el medio de crecimiento y solo este llevando acabo algunas funciones celulares importantes para mantener el crecimiento hasta que las condiciones nutricionales se tornen favorables.

En *T. atroviride* se ha reportado que el metabolismo de carbohidratos está fuertemente relacionado con las vías que conducen a la conidiación en hongos (Chovanec y col., 2001; Casas-Flores y col., 2004; Friedl y col., 2008). Además la limitación de Carbono y Nitrógeno se ha visto que induce la formación de conidias en varias especies de *T.*

atroviride (Casas-Flores y col., 2004; Steyaert y col., 2010c). Cuando esta respuesta fue evaluada bajo un fondo genético mutante *blr* solo se observó conidiación en una condición limitante de Nitrógeno pero no de Carbono (Casas-Flores y col., 2006). Las cepas de *T. atroviride* evaluadas en este trabajo no mostraron evidencia alguna de conidiación en oscuridad bajo condiciones no limitantes y limitantes de Pi, presentado solamente un crecimiento micelial abundante, así como la formación de conidióforos observados a nivel microscópico en condiciones limitantes, wt y mutantes *blr*. Estos datos confirman que la limitación de Pi, es una señal de estrés que induce la formación de conidióforos en el caso de las mutantes *blr* ($\Delta blr-1$, $\Delta blr-2$), y en conjunto con la luz, la señal es amplificada y esto se ve reflejado en el desarrollo de conidióforos en un fondo genético *blr* (**Figura 9**).

T. atroviride (wt) mostró conidiación solo después de recibir un pulso de luz en condiciones controles de Pi, esta respuesta fue amplificada por déficit de Pi en el medio (0.9mM) al percibir la señal luminosa, reflejado en el número de conidias producidas, siendo 4 veces mayor que en condiciones nutricionales favorables. También demostramos que la cantidad de Pi presente en concentraciones más limitadas (0.1mM) no es suficiente para la adecuada formación del anillo de conidiación y por ende la formación de conidias disminuye en presencia de la señal luminosa comparada con la condición control. Para las mutantes nulas en los genes *blr*, que no responden a la luz formando un anillo de conidiación, solamente se demostró la formación de conidióforos a nivel microscópico en oscuridad, aunque el número de conidias resultó inferior comparado con la cepa wt. Estos resultados, coinciden con los reportes sobre el papel de las proteínas BLR para sensar nutrientes tales como la privación de carbono, en cepas que no presentan estas proteínas no existe conidiación en respuesta al estrés nutricional y a la luz (Casa-Flores y col., 2004; 2006). Nuestros resultados demuestra que la limitación de Pi propicia un ambiente de estrés e induce la conidiación, además se muestra el papel que juegan las proteínas BLR en detectar otros tipos de factores de estrés, como en este caso la limitación de Pi (**Figura 12**).

Posiblemente la limitación de Pi provoque un desbalance en el estado redox intracelular y éste sea detectado a través de los dominios PAS de las proteínas BLR, los cuales se ha reportado detectan cambios de luz, oxígeno, voltaje y cambios redox en las células. Alternativamente puede existir la unión de ligandos de las BLR en respuesta al

déficit de Pi como se sugiere para la respuesta de disponibilidad de fuentes de carbono (Casas-Flores y col., 2006; Friedl y col., 2008) (**Figura 12**).

En el caso de las mutantes *blr* que no mostraron conidiación en respuesta a dos factores de estrés, pero si la formación de conidióforos en presencia y ausencia de luz, esta respuesta sugiere la activación de vías de señalización alternas generada únicamente por limitación de Pi, pero no es suficiente para inducir la conidiación de forma similar a la cepa wt (**Figura 12**). En la cepa wt estos dos factores de estrés (luz y limitación de Pi) actúan sinérgicamente amplificando la respuesta de conidiación, posiblemente a través de las proteínas BLR (**Figura 12**).

