



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

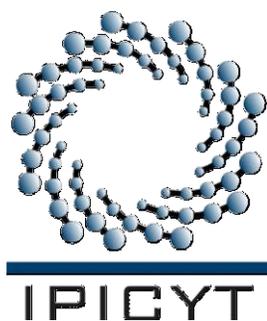
“Construcción de vectores para la generación de cepas knockdown y sobreexpresantes con proteínas etiquetadas en el hongo filamentoso *Trichoderma atroviride*”

Tesis que presenta  
**Yazmín Hernández Díaz**

Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis:  
**Dr. J. Sergio Casas Flores**

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2013



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Construcción de vectores para la generación de cepas knockdown y sobreexpresantes con proteínas etiquetadas en el hongo filamentoso *Trichoderma atroviride***” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Yazmín Hernández Díaz** y aprobada el **17 de Septiembre de 2013** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

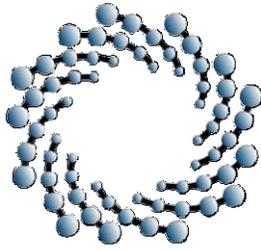
Dr. J. Sergio Casas Flores  
(Director de la tesis)

---

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís  
(Asesor de la tesis)

---

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz  
(Asesor de la tesis)

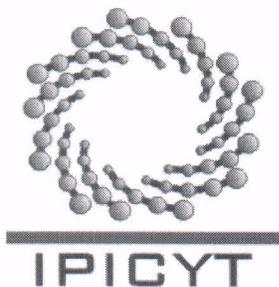


**IPICYT**

## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada 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 dirección del Dr. J. Sergio Casas Flores.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (423719), y una beca de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Este trabajo fue apoyado por el proyecto SEP-CONACYT 83798 otorgado al Dr. Alfredo Herrera Estrella y al Dr. Sergio Casas Flores.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 113 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 17 días del mes de septiembre del año 2013, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Yazmín Hernández Díaz**

sobre la Tesis intitulada:

*Construcción de vectores para la generación de cepas knockdown y sobreexpresantes con proteínas etiquetadas en el hongo filamentoso Trichoderma atroviride*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. J. Sergio Casas Flores**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 13:55 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 17 días del mes de septiembre de 2013.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## Dedicatorias

*A mis padres*

*A mi familia*

*A Jorge Vicencio*

-La ciencia se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad-

*Julio Verne*

## **Agradecimientos**

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica como de la vida.

A Jorge Luis Vicencio por el gran apoyo y cariño brindado durante esta etapa compartida.

Al Dr. J. Sergio Casas Flores por todas sus enseñanzas y por el tiempo dedicado en mi formación académica.

A la Dra. Lina Riego y al Dr. Ángel Alpuche por su apoyo en la revisión de mi tesis y por sus sugerencias que mejoraron mi trabajo.

A la Dra. Edith Uresti y al Dr. Javier Montalvo por su valiosa amistad y todas sus enseñanzas a nivel personal y académico.

A mis compañeros del laboratorio 8: Ángel Jiménez, Macario Osorio, Magnolia Estrada, Mayte Cervantes, Tania Muñoz y Jesús Gallardo por la amistad brindada y en especial a Francisco Pérez por su amistad y apoyo en el proceso de titulación.

A mis grandes amigos y compañeros de generación: Ángel López, Cinthia Rodríguez, Oscar Martínez, Patricia Estrada y Tere Esquivel ha sido un gusto compartir tantos momentos lindos dentro y fuera del instituto, los aprecio mucho.

A la Ing. María Isabel Isordia Jasso por su apoyo técnico que me fue de gran utilidad y por su amistad.

A Claudia Adriana por su apoyo técnico y por su amistad.

Al IPICYT por permitirme realizar mis estudios de maestría.

A la UJAT y al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios.

# Contenido

<b>Constancia de aprobación de la tesis</b>	ii
<b>Créditos institucionales</b>	iii
<b>Acta de examen</b>	iv
<b>Dedicatorias</b>	v
<b>Agradecimientos</b>	vi
<b>Lista de figuras</b>	ix
<b>Abreviaturas</b>	x
<b>Resumen</b>	xi
<b>Abstract</b>	xii
<b>Introducción</b>	1
<b>Materiales y Método</b>	5
Cepas, medios y condiciones de cultivo	5
Double-Joint PCR (DJ-PCR)	5
Transformación de <i>T. atroviride</i> por el método de protoplastos	6
Ensayo de inducción con QA	7
<b>Resultados</b>	11
Diseño de los vectores pBHD-5´F, pBHD-3´F, pBHD-5´M y pBHD-3´M	11
Construcción de los vectores pBHD-5´F, pBHD-3´F, pBHD-5´M y pBHD-3M basados en el principio de la técnica DJ-PCR	12
Generación de las construcciones pHD-5F*b2, pHD-3F*b2, pHD-5M*b2, pHD-3M*b2 y pHD-3F*g5 para la transformación de <i>T. atroviride</i>	16
Obtención de cepas transformantes de <i>T. atroviride</i>	18
Análisis fenotípico de las cepas T3FB2 y TMBFG en ausencia o presencia de QA	22
<b>Discusión</b>	27
<b>Referencias</b>	33

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Double-Joint PCR de las cuatro distintas construcciones. .... 14
- Figura 2.** Mapa de los vectores pBHD generados en el presente estudio..... 15
- Figura 3.** Confirmación de la clonación y orientación del gen *blr-2* en pHD-5´F, pHD-3´F, pHD-5´M y pHD-3´M por PCR y digestión con la enzima de restricción *Pst* I y confirmación de la clonación y orientación del gen *tgf-1* en pHD-3´F por digestión con la enzima de restricción *Xho* I..... 17
- Figura 4.** Análisis por PCR de las cepas transformantes de *T. atroviride* transformadas con los plásmidos pHD-3´F, pHD-3´M, pHD-3´M\*b2 y pHD-3´F\*g5..... 20
- Figura 5.** Fenotipo de la cepa T3FB2 en ausencia o presencia de QA. .... 24
- Figura 6.** Fenotipo de la cepa TMBFG en ausencia o presencia de QA..... 25
- Figura 7.** Análisis por RT-PCR de la expresión del gen *blr-2* en presencia de QA en la cepa WT y T3FB2. .... 26

## Abreviaturas

(Por sus siglas en inglés)

<b><i>blr-2</i></b>	<u>b</u> lue <u>l</u> ight <u>r</u> egulator- <u>2</u>
<b>cDNA</b>	<u>c</u> omplementary <u>D</u> NA
<b>DNA</b>	<u>D</u> eoxyribo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
<b><i>gcn5</i></b>	general <u>c</u> ontrol <u>n</u> on-derepressible 5
<b><i>hph</i></b>	<u>h</u> ygromycin <u>p</u> hosphotransferase
<b>ORF</b>	<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame
<b>PCR</b>	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
<b>QA</b>	<u>Q</u> uinic <u>A</u> cid
<b>RNA</b>	<u>R</u> ibo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
<b>RT-PCR</b>	<u>R</u> everse <u>T</u> ranscription- <u>P</u> CR
<b>TGF-1</b>	<u>T</u> richoderma <u>G</u> CN <u>F</u> ive- <u>1</u>

## Resumen

### **Construcción de vectores para la generación de cepas knockdown y sobreexpresantes con proteínas etiquetadas en el hongo filamentoso *Trichoderma atroviride***

El hongo filamentoso *Trichoderma atroviride* es utilizado como agente de biocontrol debido a que induce la resistencia sistémica a patógenos en plantas, produce antibióticos y enzimas líticas. Adicionalmente, este hongo se utiliza como modelo fotomorfogénico debido a que conidia en respuesta a un pulso de luz azul. Las proteínas BLR-1, BLR-2 y TGF-1 juegan papeles muy importantes en la respuesta a la luz azul. A pesar de la importancia de éste hongo en la ciencia básica y la aplicada, los estudios a nivel molecular han sido limitados debido a la carencia de herramientas moleculares para su estudio. En el presente trabajo generamos vectores para el reemplazo de genes esenciales o que provoquen fenotipos aberrantes en *T. atroviride*. Los vectores portan el promotor inducible *Pqa-2* del hongo *Neurospora crassa* (que responde a la presencia del ácido quínico en el medio de cultivo), el terminador *TtrpC* del hongo *Aspergillus nidulans*, el marcador de selección *hph* y las etiquetas FLAG o c-Myc para la obtención de proteínas etiquetadas en sus extremos amino o carboxilo. Los genes *blr-2* y *tgf-1*, fueron clonados en algunas de las cuatro variantes de los vectores, las cuales fueron utilizadas para transformar a *T. atroviride*, obteniendo un set de cepas portadoras del gen *blr-2* o cepas co-transformadas con los genes *blr-2* y *tgf-1*. El análisis de las transformantes mostró fenotipos de hiperconidiación. La conidiación se potenció conforme se incrementó la concentración del inductor en el medio de cultivo, lo que sugirió la posible inducción de la actividad del *Pqa-2* modulando la expresión del gen *blr-2* o de los genes *blr-2* y *tgf-1*. Estos indican fuertemente que los vectores generados son funcionales en *T. atroviride* y muy probablemente lo sean en otros hongos filamentosos.

**Palabras claves:** *Trichoderma*, Vectores, *Pqa-2*, conidiación.

## Abstract

### **Construction of vectors for the generation to knockdown and overexpressing strains with tagged proteins in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride***

The filamentous fungus *Trichoderma atroviride* is used as a biocontrol agent due that it induces the systemic resistance to pathogens in plants, produces and secretes a number of antibiotics and lysing enzymes. In addition, this fungus is also used as a photomorphogenic model due that it conidiates in response to a blue light pulse. The BLR-1, -2 and TGF-1 proteins play important roles in blue light response. Despite the importance of this fungus in basic and applied science, its molecular studies have been scarce, because of the lacking of molecular tools. In this work we generated molecular vectors for the replacement of essential genes or those that provokes aberrant phenotypes in *T. atroviride*. These vector harbors the *Pqa-2* inducible promoter from fungus *Neurospora crassa*, that responds to the addition of quinic acid in the culture medium, them also carry the *TtrpC* terminator from the fungus *Aspergillus nidulans*, the hygromycin phosphotransferase selection cassette and sequences that encode for FLAG and c-Myc epitopes to obtain tagged proteins in their respective amino or carboxy termini. The *blr-2* or *tgf-1* genes were cloned in some of the four variants of the vectors, which were used to transform *T. atroviride*, obtaining a set of strains bearing the *blr-2* gen or both the *blr-2* and the *tgf-1* genes. Analysis of the transformants showed hyperconidiation phenotypes, which was enhanced as the concentration of quinic acid was increased in the culture medium, which suggested the transcriptional modulation of *blr-2* or *tgf-1* and *blr-2* together under the control of *Pqa-2*. These data hardly suggest that the system based on *Pqa-2* and *TtrpC* is functional in *T. atroviride* and probably in other filamentous fungi.

