



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Las modificaciones de la cromatina y su rol en la
percepción de las señales externas en
*Trichoderma atroviride***

Tesis que presenta

Macario Osorio Concepción

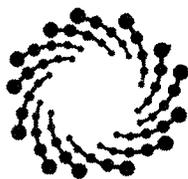
Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. J. Sergio Casas Flores

San Luis Potosí, S.L.P., Febrero de 2017



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Las modificaciones de la cromatina y su rol en la percepción de las señales externas en Trichoderma atroviride***" presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Macario Osorio Concepción** y aprobada el **diecisiete de febrero del dos mil diecisiete** 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. Alejandro De Las Penas Nava
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Carlos Cortés Penagos
Miembro del Comité Tutorial

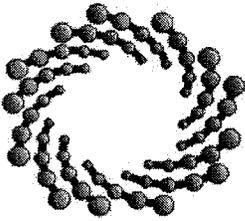


Créditos Institucionales

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.

La investigación descrita en esta tesis fue financiada con recursos otorgados al Dr. J. Sergio Casas Flores por el proyecto SEP-CONACYT CB-2013-01-220791.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 226637) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. (SA-052/2016).



IPICYT

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 092 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 17 días del mes de febrero del año 2017, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Secretario	IPICYT
Dr. Carlos Cortés Penagos	Sinodal externo	UMSNH
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Macario Osorio Concepción

sobre la Tesis intitulada:

Las modificaciones de la cromatina y su rol en la percepción de las señales externas en Trichoderma atroviride

que se desarrolló bajo la dirección de

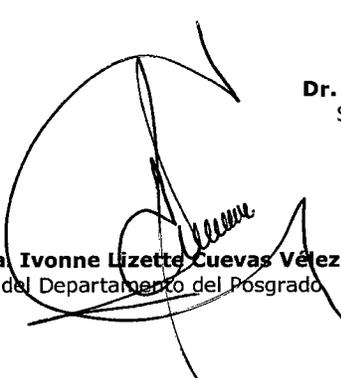
Dr. J. Sergio Casas Flores

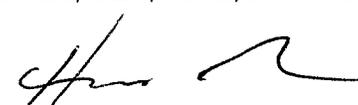
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 17 días del mes de febrero de 2017.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



Dedicatorias

A Dios por todas sus bendiciones

A mis adorados padres; Miguel Osorio Hernández y Juventina Concepción Magdalena que siempre me han brindado su apoyo, consejos, paciencia, confianza, por todos los sacrificios realizados y que me han permitido culminar esta etapa académica.

A mis queridos hermanos por sus consejos, y el apoyo sin límites durante este tiempo.

Agradecimientos

A CONACYT por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

Al IPICYT por permitirme realizar mis estudios de doctorado.

Al Dr. Nicolás Gómez Hernández y a la M. en C. Norma Angélica Pérez Ramírez por el apoyo técnico, consejos y por su valiosa amistad. Gracias!.

Al Dr. Carlos Cortés Penagos por ser parte inicial de mi formación científica, por sus consejos, y por su valiosa amistad.

Al Dr. J. Sergio Casas Flores por permitirme formar parte de su grupo de investigación en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa, y por la asesoría durante la realización de este trabajo de investigación.

A mis sinodales, la Dr. Irene Castaño Navarro, la Dra. Catalina Arenas Huertero, Carlos Cortés Penagos y el Dr. Alejandro de Las Peñas Nava, por sus comentarios y sugerencias en este trabajo de investigación.

A mis compañeros de trabajo y amigos del Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Abreviaturas	ix
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción	1
1. La biología de <i>Trichoderma</i> spp.	1
2. Los factores que inducen la conidiación en <i>Trichoderma atroviride</i>	1
2.1. La luz	1
2.2. El daño mecánico y la limitación de nutrientes	4
3. Las especies de oxígeno reactivas (EORs)	5
4. La estructura y la función de la cromatina	6
4.1. Las metiltransferasas de histonas (HMTs)	6
4.1.1. La metilación y su papel en la respuesta a las señales externas	8
4.2. Las acetiltransferasas de histonas (HATs)	9
4.2.1. La influencia de la acetilación en la transcripción génica	9
4.3. Las desacetilasas de histonas (HDACs)	10
4.3.1. La desacetilación y su papel en la transcripción génica	11
5. RNA de interferencia (RNAi)	11
Antecedentes directos	14
Justificación	15
Objetivo general	15
Objetivos particulares	15
Resultados parte I	16
La proteínas SET-5 y HDA-2 regulan las respuestas a la luz en <i>Trichoderma atroviride</i>	17
Las proteínas HDA-2 y SET-5 regulan diferencialmente la tolerancia a estrés oxidante	20
La delección de SET-5 favorece la tolerancia de las conidias al H ₂ O ₂	25
Los genes <i>dicer</i> y <i>ago</i> son regulados diferencialmente por la luz en <i>Trichoderma atroviride</i>	26
Resultados parte II	28
Constructos de los genes <i>ago1-ago3</i> , <i>hda-2</i> , <i>set-5</i> y <i>tmk-3</i> con las etiquetas FLAG y c-Myc para la transformación de <i>Trichoderma atroviride</i>	29
Discusión parte I	34
Discusión parte II	38

Conclusiones	39
Perspectivas	39
Anexos	41
Materiales y métodos, parte I	42
Materiales y métodos Parte II	43
Materiales y métodos, parte III	44
Participación en otros trabajos	46
Bibliografía	49

Abreviaturas

BLR-1	<u>B</u> lue <u>L</u> ight <u>R</u> egulator-1 (De sus siglas en inglés)
BLR-2	<u>B</u> lue <u>L</u> ight <u>R</u> egulator-2 (De sus siglas en inglés)
WC-1	<u>W</u> hite <u>C</u> ollar-1 (De sus siglas en inglés)
WC-2	<u>W</u> hite <u>C</u> ollar-2 (De sus siglas en inglés)
PAS	Per, Arnt, Sim
LOV	Luz, Oxígeno y Voltage
BLRC	<u>B</u> lue <u>L</u> ight <u>R</u> egulator <u>C</u> omplex (De sus siglas en inglés)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ATP	Adenosín Trifosfato
RNA	Ácido Ribonucleico
DNAc	DNA complementario
AMPc	Adenosín Mono Fosfato cíclico
FAD	Flavín Adenin Dinucleótido
H3	Histona H3
H4	Histona H4
HDAC	Histone Deacetylase (De sus siglas en inglés,)
HAT	Histone Acetyltransferase (De sus siglas en inglés)
HMT	Histone Methyltransferase (De sus siglas en inglés)
kb	Kilobases
pb	Pares de bases
µg	Microgramos
µmol	Micromol
µM	Micromolar
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
EORs	Especies de oxígeno reactivas
ChIP	Immunoprecipitación de la cromatina
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa cuantitativa

Resumen

Las modificaciones de la cromatina y su rol en la percepción de las señales externas en *Trichoderma atroviride*

Las enzimas que modifican la cromatina modulan las respuestas a las señales ambientales de los organismos a través de la reprogramación de la transcripción génica. Sin embargo, elementos adicionales en el contexto de la cromatina que integren la vía de la regulación a los estímulos de estrés no se han identificado. En el presente trabajo, evaluamos la función de HDA-2 y SET-5 en la respuesta a la luz azul y al estrés oxidante en *T. atroviride*. Las mutantes $\Delta hda-2$ presentaron un crecimiento lento, ausencia de conidiación y bajos niveles de expresión del gen *con-1*. En cambio, la cepa $\Delta set-5$ mostró una mayor conidiación y la rápida expresión de *con-1* y *hymA* en respuesta a la luz azul. La transcripción de *hda-2* inducida por la luz fue dependiente de la proteína BLR-1, mientras que HDA-2 es esencial para la transcripción de los genes responsivos a la luz, que incluyen a *blr-1* y *-2* (Blue Light Regulator-1 y -2). En la presencia de estrés oxidante, las mutantes $\Delta hda-2$ mostraron un fenotipo sensible, mientras que las cepas $\Delta set-5$ y Δblr exhibieron un fenotipo opuesto. Estos resultados fueron consistentes con la inducción de los genes relacionados a EORs en las cepas wt, $\Delta set-5$ y $\Delta blrs$, y su baja expresión en $\Delta hda-2$. De manera interesante, los niveles de la acetilación en los promotores de los genes *cat-3* y *gst-1* depende HDA-2 y de las proteínas BLR. Nuestros resultados sugieren la dependencia mutua de HDA-2 y los reguladores BLR para regular la transcripción génica en respuesta a la luz azul y al estrés oxidante. Por otra parte, La maquinaria de la biogénesis de los sRNAs de *T. atroviride* se han visto implicados en el desarrollo del hongo. Nuestros resultados indican que los genes *dcr* y *ago*, son regulados por la luz azul. Sin embargo, la ausencia de la acetiltransferasa de histonas TGF-1 desregula la expresión de estos genes. Estos datos sugieren que TGF-1 regula positivamente la expresión de los genes *dcr* y *ago* debido a que esta proteína regularmente actúa como coactivador de la transcripción.

Palabras clave. *Trichoderma*, Luz azul, Estrés oxidante, Proteínas BLR, Dicer, Argonauta, Acetiltransferasa de histonas, Metiltransferasa de histonas, Gcn5p, NGF-1,, Desacetilasas de histonas, HDA-2, Hos2p.

Abstract

Role of chromatin modifications in the perception of external cues in *Trichoderma atroviride*

Fungal blue-light photoreceptors have been proposed as integrators of light and oxidative stress. However, additional elements participating in the integrative pathway remain to be identified. In *Trichoderma atroviride*, the blue-light Regulator (BLR) proteins BLR-1 and -2 are known to regulate gene transcription, mycelial growth and asexual development upon illumination. Here, we evaluate the role of HDA-2 and SET-5 in the regulation of genes responsive to light and oxidative stress by assessing responses to stimuli in wild-type, $\Delta hda-2$ and $\Delta set-5$ strains. $\Delta hda-2$ strains present reduced growth, misregulation of the *con-1* gene and absence of conidia in response to light and mechanical injury. Furthermore, $\Delta set-5$ showed more conidiation induced by blue light and early induction of *con-1* and *hymA* genes. We found that the expression of *hda-2* is BLR-1 dependent and HDA-2 in turn is essential for the transcription of light-responsive genes that include *blr-1* and *blr-2*. When subject to reactive oxygen species (ROS), $\Delta hda-2$ mutants displayed high sensitivity whereas $\Delta set-5$ and Δblr strains exhibited the opposite phenotype. Consistently, in the presence of ROS, ROS-related genes show high transcription levels in wild-type, $\Delta set-5$ and Δblr strains but misregulation in $\Delta hda-2$. Finally, chromatin immunoprecipitations of histone H3 acetylated at Lys9/Lys14 on *cat-3* and *gst-1* promoters display low accumulation of H3K9K14ac in Δblr and $\Delta hda-2$ strains. Our results point to a mutual dependence between HDA-2 and BLR and reveal the role of these proteins in an intricate gene-regulation landscape in response to blue light and ROS. Moreover, the biogenesis machinery components of small RNAs from *T. atroviride* regulate fungal development. Here we showed that expression of *dcr* and *ago* genes increased after a brief pulse of blue light in *T. atroviride* wild type, whereas it dropped in a $\Delta tgf-1$ background, whose product codes for a histone acetyltransferase. These data suggest that TGF-1 acts as positive regulator of *dcr* and *ago* transcription, similarly to TGF-1 orthologs have been described as transcription coactivators.