Se ha descrito para algunos hongos filamentosos como *N. crassa*, *A. nidulans*, *M. oryzae* y *F. oxysporum*, un conjunto de genes asociados con programas de desarrollo asexual, expresados durante el proceso de conidiación (Lauter y col., 1991,1993;; Carattoli y col., 1995; Liu y col., 2003; Linden y col., 1997; Mooney y col., 2010; Greenwald y col., 2010). Existen evidencias de que la transcripción de algunos de estos genes son estimulados por luz azul de manera coordinada durante etapas tempranas y tardías del proceso de conidiación, tal es el caso de los genes *con-10*, *con-13*, así como genes que regulan la entrada al proceso de conidiación como *nrc-2*, en *N. crassa* (Lauter y col., 1991,1993; Carattoli y col., 1995; Liu y col., 2003; Linden y col., 1997; Kothe y col., 1998). Mutantes de *N. crassa* en los genes *wc-1* y *wc-2* importantes para la percepción de luz, no inducen la transcripción de algunos genes *con* en respuesta a un pulso de luz (Lauter y col., 1991). En *T. atroviride* se identificó un gen asociado a la conidiación y se denominó *con-1*. Este gen se induce a las 12 h después de un pulso de luz azul y en etapas tardías de la fotoconidiación (Berrocal-Tito, tesis de doctorado 1999). Debido a la poca información con respecto a genes asociados con el proceso de conidiación en *T. atroviride*, se decidió realizar la búsqueda de posibles genes asociados a este proceso sobre el genoma de *T. atroviride* (<http://genome.jgi-psf.org/Triat2/Triat2.home.html>), utilizando como genes de referencia los reportados para otros hongos modelo (Lauter y col.,1991,1993; Carattoli y col., 1995; Liu y col., 2003; Linden y col., 1997). Al analizar la expresión de los genes putativos de conidiación en *T. atroviride*, se observó que su expresión estaba controlada por el pulso de luz, como se reportó para *N. crassa* (; Lauter y col., 1991,1993; Carattoli y col., 1995; Liu y col., 2003; Linden y col., 1997). Interesantemente, se observó que la limitación

de Pi induce la expresión de estos genes de manera diferencial durante la conidiación. La expresión de estos genes coincide con las diferentes etapas de la formación del conidióforo. Los niveles de expresión de estos genes aumentaron de forma gradual en todos los tiempos empleados posterior al pulso de luz. En oscuridad, se observó la expresión de los genes *con* en condiciones limitantes. Cabe mencionar que los datos obtenidos en los tiempos de expresión de *con-1* en *T. atroviride* en condiciones no limitantes de Pi, coincide con los tiempos de expresión reportada por Berrocal-tito., (1999). Es importante destacar que la expresión de este gen se observó en fuentes limitadas de Pi en oscuridad. Posiblemente *con-1* puede ser estimulado por otros factores que propician un ambiente de estrés y consecuentemente estimular la conidiación (Figura 12).

La expresión es dependiente de las proteínas BLR, ya que *con-1* se reprime en una mutante *blr* en todas las concentraciones limitadas empleadas. La presencia de dos transcritos en *T. atroviride* del gen *con-10* en condiciones limitantes y no limitantes podría deberse por un splicing alternativo dando origen a distintos transcritos, La expresión de algunos genes (*otfc*, *ppp-1*) depende solamente de la disponibilidad de Pi ya que los niveles de expresión incrementen ligeramente en las concentraciones limitadas y no con la aplicación de un pulso de luz. El gen *nrc-2* responde a diversos factores de estrés, ya que se expresa en oscuridad y con la señal luminosa su expresión aumenta. En relación al gen *con-13* que solo expresa en la mutante *blr*, podría deberse la existencia de dos genes implicadas en la misma etapa de desarrollo regulado por las proteínas BLR, donde uno expresa en condiciones favorables y el segundo solo se expresa en condiciones de estrés en ausencia de las BLR. Nuestros datos demuestra la presencia de genes asociados a la conidiación en *T. atroviride* y además que son diferencialmente expresados por otros factores de estrés, tal es el caso de la limitación de Pi, sugiriendo que los genes *con* así como otros genes implicadas en la conidiación pueden estar regulados por las proteínas BLR en respuesta a la señal luminosa, como se reporta para los genes *con* en *N. crassa* (Lauter y col.,1991,1993;; Carattoli y col., 1995; Liu y col., 2003; Linden y col., 1997) o controladas por otros factores que propician un ambiente de estrés de forma dependiente e independiente de las proteínas BLR (**Figura 12**). Esta idea se fundamenta en que no todos los genes responsivos a luz son reguladas por las proteínas BLR, mostrando un patrón de expresión similar a los genes que son dependiente de estas proteínas, indicando la existencia de una vía de