**Key words:** *Trichoderma*, Vectors, *Pqa-2*, conidiation.

## 1. Introducción

Las especies fúngicas del género *Trichoderma* (Ascomicetos) se caracterizan por ser hongos saprófitos que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, donde son capaces de competir por nutrientes y espacio con otros microorganismos (Howell, 2003; Shoresh *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que varias cepas del género *Trichoderma*, presentan la capacidad de parasitar a otros hongos, al enrollarse en sus hifas, por medio de estructuras tipo apresorio, y por la producción de enzimas líticas como glucanasas, chitinasas, proteasas y lipasas, que terminan degradando la pared celular del huésped y consumiendo el contenido de éste (Benítez *et al.*, 2004).

Además, algunas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos volátiles y no-volátiles que impiden el desarrollo de otros microorganismos sin que se establezca un contacto físico entre ellos. Entre estos metabolitos, encontramos a el ácido harziánico, la 6-pentil pirona, los peptaiboles, la viridina, la gliotoxina, la trichodermina y otros más que han sido descritos (Reino *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2012). Por estas características, varias especies del género *Trichoderma* son consideradas excelentes agentes de control biológico.

Las cepas rizósfera-competentes de *Trichoderma* juegan un papel importante para las plantas debido a que pueden formar asociaciones benéficas, con lo cual también contribuyen en el control de los agentes fitopatógenos de manera indirecta. Varias cepas de *Trichoderma* incrementan el porcentaje y la tasa de germinación de las semillas, secretan moléculas que promueven el crecimiento y se encuentran colonizando las raíces de las plantas. Se ha determinado que cepas de *Trichoderma* son capaces de inducir la resistencia sistémica en las plantas a través de las vías de señalización mediadas por el ácido jasmónico/etileno y por el ácido salicílico (Shoresh *et al.*, 2010; Hermosa *et al.*, 2012).

Algunos hongos integrantes del género *Trichoderma/Hypocrea* también son utilizados como modelos fotomorfogénicos debido a que responden a la luz azul formando un anillo de conidias (estructuras de reproducción asexual) en el perímetro de la colonia donde fue dado un estímulo luminoso. Este patrón definido y localizado, denominado fotoconidiación, permite utilizar a *Trichoderma* como modelo para estudiar el proceso de percepción de la luz. En *T. atroviride* las proteínas BLR-1 y BLR-2 son esenciales para la fotoconidiación y la regulación de genes responsivos a luz azul (Casas-Flores *et al.*, 2004; Castellanos *et al.*, 2010).

En *Trichoderma*, la luz también regula el metabolismo secundario, el crecimiento micelial, el metabolismo del carbono, el metabolismo del azufre, la respuesta a estrés oxidativo y la reproducción sexual (Casas-Flores y Herrera-Estrella, 2013). Estos procesos regulados por la luz, están mediados por distintas vías de señalización como las MAP cinasas, proteínas cinasas dependientes de cAMP (PKA), y las proteínas G heterotriméricas (Casas-Flores y Herrera-Estrella, 2013). Cabe resaltar que la proteína TGF-1, la ortóloga a Gcn5 de *Saccharomyces cerevisiae* en *T. atroviride*, también participa en la regulación de las respuestas a la luz azul como coactivador transcripcional (Uresti-Rivera *et al.*, en preparación).

La generación y aplicación de herramientas o técnicas moleculares que permitan el estudio de las especies del género *Trichoderma* son esenciales y necesarias. Un recurso clave para éste enfoque, es la generación de mutantes knockout que proporcionan información sobre la función del gen de interés.

Recientemente en nuestro grupo de trabajo, hemos obtenido mutantes en genes que codifican para proteínas de la maquinaria epigenética. Estas mutantes se encuentran afectadas en el crecimiento, conidiación y en la pigmentación de las conidias y en algunos casos no se han podido obtener cepas viables, probablemente, porque los genes son esenciales. Todo esto, dificulta el análisis e impone limitaciones adicionales, por lo que es importante la generación de nuevas herramientas que brinden soluciones a estos tipos de inconvenientes.

El uso de promotores inducibles permite analizar los efectos de la expresión de genes esenciales, debido a que la actividad de estos promotores es regulada por la presencia o ausencia de factores bióticos o abióticos. La variedad de promotores inducibles varían de acuerdo al organismo y a las células o tejidos donde se desea regular la transcripción del gen. Los promotores inducibles están agrupados con base en su regulación, la cual puede ser modulada química o físicamente.

Los promotores regulados químicamente incluyen promotores regulados por la presencia o ausencia de alcoholes, tetraciclina, esteroides, metales y otros componentes. Los promotores regulados físicamente incluyen promotores que son regulados por la presencia o ausencia de luz, patógenos, bajas o altas temperaturas y otras condiciones (Cheng *et al.*, 2001; Felenbok *et al.*, 2001; Vogt *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008). Si el nivel de expresión del gen de interés es estrictamente regulado, estos promotores también son adecuados para la obtención de proteínas tóxicas y para la generación de mutantes de expresión condicional de genes que son esenciales para la viabilidad de la célula (Shoji *et al.*, 2005).

Varios promotores inducibles han sido utilizados con la finalidad de regular la expresión del gen de interés en hongos filamentosos, entre ellos el promotor del gen *qa-2* de *Neurospora crassa*, inducible por el ácido quínico; el promotor *alcA* de *Aspergillus nidulans*, inducible por alcoholes; el promotor *cbh1* de *T. reesei*, inducible por derivados de celulosa y un sistema basado en el operón de resistencia a tetraciclina de *Escherichia coli*, inducible por derivados de la tetraciclina en *A. fumigatus* (Cheng *et al.*, 2001; Felenbok *et al.*, 2001; Vogt *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008).

El promotor del gen *qa-2* (*Pqa-2*) de *N. crassa* es comúnmente usado como un sistema regulable, ya que se encuentra silenciado en ausencia de ácido quínico, pero la adición del inductor al medio de cultivo lo activa (Giles *et al.*,

1985). Este promotor ha sido usado para modular la expresión de genes y para la obtención de proteínas (Cheng *et al.*, 2001).

Las proteínas tienen un papel crítico en diversos procesos biológicos a través de interacciones con otras proteínas, ADN, ARN y otras moléculas. El etiquetado de proteínas con epítomos ha llegado a ser un método que permite la caracterización rápida, la detección, la purificación y la localización de las éstas *in vivo* (Jarvik y Telmer, 2008).

Debido a varios aspectos mencionados anteriormente, hemos construido cuatro vectores para el reemplazo de genes esenciales o para el reemplazo de genes que provoquen fenotipos aberrantes en *T. atroviride*. Los vectores portan el promotor inducible *Pqa-2* de *N. crassa* permitiendo modular la expresión del gen de interés, el terminador *TtrpC* de *A. nidulans*, y el marcador de selección *hph*. Además, los vectores contienen secuencias que codifican para los epítomos FLAG o c-Myc que nos permitirán obtener proteínas etiquetadas en su extremo amino o carboxilo.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo

En este trabajo se utilizó la cepa IMI 206040 de *Trichoderma atroviride* como cepa silvestre (WT). Para la transformación de plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli* TOP10F' (Invitrogen). La cepa WT fue crecida en cajas con PDA (Papa Dextrosa Agar, DIFCO™) a 28°C. Para la selección de cepas transformantes se utilizó el medio PDA con 0.5 M de sacarosa y 100 µg/mL de higromicina como antibiótico de selección. Para la regeneración de protoplastos se utilizó el medio de selección (Caldo de Dextrosa de Papa -DIFCO™-, Agarosa 0.8% -Nara Biotec-, y Sacarosa 0.5 M) con agar suave al 0.8% y 50 µg/mL de higromicina. Para el crecimiento bacteriano se utilizó el medio LB (Luria-Bertani) (Tryptona 1% -DIFCO™-, Extracto de levadura 0.5% -DIFCO™- y NaCl 1%). Para el medio LB sólido se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 1.5% (p/v), y cuando fue necesario se agregó carbenicilina a una concentración final de 100 µg/mL. Para la  $\alpha$  complementación de las células TOP10F' se utilizó IPTG a una concentración final de 0.5 mM y X-gal a una concentración final de 20 µg/mL.

### 2.2. Double-Joint PCR (DJ-PCR)

Se diseñaron oligonucleótidos específicos a los cuales se les agregaron de 25-30 bases de homología en su extremo 5' para llevar a cabo la fusión de los fragmentos (Yu *et al.*, 2004). Para una descripción gráfica de la técnica refiérase a la Fig.1A. Los oligonucleótidos empleados se describen en la Tabla 1. Mediante una reacción de PCR punto final utilizando la enzima Herculase II Fusion DNA Polymerase de alta fidelidad (Agilent Technologies) (la cual no presenta actividad de transferasa terminal), se amplificaron en reacciones separadas, el *Pqa-2* de *N. crassa* tomando como molde el plásmido pMSK374 (Case, 1986), el *TtrpC* a partir del plásmido pEYFPC (Donado por el Dr. Artemio Mendoza-Mendoza) y se amplificó el marcador de selección *hph* tomando como molde el plásmido pKAR1

(Casas-Flores *et al.*, 2006). Los programas de PCR se ejemplifican en la Tabla 2. Los productos fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, los tres fragmentos se mezclaron en una sola reacción (relación molar 1:3:1) para llevar a cabo una segunda ronda de PCR sin oligonucleótidos. El producto de la amplificación anterior fue empleado como molde para la tercera ronda de PCR empleando oligonucleótidos que flanquean los extremos de la construcción final. Los programas de PCR se ejemplifican en la Tabla 2. La amplificación final fue llevada a cabo usando la enzima Go Taq DNA Polimerasa (Promega) (genera extremos cohesivos por su actividad de transferasa terminal). Cuatro reacciones separadas fueron llevadas a cabo para generar las construcciones que presentan la etiqueta FLAG o c-Myc hacia el 5' o 3' adyacente al sitio de restricción *Sma* I. Los amplicones fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System como se describió anteriormente.