Key words. *Trichoderma*, blue light, oxidative stress, BLR proteins, histone acetylation, Gcn5p, NGF-1, histone deacetylases, HDA-2, Hos2p, dicer, argonaute, histone methyltransferase.

Introducción

1. La biología de *Trichoderma* spp.

Las especies del género *Trichoderma* son hongos filamentosos que habitan en una gran variedad de ecosistemas, ya que son capaces de colonizar la materia orgánica en descomposición, madera caída, toleran condiciones extremas de temperatura, salinidad y pH, entre otras (Druzhinina *et al.*, 2012; Hermosa *et al.*, 2013; Nicolás *et al.*, 2014). Algunas especies de *Trichoderma* se utilizan como agentes de control biológico, debido a que mejoran la salud de las plantas al inhibir a los patógenos a través de su capacidad micoparasítica, la producción de enzimas líticas que degradan la pared celular, la producción de antibióticos, la secreción de metabolitos secundarios, la competencia por los nutrientes de la rizósfera, la estimulación del crecimiento y la inducción de la resistencia sistémica (Brotman, Kapuganti, and Viterbo 2010; Viterbo and Horwitz 2010; Druzhinina *et al.* 2011). La esporulación asexual (conidiación) es el principal mecanismo de supervivencia y de dispersión de *Trichoderma*. Este tipo de reproducción consiste en la diferenciación de las hifas hialinas que culmina con el desarrollo de las conidias que se caracterizan por su forma ovoide con pigmentación verde y con núcleo haploide (Rosen *et al.*, 1974).

2. Los factores que inducen la conidiación en *Trichoderma atroviride*

2.1. La luz

Los organismos están constantemente expuestos a diversos cambios ambientales que afectan su supervivencia y proliferación, por lo cual han desarrollado mecanismos para detectar, adaptarse, ubicar su entorno y responder de manera específica a cada uno de los estímulos. La luz es un factor abiótico que causa efectos cruciales en la fisiología y comportamiento de los organismos. En los hongos, la luz regula la reproducción asexual y sexual, el fototropismo, la síntesis de pigmentos y el ritmo circadiano (Rodríguez-Romero *et al.*, 2010; Casas-Flores and Herrera-Estrella, 2013). *Trichoderma atroviride* se utiliza como organismo modelo para investigar los mecanismos de la percepción de la luz. En la oscuridad y con los nutrientes ilimitados en el medio, *T. atroviride* crece como micelio hialino (**Figura 1a**), mientras que la aplicación de un pulso de luz azul lleva a la formación de un anillo de conidias, exclusivamente, en la periferia de la colonia donde se aplicó el estímulo (**Figura 1b**) (Gressel and Galun, 1967; Horwitz *et al.*, 1985; Betina, 1995). De manera distinta a los anillos concéntricos de conidias formados con 12 h de ciclos de luz/oscuridad (**Figura 1c**) o después de un pulso de luz azul,

las cepas expuestas a la luz de manera constante conidian en toda la colonia (**Figura 1d**) (Horwitz, Perlman and Gressel, 1990; Betina, 1995; Steyaert, Weld and Stewart, 2010a, 2010b).

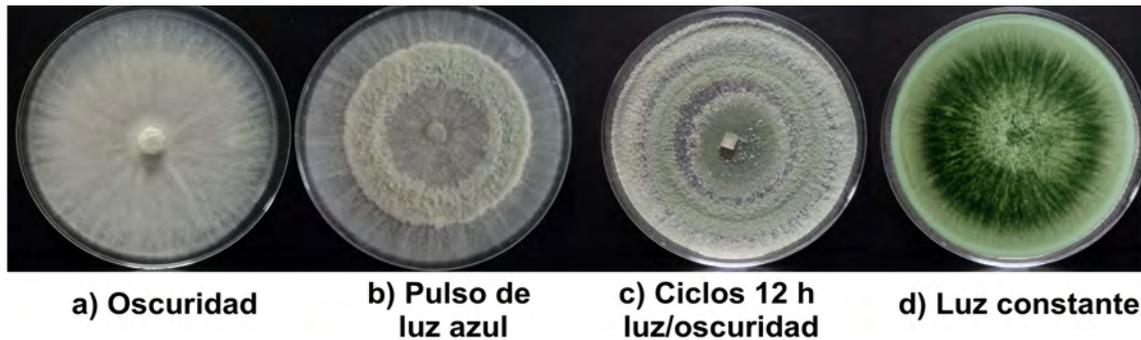


Figura 1. Fotoconidiación de *Trichoderma atroviride*. Las fotografías muestran la formación de las conidias en las cepas silvestre como respuesta a la luz. **a)** Crecimiento de una colonia en la oscuridad con abundante micelio hialino. **b)** Anillo de conidiación formado 48 h después de recibir un pulso de luz azul (5 min). **c)** Conidiación de una colonia expuesta a ciclos de 12 h luz/oscuridad por 96 h. **d)** Conidiación en toda la colonia inducida por la exposición a la luz constante (Esta última foto, tomada y modificada de (Carreras-Villaseñor, 2013)).

El proceso de la formación de las conidias ocurre alrededor de 24 h después del pulso de luz y consiste de 5 etapas: **(a)** las hifas aéreas se forman a las 4 h; **(b)** se diferencian a conidióforos 9 h después del estímulo; **(c)** el desarrollo de las fiálides (Estructuras dispuestas en el ápice de los conidióforos, sobre la cual se originan las conidias) inicia a las 12 h; **(d)** la formación de conidias ocurre a las 16 h, **(e)** finalmente, 24 h después del pulso se observan conidias maduras (**Figura 2**) (Horwitz, Perlman and Gressel, 1990; Betina, 1995; Steyaert, Weld and Stewart, 2010a, 2010b). Adicionalmente, se han reportado otras respuestas fisiológicas y moleculares activadas por la luz, que incluyen: el incremento en los niveles de AMPc, cambios en los patrones de la fosforilación de las proteínas (Gresik, Kolarova and Farkas, 1988), el incremento en la actividad de la adenilil ciclasa, cambios en el potencial de la membrana (Horwitz *et al.*, 1984), variación en la concentración de ATP (Gresik, Kolarova and Farkas, 1988; Tánová, Farkaš and Betina, 1995) y en la transcripción génica (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006).

2.1.2. Los reguladores de la luz azul, BLR-1 y BLR-2

Estudios genéticos moleculares, bioquímicos y fotobiológicos revelaron la participación de sistemas de percepción que regulan la respuesta a la luz en *T. atroviride* (Berrocal-Tito *et al.*, 2000; Rocha-Ramírez *et al.*, 2002; Casas-Flores *et al.*, 2006). Las proteínas Blue Light Regulator -1 (BLR-1) y -2 (BLR-2), ortólogas a White Collar-1 (WC-1) y White Collar-2 (WC-2) de *Neurospora crassa*, se identificaron y se caracterizaron en *T. atroviride* (Casas-Flores *et al.*, 2004). Ambas proteínas presentan dominios PAS (Per-Arnt_sim) importantes para las interacciones proteína-proteína, y dominios de unión a DNA tipo dedo de Zn que les confiere un rol de factores de transcripción (**Figura 3**) (Casas-Flores *et al.*, 2004). Uno de los dominios PAS presentes en BLR-1 es un dominio especializado en detectar Luz, Oxígeno y Voltaje (LOV), y contiene los residuos de aminoácidos necesarios para unir un cromóforo de flavina (**Figura 3**), por lo cual se considera a BLR-1 como el fotorreceptor de la luz azul en conjunto con BLR-2 (Casas-Flores *et al.*, 2004). Adicionalmente, en la proteína BLR-2 se identificó un dominio putativo para la unión a desacetilasas de histonas (HDACs) (**Figura 3**; (Schmoll, Esquivel-Naranjo and Herrera-Estrella, 2010).

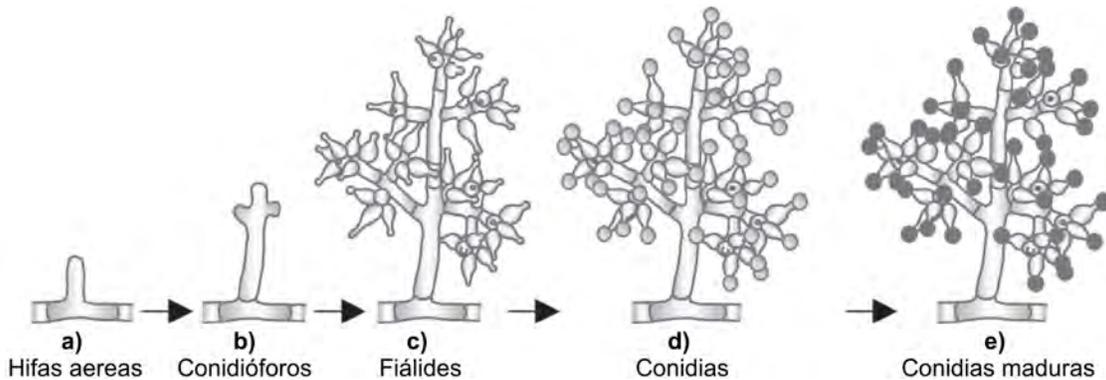


Figura 2. La diferenciación de las hifas durante el proceso de conidiogénesis de *Trichoderma* spp., en respuesta a la luz. El proceso de la diferenciación de las hifas y el desarrollo de las conidias ocurre 24 h después de recibir el pulso de luz azul, y se observan las siguientes etapas;

a) La formación de las hifas aéreas, **b)** El desarrollo de los conidióforos de las hifas aéreas, **c)** La formación de las fiálides sobre los conidióforos, **d)** Se observa la producción de las conidias, **e)** Ocorre la maduración de las conidias. Tomada y modificada de (Steyaert *et al.*, 2010).