señalización a luz alterna independiente de las proteínas BLR. Además existen evidencias de la presencia de LRE (elementos de respuesta a luz) en el promotor de genes responsivos a luz dependientes o dependientes de las proteínas BLR, involucradas en su regulación por este factor (Rosales-Saavedra y col., 2006). En este sentido cabe la posibilidad de la existencia de otras secuencias consenso bien conservadas a parte de los LRE en los genes asociados a la conidiación en *T. atroviride* que regulen su expresión ante ciertos factores de estrés, además del factor luz explicando así la expresión de genes en ausencia o presencia de las proteínas BLR. Rosales-Saavedra y col., (2006) señala que varios genes responsivos a luz son de función desconocida y por lo tanto la expresión de estos genes podrían ser analizados en el proceso de fotoconidiación de *T. atroviride* y bajo condiciones limitantes de Pi.

Nuestros datos indican que el Pi es un elemento importante en desarrollo de *Trichoderma*, ya que el déficit de este elemento en el medio de crecimiento induce cambios morfológicos drásticos a nivel de producción de biomasa y conidiación. Esta última respuesta es amplificada dependiente de las proteínas BLR en presencia de la señal luminosa. La presencia de estos dos factores es interpretada como una señal de estrés que activa sistemas de defensa celular induciendo al programa de diferenciación morfológica (conidiación) para la preservación y continuidad de la especie. Además se analizó la expresión de genes asociados en la conidiación descritos en otros sistemas fúngicos, y los resultados mostraron una regulación diferencial, mediada posiblemente por factores de estrés. Lo que fue evidente es que no todos están regulados por las proteínas BLR, proporcionando evidencia de una posible comunicación cruzada entre el factor luz y la limitación de nutrientes en la fuente de Pi (**Figura 12**).