### **2.3. Transformación de *T. atroviride* por el método de protoplastos**

Las construcciones originadas por la DJ-PCR fueron amplificadas mediante una PCR convencional y se utilizaron para la transformación de *T. atroviride*. La obtención de protoplastos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Baek y Kenerley (1998) con las siguientes modificaciones: se inocularon 10<sup>8</sup> conidias en 100 mL de PDYCB (Caldo Papa Dextrosa DIFCO™ 24 g/L, Extracto de Levadura 2 g/L y Casaminoácidos 1.2 g/L) y se incubaron por 24 h a 28 °C con agitación a 250 rpm. El micelio se colectó por filtración, se lavó con agua y 0.5 gramos (peso húmedo) fueron resuspendidos en Osmoticum (CaCl<sub>2</sub> 50 mM, Manitol 0.5 M y MES 50 mM, pH 5.5) con 15 mg/mL de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (LET) (Sigma). La mezcla fue incubada a 28°C con agitación suave por 5 h. Los protoplastos fueron recolectados por filtración a través de una malla de nylon estéril con poros de 100 µm y posteriormente, se agregaron 5 mL de Osmoticum sobre las mallas de nylon para recuperar los protoplastos que pudieran haberse quedado atrapados en éstas. La muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 20 min

y finalmente se resuspendieron en Osmoticum a una concentración de  $1 \times 10^8$  protoplastos/mL. Se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión para observar la integridad de los protoplastos en un microscopio óptico a una amplificación de 40X. A 250  $\mu$ l de protoplastos se les agregó de 10-20  $\mu$ g de DNA transformante. La mezcla se incubó en hielo por 20 min y posteriormente se agregaron 250  $\mu$ l de PEG-4000 al 60%, y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. De la mezcla obtenida se hicieron diferentes diluciones y se mezclaron con 7 mL de medio de selección con agar suave al 0.8% y 50  $\mu$ g/mL de higromicina y se vaciaron a cajas de Petri con medio selectivo. Las cajas se incubaron a 28°C por 72 h y se aislaron los protoplastos regenerados resistentes a higromicina. Para la obtención de las cepas transformadas se realizaron varios cultivos monospóricos, en los cuales se sembraron un número determinado de esporas sobre el medio de selección para posteriormente aislar colonias originadas a partir de una conidia, la cual es portadora de un solo núcleo. La colonia monospórica fue aislada y se transfirió a un medio sin antibiótico de selección para su desarrollo. Para la generación y obtención de cepas co-transformadas se utilizó el doble de las concentraciones de higromicina utilizadas para la transformación sencilla.

#### **2.4. Ensayos de inducción con QA**

Las cepas WT, T3FB2, TMBFG, OEblr-2 (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007) y a la cepa  $\Delta blr-2$  (Casas-Flores *et al.*, 2004) se crecieron en medio mínimo sólido de Vogel 1X (Microbial Genetics Bulletin 13:42-43, 1956) con 2% de glucosa para la condición de no inducción (-QA) o con 0.1% de glucosa y distintas concentraciones de ácido quínico (0.3%, 0.6% y 0.8%) para la condición de inducción (+QA) y se incubaron a 28 °C durante cinco días. Para los ensayos de inducción en medio líquido se inocularon  $10^6$  conidias/mL en 200 mL de medio líquido de Vogel 1X. Los cultivos en condición de no inducción se incubaron durante 48 h a 28 °C con agitación constante a 250 rpm, el micelio se colectó y se transfirió al medio de inducción. El ácido quínico se añadió a una concentración final de 0.6%, el cual fue aplicado al tiempo de transferencia de la condición de no

inducción a la condición de inducción. El micelio se colectó en diversos tiempos después de la adición del ácido quinico al medio de cultivo (2, 4, 6 y 8 h).

**Tabla 1.** Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo

	<b>Nombre</b>	<b>Gen o secuencia que amplifica</b>	<b>Secuencia (5´- 3´)</b>
1	qa-2-F	<i>Pqa-2</i>	CAGGGGCGGGCTTGATTCCGCCTA
2	qa-2-FLAG-NH2-R	<i>Pqa-2</i>	ATTCTTGTTGACATGGAGCTATTAATC <u>CCCCGGG</u> <b>CTTGTCATCGTCATCTTTGTAGTCC</b> ATTGTGTTTGGTACC TCTGGTTGGGTGCGATG
3	qa-2-FLAG-COOH-R	<i>Pqa-2</i>	ATTCTTGTTGACATGGAGCTATTAATC <b>ACTTGTCATCGTCATCTTTGTAGT</b> <u>CCCCGGG</u> TGTGTTTGGTACCTCT GGTTGGGTGCGATG
4	qa-2-MYC-NH2-R	<i>Pqa-2</i>	ATTCTTGTTGACATGGAGCTATTAATC <u>CCCCGGG</u> <b>CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC</b> CATTGTGTTT GGTACCTCTGGTTGGGTGCGATG
5	qa-2-MYC-COOH-R	<i>Pqa-2</i>	ATTCTTGTTGACATGGAGCTATTAATC <b>CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTC</b> <u>CCCCGGG</u> TGTGTTTGGT ACCTCTGGTTGGGTGCGATG
6	trp-CF	<i>TtrpC</i>	TAGTGATTTAATAGCTCCATG
7	trp-CR	<i>TtrpC</i>	CTCGAGTGGAGATGTGGAGTG
8	TtrpC-hph-F	Cassette de <i>hph</i>	AGCGCCCACTCCACATCTCCACTCGAGGATCGACGTTAACTGATATTGAAGGAG
9	DJhph-R	Cassette de <i>hph</i>	CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGT
10	Fw-BLR2-myc/flag	ORF del gen <i>blr-2</i>	T <u>CCCCGGG</u> GAATGTCCACGGGCCCTCCAC
11	Rv-BLR2-myc/flag	ORF del gen <i>blr-2</i>	T <u>CCCCGGG</u> GGAGCCTGCAGCTGGAGTTGC
12	Fw-GCN5-myc/flag	ORF del gen <i>tgf-1</i>	T <u>CCCCGGG</u> GAATGGCCGACATCAAAGAAG
13	Rv-GCN5-myc/flag	ORF del gen <i>tgf-1</i>	T <u>CCCCGGG</u> GATTTGTCCGGCTCGAGATGC

Las secuencias subrayadas corresponden al sitio de reconocimiento por la enzima de restricción *Sma* I y las secuencias en negritas corresponden a la etiqueta indicada en el nombre del oligonucleótido.

**Tabla 2.** Programas de PCR utilizados en este trabajo

<b><i>Gen o secuencia que amplifica</i></b>	<b><i>Programa de PCR</i></b>
<i>Pqa-2</i>	Un ciclo inicial de 95 °C por 4 min, 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 60 °C por 20 s y 72 °C por 30 s, y un ciclo final de 72 °C por 3 min.
<i>TtrpC</i>	Un ciclo inicial de 95 °C por 4 min, 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 52 °C por 20 s y 72 °C por 20 s, y un ciclo final de 72 °C por 3 min.
Cassette <i>hph</i>	Un ciclo inicial de 95 °C por 4 min, 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 60 °C por 20 s y 72 °C por 45 s, y un ciclo final de 72 °C por 3 min.
<b><i>Double-Joint PCR</i></b>	<b><i>Programa de PCR</i></b>
Segunda ronda	Un ciclo inicial de 95 °C por 4 min, 28 ciclos de 95 °C por 20 s, 55 °C por 20 s y 72 °C por 2 min, y un ciclo final de 72 °C por 3 min.
Tercera ronda	Un ciclo inicial de 95 °C por 4 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 3 min, y un ciclo final de 72 °C por 10 min

### 3. Resultados

#### 3.1. Diseño de los vectores *pBHD-5´F*, *pBHD-3´F*, *pBHD-5´M* y *pBHD-3´M*

En nuestro grupo de investigación hemos generado cepas knockout de genes que codifican para proteínas de la maquinaria epigenética. En algunos casos, éstas cepas han presentado fenotipos aberrantes o los genes deletados han resultado ser esenciales para la viabilidad del hongo (Cristóbal-Mondragón, 2011; Uresti-Rivera, 2013).

Debido a lo anterior, decidimos construir cuatro vectores que porten el *Pqa-2* de *N. crassa* (regulado transcripcionalmente por el ácido quínico), el *TtrpC* de *A. nidulans* y el marcador de selección *hph* de *E. coli*. Entre la secuencia del promotor *Pqa-2* y la secuencia del terminador *TtrpC* se ubicará un sitio de restricción *Sma* I (genera secuencias con extremos romos) para la inserción del gen de interés. También se agregarán individualmente, secuencias que codifican para una copia de las etiquetas FLAG o c-Myc. Dichas secuencias serán colocadas a los extremos 5´ o 3´ del sitio *Sma* I, lo que nos permitirá obtener proteínas etiquetadas en su extremo amino o carboxilo terminal para la realización de estudios posteriores.

Las distintas construcciones amplificadas, serán clonadas en el sitio *Sma* I del fagémido pBluescript II SK (+) con lo cual, estas quedarán flanqueadas por dos sitios múltiples de clonación, y servirán para clonar los extremos 5´ y 3´ flanqueantes del marco de lectura abierto del gen de interés, y posteriormente realizar el reemplazo génico por doble recombinación homóloga.

### **3.2. Construcción de los vectores pBHD-5´F, pBHD-3´F, pBHD-5´M y pBHD-3´M basados en el principio de la técnica DJ-PCR**

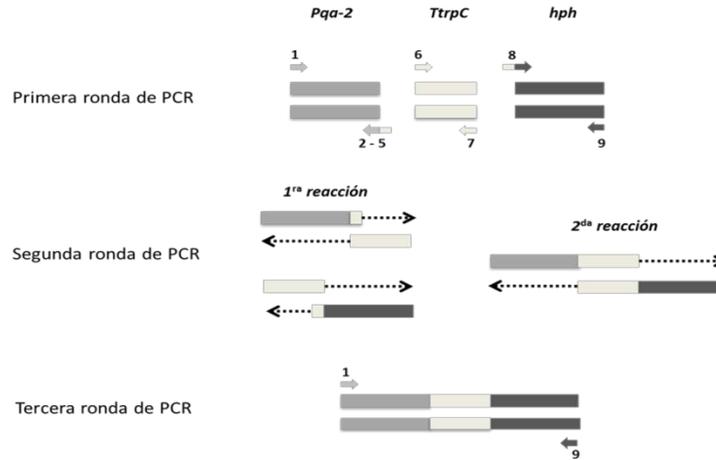
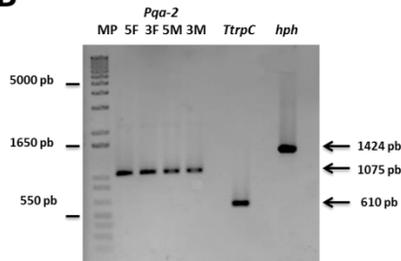
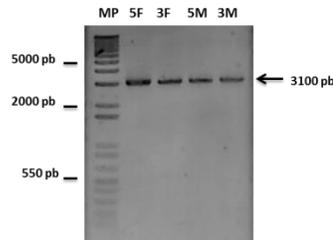
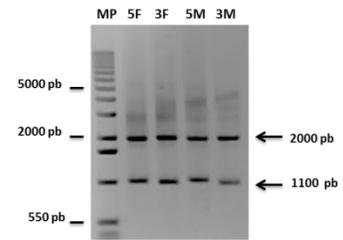
Para el estudio de la función de los genes de *T. atroviride*, hemos diseñado una serie de vectores basados en el uso de la técnica DJ-PCR previamente utilizada en *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* y *Fusarium graminearum* (Yu *et al.*, 2004). En ésta técnica, los oligonucleótidos son diseñados de tal modo que se generen extremos sobrelapados de ADN entre dos módulos o más, necesarios para generar la fusión en una reacción de PCR convencional, utilizando una DNA Polimerasa con una alta fidelidad, y que no presente actividad de transferasa terminal de nucleótidos (Fig. 1A).