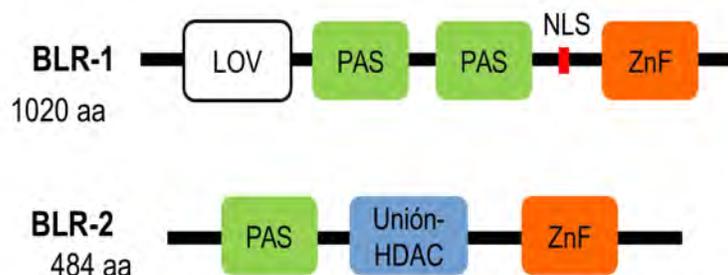


Figura 3. Estructura de las proteínas BLR-1 y BLR-2 de *T. atroviride*. LOV, Dominio sensorial de unión a cromóforo FAD, PAS; Dominios de interacción entre proteínas, NLS; Dominio de localización nuclear, ZnF; Dominios de unión a DNA tipo dedo de Zinc, Unión-HDAC; Dominio putativo de unión para una desacetilasa de histonas (Tomada y modificada de (Schmoll, Esquivel-Naranjo and Herrera-Estrella, 2010)).

Las mutantes $\Delta blr-1$ y $\Delta blr-2$ de *T. atroviride* pierden la capacidad de conidiar y su fenotipo es equivalente al de la cepa silvestre crecida en la oscuridad (Casas-Flores *et al.*, 2004). El crecimiento micelial y la transcripción de los genes responsivos a la luz, también se afectaron negativamente con la delección de los genes *blr-1* y *-2* (Casas-Flores *et al.*, 2004; Rosales-Saavedra *et al.*, 2006). Se ha postulado que los genes responsivos a la luz podrían ser parte de la vía de activación de la fotoconidiación. Sin embargo, el silenciamiento a través de la expresión del cDNA de los genes *blu* en orientación antisentido no suprimió la conidiación inducida por la luz en *T. atroviride* (Esquivel-Naranjo, 2007). Datos recientes indican que el gen *blu7*, el cual codifica para un factor de transcripción putativo tipo dedo de zinc C2H2, regula la sensibilidad a la luz debido a que se encontró una reducción en la cantidad de conidias formadas en una mutante $\Delta blu7$ (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006; Cetz-Chel *et al.*, 2016).

2.2. El daño mecánico y la limitación de nutrientes

Se ha demostrado que el daño mecánico y la limitación de nutrientes (carbono, nitrógeno y fosfato), también, inducen la conidiación en *T. atroviride* (Casas-Flores *et al.*, 2004; Steyaert, Weld and Stewart, 2010a; Hernández-Oñate *et al.*, 2012; Osorio-Concepción, Casas-Flores and Cortés-Penagos, 2013). Los dominios PAS que pertenecen al subgrupo de dominios LOV que unen un cromóforo de flavina, similar a uno de los dominios identificados en la proteína BLR-1, funcionan como módulos de señalización debido a que detectan señales intra- y extracelulares tales como el oxígeno, cambios en el potencial redox y la luz (Taylor and Zhulin,

1998). Durante la caracterización de las mutantes *Δblr-1* y *-2*, se descubrió que el daño al micelio activa la conidiación, únicamente en el sitio dañado (Casas-Flores *et al.*, 2004). Análisis transcriptómicos en respuesta al daño mecánico mostraron la inducción y la represión de 522 y 411 genes, respectivamente (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). La mayoría de los genes inducidos codifican para proteínas involucradas en el estrés oxidante, el balance redox, la señalización, el transporte de calcio, la respuesta al estrés, el ciclo celular y la síntesis de oxilipinas. En cambio, los genes que se reprimen están relacionados a procesos del metabolismo, la transcripción, y en la neutralización de las especies de oxígeno reactivas (EORs) (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Notablemente, la adición de agentes antioxidantes suprime la conidiación por daño mecánico, lo cual establece el vínculo entre el estrés oxidante y la esporulación asexual en *T. atroviride* (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Se ha reportado en los hongos que las proteínas G heterotriméricas, las proteínas cinasas A dependiente de AMP cíclico (cAMP-PKA) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) constituyen los reguladores moleculares de la activación de vías de señalización para la respuesta apropiada a las señales ambientales (Bahn *et al.*, 2007).

3. Las especies de oxígeno reactivas (EORs)

Los organismos aerobios utilizan el oxígeno molecular (O_2) como el último aceptor de electrones durante la respiración mitocondrial para la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) (Heller and Tudzynski, 2011). A pesar de que el oxígeno es importante para la respiración celular, éste llega a ser tóxico debido a la formación de EORs. La transferencia de energía al oxígeno produce el oxígeno singulete (1O_2), mientras que la reducción parcial secuencial por la transferencia de electrones al oxígeno forma el superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH \cdot) (Heller and Tudzynski, 2011). Estas especies reactivas causan daño celular debido a que oxidan a las proteínas, a los lípidos y a los ácidos nucleicos (Reinheckel *et al.*, 1998; Neill *et al.*, 2002). Sin embargo, las EORs regulan la diferenciación celular en los organismos eucariotas a través de las modificaciones redox de las proteínas regulatorias, tales como las MAPKs, las proteínas G, las proteínas Ras, las proteínas tirosina fosfatasa (PTPs) y los factores de transcripción (Delaunay *et al.*, 2002; Adachi *et al.*, 2004; Veal *et al.*, 2004). En los hongos, las NADPH oxidasas (NOX), son las principales generadoras de EORs intracelular para regular diversos procesos celulares (Finkel, 2003; Foreman *et al.*, 2003). Las enzimas NOX catalizan la reducción del oxígeno molecular en una reacción con NADPH para formar el superóxido y H_2O_2

(peróxido de hidrógeno) (Bedard and Krause, 2007). La naturaleza difusible de las EORs, les confiere un carácter de segundos mensajeros para activar las vías de señalización (Takemoto, Tanaka and Scott, 2007). *T. atroviride* presenta tres genes *nox*, dos codifican para las subunidades catalíticas (*nox-1* y *-2*), mientras que el tercer gen codifica para la subunidad regulatoria (*nox-R*). Las mutantes Δ *nox-1* y Δ *nox-R* no formaron conidias después del daño mecánico, mientras que la delección de *nox2* no afectó la conidiación (Hernández-Oñate *et al.*, 2012). Estos resultados resaltan la importancia del estado oxidante intracelular inducido por la actividad de las NADPH oxidasas para el desarrollo de los hongos.

4. La estructura y la función de la cromatina

La cromatina es un complejo de DNA y proteínas histonas, cuya unidad fundamental es el nucleosoma; constituido por un octámero de histonas con dos copias de las proteínas H2A, H2B, H3, H4, y por 146 pares de bases (pb) de DNA alrededor de éstas (Kornberg and Lorch, 1999; Wu and Grunstein, 2000). Las histonas presentan colas amino terminales que son susceptibles a modificaciones químicas postraduccionales. Estas modificaciones afectan la estructura de la cromatina que conduce ya sea a un estado relajado (Eucromatina) asociado con la activación de la transcripción génica, o bien a un estado condensado (Heterocromatina) que se relaciona con la represión (Berger, 2007; Turner, 2007). Las principales modificaciones en la cromatina son: la metilación, la acetilación y la desacetilación. Las modificaciones mencionadas, son catalizadas por las metiltransferasas de histonas (HMTs), las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las desacetilasas de histonas (HDACs), respectivamente, sobre los residuos de lisina, arginina, serina y treonina (Zhang *et al.*, 2007). Se ha propuesto, que el estado transcripcional en eucariontes se regula por un código de histonas, la cual consiste en un patrón de las modificaciones de las histonas en los diferentes residuos (Jenuwein and Allis, 2001).

4.1. Las metiltransferasas de histonas (HMTs)

La mayoría de las HMTs contienen un dominio SET conservado (Su (var) 3-9, Enhancer of zeste, Thritorax domain) importante para la metilación de las lisinas (Tschiersch *et al.*, 1994; Xhemalce *et al.*, 2011). Las HKMTs y las PRMTs transfieren un grupo metilo a las lisinas y argininas de las histonas H3 y/o H4, respectivamente, de S-adenosil-L-metionina (AdoMet) (**Figura 4a y b**). Las lisinas pueden ser mono-, di- y tri-metiladas, mientras que las argininas son mono- y di-metiladas de manera simétrica o asimétrica. La eliminación de los grupos metilo

puede ser mediada por desmetilasas de histonas que contienen un dominio JmjC (JHDMS) y/o LSD1 (**Figura 4a y b**). LSD, exclusivamente, elimina mono o trimetilaciones, mientras JHDMS remueve los tres estados de metilación (Barski *et al.*, 2007; Heintzman *et al.*, 2009). A diferencia de la acetilación, la metilación no altera la carga de las histonas, pero funciona como marcas para la unión de (Musselman *et al.*, 2012) proteínas lectoras que reconocen los estados de metilación definidos (Musselman *et al.*, 2012). Por ejemplo, la trimetilación de la histona H3 en la lisina K4 y lisina 36 (H3K4me3, H3K36me3) se asocia con la activación de la transcripción, mientras que la trimetilación en la H3K9, H3K27 y H4K20 ejerce un efecto opuesto (Barski *et al.*, 2007). En *T. atroviride* se identificaron 15 HKMTs; DIM5/CLR4 (TA_131894), SET1 (TA_171650), SET2 (TA_241288,TA_138765), ASH-1 (TA_276289), SET3/SET4 (TA_226045), SET5 (TA_86045, TA_286297, TA_183670, TA_94162), SET9 (TA_295421, TA_79382), En(z) (TA_171932), SMYD (TA_79702, TA_29913). De las cuales 4 son ortólogos a Set5p de *S. cerevisiae* (Schmoll *et al.*, 2016). Adicionalmente, presenta en su genoma cada una de las PRMTs descritas (PRMT1[TA_243745], PRMT3 [TA_164996], PRMT5 [TA_295253]) (Schmoll *et al.*, 2016).