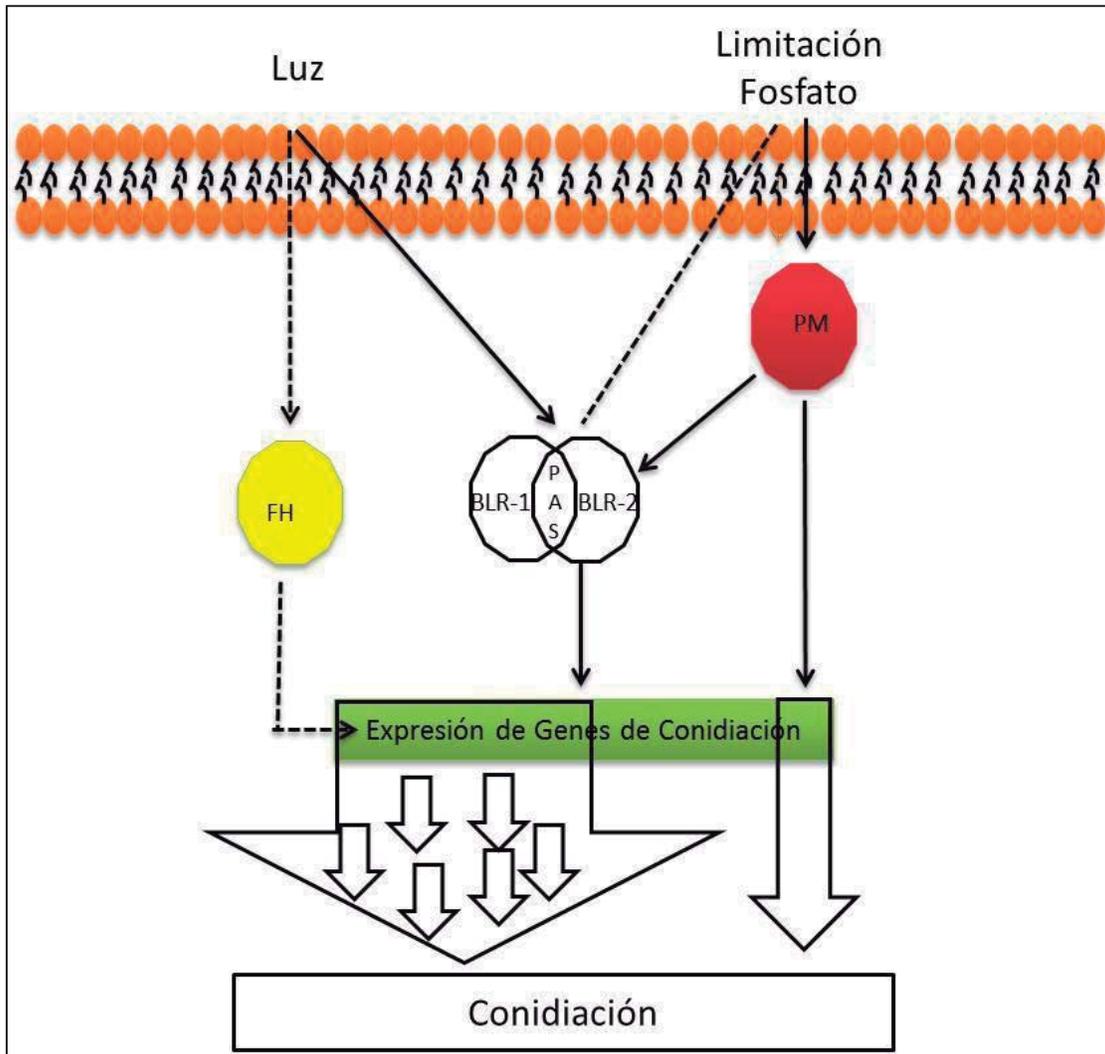


Figura 12. Modelo hipotético mostrando las vías de regulación de la conidiación por luz y limitación Pi en *Trichoderma atroviride* y la posible conexión entre las dos vías. El complejo BLR percibe y transmite la señal originada por la luz o por la limitación de Pi directamente por el complejo BLR o través de una proteína moduladora (PM). La conidiación también puede ser regulada por sistemas de señalización alternas que involucran una proteína moduladora por limitación de Pi (PM) y un Fotorreceptor Hipotético para la percepción de la señal luminosa (FH), resultando la inducción de genes de conidiación. Las líneas continuas son pasos hipotéticos y las líneas sólidas indican datos validados. Las flechas en la parte inferior según su tamaño indican el nivel de respuesta de *Trichoderma atroviride* en combinación de dos factores o de un solo factor de estrés en la formación de estructuras de reproducción (conidias).

VIII. CONCLUSIONES

1. La concentración de Pi es importante para el crecimiento micelial de *T. atroviride* y su limitación es una señal de estrés ya que en conjunto con la luz actúa de manera sinérgica en la formación de conidas asexuales.
2. Una concentración de 0.9mM de Pi es la condición óptima en combinación con la luz para la máxima formación de conidias durante la reproducción asexual de *T. atroviride*.
3. La expresión del gen *con-1* en respuesta a la limitación de Pi depende de la formación del complejo BLR, evidenciando la conexión molecular entre las señales de estrés nutricional por Pi y la luz.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- **Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora C., Cabibbo, A., Macino, G.** 1996. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.* 15:1650-1657.
- **Bastos, C. N.** 2001. Effect of temperature, pH and nutrition on growth and sporulation of *Trichoderma stromaticum* sp. Nov., an antagonist of cocoa witches' broom pathogen. *Summa Phytopathol* 27, 73–76.
- **Baum, D. and Horwitz, B. A.** 1991. Changes in synthesis and abundance of specific polypeptides at early and late stages of blue-light-induced sporulation of *Trichoderma*. *J., Photochem Photobiol B* 11, 117–127.
- **Bayram, O., Krappmann, S., Seiler, S., Vogt, N. Braus, G. H.** 2008. *Neurospora crassa ve-1* affects asexual conidiation. *Fungal Genet Biol* 45, 127–138.
- **Berlin, V., Yanofsky C** 1985. Isolation and characterization of genes diferentially expressed during conidiation of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol* 5:849–855
- **Berrocal-Tito, G., Rosales Saavedra, M. T., Herrera-Estrella, A. 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.
- **Bieszke, J. A., L. Li, and Borkovich K. A.** 2007. The fungal opsin gene *nop-1* is negatively-regulated by a component of the blue light sensing pathway and influences conidiation-specific gene expression in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* 52:149–157.
- **Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole D.J., Zelter A., Kalkman E.R., O'Rourke R., Bowring F., Yeadon J., Ishii C., Suzuki K., Sakai W., Pratt R.** 2004. Lessons

from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 1–108.