En la primer ronda de la DJ-PCR (Fig. 1A), el *Pqa-2*, el *TtrpC* y el *hph* se amplificaron en reacciones separadas. El *Pqa-2* contiene la etiqueta FLAG o c-Myc hacia los extremos 5´ o 3´ del sitio *Sma* I generado en el *Pqa-2*. La Fig. 1B muestra los productos obtenidos de la primera ronda de la DJ-PCR, correspondientes al *Pqa-2*, el *TtrpC* y el *hph*, los cuales son de 1075, 610 y 1424 pb, respectivamente. En la tercera ronda de PCR, la fusión del *Pqa-2*, el *TtrpC* y el cassette *hph* generó una construcción del tamaño esperado (3100 pb) que se corroboró por digestión con la enzima de restricción *Sma* I que genera fragmentos de 1100 pb y 2000 pb (Fig. 1C y 1D).

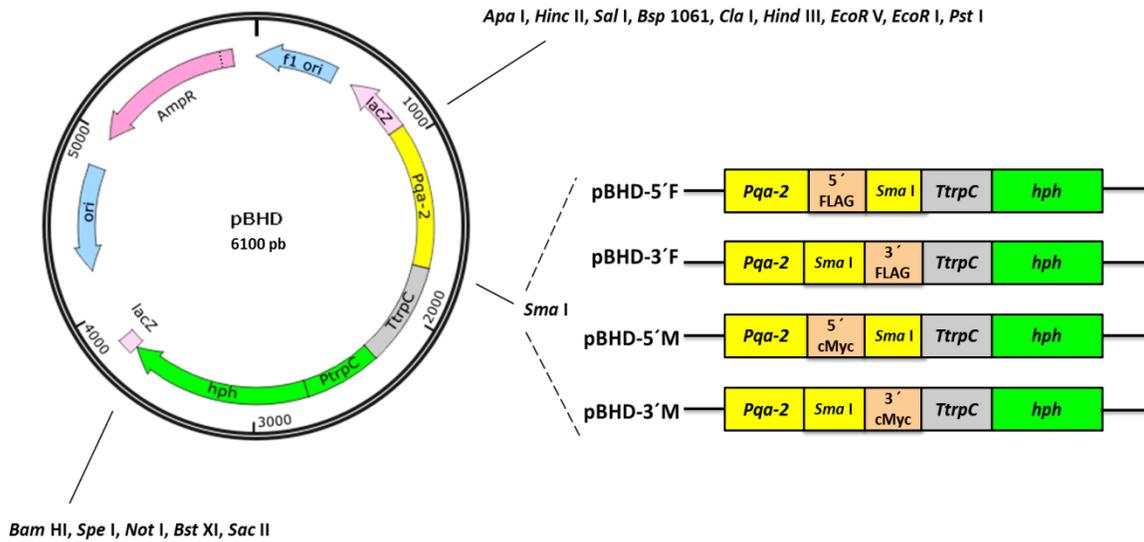
Las construcciones de 3100 pb generadas se amplificaron por PCR utilizando a la enzima GoTaq DNA Pol (la cual agrega adeninas en los extremos 3´ terminal debido a su actividad de transferasa terminal) y se clonaron en el vector pGEM-T Easy. Posteriormente, mediante una reacción de PCR punto final, y tomando como molde las clonas anteriores, se amplificaron las construcciones clonadas con la enzima Herculase II y se insertaron en el sitio *Sma* I (genera extremos romos) del pBluescript II SK (+) originando los vectores pBHD-5´F y pBHD-3´F (ambos contienen al epítipo FLAG en el 5´ o 3´ adyacente al sitio de restricción *Sma* I respectivamente) y los vectores pBHD-5´M y pBHD-3´M (ambos

contienen al epítipo c-Myc en el 5' o 3' adyacente al sitio de restricción *Sma* I respectivamente) (Fig. 2). Mediante secuenciación se corroboró la inserción de cada una de las construcciones en el pBluescript II SK (+) y la orientación de las mismas con respecto al sitio múltiple de clonación del pBluescript II SK (+). (Fig. 2).

En los vectores quedaron disponibles río arriba del *Pqa-2* los sitios para las enzimas de restricción *Apa* I, *Hinc* II, *Sal* I, *Bsp* 1061, *Cla* I, *Hind* III, *EcoR* V, *EcoR* I y *Pst* I, y los sitios para las enzimas *Bam* HI, *Spe* I, *Not* I, *Bst* XI y *Sac* II río abajo del marcador *hph* para la clonación de las regiones 5' y 3' flanqueantes del gen de interés para llevar a cabo el remplazo génico por doble recombinación homóloga (Fig. 2).

**A****B****C****D****Figura 1. Double-Joint PCR de las cuatro distintas construcciones.**

(A) Esquema que muestra las rondas de PCR para llevar a cabo la fusión de la construcción deseada. Las flechas numeradas representan los oligonucleótidos usados para cada una de las reacciones de PCR's. Los oligonucleótidos 2–5 y 8 presentan 25-30 bases de homología con el siguiente fragmento a fusionar (*Pqa-2-TtrpC* y *TtrpC-hph*, respectivamente) (Modificado de Yu *et al.*, 2004). (B) Amplificación de los módulos a fusionar en la primera ronda de PCR con los oligonucleótidos indicados en la Fig. 1A. El promotor *Pqa-2* corresponde a un producto de 1075 pb, el *TtrpC* a un producto de 610 pb y el *hph* a un amplicón de 1424 pb. (C) La amplificación de la construcción final en la tercera ronda de PCR con los oligonucleótidos 1 y 9 generan un producto de 3100 pb. (D) Digestión de los productos de PCR mostrados en la Fig. 1C con la enzima *Sma* I que genera fragmentos de 1100 pb y 2000 pb. MP: Marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen), 5F y 3F: Construcción que presentan la etiqueta FLAG hacia el extremo 5' o 3' del sitio *Sma* I, 5M y 3M: Construcción que presentan la etiqueta c-Myc hacia el extremo 5' o 3' del sitio *Sma* I.



**Figura 2. Mapa de los vectores pBHD generados en el presente estudio.** La imagen muestra el mapa del vector junto con los sitios de restricción disponibles (izquierda) y los esquemas de las cuatro construcciones que muestran las diferencias entre cada vector generado (pBHD-5'F, pBHD-3'F, pBHD-5'M y pBHD-3'M) (derecha). La nomenclatura de los vectores es la siguiente: p (Plásmido), B (Bluescript II SK (+)), HD (Hernández-Díaz), 5' ó 3' (Localización de la etiqueta con respecto al sitio *Sma* I), F (FLAG) o M (c-Myc).

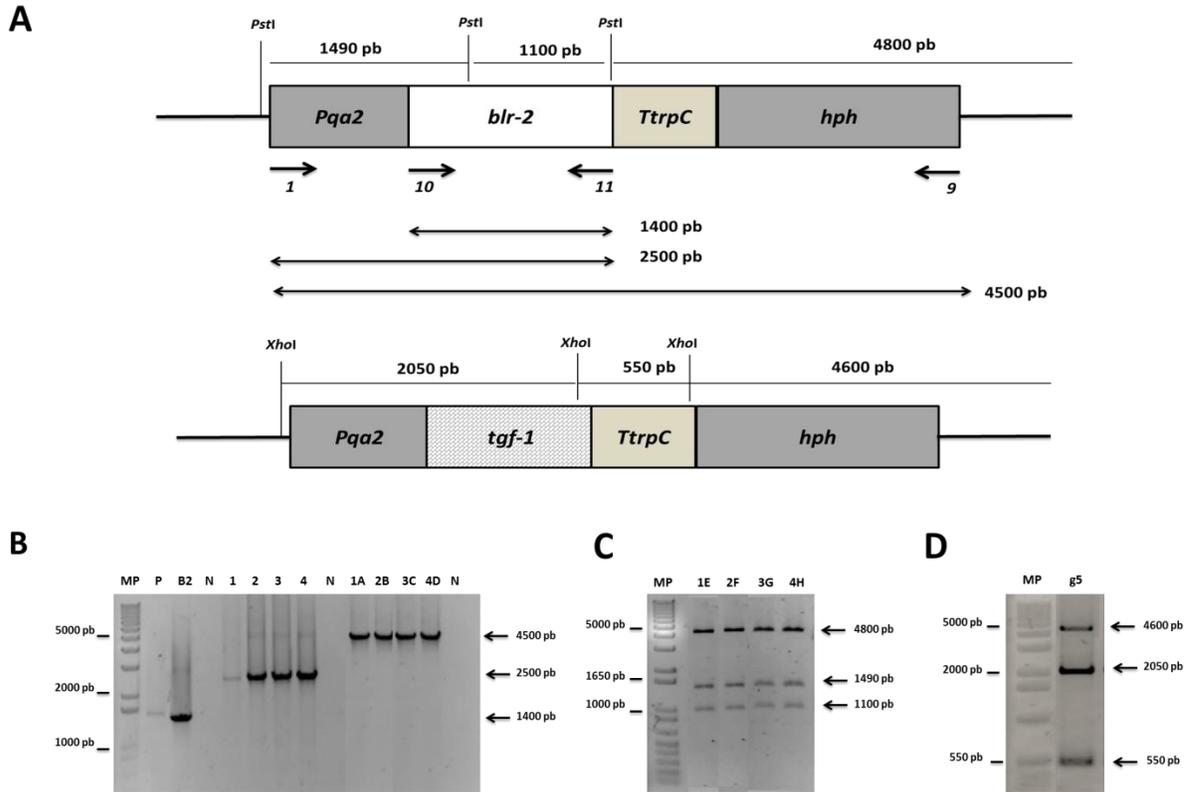
### **3.3. Generación de las construcciones pHD-5F\*b2, pHD-3F\*b2, pHD-5M\*b2, pHD-3M\*b2 y pHD-3F\*g5 para la transformación de T. atroviride**

Con la finalidad de determinar si el sistema que hemos construido es funcional, el gen *blr-2* que codifica para uno de los componentes del sistema fotorreceptor, con actividad de factor transcripcional y el gen *tgf-1* que codifica para una acetil transferasa de histonas se introdujeron en la cepa silvestre de *T. atroviride* bajo la regulación del *Pqa-2*.