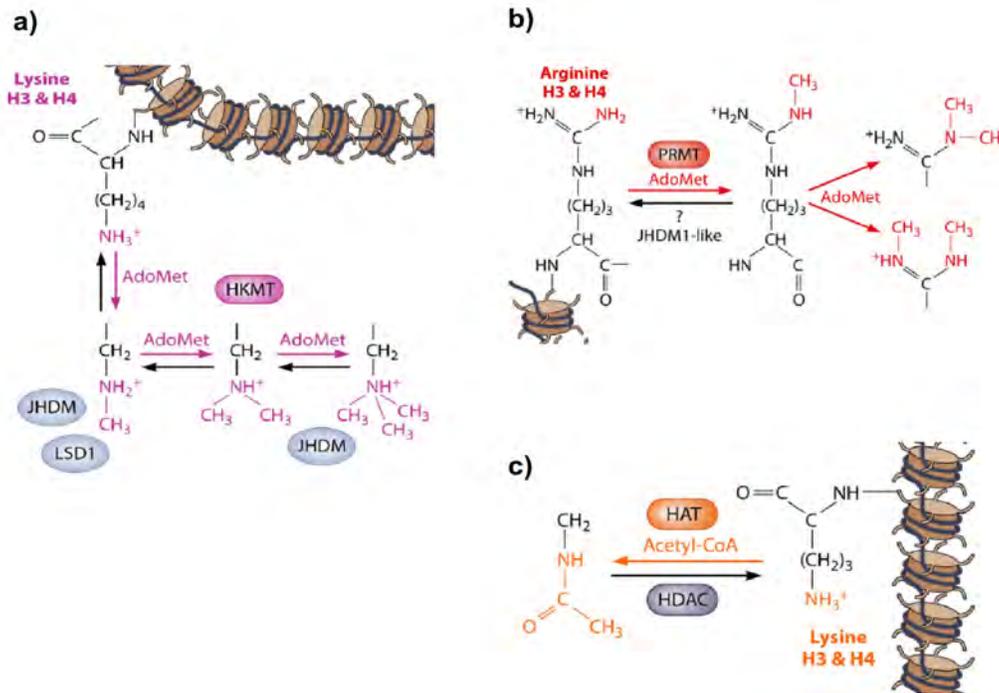


Figura 4. Enzimas modificadoras de la cromatina. Las HKMTs (a) y las PRMTs (b) añaden un grupo metilo a las histonas H3 y/o H4, respectivamente, de S-adenosil-L-metionina (AdoMet). La eliminación de los grupos metilo puede ser mediada por las desmetilasas de histonas que contienen un dominio JmjC (JHDMs) y/o LSD1. c) Las acetiltransferasas de histonas (HATs) transfieren un grupo acetilo de acetil-CoA a los residuos de lisinas de las histonas H3 y H4. c) Las HDACs remueven los grupos acetilo de las lisinas de la histona H3 o H4, (Tomada y modificada de (Schmoll *et al.*, 2016).

4.1.1. La metilación y su papel en la respuesta a las señales externas

En *N. crassa* las mutantes $\Delta dim-5$ y $\Delta set-1$ presentaron mayor expresión de *frq*. Adicionalmente, las cepas $\Delta dim-5$ mostraron una mayor conidiación, mientras que la ausencia de SET-1 afectó la ritmicidad de la formación de conidias (Raduwan, Isola and Belden, 2013; Ruesch *et al.*, 2015). De manera interesante, la unión de White Collar-2 en el promotor *frq* permanece por más tiempos en las mutante $\Delta dim-5$ y $\Delta set-1$, lo cual sugiere un estado relajado de la cromatina. La función de SET-5 y SET1 es importante para modular la respuesta circadiana y a la luz a través de la compactación de la cromatina (Raduwan, Isola and Belden, 2013).

4.2. Las acetiltransferasas de histonas (HATs)

Las HATs utilizan acetil coenzima A para transferir un grupo acetilo a los residuos de lisina de las histonas (**Figura 4c**) (Kölle *et al.*, 1998). Se ha postulado que la acetilación neutraliza la carga positiva de las lisinas para debilitar las interacciones entre las histonas y el DNA (Workman and Kingston, 1998). Este tipo de modificación, generalmente, conlleva a la activación de la transcripción génica, por lo tanto, las HATs son consideradas como coactivadores de la transcripción (Fletcher and Hansen, 1996; Workman and Kingston, 1998). Las HATs se dividen en dos clases: las de tipo A y B (Brownell *et al.*, 1996). Las de tipo A se localizan en el núcleo, e interactúan con complejos multiproteínas y son una familia más diversa de enzimas que las tipo B (Parthun, 2012). Sin embargo, se pueden dividir en tres grupos en función de la estructura conformacional y la homología a nivel de secuencia de aminoácidos: la familia GNAT, la MYST, y CBP/300 (Hodawadekar and Marmorstein, 2007). Generalmente este tipo de HATs acetilan las histonas de la cromatina. En *T. atroviride* se han identificado los ortólogos de HATs de la familia GNAT y MYST, que incluyen: HAT1 (TA_295148), GCN5 (TA_47901), ELP3 (TA_156760), Spt10p (TA_222395), Sas3 (TA_275394), Esa1 (TA_263693), Sas2 (TA_222668) (Schmoll *et al.*, 2016). Las HATs de tipo B son citoplásmicas y acetilan a las histonas libres recién sintetizadas, pero no a aquellas incorporadas en la cromatina (Parthun, 2007). *T. atroviride* contiene solo una HATs de tipo B; Rtt109p (TA_278283) (Schmoll *et al.*, 2016).

4.2.1. La influencia de la acetilación en la transcripción génica

La proteína p55 de *Tretahymena thermophila* fue la primera proteína identificada con actividad HAT tipo A y es ortóloga a la proteína Gcn5 (General control nonderepressible-5) de *S. cerevisiae* (Georgakopoulos and Thireos, 1992; Brownell *et al.*, 1996). Varios estudios en *N. crassa* han demostrado que la acetilación transitoria de la histona H3 en el promotor del gen *al-3* induce su expresión dependiente del fotoreceptor WC-1 en respuesta a un pulso de luz azul (Grimaldi *et al.*, 2006). Las cepas con una mutación el gen que codifica para H3 (hH3K14Q) presentaron una disminución en los niveles de expresión de *al-3* en respuesta a la luz, similar a la mutante $\Delta wc-1$ (Grimaldi *et al.*, 2006). En este mismo trabajo, la mutación de *ngf-1* (*gcn five -1*) en *N. crassa*, ortólogo a GCN5 de *S. cerevisiae*, resultó una cepa sin acetilación de la histona H3K4 y afectada en la fotoinducción (Grimaldi *et al.*, 2006). Las mutantes *ngf-1*^{RIP1} and $\Delta wc-1$ mostraron una reducción en los niveles de acetilación de H3K14 (Brenna *et al.*, 2012). Se ha descrito que la NGF-1 interactúa físicamente con la proteína WC-1

para ejercer su actividad de HAT y regular la fotorespuesta en *N. crassa* (Brenna *et al.*, 2012). De manera interesante, el complejo NGF-1/WC-1 se forma en la oscuridad, pero solo después del pulso de luz acetila a las histonas. Probablemente, el estímulo luminoso induce cambios conformacionales en el dominio LOV de WC-1 y posiciona a NFG-1 en los nucleosomas (Crosson and Moffat, 2002). La delección de GCN5 en *T. reesei* causó un crecimiento lento, cambios morfológicos y sin conidiación. La acetilación de la histona H3K9/14 en el promotor de los genes que codifican para celulasas en *T. reesei* disminuyó drásticamente, al igual que su transcripción, debido a la delección de la HAT TrGCN5 (Xin *et al.*, 2013).

4.3. Las desacetilasas de histonas (HDACs)

Las enzimas HDACs remueven el grupo acetilo de las histonas (**Figura 4c**) para restaurar la carga positiva de las lisinas y favorecer la compactación de la cromatina, por lo cual se consideran como correpresores de la transcripción génica (Finnin *et al.*, 1999; Berger, 2007). Los residuos blanco de las proteínas HDAC son las lisinas 9, 14, 18 de la H3, y lisinas 8, 12, 16, 20 de la H4 (Fierz and Muir, 2012). Las HDACs se clasifican en tres grupos: 1) la familia HDAC clásica que se divide en clase I y II, 2) la familia de sirtuinas, 3) la familia HD específica de las plantas (Pandey *et al.*, 2002). Las HDACs clase I están relacionadas al regulador transcripcional RPD3 (reduced potassium dependency-3) de *S. cerevisiae*, mientras que las de clase II comparten homología con la HDA1 (histone deacetylase 1), identificada en levaduras (Fischle *et al.*, 2002). Nuestro modelo de estudio, *T. atroviride* contiene HDACs clásicas (tipo RPD3/HDA1): RPD3 (TA_163610), HDA1 (TA_39952), HDA-2 (TA_212638), y HOS-B (TA_161985) (Schmoll *et al.*, 2016). También se encontraron en *T. atroviride* HDACs de la familia de las Sirtuinas, homólogas a la proteína reguladora de la información silenciosa 2 de *S. cerevisiae* (Sir2, por sus siglas en inglés): HST1 (TA_51699), HST2 (TA_166209), HST3 (TA_215446), HST5 (299367), y HST6 (TA_81752) (Schmoll *et al.*, 2016).

4.3.1. La desacetilación y su papel en la transcripción génica

En los hongos, la acetilación y la desacetilación se asocian con diversos procesos tales como los factores de patogenicidad, la respuesta al estrés, el metabolismo secundario, el crecimiento micelial y la conidiación. En el patógeno *Cochliobolus carbonum*, la delección del gen *HDC1*, ortólogo a *HOS2* de *S. cerevisiae* afectó negativamente la virulencia, la expresión de los genes que codifican para enzimas que degradan la pared celular y la morfología de las conidias (Baidyaroy *et al.*, 2001). Se ha demostrado en *S. cerevisiae*, que las HDACs Rpd3 se requieren para la activación y la represión de la transcripción, a través de su interacción con complejos de preiniciación de la transcripción (Sharma *et al.*, 2007). En el 2002, (Wang, Kurdistani and Grunstein, 2002)., se demostró que Hos2 se une a las regiones codificantes de genes para su activación a través de la desacetilación de las lisinas de las histonas H3 y H4. En este sentido, el complejo corepresor Tup1 recluta a las HDACs para la desacetilación de los nucleosomas y promueve la interacción histonas-Tup1 para la regulación génica en levaduras (Watson *et al.*, 2000). En el hongo fitopatógeno *Magnaporthe Oryzae*, la ausencia de la HDAC *HOS2* y/o otros componentes del complejo corepresor transcripcional, tales como *Tig1*, *Set3* y *Snt1*, disminuyó el crecimiento invasivo a las plantas de arroz, la formación de conidias y la resistencia al estrés (Ding *et al.*, 2010). Estudios acerca de la exposición de células epiteliales a estrés oxidante revelaron una alta actividad de las HDACs clasel/II, lo cual sugiere que el estrés oxidante modifica transitoriamente la estructura de la cromatina a través de la modulación de la actividad de las enzimas HDACs (Niu *et al.*, 2015).

5. RNA de interferencia (RNAi)

Se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional y transcripcional conocido como RNA de interferencia (RNAi), donde los principales efectores son moléculas de RNA no codificantes pequeñas (sRNAs) y largas (lncRNAs) (Lee, Feinbaum and Ambros, 1993; Hombach and Kretz, 2016). A partir del descubrimiento del sRNA *lin-4* en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, se han identificado diferentes clases de sRNAs no codificantes en las plantas, las moscas y los mamíferos. Por la estructura precursora, la biogénesis y el modo de acción, los sRNAs se clasifican generalmente en tres categorías: microRNAs (miRNAs), RNAs pequeños interferentes (siRNAs) y RNAs asociados a piwi (piRNAs) (Farazi, Juraneck and Tuschl, 2008; Siomi *et al.*, 2011; Jiang, Wei and Li, 2012). La categoría miRNA son de origen endógeno, derivada de precursores de RNA plegados sobre si mismos

con estructuras tipo tallo-asa, y transcritos a partir de los genes miRNAs (**Figura 5b**).