- **Boylan, MT., Mirabito, PM., Willett, C. E., Zimmerman, CR., Timberlake, WE.,** 1987. Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 7:3113-3118
- **Breakspear Andrew and Momany Michelle.** 2007. *Aspergillus nidulans* conidiation genes *dewA*, *fluG*, and *stuA* are differentially regulated in early vegetative growth. *Eukaryotic Cell* 6(9):1697-1700. doi:10.1128/EC.00189-07.
- **Briggs, W. R. and Huala, E.** 1999. Blue Light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 15:33-62.
- **Brotman, Yariv J., Gupta, Kapuganti and Viterbo, Ada.** 2010. *Trichoderma*, *Current Biology*. Vol. 20 No 9.
- **Brunner, M., and Schafmeier, T.** 2006. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the circadian clock of *cyanobacteria* and *Neurospora*. *Genes Dev.* 20, 1061–1074.
- **Brunner, M., Kaldi, K.,** 2008. Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 68, 255–262.
- **Calvo, A. M.** 2008. The *VeA* regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* 45, 1053–1061.
- **Calvo, A. M., Bok, J., Brooks W. and Keller, N. P.** 2004. *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* 70, 4733–4739.
- **Carattoli, A., Kato, E., Rodríguez-Franco, M., Stuart, WD., Macino, G.** 1995. A chimeric light-regulated amino acid transport system allows the isolation of blue light regulator (*blr*) mutants of *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6612–6616.
- **Casas-Flores, S., Ríos-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, M., Rosales-Saavedra, T., Martínez-Hernandez, 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.
- **Castellanos, F., Schmoll, M., Martínez, P., Tisch, D., Kubicek, C. P., Herrera-Estrella, A. & Esquivel-Naranjo, E. U.** 2010. Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol.* **47**, 468–476.
- **Cheng, M., Chory, J. and Fankhauser, C.** 2004. Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* **38**:87-117
- **Cheng, P., He, Q., Yang, Y., Wang, L., and Liu, Y.** 2003. Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:5938- 5943.
- **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.
- **Chovanec, P., Hudecova, D. and Varecka, L.** 2001. Vegetative growth, aging- and light-induced conidiation of *Trichoderma viride* cultivated on different carbon sources. *Folia Microbiol (Praha)* **46**, 417–422.
- **Corrochano, L. and Galland, P.** 2006. Photomorphogenesis and Gravitropism in fungi. *The Mycota. Springer- Verlag.* 233-259.
- **Danielson, R.M. Y Davey, C.B.** 1973. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biol. Biochem.* **5**:505-515.
- **Domsch, K. Gams, W. Anderson, O.** 1993. Compendium of Soil Fungi: *Trichoderma*. Germany, IHW-Verlag. 794 – 809. Vol. II
- **Dunlap, J.C., Loros JJ.** 2006. How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi. *Curr. Opin Microbiol* **9**: 579–587

- **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.
- **Esquivel-Naranjo, E.U. and Herrera-Estrella, A.** 2007. Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by *blr-2* overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* (2007), 153, 3909–3922
- **Freese Elisabeth Bautz, Chu Martha, and Freese Ernst.** 1982. Initiation of Yeast Sporulation by Partial Carbon, Nitrogen, or Phosphate Deprivation. *Journal of Bacteriology*, Vol. 149, No. 3. 840-851.
- **Friedl, M. A., Kubicek, C. P. & Druzhinina, I. S.** 2008. Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis*. *Appl Environ Microbiol* 74, 245-250.
- **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. and Dunlap, J. C.** 2005. Genetic and Molecular Analysis de Phytochromes from the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *Eukariotic. Cell*. 4:2140-2152
- **Gresík, M., Kolarova, N. & Farkas, V.** 1991. Hyperpolarization and intracellular acidification in *Trichoderma viride* as a response to illumination. *J Gen. Microbiol.* 137, 2605–2609.
- **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.
- **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.
- **He, Q., Liu, Y.,** 2005. Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes. Dev.* 19, 2888–2899.