Los ORFs de *blr-2* y *tgf-1* se amplificaron por PCR a partir de cDNA y los productos se ligaron en el vector pGEM-T Easy, lo que generó las clonas pHD-b2 y pHD-g5, respectivamente. Posteriormente, los genes fueron amplificados por PCR con la enzima Herculase II tomando como molde el ADN de las las clonas anteriores para ser ligado en el sitio *Sma* I (genera extremos romos) de cada una de las construcciones albergadas en el vector pGEM-T Easy.

La clonación de los genes y la orientación de los mismos se confirmaron por PCR y por digestión con enzimas de restricción. La localización de los sitios de restricción o de los oligonucleótidos se muestra en la Fig. 3A. Las Figs. 3B y C muestran la clonación y la orientación del inserto *blr-2* determinada por PCR y por digestión con la enzima *Pst* I que genera fragmentos de 1100 pb, 1490 pb y 4800 pb si el gen está orientado correctamente o fragmentos de 450 pb, 2200 pb y 4800 pb si el gen está en la orientación incorrecta. La inserción de *blr-2* en los vectores permitió generar las clonas pHD-5F\*b2, pHD-3F\*b2, pHD-5M\*b2 y pHD-3M\*b2.

La clonación y orientación del gen *tgf-1* se confirmó por digestión con la enzima de restricción *Xho* I que genera fragmentos de 4600 pb, 2050 pb y 550 pb si el gen está orientado correctamente o fragmentos de 1300 pb, 1400 pb y 4600 pb si el gen está en orientación incorrecta (Fig. 3D). La inserción de *tgf-1* en el vector pHD-3´F permitió generar la construcción pHD-3F\*g5.



**Figura 3. Confirmación de la clonación y orientación del gen *blr-2* en pHD-5'F, pHD-3'F, pHD-5'M y pHD-3'M por PCR y digestión con la enzima de restricción *Pst* I y confirmación de la clonación y orientación del gen *tgf-1* en pHD-3'F por digestión con la enzima de restricción *Xho* I. A) Esquema que muestra la localización del sitio de restricción *Pst* I y de los oligonucleótidos con los tamaños esperados (Flechas sólidas abajo del esquema) y esquema que muestra la localización del sitio de restricción *Xho* I. B) Amplificación por PCR del gen *blr-2* clonado en los vectores generados. C) Digestión del ADN plasmídico de las clonas positivas a la clonación del gen *blr-2* con la enzima *Pst* I. D) Digestión del ADN plasmídico de la clona positiva a la clonación del gen *tgf-1* con la enzima *Xho* I. MP: Marcador de peso molecular, P: Control positivo, B2: Amplificación del ORF de *blr-2* a partir de cDNA con los oligonucleótidos 10 y 11, N: Control negativo, 1- 4: Amplificación de pHD-5'F, -3'F, -5'M y -3'M con los oligonucleótidos 1 y 11 utilizando como molde el ADN plasmídico, 1A-4D: Amplificación de pHD-5'F, -3'F, -5'M y -3'M con los oligonucleótidos 1 y 9 utilizando como molde el ADN plasmídico, 1E- 4H: Patrón de digestión de pHD-5'F\*b2, -3'F\*b2, -5'M\*b2 y -3'M\*b2; g5: Patrón de digestión de pHD-3'F\*g5.**

### **3.4. Obtención de cepas transformantes de *T. atroviride***

Con el propósito de determinar si los vectores generados son funcionales en *T. atroviride* y de generar cepas que alberguen al gen *blr-2* y al gen *tgf-1* con la etiqueta FLAG o c-Myc, las construcciones generadas en el apartado anterior fueron utilizadas para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

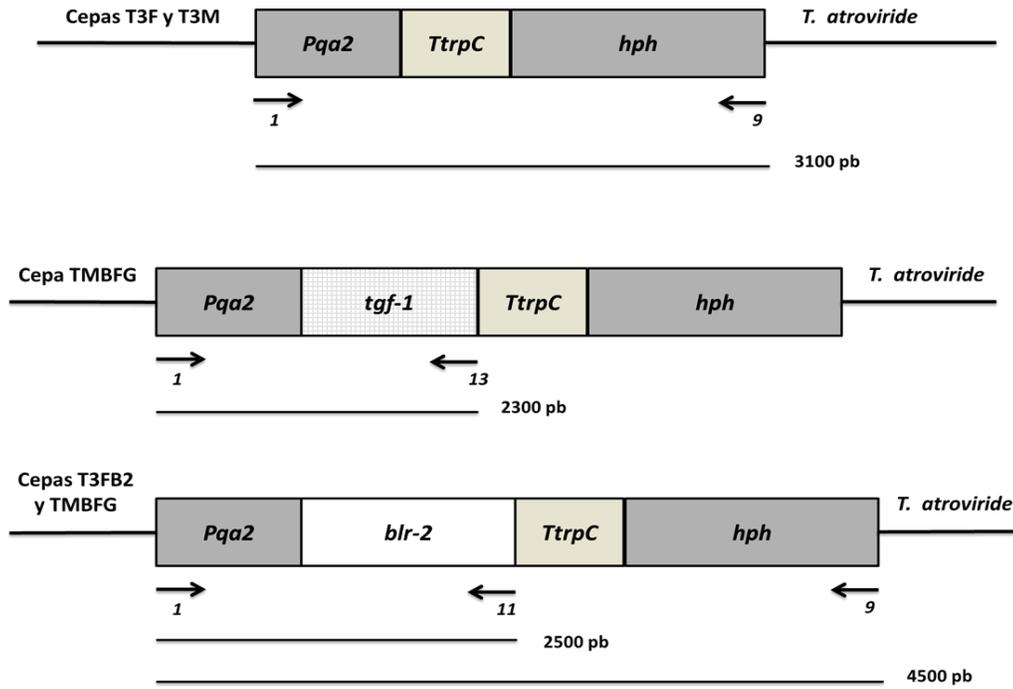
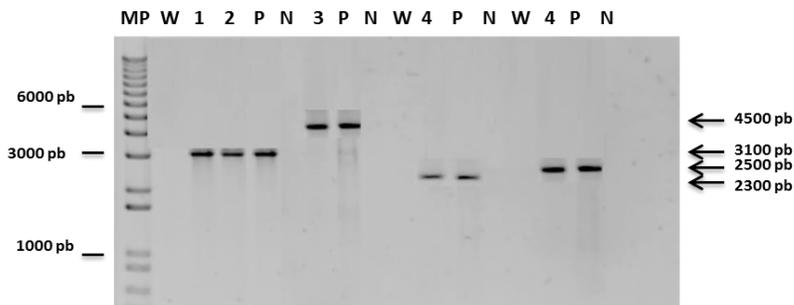
Posteriormente, se seleccionaron las colonias transformantes resistentes a higromicina, indicativo de que poseen al menos el casete de resistencia a dicho antibiótico. Debido a que las inserciones ectópicas pueden repercutir en el fenotipo del hongo como en el crecimiento y desarrollo, las cepas transformantes se seleccionaron con base en un fenotipo de crecimiento y conidiación similar al de la cepa WT. Las cepas transformantes generadas en este estudio se enlistan en la Tabla 2.

Para confirmar la inserción de las construcciones en el genoma del hongo, se realizó un análisis por medio de PCR utilizando como molde el DNA genómico de las cepas transformantes. La Fig. 4A muestra la localización de los oligonucleótidos utilizados en el análisis por PCR, el cual nos confirmó la obtención de cepas transformantes que presentan una construcción de 4,500 pb que corresponde a la presencia del gen *blr-2* con la etiqueta FLAG en su extremo 3' y cepas que presentan una construcción de 3,100 pb que corresponde a los vectores pBHD-3'F o 3'M vacíos, como cepas control (Fig. 4B).

Para investigar si las proteínas BLR-2 y TGF-1 de *T. atroviride* interactúan entre sí, se generaron cepas co-transformadas que albergan los genes *blr-2* y *tgf-1* con la etiqueta c-Myc y FLAG, respectivamente en su extremo 3'. Para confirmar la inserción en el genoma se realizó un análisis por medio de PCR utilizando como molde el DNA genómico de las cepas co-transformadas (Fig. 4B).

**Tabla 3.** Cepas de *T. atroviride* generadas en este estudio

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo relevante</b>	<b>Fenotipo</b>
<b>T3F</b>	Presenta el <i>Pqa-2</i> con la etiqueta FLAG hacia el extremo 3' del sitio <i>Sma</i> I, el <i>TtrpC</i> y el <i>hph</i>	Hyg <sup>R</sup>
<b>T3M</b>	Presenta el <i>Pqa-2</i> con la etiqueta c-Myc hacia el extremo 3' del sitio <i>Sma</i> I, el <i>TtrpC</i> y el <i>hph</i>	Hyg <sup>R</sup>
<b>T3FB2</b>	Presenta a el gen <i>blr-2</i> con la etiqueta FLAG en su extremo 3' bajo la regulación del <i>Pqa-2</i> , el <i>TtrpC</i> y el <i>hph</i>	Hyg <sup>R</sup>
<b>TMBFG</b>	Presenta a los genes <i>blr-2</i> con la etiqueta c-Myc en su extremo 3' y al gen <i>tgf-1</i> con la etiqueta FLAG en su extremo 3' bajo la regulación del <i>Pqa-2</i> , el <i>TtrpC</i> y el <i>hph</i>	Hyg <sup>R</sup>

**A****B**

**Figura 4. Análisis por PCR de las cepas transformantes de *T. atroviride* transformadas con los plásmidos pHD-3'F, pHD-3'M, pHD-3'F\*b2, pHD-3'M\*b2 y pHD-3'F\*g5.** A) Esquema que muestra la localización de los oligonucleótidos utilizados (Flechas sólidas abajo del esquema) en los análisis por PCR con los tamaños esperados. B) Amplificación de las construcciones insertadas en el genoma de *T. atroviride* con los oligonucleotidos mostrados en la Fig. 4A. MP: Marcador de peso molecular, W: Cepa silvestre, P: Control positivo, N: Control negativo, 1: Cepa T3F, 2: Cepa T3M, 3: Cepa T3FB2, 4: Cepa TMBFG.