En animales, los miRNAs son transcritos, generalmente, por la RNA polimerasa II como transcritos miRNA primarios (pri-miRNA) (**Figura 5b**). Los pri-miRNAs son procesados por el complejo microprocesador formado por la proteína RNAsa III Drosha y la proteína de unión a RNA de doble cadena DGCR8 (o Pasha en moscas) para generar el precursor miRNA (pre-miRNA) (**Figura 5b**). El pre-miRNA se transporta al citosol por la exportina 5 (EXP5). En el citosol, el pre-miRNA se procesa a miRNA dúplex de 21 nucleótidos, aproximadamente, por la RNAsa III Dicer en conjunto con su cofactor TRBP o PACT (**Figura 5b**). La biogénesis de los miRNAs en las plantas difiere sustancialmente de la de animales. En las plantas, los miRNAs se producen del pri-miRNA por la RNAsa nuclear similar a Dicer-1 (DCL1, por sus siglas en inglés) y las proteínas SERRATE (SE) e HYPOPLASTIC LEAVES (HYL1) (**Figura 5a**). La hebra guía del miRNA dúplex preferencialmente se incorpora a una de las proteínas de la familia Argonauto (AGO) para formar el complejo RISC (por sus siglas en inglés, RNA-Induced Silencing Complex). La hebra pasajera del miRNA dúplex, también, puede ser incorporado por alguna de las proteínas AGO. La región semilla (seed) de los miRNAs localizada en el extremo 5' que abarca del nucleótido 2 al 8, es crucial para la complementariedad de bases en la región 3' no traducible (3'-UTR) del mRNA y para el silenciamiento génico (Jiang, Wei and Li, 2012; Saito *et al.*, 2012; Hombach and Kretz, 2016). El miRNA de cadena sencilla maduro incorporado en AGO actúa como guía para la unión del complejo RISC a los sitios complementarios, generalmente, localizadas dentro de la región 3'-UTR del mRNA blanco. La unión del miRNA al RNAm blanco puede ser de forma parcial y/o perfecta (Sun *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2012). La complementariedad parcial resulta en la inhibición de la traducción del RNAm (**Figura 5b**), donde la proteína efectora AGO evita la formación del complejo de iniciación de la traducción (**Figura 5b**). Este tipo de silenciamiento génico generalmente sucede en los mamíferos. De manera contraria, la complementariedad de bases perfecta, generalmente en las plantas, ejerce la degradación del mRNA (**Figura 5a**). El silenciamiento génico por RNAi parece estar muy conservado en los organismos fúngicos (Lee *et al.*, 2010; Nicolas *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2012).

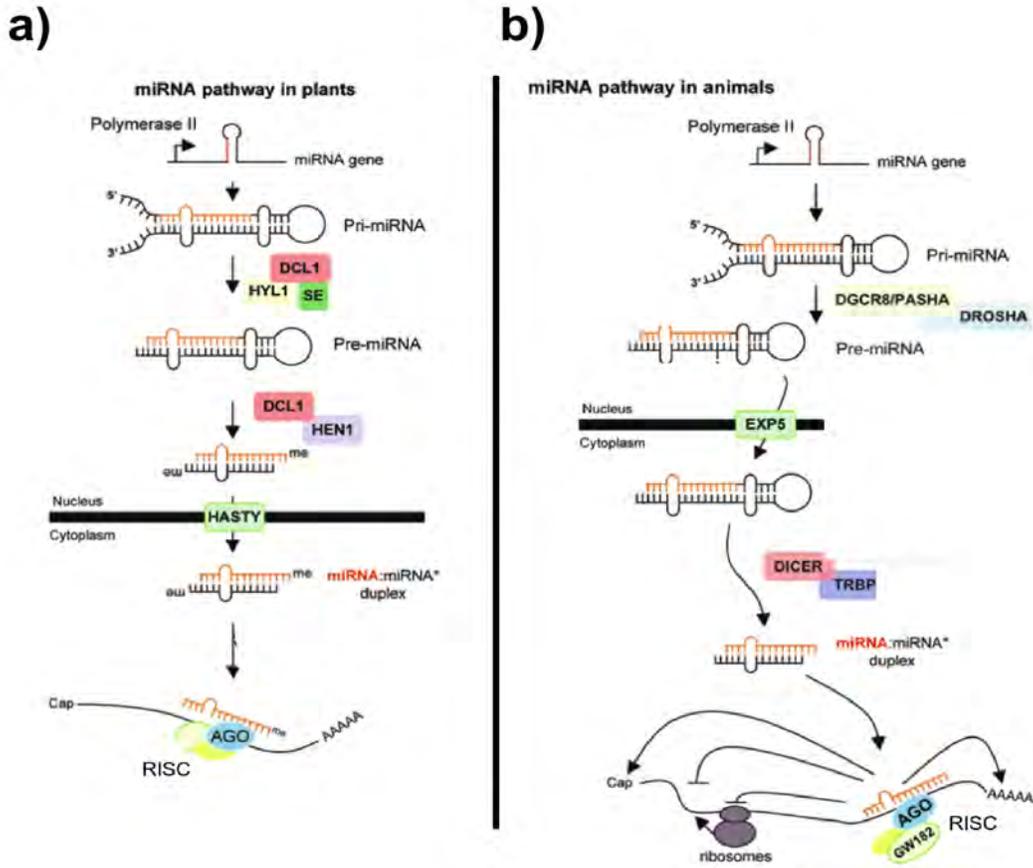


Figura 5. El mecanismo de la biogénesis de los microRNAs (miRNA) y el silenciamiento génico mediado por miRNAs en las plantas y los animales. a) En las plantas, el pri-miRNA es procesado por la enzima DCL-1, por los cofactores SE e HYL1 para producir el pre-miRNA. La proteína HEN1 metila cada extremo 3' del miRNA dúplex. HST transporta el miRNA dúplex al citoplasma. **b)** En animales, los pri-miRNAs transcritos por la RNA polimerasa II son procesados por Drosha y Pasha o DGCR8. Los pre-miRNAs exportados al citoplasma vía EXPORTINA 5 (EXP5), donde son procesados por DICER y TRBP para generar los miRNAs dúplex maduros. La hebra guía (color rojo) del miRNA dúplex se incorpora en la proteína AGO. El miRNA guía a RISC al mRNA blanco para su degradación, proceso observado en las plantas **(a)**. En animales, la proteína AGO parte del complejo RISC interactúa con GW182 para prevenir iniciación traducción **(b)**. Tomada y modificada de (Kutter and Svoboda, 2008).

Antecedentes directos

En *T. atroviride*, el producto del gen *tgf-1* (ortólogo a *GCN5* de *S. cerevisiae*) parece ser importante para la acetilación y la transcripción de los genes de respuesta a la luz. La delección de *tgf-1* resulta en una cepa con un fenotipo pleiotrópico; crecimiento lento e incapacidad para y sin la producción conidias. El análisis de la acetilación global en la respuesta a la luz en *T. atroviride*, mostró altos niveles de acetilación de la histona H3 30 min después de la fotoinducción, los cuales disminuyen después de 120 min. Los niveles de la acetilación de la H3 correlaciona con los niveles del mRNA de *phr-1*, un gen marcador de la respuesta a la luz. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina reveló que TGF-1 está presente en el promotor de *phr-1* en la oscuridad, y la acetilación alcanza altos niveles a los 30 y 120 min después del pulso de luz. Sin embargo, en Δ *tgf-1* la alta acetilación de H3 desaparece completamente en el promotor de *phr-1* (Uresti-Rivera, 2013). La nula acetilación de H3 en la cepa Δ *tgf-1* parece estar relacionada con la baja expresión de los genes de respuesta a la luz (*phr-1*, *al-3*, *env-1* y *grg-1*) en esta mutante. Los datos establecen un escenario donde TGF-1 es un coactivador de la transcripción de los genes responsivos a la luz (Uresti-Rivera, 2013).

Datos recientes indican que *T. atroviride* posee los componentes de la biogénesis de los miRNAs que incluyen a los genes *dicer* (*dcr1* y *dcr2*), a 3 *argonautas* (*ago 1- ago3*) y a 3 *polimerasas de RNA dependientes de RNA* (*rdr1- rdr3*) (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013). Las mutantes Δ *dcr2*, Δ *dcr1/\Delta**dcr2* presentaron un crecimiento reducido sin la producción de conidias y menor número en la expresión de los genes responsivos a la luz. En cambio, las mutantes sencillas en los genes *argonautas* (Δ *ago1*, Δ *ago2* y Δ *ago3*) no perdieron la capacidad de respuesta a la luz (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013). Los resultados sugieren que los genes *dicer* controlan el desarrollo vegetativo y reproductivo de *T. atroviride*. En *A. thaliana* se demostró que HAG1, ortólogo de *GCN5*, es necesaria para la expresión de un conjunto de genes que codifican miRNAs inducidos por diversos factores ambientales (Kim *et al.*, 2009).

Justificación

Trichoderma atroviride es un organismo modelo para estudiar el proceso de la percepción de la luz. Se han realizado análisis exhaustivos para entender los procesos fisiológicos y del desarrollo de *T. atroviride* regulados por la luz. Sin embargo, los elementos adicionales que integran la vía de la regulación de la percepción y la respuesta a estímulos ambientales a nivel de la cromatina no se han identificado.

Objetivo general

Determinar el rol de las proteínas modificadoras de la cromatina, HDA-2, SET-5 y TGF-1 en la respuesta a señales externas en *T. atroviride*.

Objetivos particulares

Parte I (HDA-2 y SET-5)

- 1) Evaluar el fenotipo de la mutante $\Delta hda-2$ y $\Delta set-5$ en respuesta a la luz o daño mecánico
- 2) Evaluar la expresión de *hda-2* en respuesta a la luz y estrés oxidante.
- 3) Evaluar la capacidad de respuesta de las cepas wt, $\Delta set-5$ y $\Delta hda-2$ al estrés oxidante.
- 4) Analizar el patrón de expresión de los genes de respuesta temprana (ej. *al-3* y *phr-1*) y tardía (ej. *hymA* y *con-1*) a la luz en los fondos genéticos mutantes y silvestres.
- 5) Analizar los patrones de expresión de los genes que codifican para las enzimas antioxidantes en respuesta al estrés oxidante en los fondos genéticos mutante y silvestre.
- 6) Cuantificar los niveles de acetilación en los promotores de aquellos genes con expresión diferencial en respuesta al estrés oxidante.