- **Heintzen, C., Loros, J.J., Dunlap, J.C.**, 2001. The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*. 104, 453–464.
- **Herrera-Estrella, A. and Horwitz, B.** 2007. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol. Microbiol.* 64:5-15
- **Hidalgo, A.** 1989. Comparación de dos métodos para la selección de aislamientos de *Trichoderma* para el combate biológico de *Fusarium* y *Rhizoctonia* en clavel. Tesis para optar por el grado de Licenciado en Agronomía. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 89 p.
- **Hoff, B., Kamerewerd, J., Sigl, C., Mitterbauer, R., Zadra, I., Kürnsteiner, H. & Kück, U.** 2010. Two components of a *velvet*-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot Cell* Jun 11 [Epub ahead of print], doi:10.1128/EC.00077-10.
- **Horwitz, B. A., Gressel, J., and Malkin, S.** 1985. Photoperception mutants in *Trichoderma*: mutants that sporulate in response to stress but not light. *Curr. Genet.* 9:605-613.
- **Horwitz, B. A., Perlman, A. & Gressel, J.** 1990. Induction of *Trichoderma* sporulation by nanosecond laser pulses: evidence against cryptochrome cycling. *Photochem Photobiol.* 51, 99–104.
- **Hunt, M Suzanne., Thompson, Seona., Elvin, Mark., and Heintzen, Christian.** 2010. VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora*. *PNAS.* 1-6.
- **Idnurm, A., Rodríguez Romero, J., Carrochano, 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.
- **Idnurm, A., Rodríguez Romero, J., Carrochano, 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.
- **Idnurm, Alexander and Heitman, Joseph.** 2005. Photosensing Fungi: Phytochrome in the Spotlight. Current Biology. 15:829-832.
 - **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.
 - **Kihara, J, A., Moriwaki, N., Tanaka, M., Ueno and S. Arase.** 2007. Characterization of the *BLR1* gene encoding a putative blue-light regulator in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*, FEMS Microbiol. Lett. 266, 110–118.
 - **Ko, W. H., Nash, A. I. and Gardner, K. H.** 2007. A LOV ely view of blue light photosensing. Nat. Chem. Biol. 3:372-374.
 - **Kolarova, N., Haplová, J. and Gresik, M.** 1992 Light activated adenyl cyclase from *Trichoderma viride*. FEMS Microbiol. Lett. 72:275-278.
 - **Krappmann, S., Bayram, O. & Braus, G. H.** 2005. Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus veA* locus via a novel recyclable marker module. Eukaryot Cell. 4, 1298–1307.
 - **Lauter FR, Russo VE.** 1991. Blue light induction of conidiation-specific *wc* genes in *Neurospora crassa*. Nucleic Acids Res 19:6883–6886.
 - **Lauter, F.R., and Yanofsky, C.** 1993. Day/night and circadian rhythm control of con gene expression in *Neurospora*. Proc Natl Acad Sci USA. 90: 8249±8253.
 - **Lenburg, M.E., and O’Shea, E.K.** 1996. Signalling phosphate starvation. Trends Bioch Sci. **21**: 383–387.
 - **Linden, H. and Macino, G.** 1997. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. EMBO J. 16: 98-109.
 - **Linden, H., Ballario, P., and Macino, G.** 1997. Blue Light Regulation in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol. 22: 141-150.
 - **Linden, Harmut.** 2002. A White Collar Protein Senses Blue Light. Science. 297: 777-778.