Las cepas positivas al análisis por PCR presentaron amplicones de 2300 pb que corresponde a la región del *Pqa-2* y del ORF del gen *tgf-1* y, a los amplicones de 2500 pb que corresponde a la región del *Pqa-2* y del ORF del gen *blr-2* (Fig. 4B). La cepa WT empleada como cepa control no mostró amplificación con ninguno de los juegos de oligonucleótidos utilizados debido a que los genes endógenos tienen su propio promotor, solo serán regulables los genes introducidos en el genoma de *T. atroviride* (Fig. 4).

### **3.5. Analisis fenotípico de la cepas T3FB2 y TMBFG en ausencia o presencia de QA**

La cepa T3FB2 generada en el presente estudio alberga al gen *blr-2* bajo la regulación del *Pqa-2* por lo que realizamos ensayos de inducción en presencia del inductor debido a que en presencia del QA el gen *qa-2* se expresa y en ausencia del ácido quínico o en presencia de glucosa el gen *qa-2* no se expresa.

Se sabe, que las cepas de *T. atroviride* que sobreexpresan al gen *blr-2* (OE*blr-2*) presentan un fenotipo de hiperconidiación en respuesta a la luz (producción de esporas asexuales) en comparación con la cepa WT (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007), por lo que esperaríamos un fenotipo similar al reportado en las cepas generadas en éste trabajo si lográramos la sobreexpresión del gen en presencia del inductor.

Los ensayos de inducción del promotor *Pqa-2* con la cepa T3FB2 y la cepa WT (cepa control) se llevaron a cabo creciendo a las cepas en medio de Vogel con 0.3% y 0.6% de QA, incluyendo como control a las cepas creciendo en medio de Vogel sin QA. Los resultados muestran un fenotipo de hiperconidiación en la cepa T3FB2, el cual mostró ser modulable por la concentración de QA en el medio de cultivo. Como se observa en la Fig. 5, la conidiación de la cepa T3FB2 fue mayor al aumentar la concentración del inductor de 0.3% a 0.6% (Fig. 5).

El ensayo anterior se repitió con la cepa TMBFG la cual alberga a los genes *blr-2* y *tgf-1* bajo la regulación del *Pqa-2* empleando una mayor concentración del inductor (0.8%). Las cepas WT, OE*blr-2* (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007) y la cepa knockout en el gen *blr-2* ( $\Delta$ *blr-2*) (Casas-Flores *et al.*, 2004) de *T. atroviride* se utilizaron como cepas control del experimento.

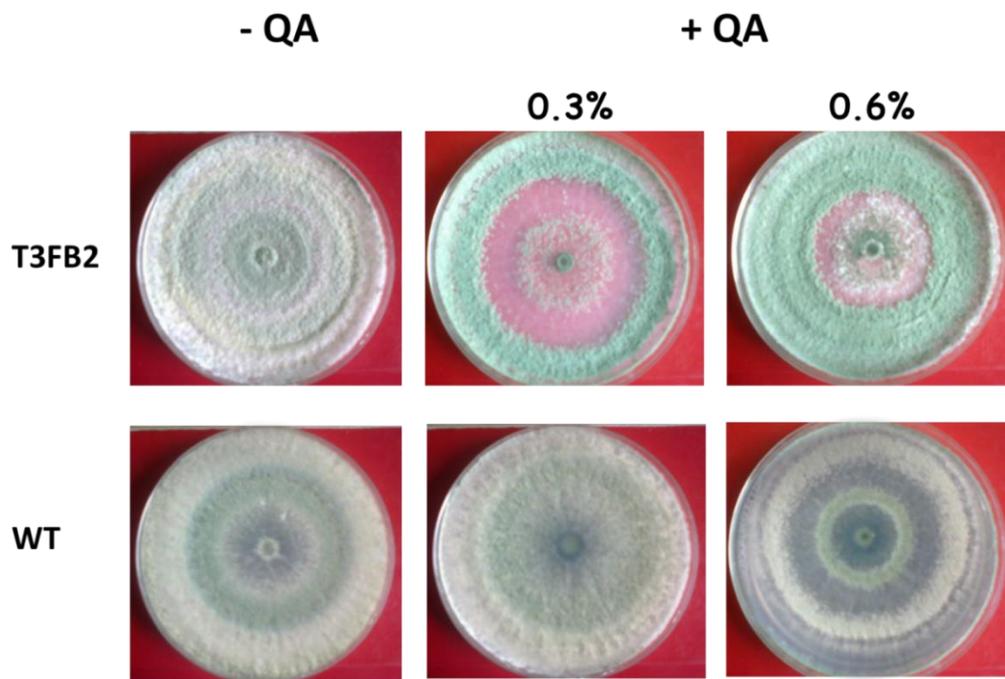
Las cepas WT, OE*blr-2* y  $\Delta$ *blr-2* mostraron el fenotipo característico reportado en la literatura. Cabe resaltar, que la adición del QA retrasa ligeramente

el crecimiento de todas las cepas. La cepa TMBFG mostró un fenotipo de hiperconidiación en presencia de QA (Fig. 6), dicho fenotipo de hiperconidiación, fue mucho mayor al observado en la cepa portadora de la construcción con el gen *blr-2* (T3FB2) (Fig. 5 y 6).

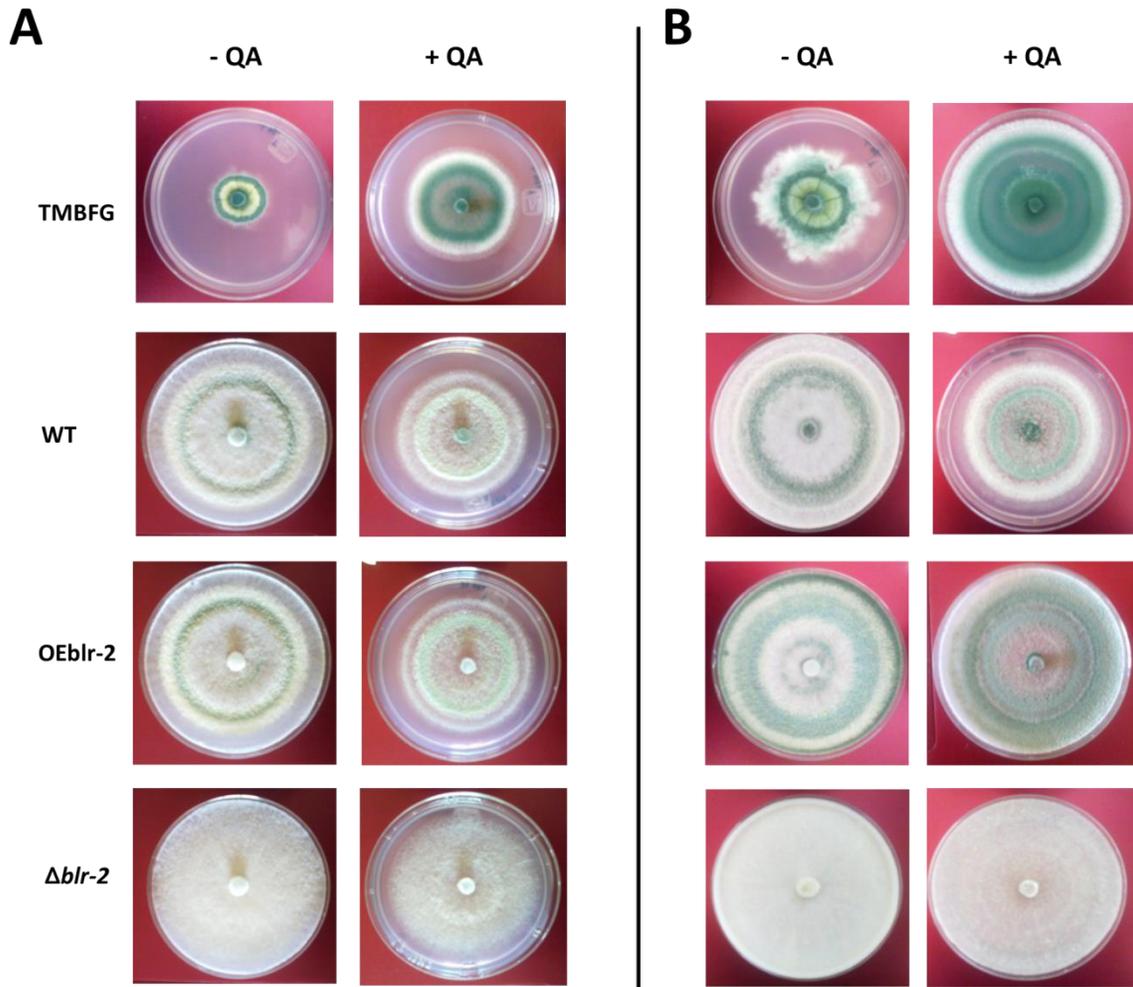
La hiperconidiación de la cepa TMBFG fue notoria a partir del segundo día de crecimiento, periodo en el que la cepa WT comienza a conidiar. La cepa TMBFG presentó un rezago en el crecimiento en ausencia de QA desde los primeros días de crecimiento (Fig. 6A). Sin embargo, el crecimiento empezó a ser relativamente más rápido a partir del tercer día de crecimiento (Fig. 6B). Este rezago en el crecimiento no se observó en la cepa T3FB2 (Fig. 5 y 6).

Los resultados fenotípicos de las cepas T3FB2 y TMBFG mencionados anteriormente nos sugirieron la posible inducción del *Pqa-2* por la adición de QA al medio de cultivo, y para corroborar dicha aseveración, realizamos los ensayos de inducción en medio líquido en presencia y ausencia de QA, para determinar los niveles de expresión de los genes de interés.