Parte II (TGF-1)

- 7) Evaluar el rol de la proteína TGF-1 en la regulación de los genes dicer (*dcr-1* y *dcr-2*), y argonautas (*ago1* a *ago3*) que codifican para proteínas implicadas en silenciamiento por RNAi.
- 8) Determinar la expresión diferencial de los sRNAs en la cepa wt y mutantes $\Delta tgf-1$ en condiciones de luz y oscuridad.
- 9) Identificar los mRNA blancos de los sRNAs diferenciales en *T. atroviride*.

Parte III

- 10) Generar construcciones de los genes *ago1*, *ago2*, *ago3*, *hda-2*, *set-5* y *tmk-3* con las etiquetas Flag o c-Myc.

Resultados parte I

La proteínas SET-5 y HDA-2 regulan las respuestas a la luz en *Trichoderma atroviride*

El gen *set-5* (JGI ID: 94162) codifica para una metiltransferasa de histonas putativa y se induce por la luz azul después de 5 min de la aplicación del estímulo. Las mutantes $\Delta set-5$ presentan una mayor conidiación con menor cantidad de luz azul comparada con la cepa silvestre (Cristóbal-Mondragón, 2011). Los ensayos de fotoconidiación confirmaron éste resultado. La cepa silvestre requirió entre 75 a 1200 μM de luz azul para formar un anillo de conidias, mientras que la cepa $\Delta set-5$ alcanzó la misma respuesta con menor dosis de luz (25-75 μM) (Figura 6). Además, la maduración de las conidias, que se caracteriza por la pigmentación verde, en la $\Delta set-5$ ocurrió con solo 75 μM de luz azul, en cambio en la cepa silvestre se observó con mayor cantidad de luz (1200 μM). Para realizar un análisis más a detalle, se decidió determinar la expresión de los genes de respuesta temprana (*phr-1* [JGI ID: 302457] y *al-3* [JGI ID: 160158]) y tardía a la luz (*hymA* [JGI ID: 177297] y *con-1* [JGI ID: 31682]) en los fondos genéticos $\Delta set-5$ y silvestre. En la cepa wt, el gen *phr-1* que codifica para una fotoliasa se indujo rápidamente y alcanzó una máxima acumulación del transcrito después de 30 min del estímulo luminoso (Figura 7a).

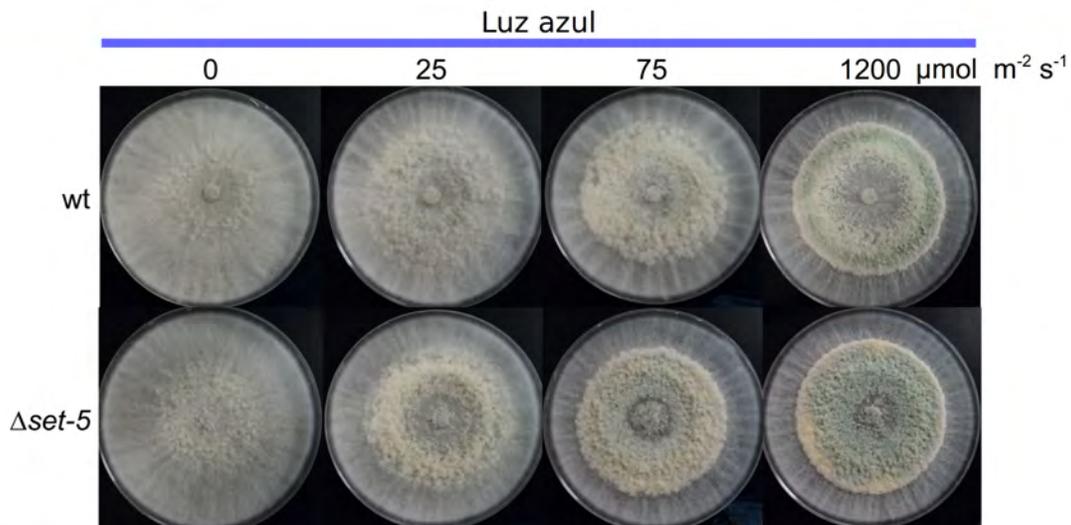


Figura 6. La ausencia de SET-5 genera un fenotipo de hiperconidiación después de la aplicación de un pulso de luz azul en *T. atroviride*. Las fotografías muestran el fenotipo de las cepas silvestre (wt) y $\Delta set-5$ después de haber sido expuestas a diferentes cantidades de luz azul, indicadas en la parte superior como $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La inducción de *al-3* que codifica para una Geranilgeranil pirofosfato sintasa ocurrió 30 min después del pulso de luz (**Figura 7b**). El gen *phr-1* se transcribió de manera similar en la cepa wt, y en la mutante $\Delta set-5$ (**Figura 7a**). La inducción del gen *al-3* alcanzó niveles más altos en la $\Delta set-5$, los cuales fueron superiores a los observados para la cepa wt (**Figura 7b**). En el caso de los genes de expresión tardía *con-1* y *hymA* relacionados con la conidiación, la aplicación de un pulso de luz azul en la cepa wt causó la acumulación del transcrito de *con-1* 12 h después (**Figura 7c**), como se ha reportado (Berrocal-Tito, 1999; Osorio-Concepción *et al.*, 2017).

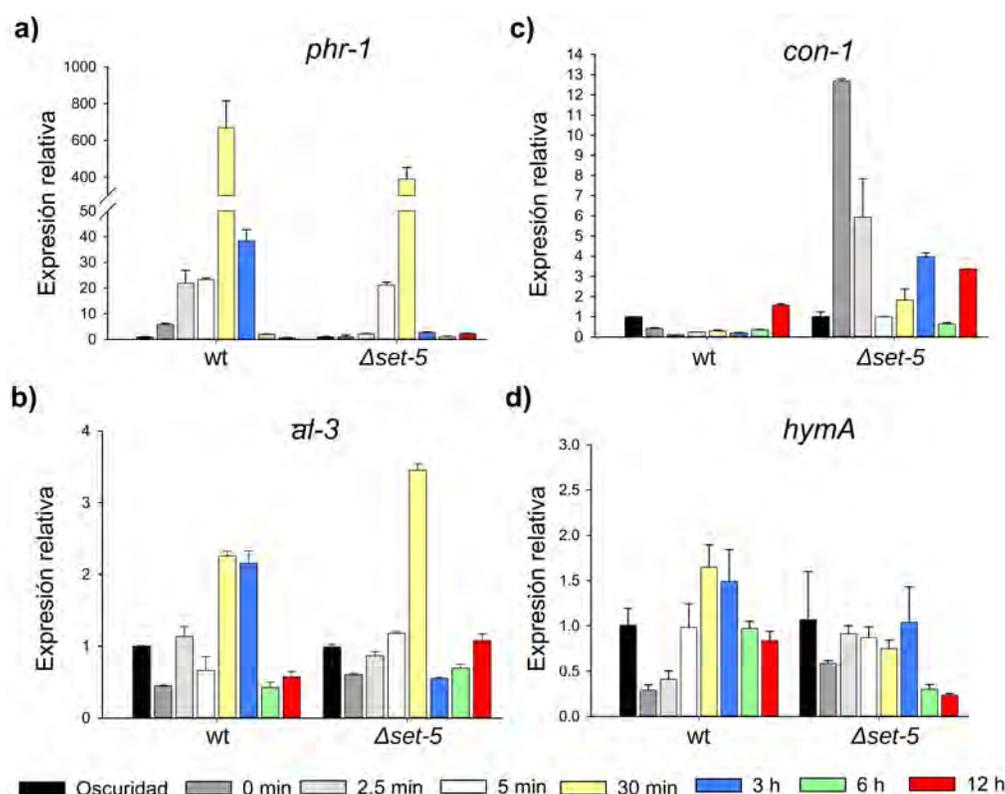


Figura 7. Análisis de expresión por RT-qPCR de respuesta a la luz de los genes tempranos (*phr-1* y *al-3*) y tardíos relacionados a la conidiación (*con-1* y *hymA*) en las cepas wt, $\Delta set-5$. El micelio de las cepas wt y $\Delta set-5$ se crecieron por 48 h en la oscuridad y se aplicó un pulso de luz azul ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se colectaron los micelios a los tiempos indicados para el análisis de la expresión de los genes *phr-1* (a), *al-3* (b), *con-1* (c), y *hymA* (d). El micelio no expuesto a la luz se utilizó como control. El gen *tef-1* se utilizó como control génico para normalizar la expresión de los genes responsivos a la luz a través del método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

En cambio, en la cepa $\Delta set-5$ se observaron niveles altos del transcrito de *con-1* en el tiempo 0 (**Figura 7c**). El gen *hymA*, ortólogo del gen de *Aspergillus nidulans* que codifica para un factor de transcripción putativo involucrado en el desarrollo de los conidióforos presenta altos niveles de expresión después de 30 min en la cepa wt, y mantiene sus niveles hasta las 3 h. Posteriormente, disminuyeron a las 6 y 12 h después del estímulo (**Figura 7d**). Sin embargo, la acumulación de *hymA* en la mutante $\Delta set-5$ fue más alta que en la cepa silvestre a los 0 y 2.5 min. Los niveles de *hymA* en estos tiempos se mantiene hasta los 5, 30 min y 3 h de manera muy similar a la observada para la cepa wt, y disminuye drásticamente a tiempos tardíos (6 y 12 h (**Figura 7d**)). Estos resultados sugieren que la proteína SET-5 es un modulador negativo de los genes asociados a la conidiación, lo que podría repercutir en un fenotipo de hiperconidiación después de un pulso de luz azul en *T. atroviride*.

Resultados anteriores mostraron que la expresión de *blr-1* es dependiente de la desacetilasa de histonas HDA-2 (Osorio-Concepción *et al.*, 2017). Se ha propuesto que los productos de los genes *blr-1* y *-2* forman el complejo fotorreceptor de la luz azul (BLRC). Para evidenciar el papel de HDA-2 en la percepción de la señal luminosa, se analizó el nivel de expresión del gen *blr-2* en el fondo genético mutante y silvestre. Contrario a la cepa wt, en la mutante $\Delta hda-2$, el gen *blr-2* presentó niveles basales muy bajos de expresión y su inducción después de un pulso de luz fue nula (5, 15 y 30 min) (**Figura 8a**). Por lo tanto, se decidió analizar la expresión de otros genes que se inducen por la luz, como *frq*, y *al-3* para confirmar el vínculo entre HDA-2 y la proteína BLR-1 para la regulación génica. Los genes *al-3*, y *frq* se indujeron por la luz en la cepa silvestre 30 min después de la aplicación del estímulo (**Figura 8b y c**). Sin embargo, estos dos genes presentaron niveles de expresión bajos en las mutantes $\Delta blr1$ y $\Delta hda-2$ en todos los tiempos evaluados (**Figura 8b y c**). La reducción de los niveles *frq* y *al-3* fue más drástico en la cepa $\Delta hda-2$. Estos resultados sugieren una regulación positiva mutua entre HDA-2 y las proteínas BLR para controlar la transcripción de los genes responsivos a la luz.