- **Lledias F, Hansberg W.** 2000. Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol.* 319, 110–119.
- **Lombardi L. M. and S. Brody.** 2005. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: clock gene homologues in fungi, *Fungal Genet. Biol.*, 42, 887–892.
- **Lu Y. Sun K, K.H. and Shen W. C.** 2005. Blue light negatively regulates the sexual filamentation via the *Cwc1* and *Cwc2* proteins in *Cryptococcus neoformans*, *Mol. Microbiol.* 56, 480–491.
- **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.
- **Malzahn Erik, Ciprianidis Stilianos, Ildi Krisztina Ka', Schafmeier Tobias, and Brunner Michael.** 2010. Photoadaptation in *Neurospora* by Competitive Interaction of Activating and Inhibitory LOV Domains. *Cell* 142, 762–772.
- **Mendoza-Mendoza, A., Pozo, M. J., Grzegorski, D., Martínez, P., García, J. M., Olmedo-Monfil, V., Cortes, C., Kenerley, C. & Herrera-Estrella, A.** 2003. Enhanced Biocontrol activity of *Trichoderma* through inactivation of a mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 15965–15970.
- **Mendoza-Mendoza, A., Rosales-Saavedra, T., Cortes, C., Castellanos-Juárez, V., Martínez, P & Herrera-Estrella, A.** 2007. The MAP kinase TVK1 regulates conidiation, hydrophobicity and the expression of genes encoding cell wall proteins in the fungus *Trichoderma virens*. *Microbiology.* 153, 2137–2147.
- **Michael M. Neff, Christian Fankhauser y Joanne Chory.** 2011. Light: an indicator of time and place. *Genes Dev.* 2000 14: 257-271
- **Mikus, M., Hatvani, L., Neuhof, T., Komon-Zelazowska, M., Dieckmann, R., Schwecke, T., Druzhinina, I. S., Von Dohren, H. & Kubicek, C. P.** 2009. Differential regulation and posttranslational processing of the class II hydrophobin genes from the biocontrol fungus *Hypocrea atroviridis*. *Appl Environ Microbiol.* 75, 3222–3229.
- **Miller, K. Y., J. Wu, and B. L. Miller.** 1992. *StuA* is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes Dev.* 6:1770–1782.

- **Möglich, A., Ayers, R. A. & Moffat, K.** 2009. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure*. 17, 1282–1294.
- **Mooney, J. L. & Yager, L. N.** 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* 4, 1473–1482.
- **Mukherjee, M., Mukherjee, P. K. & Kale, S. P.** 2007. AMPc signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*. *Microbiology*. 153, 1734–1742.
- **Mukherjee, P. K. & Kenerley, C. M.** 2010. Regulation of morphogenesis and biocontrol properties in *Trichoderma virens* by a VELVET Protein, *Vel1*. *Appl Environ Microbiol.* 76, 2345–2352.
- **Mukherjee, P. K., Latha, J., Hadar, R. & Horwitz, B. A.** 2004. Role of two G-protein alpha subunits, *TgaA* and *TgaB*, in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*. *Appl Environ Microbiol.* 70, 542–549.
- **Muñoz, G., Nakari-Setälä, T., Agosin, E. & Penttilä, M.** 1997. Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Curr Genetic.* 32, 225–230.
- **Nemcovic, M. & Farkas, V.** 1998. Stimulation of conidiation by derivatives of AMPc in *Trichoderma viride*. *Folia Microbiol.* 43, 399–402.
- **Nemcovic, M., Jakubikova, L., Viden, I. & Farkas, V.** 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiol Lett.* 284, 231–236.
- **Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., and Fischer, R.** 2006. Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol.* 9:566-571.
- **Puyesky, M., Ponce-Noyola, P., Horwitz, B. A. & Herrera-Estrella, A.** 1997. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in *Trichoderma harzianum* is repressed during conidiation and mycoparasitism. *Microbiology*. 143, 3157–3164.
- **Rausch Christine y Bucher Marcel.** 2002. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*. 216: 23–37.

- **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
- **Rocha-Ramírez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B. A. & Herrera-Estrella, A.** 2002. *Trichoderma atroviride* G-protein α -subunit gene *tg1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot Cell.* 1, 594–605.
- **Rodríguez-Romero J and L. M. Corrochano.** 2006. Regulation by blue light and heat shock of gene transcription in the fungus *Phycomyces*: proteins required for photoinduction and mechanism for adaptation to light, *Mol. Microbiol.* 61, 1049–1059.
- **Rosales-Saavedra T, E. U. Esquivel-Naranjo, S. Casas-Flores, P. Martínez-Hernández, E. Ibarra-Laclette, C. Cortes-Penagos and A. Herrera-Estrella.** 2006. Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays, *Microbiology.* 152. 3305–3317.
- **Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, E., Christie, M., Briggs, R., Wada, M. and Okada, K.** 2001. *Arabidopsis* *nph1* and *np1*: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc., Natl., Acad., Sci., USA.* 98, 6969-6974.
- **Santos-Beneit Fernando, Rodríguez-García Antonio, Franco-Domínguez Etelvina and Martín Juan F.** 2008. Phosphate-dependent regulation of the low- and high-affinity transport systems in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology.* 154, 2356–2370.
- **Schaeffer, H. J. & Weber, M. J.** 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2435–2444.
- **Schmoll Monika, Esquivel-Naranjo Edgardo Ulises, Herrera-Estrella Alfredo.** 2010. *Trichoderma* in the light of day-Physiology and development. *Fungal Genet. Biol.* doi:10.1016/j.fgb.2010.04.010
- **Schmoll, M., Franchi, L., Kubicek, C.P.** 2005. Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. *Eukaryot. Cell.* 4, 1998–2007.