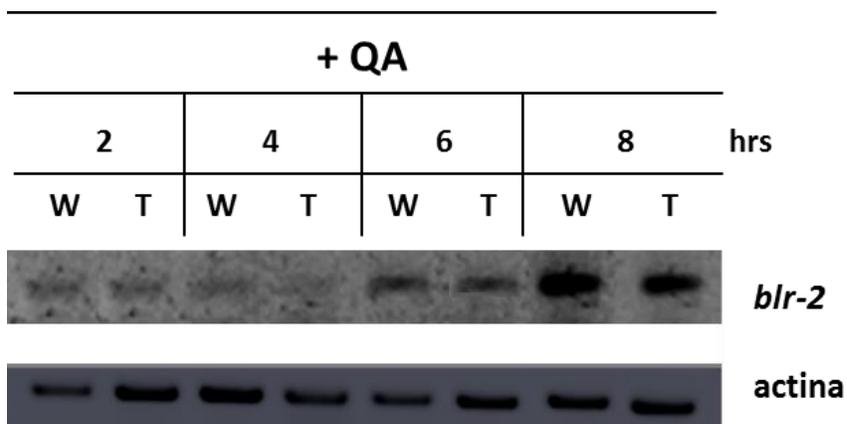
Dichos ensayos consistieron en crecer a la cepa T3FB2 en la condición de -QA para después ser transferido a la condición de +QA (0.6% de QA). El micelio se colectó a los tiempos 2, 4, 6 y 8 h después de la adición del QA al medio de cultivo. Se extrajo el RNA total de las muestras y se sintetizó el cDNA para los ensayos de RT-PCR. Sin embargo, la expresión del gen *blr-2* en la cepa T3FB2 fue similar a la expresión del gen endógeno en la cepa WT en los diversos tiempos analizados (Fig. 7).



**Figura 5. Fenotipo de la cepa T3FB2 en ausencia o presencia de QA.** Las cepas T3FB2 y WT se crecieron en ausencia (-QA) o presencia de 0.3% o 0.6% de ácido quínico (+QA) a 25-28 °C. Las fotografías fueron capturadas a los 4 días de crecimiento.



**Figura 6. Fenotipo de la cepa TMBFG en ausencia o presencia de QA.** Las cepas TMBFG, WT, OEblr-2 (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007) y  $\Delta$ blr-2 (Casas-Flores *et al.*, 2004) se crecieron en ausencia (-QA) o presencia de 0.8% de ácido quínico (+QA) a 28 °C. A) Las fotografías fueron capturadas a los 3 días de crecimiento. B) Las fotografías fueron capturadas a los 5 días de crecimiento.



**Figura 7. Análisis por RT-PCR de la expresión del gen *blr-2* en presencia de QA en la cepa WT y T3FB2.** Las cepas WT y T3FB2 se crecieron en medio líquido en la condición de -QA durante 2 días para después ser transferidas a la condición de +QA con 0.6% de QA. Las muestras se colectaron en los tiempos indicados después de la adición del QA al medio de cultivo. W: Cepa WT, T: Cepa T3FB2.

## 4. Discusión

Los hongos filamentosos son considerados sistemas modelos que incluyen especies importantes para la producción de proteínas heterólogas y se encuentran disponibles una variedad de herramientas y métodos versátiles para su manipulación; sin embargo, la mayoría de dichos elementos se encuentran disponibles solo para el estudio de dos especies modelos: *A. nidulans* y *N. crassa* (Nayak *et al.*, 2006; Honda y Selker, 2009).

Los estudios a nivel molecular en *T. atroviride* han sido limitados debido a la carencia de herramientas y métodos experimentales para esta especie. Dichos estudios implican la transformación del hongo con construcciones para reemplazar o sobre-expresar un gen, generadas por procedimientos de clonación convencionales, por lo que la generación de dichas herramientas son muy laboriosas y consumen mucho tiempo.

En el presente trabajo hemos generado una serie de vectores para el estudio de *T. atroviride* basados en el principio de la técnica DJ-PCR. Dicha técnica ofrece varias ventajas sobre estrategias convencionales de clonación. Un posible inconveniente de esta técnica es que la PCR puede inducir mutaciones y esto puede ser un problema si la mutación ocurre en una región codificante o regulatoria. Para reducir este problema, hemos optimizado el proceso usando una DNA polimerasa de alta fidelidad, procesividad y que no presenta actividad de transferasa terminal favoreciendo las clonaciones en sitios romos.

Los vectores generados en este trabajo albergan secuencias que codifican para una copia de la etiqueta FLAG o c-Myc. La versatilidad del etiquetado de proteínas con epítomos es muy variada, algunas de las aplicaciones de estas herramientas permiten conocer la localización, la topología, las interacciones, las dinámicas de las proteínas y además permiten su purificación (Jarvik y Telmer, 1998). Debido a que el epítomo puede interferir con la estructura o la actividad

biológica de la proteína, nuestros vectores fueron diseñados para que el epítipo se añadiera al extremo amino o carboxilo de la proteína, brindando una variedad de opciones para la obtención de proteínas etiquetadas.

En nuestro grupo de trabajo se han obtenido una serie de mutantes knockout en los genes que codifican para proteínas de la maquinaria epigenética, como lo son: *tgf-1* y *hd-1*, este último codifica para una desacetilasa de histonas. Dichas mutantes muestra un crecimiento muy lento en comparación con la cepa silvestre, y la conidiación es escasa, entre otras características (Uresti-Rivera *et al.*, en preparación). Cristóbal-Mondragón (2011) realizó varios intentos para aislar cepas transformantes del gen *rsc-9*, el cual codifica para un remodelador de la cromatina dependiente de ATP, pero no le fue posible obtener la cepa mutante, lo que sugirió que este gen es esencial para la viabilidad del hongo tal como se ha reportado para su ortólogo en *S. cerevisiae* (Damelin *et al.*, 2002).

Por tal motivo, diseñamos una estrategia que permitiera averiguar el papel que juegan los productos de estos genes en *T. atroviride*. La serie de vectores generados en este trabajo albergan al promotor inducible del gen *qa-2*, el cual codifica para una enzima involucrada en la utilización del ácido quínico como fuente de carbono en *N. crassa* (Giles *et al.*, 1985). En presencia del ácido quínico, el gen *qa-2* se expresa y en ausencia del ácido quínico o en presencia de glucosa el gen *qa-2* no se expresa. Con esta estrategia se puede regular la expresión del gen de interés que se inserte río abajo del *Pqa-2*.

La regulación de la expresión de genes permitirá discernir la función de genes esenciales en una sola cepa, en la cual se podrán generar fenotipos mutantes, intermedios y silvestres. Meyer *et al.*, (2011) generaron mutantes que son viables bajo ciertas condiciones aunque con genes esenciales eliminados del genoma. En este trabajo, generaron una mutante interrumpiendo el ORF del gen *actA*, el cual es esencial en hongos filamentosos. Dicha cepa portaba una copia adicional del gen *actA* bajo la regulación del sistema Tet-on el cual es inducible

por deoxiciclina (Dox). La cepa -OE*actA* fue incapaz de crecer en un medio que careciera de Dox, generando una condición knockout; sin embargo, el crecimiento de la cepa -OE*actA* fue rescatada en un medio que contenía cantidades crecientes de Dox, debido a que la expresión de *actA* fue inducida por el sistema Tet-on.

Una serie de trabajos, han reportado la eficiente utilización del *Pqa-2* para regular la expresión de varios genes (*wc-1*, *wc-2* y *frq*) (Cheng *et al.*, 2001; Schafmeier *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2010) y para la detección de la proteína correspondiente en *N. crassa*, y la expresión del gen *env1* en *Hypocrea jecorina* (Shuster *et al.*, 2007). En *N. crassa* se ha reportado la activación del *Pqa-2* agregando desde  $10^{-7}$  M hasta  $10^{-2}$  M y 0.3% de ácido quínico, generando la sobreexpresión del gen de interés con 0.2% y 0.3% de QA. Sin embargo, en *H. jecorina* (teleomorfo de *T. reesei*) la detección del transcrito de *env1* se observó al añadir una concentración mayor (0.6%) (Shuster *et al.*, 2007) que las reportadas en *N. crassa*, debido a lo anterior empleamos las concentraciones mayores reportadas para la inducción de nuestro sistema (0.3% y 0.6%).

En los ensayos de inducción reportados en *N. crassa* (Cheng *et al.*, 2001; Schafmeier *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2010) utilizan la glucosa al 0.1% en presencia de QA, debido a que la glucosa es una mejor fuente de carbono en comparación con el QA; sin embargo, en *H. jecorina* (Shuster *et al.*, 2007) la glucosa es reemplazada por glicerol considerada también como una buena fuente de carbono. Debido a que la mayoría de los trabajos utilizan la glucosa en presencia de QA, decidimos utilizar la glucosa en nuestros ensayos de inducción.

Se ha demostrado que la conidiación inducida por la luz en *T. atroviride* es dependiente de la función de las proteínas receptoras de luz azul BLR-1 y BLR-2. La proteína BLR-2 es un factor transcripcional que forma parte del complejo

fotoreceptor que regula la expresión de una variedad de genes, entre ellos, genes regulados por luz azul (Casas-Flores *et al.*, 2004).

Con la finalidad de observar si el sistema propuesto en el presente estudio es funcional, realizamos una variedad de ensayos para inducir el *Pqa-2*. Los fenotipos resultantes de la cepa T3FB2 derivado de los ensayos de inducción con QA sugieren una posible inducción del *Pqa-2*. La presencia de al menos una copia extra del gen *blr-2* en el genoma de *T. atroviride* junto con concentraciones mayores del inductor (0.3% y 0.6%) pudo originar la sobreexpresión del gen *blr-2* teniendo como resultado el fenotipo de hiperconidiación que observamos, el cual ha sido reportado para varias cepas sobreexpresantes de dicho gen en *T. atroviride* (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007).

La conidiación observada en T3FB2 aumentó en relación con la concentración empleada del inductor; es decir, a mayor concentración de QA se observó una mayor conidiación en la cepa T3FB2 (Fig. 5). Este resultado nos sugiere la posible modulación del *Pqa-2* teniendo como resultado distintos niveles de la expresión del gen lo cual se vio reflejado en los distintos niveles de conidiación. La variedad de fenotipos obtenidos fue regulado por la concentración de QA lo cual es similar a lo reportado por Meyer *et al.*, (2011) donde obtienen una variedad de fenotipos derivados de las concentraciones empleadas para inducir el sistema Tet-on.

En la regulación de la expresión de genes responsivos a luz azul en *T. atroviride*, también participa la proteína TGF-1 que codifica para un coactivador transcripcional con actividad de acetil transferasa de histonas, la cual ha sido considerada un regulador importante en muchos procesos celulares de *T. atroviride* y *N. crassa* (Brenna *et al.*, 2012; Uresti-Rivera *et al.*, en preparación).