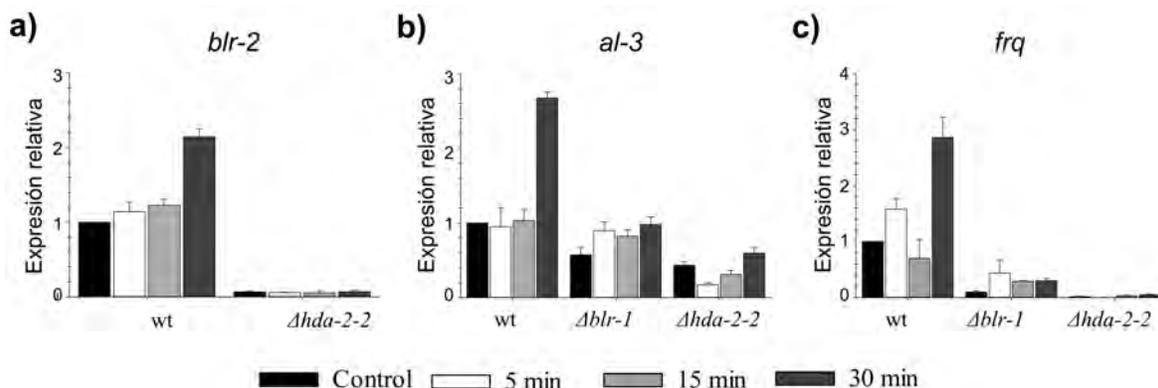


Figura 8. La expresión de los genes responsivos a la luz es dependiente de HDA-2 y BLR-1. Las cepas wt, $\Delta blr-1$, $\Delta hda-2-2$ se crecieron en la oscuridad por 72 h, y se aplicó un pulso de luz azul (BL). Los micelios se colectaron en los tiempos indicados para el análisis de la expresión de los genes *blr-2* (a), *al-3* (b) y *frq* (c). Los micelios sin la fotoinducción se utilizaron como control. El factor de elongación *tef-1* se utilizó como control génico para normalizar la expresión de los genes de respuesta a la luz por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Las proteínas HDA-2 y SET-5 regulan diferencialmente la tolerancia a estrés oxidante

Las moléculas biológicas tales como las flavinas, pterinas y porfirinas pueden absorber la luz azul y transferir la energía captada al oxígeno molecular (O_2) en la célula, lo cual genera especies de oxígeno reactivas (EORs), principalmente el oxígeno singulete (1O_2) y superóxido (O_2^-). De manera interesante, el gen *set-5* que codifica para una metiltransferasa de histonas putativa se induce rápidamente por la luz azul. Para investigar si el producto de *set-5* regula la respuesta a diferentes señales ambientales tales como la luz y el estrés oxidante, se evaluó el crecimiento micelial de las cepas silvestre y $\Delta set-5$ en diferentes concentraciones de H_2O_2 , menadiona y terc-butilo hidroperóxido (t-BOOH) en condiciones de luz u oscuridad. Las principales EORs producidos por el H_2O_2 y menadiona son el radical hidroxilo (OH) y O_2^- , mientras que el t-BOOH genera radicales peróxidos (RO). Las EORs causan daño celular debido a que oxidan a los lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos.

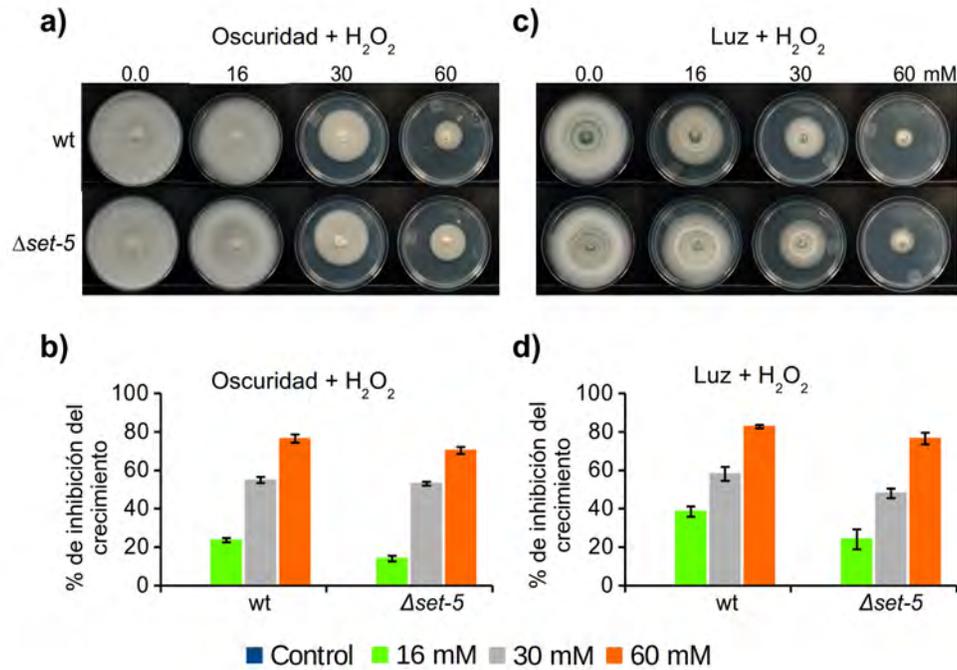


Figura 9. crecimiento radial de *T. atroviride* en respuesta a H₂O₂. (a y b) Las fotografías muestran los fenotipos de inhibición del crecimiento de las cepas wt y $\Delta set-5$ después de 96 h de su inoculación crecimiento en medio de cultivo MMV adicionada con diferentes concentraciones de H₂O₂ en la oscuridad (a) o expuestas a 12 h luz/oscuridad (c). Los porcentajes de inhibición del crecimiento corresponden a 72 h de crecimiento en diferentes concentraciones de H₂O₂ en la oscuridad (b) o en ciclos de 12 h luz/oscuridad (d). Las cepas crecidas en medios de cultivo sin H₂O₂ en la oscuridad o expuestas a ciclos de 12 h luz/oscuridad se utilizaron como control. Los cultivos se incubaron a 28°C.

En condiciones de oscuridad, la mutante $\Delta set-5$ mostró ligeramente mayor tolerancia que la cepa silvestre al H₂O₂. La inhibición del crecimiento micelial de $\Delta set-5$ osciló entre 9, 2 y 6% menos que la cepa wt para 16, 30, y 60 mM de H₂O₂, respectivamente, (Figura 9a y b). De manera similar a este resultado, en la presencia de la luz la cepa $\Delta set-5$ fue ligeramente más resistente que la cepa wt a 16, 30, y 60 mM de H₂O₂, reflejado en un menor porcentaje de inhibición del crecimiento (14, 10 y 6%) (Figura 9c, d). En otras fuentes de estrés oxidante tales como menadiona en condiciones de oscuridad, $\Delta set-5$ fue ligeramente resistente a 0.2 mM que la cepa silvestre, mientras que mostró mayor sensibilidad a 0.3 mM (Figura 10a y b). Sin embargo la adición de 0.4 y 0.5 mM de menadiona afectó a la cepa wt y mutante $\Delta set-5$ de manera similar (Figura 10a y b). En la presencia de la luz, las diferentes concentraciones de menadiona inhibieron el crecimiento

micelial de $\Delta set-5$. El crecimiento se afectó más en la mutante que en la cepa silvestre a 0.2, 0.3 mM de menadiona, mientras que 0.4 y 0.5 mM afectó el crecimiento de ambas cepas de manera equivalente (**Figura 10c y d**).

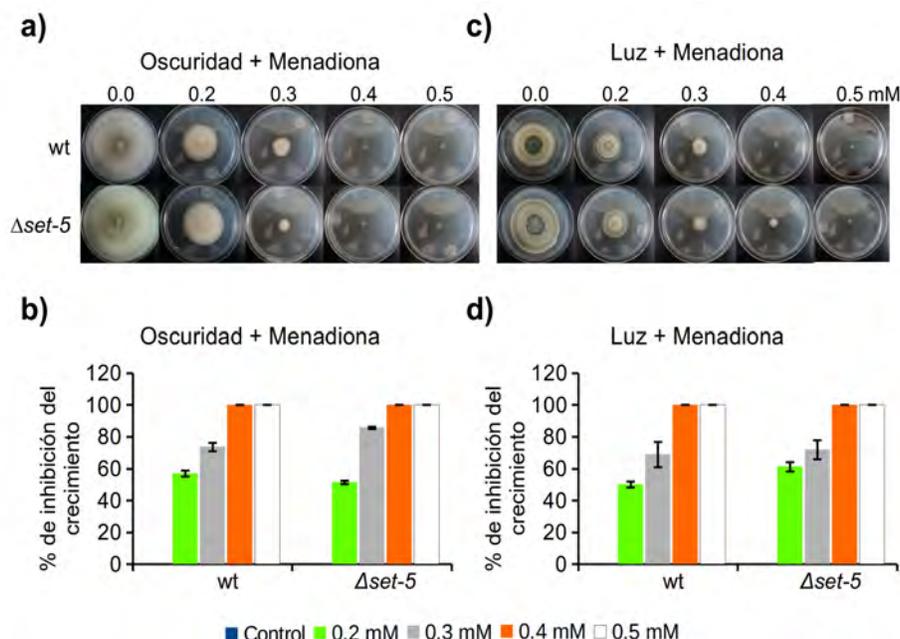


Figura 10. Crecimiento radial de *T. atroviride* en respuesta a menadiona. (a y b) Las fotografías muestran los fenotipos de inhibición del crecimiento de las cepas wt y $\Delta set-5$ después de 96 h de su inoculación en medio de cultivo MMV adicionado con diferentes concentraciones de menadiona en la oscuridad (a) o expuestas a 12 h luz/oscuridad (c). Los porcentajes de inhibición del crecimiento corresponden a 72 h de crecimiento en diferentes concentraciones de menadiona oscuridad (b) o en ciclos de 12 h luz/oscuridad (d). Las cepas crecidas en medios de cultivo sin menadiona en la oscuridad o expuestas a ciclos de 12 h luz/oscuridad se utilizaron como control. Los cultivos se incubaron a 28°C.

La inhibición del crecimiento de $\Delta set-5$ se confirmó al incrementar las concentraciones de ter-butil hidroperóxido. En la oscuridad, el efecto de 0.125 y 0.25 mM de este compuesto fue mayor en el crecimiento de $\Delta set-5$ con respecto a la cepa silvestre, sin embargo 0.5 mM inhibió drásticamente el crecimiento para la dos cepas de manera similar (**Figura 11a y b**). Mientras tanto, en la presencia de la luz, la mutante $\Delta set-5$ mostró mayor sensibilidad a 0.125 mM de t-BOOH, en cambio se observaron índices de inhibición equivalentes entre la cepa wt y $\Delta set-5$ a 0.25 y 0.5 mM (**Figura 11c y d**). Estos datos indican que SET-5 regula

diferencialmente la respuesta a los diferentes tipos de estrés; negativa para H₂O₂, y positiva para menadiona y t-BOOH. Por otra parte, resultados previos indican que la cepa $\Delta hda-2$ es más sensible que la cepa silvestre y $\Delta set-5$ a H₂O₂ y menadiona (Osorio-Concepción *et al.*, 2017).