- **Schuster, A., Kubicek, C. P., Friedl, M. A., Druzhinina, I. S. & Schmoll, M.** 2007. Impact of light on *Hypocrea jecorina* and the multiple cellular roles of ENVOY in this process. *BMC Genomics* **8**, 449.
- **Schwerdtfeger C. y Linden H.** 2003. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J.* 22:4846-4855.
- **Schwerdtfeger, C., Linden, H.,** 2001. Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 39, 1080–1087.
- **Seibel, C., Gremel, G., Silva, R. D., Schuster, A., Kubicek, C. P. & Schmoll, M.** 2009. Light dependent roles of the G-protein α -subunit GNA1 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). *BMC Biol.* **7**, 58.
- **Seidl, V., Song, L., Lindquist, E., Gruber, S., Koptchinskiy, A., Zeilinger, S., Schmoll, M., Martínez, P., Sun, J. & other authors.** 2009. Transcriptomic response of the mycoparasitic fungus *Trichoderma atroviride* to the presence of a fungal prey. *BMC Genomics.* 10, 567.
- **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.
- **Simkovic, M., Ditte, P., Kurucova, A., Lakatos, B. & Varecka, L.** 2008. Ca²⁺-dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride*. *Can J Microbiol.* 54, 291–298.
- **Smith, H.** 2000. Phytochromes and light signal perception by plants an emerging synthesis. *Nature.* 407, 585-591.
- **Steyaert Johanna M, Weld Richard J., Mendoza-Mendoza Artemio and Stewart Alison.** 2010. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*, doi:10.1099/mic.0.041715-0.
- **Steyaert, J. M., Weld, R. J. & Stewart, A.** 2010b. Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology. *Fungal Biol.* 114, 198–208.
- **Steyaert, J. M., Weld, R. J. & Stewart, A.** 2010c. Isolate-specific conidiation in *Trichoderma* in response to different nitrogen sources. *Fungal Biol.* 114, 179–188.

- **Stoppacher, N., Kluger, B., Zeilinger, S., Krska, R. & Schuhmacher, R.** 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HSSPME-GC-MS. *J Microbiol Methods*. 81, 187–193.
- **Stringer, M. A., and W. E. Timberlake.** 1995. *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. *Mol. Microbiol.* 16:33–44.
- **Stringer, M. A., R. A. Dean, T. C. Sewall, and W. E. Timberlake.** 1991. Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev.* 5:1161–1171.
- **Sulova, Z. & Farkas, V.** 1991. Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*: a study with inhibitors. *Folia Microbiol.* 36, 267–270.
- **Sun Chul Kang, Chul Gyu Ha, Tae Geun Lee and D. K. Maheshwari.** 2002 Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. 102 current science. Vol. 82, no. 4
- **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.
- **Taylor, B. L. & Zhulin, I. B.** 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 63, 479–506.
- **Tisch, D, Schmoll, M,** 2009. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1259–1277.
- **Vogel, H. J. Microbial Genetics Bulletin.** 1956. 13:42-43.
- **Wiemann, P., Brown, D. W., Kleigrewe, K., Bok, J. W., Keller, N. P., Humpf, H. U. & Tudzynski, B.** 2010. *FfVel1* and *FfLae1*, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol Microbiol* Jun 21 [Epub ahead of print]. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07263.x.
- **Xu, J. R.** 2000. MAP kinases in fungal pathogens. *Fungal Genetic Biol.* 31, 137–152.
- **Y. Liu, Q. He and P. Cheng.** 2003. Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2131–2138.