La cepa TMBFG presenta al menos una copia extra de los genes *blr-2* y otra del gen *tgf-1* bajo la regulación del *Pqa-2*. Los análisis fenotípicos mostraron

una mayor producción de conidias en presencia de QA, en comparación con la condición -QA y las cepas control (Fig. 5 y 6), lo cual nos sugiere que probablemente indujimos la expresión de los dos genes río abajo del *Pqa-2* (*blr-2* y *tgf-1*).

En este sentido, cepas de *T. atroviride* que sobreexpresan al gen *tgf-1*, muestran un fenotipo de hiperconidiación (Uresti-Rivera *et al.*, en preparación), por lo cual, nuestros resultados indican un efecto aditivo de los productos de los genes *blr-2* y *tgf-1* al expresarlos en cantidades mayores a las endógenas, resultando en un fenotipo de hiperconidiación mayor al obtenido con la sola sobreexpresión del gen *blr-2*. Aunque se obtuvieron las construcciones correspondientes con el gen *tgf-1*, no fue posible obtener transformantes que permitieran comparar a estas cepas con la transformante para el gen *blr-2* y la co-transformante con ambos genes para llegar a una conclusión definitiva.

Por otro lado, la inducción del *Pqa-2* en la cepa TMBFG se llevó a cabo empleando una concentración mayor (0.8%) que las reportadas en la literatura y que las utilizadas en los experimentos con la cepa portadora de la construcción con el gen *blr-2*, por lo cual no descartamos que el fenotipo potenciado de conidiación, también pueda deberse a que se utilizaron concentraciones más elevadas del inductor y no a la sobreexpresión de *tgf-1* en conjunto con *blr-2* generando un efecto aditivo.

En la condición de -QA la cepa TMBFG presentó un rezago en el crecimiento, pero mostró una ligera sobreproducción de conidias en comparación con la cepa WT (Fig. 6). El crecimiento de la cepa TMBFG empezó a restablecerse a partir del tercer día de crecimiento, lo cual nos puede sugerir que el fenotipo observado pudo derivarse del exceso de glucosa empleado para reprimir la actividad basal del *Pqa-2*, el cual es regulado por represión catabólica (Cheng *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2008) junto con una cantidad mayor de la proteína

TGF-1 derivada de la inducción del gen por la actividad basal del *Pqa-2* en la condición de -QA.

Los datos obtenidos son insuficientes para explicar el fenotipo de la cepa TMBFG en la condición de -QA; sin embargo, varios trabajos han demostrado el papel que juegan las fuentes de carbono en el crecimiento micelial, dicho crecimiento puede ser rápido o lento con base en la fuente de carbono presente en el medio (Friedl *et al.*, 2008; Paraskevi *et al.*, 2012).

Se ha reportado que los niveles de glucosa presentes en el medio de cultivo regulan la función de Gcn5 en la activación o represión de genes en *S. cerevisiae* (Friis *et al.*, 2009). En nuestro sistema, tal regulación pudiera ser negativa reprimiendo la expresión de genes que codifican para el metabolismo de la glucosa originando un pobre crecimiento en la condición de -QA, tal como ocurre en *T. harzianum* donde elevadas concentraciones de glucosa (2%) reprimen la expresión del gen *gtt1* que codifica para un transportador de hexosa (Delgado-Jarana *et al.*, 2003).

El nivel de expresión del gen *blr-2* analizado por RT-PCR fue similar a la de la cepa WT en todos los tiempos analizados (2, 4, 6 y 8h) (Fig. 7), sin embargo, los resultados fenotípicos nos indican la posible inducción del *Pqa-2*, por lo que planteamos el ampliar los tiempos de colecta de las muestras después de haber añadido el QA al medio de cultivo, debido a que las cepas crecidas en medio solido con +QA tuvieron la presencia del inductor desde el inicio de su crecimiento, caso contrario para las condiciones utilizadas en medio líquido, en estos últimos ensayos la cepa se creció en presencia de glucosa durante 2 días para después añadir el QA.

Posiblemente *T. atroviride* requiera un mayor tiempo para metabolizar el ácido quínico, debido a que no es una fuente preferencial de carbono (Giles *et al.*, 1985), y posiblemente *Trichoderma* agote primero sus reservas para más tarde

utilizar el QA, por esta hipótesis, proponemos ampliar los tiempos para la recolección de las muestra en medio líquido, además de realizar RT-PCR cuantitativos.

Los resultados fenotípicos de hiperconidiación en la condición de +QA con distintas concentraciones del inductor, sugieren la posible modulación del *Pqa-2* induciendo la expresión del gen de interés teniendo como resultado fenotipos similares a los ya reportados en la literatura, lo que nos indica que el sistema propuesto en el presente estudio posiblemente es funcional para *T. atroviride*.

Los ensayos adicionales como: la cuantificación de las proteínas BLR-2 y TGF-1 junto con el análisis de la expresión de los genes en las condiciones de – QA y +QA permitirán descartar o afirmar lo propuesto anteriormente. Adicionalmente, los ensayos de co-inmunoprecipitación de la cromatina y de co-inmunoprecipitación de proteínas con los anticuerpos dirigidos contra FLAG o c-Myc y la generación de cepas knockdown ayudaran a probar la funcionalidad del sistema propuesto en el presente trabajo.

## 5. Referencias

Baek, J. M., Kenerley, C. M., 1998. The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system. *Fungal Genet. Biol.* 23, 34-44.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., Codón, A. C., 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strain. *Int. Microbiol.* 7, 249-260.

Brenna, A., Grimaldi, B., Filetici, P., Ballario, P., 2012. Physical association of the WC-1 photoreceptor and the histone acetyltransferase NFG-1 is required for blue light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* 23, 3863-3872.

Carreras-Villaseñor, N., Sánchez-Arreguín, J. A., Herrera-Estrella, A., 2012. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology* 158, 3-16.

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

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

Casas-Flores, S., Herrera-Estrella, A., 2013. The influence of light on the biology of *Trichoderma*. In *Trichoderma: Biology and applications*. Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mukherjee, M. and Schmoll, M. (Eds) London, UK: CABI International

Case, M. E., 1986. Genetic and molecular analyses of QA-2 transformants in *Neurospora crassa*. *Genetics* 113, 569-587.

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

Cheng, P., Yang, Y., Liu, Y., 2001. Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora* circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 7408-7413.

Cristóbal-Mondragón, G. R., 2011. Participación de las proteínas modificadoras de la cromatina TAHOS-2, TARSC-9 y TASET-5 en la respuesta a la luz azul en *Trichoderma atroviride*. Tesis de maestría del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C.

Damelin, M., Simon, I., Moy, T.I., Wilson, B., Komili, S., Tempst, P., Roth, F. P., Young, R. A., Cairns, B. A., Silver, P. A., 2002. The genome-wide localization of Rsc9, a component of the RSC chromatin-remodeling complex, changes in response to stress. *Mol. Cell* 9, 563-73.

Delgado-Jarana, J., Moreno-Mateos, M. A., Benítez, T., 2003. Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: Role of *gtt1*. *Eukariot. Cell* 2, 708-717.

Uresti-Rivera, E. E., 2013. La acetil transferasa de histonas TGF-1 es el coactivador de genes inducibles por la luz azul en *Trichoderma atroviride*. Tesis de maestría del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C.

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

Felenbok, B., Flipphi, M., Nikolaev, I., 2001. Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 69, 149–204.

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

Friis, R. M. N., Wu, B. P., Reinke, S. N., Hockman, D. J., Sykes, B. D., Schultz, M. C., 2009. A glycolytic burst drives glucose induction of global histone acetylation by *picNuA4* and *SAGA*. *Nucleic. Acids. Res.* 37, 3969-3980.

Giles, N. H., Case, M. E., Baum, J., Geever, R., Huiet, L., Patel, V., Tyler, B., 1985. Gene organization and regulation in the *qa* (quinic acid) gene cluster of *Neurospora crassa*. *Microbial. Rev.* 49, 338-58.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, L., Monte, E., 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158, 17-25.

Hong, C. I., Ruoff, P., Loros, J. J., Dunlap, J. C., 2008. Closing the circadian negative feedback loop: FRQ-dependent clearance of WC from the nucleus. *Gene Dev.* 22, 3196-3204.

Honda, S., Selker, E.U., 2009. Tools for fungal proteomics: multifunctional *Neurospora* vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. *Genetics* 182, 11–23.

Howell, C. R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87, 4-10.

Jarvik, J. W., Telmer, C. A., 1998. Epitope tagging. *Annu. Rev. Genet.* 32, 601-618.

Liu, T., Wan, T., Li, X., Liu, X., 2008. Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbh1*) promoter optimization. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40, 158-165.

Meyer, V., Wanka, F., Gent, J., Arentshorst, M., Hondel, C. A., Ram, A. F. J., 2011. Fungal gene expression on demand: an Inducible, Tunable, and Metabolism-Independent Expression System for *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77,2975-2983.

Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective. *Microbiology* 158, 35-45.

Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A., 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172, 1557–1566.

Paraskevi, G., Lockington, R. A., Kelly, J. M., 2012. SAGA Complex Components and Acetate Repression in *Aspergillus nidulans*. *G3* 2, 1357-1367.

Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., Collado, I. G., 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem. Rev.* 7, 89–123.

Schafmeier, T., Káldi, K., Diernfellner, A., Mohr, C., Brunner, M., 2006. Phosphorylation-dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Gene Dev.* 20, 297- 306.

Shi, M., Collet, M., Loros, J. J., Dunlap, J. C., 2010. FRQ-Interacting RNA Helicase Mediates Negative and Positive Feedback in the *Neurospora* Circadian Clock. *Genetics* 184, 351-361.

Shoji, J., Maruyama, J., Arioka, M., Kitamoto, K., 2005. Development of *Aspergillus oryzae thiA* promoter as a tool for molecular biological studies. *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 41-46.

Shoresh, M., Harman, G. E., Mastouri, F., 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 21-43.

Shuster, A., Kubicek, C. P., Friedl, A. A., Druzhinina, I. S., Schmoll, M., 2007. Impact of light on *Hypocrea jecorina* and the multiple cellular roles of ENVOY in this process. *Genomics* 8, 449.

Vogt, K., Bhabhra, R., Rhodes, J. C., Askew, D. S., 2005. Doxycycline regulated gene expression in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *BMC Microbiol.* 5, 1.

Yu, J., Hamari, Z., Han, K., Seo, J., Reyes-Domínguez, Y., Scazzocchio, C., 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 41, 973–981.