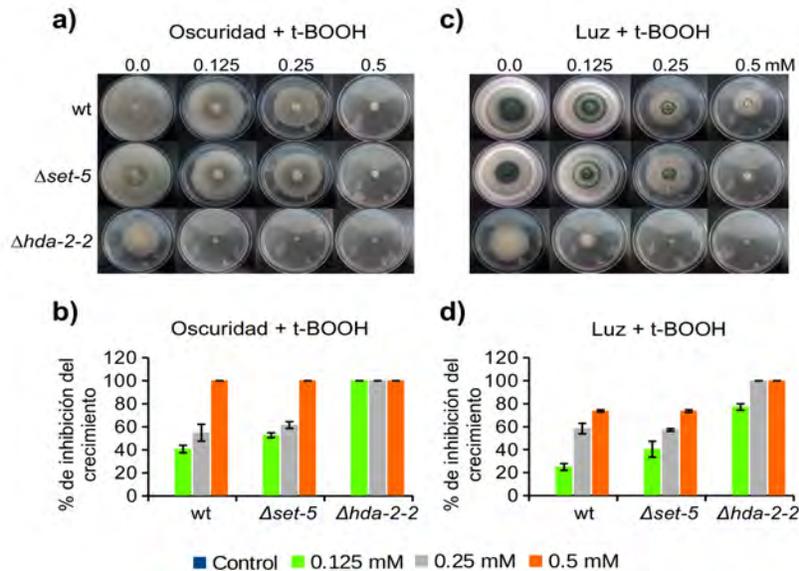


Figura 11. Crecimiento colonial de *T. atroviride* en respuesta a terc-butilo. (a y b) Las fotografías muestran los fenotipos de inhibición del crecimiento de las cepas wt, $\Delta set-5$ y $\Delta hda-2-2$ después de 96 h de su inoculación en medio de cultivo MMV adicionada con diferentes concentraciones de terc-butilo e incubadas en la oscuridad (a) o expuestas a 12 h luz/oscuridad (c) a 28 °C. Los porcentajes de inhibición del crecimiento corresponden a 72 h de crecimiento en diferentes concentraciones de terc-butilo en la oscuridad (b) o en ciclos de 12 h luz/oscuridad (d). Las cepas crecidas en medios de cultivo sin terc-butilo en la oscuridad o expuestas a ciclos de 12 h luz/oscuridad se utilizaron como control. Los cultivos se incubaron a 28°C.

La reducida tolerancia de $\Delta hda-2$ al estrés oxidante se confirmó al utilizar diferentes concentraciones de t-BOOH en la presencia de la luz y en la oscuridad. A diferencia de la cepa wt y $\Delta set-5$, el crecimiento de $\Delta hda-2$ se inhibió totalmente al ser expuesta a 0.125, 0.25 y 0.5 mM de t-BOOH en la oscuridad, mientras que en la presencia de la luz, la mutante presentó un ligero crecimiento, exclusivamente en 0.125 mM (**Figura 11a-d**). Los resultados indican que la proteína HDA-2 se requiere para la resistencia a H₂O₂, menadiona y t-BOOH, en *T. atroviride*.

La mutante $\Delta set-5$ está afectada en la expresión de genes relacionados a EORs

Debido a que la cepa $\Delta set-5$ fue menos sensible al H_2O_2 , se decidió analizar el patrón de expresión de los genes *gst-1* (*glutación s-transferasa-1*), *sod-1* (*superóxido dismutasa-1*), *cat-3* (*catalasa-3*), *gpx* (*glutación peroxidasa*) que codifican para proteínas antioxidantes. La adición de 30 mM de H_2O_2 a la cepa wt, redujo la acumulación de los transcritos de los genes *gpx*, *cat-3*, *sod-1*, y *gst-1* a los 15 min, pero alcanzaron altos niveles a los 30 min (**Figura 12a-d**). Sin embargo, en la cepa $\Delta set-5$, los genes *gpx* y *sod-1* presentaron más altos niveles de expresión que la cepa wt 15 min después del tratamiento con H_2O_2 (**Figura 12a y c**). A diferencia en la cepa wt, la mutante $\Delta set-5$ no mostró la inducción de la *cat-3* por exposición a H_2O_2 (**Figura 12b**). Mientras tanto, la transcripción de *gst-1* en $\Delta set-5$ fue similar a la observada para la cepa silvestre en las distintas concentraciones de H_2O_2 (**Figura 12d**).

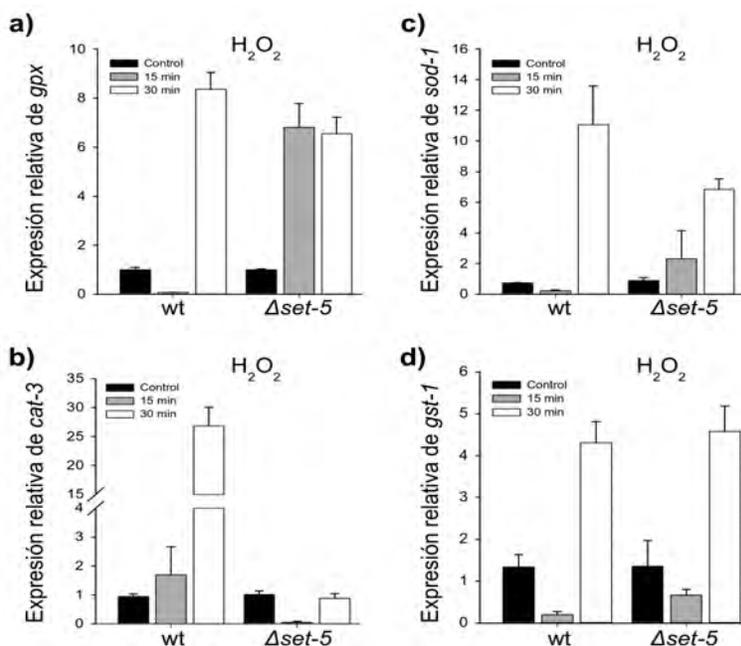


Figura 12. La proteína HDA-2 y SET-5 regulan la transcripción de los genes relacionados a EORs en la presencia de H_2O_2 . La expresión relativa de los genes *gpx*, *sod-1*, *cat-3*, *gst-1* en las cepas wt, $\Delta set-5$ se determinó a los 15 (Barras grises) y 30 min (Barras blancas) después del tratamiento con 30 mM de H_2O_2 o en usencia del estímulo (barras negras) El gen *tef-1* se utilizó como control para normalizar la expresión de los genes relacionados a EORs por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

La delección de SET-5 favorece la tolerancia de las conidias al H₂O₂

La mutante $\Delta set-5$ mostró un fenotipo diferencial en las distintas condiciones de los agentes oxidantes. Además, presentó la desregulación de algunos de los genes relacionados a EORs. Para complementar nuestro estudio acerca del rol de SET-5 en el desarrollo de *T. atroviride*, se analizó la capacidad de las conidias en su etapa de germinación (germínulas) de las cepas wt y $\Delta set-5$ para tolerar diferentes concentraciones de H₂O₂. A diferencia de la cepa wt, las conidias de la mutante $\Delta set-5$ presentaron mayor tolerancia a las diferentes concentraciones de H₂O₂ (**Figura 13**). Las conidias de $\Delta set-5$ fueron 30, 28 y 20% más tolerantes que la cepa wt a 16, 30 y 60 mM (**Figura 13**).

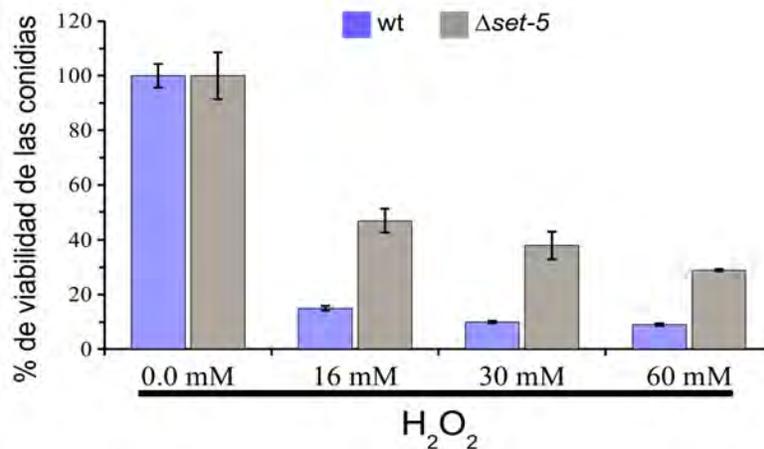


Figura 13. Las conidias de la mutante $\Delta set-5$ presentan una mayor tolerancia a H₂O₂ que la cepa wt. Las conidias de las cepas wt (barras azules) y $\Delta set-5$ (barras grises) se inocularon en medio MMV líquido a 28 °C en agitación constante y 10 h después fueron expuestas a 16, 30 y 60 mM de H₂O₂ por 30 min. Después del tratamiento, 150 conidas (germínulas) se sembraron en cajas con medio MMV sólido suplementado con 0.09 % de deoxicolato de sodio para facilitar el conteo de la colonias y se incubaron a 28 °C por 48-72 h. Las conidias sin tratamiento se utilizaron como control (0.0 mM).

Los genes *dicer* y *ago* son regulados diferencialmente por la luz en *Trichoderma atroviride*

Para determinar la participación de la proteína TGF-1 (*Trichoderma* GCN Five-1) en la biogénesis de los RNAs pequeños (sRNAs) en *T. atroviride*, se determinó el nivel de expresión de los genes *dcr-1*, *dcr-2*, *ago1-ago3* y *phr-1*, a distintos tiempos después de un pulso de luz azul en las cepas Δ *tgf-1* y silvestre. La expresión del gen control *phr-1* se indujo en la cepa silvestre como se ha reportado (Berrocal-Tito, 1999; Rosales-Saavedra *et al.*, 2006), pero su expresión fue nula en la mutante Δ *tgf-1* (**Figura 14a**). El gen *dcr-1* alcanzó altos niveles de inducción a los 60 minutos en la cepa silvestre, mientras que la Δ *tgf-1* presentó bajos niveles de transcrito (**Figura 14b**). El gen *dcr-2* presentó oscilaciones de expresión en la cepa wt entre los 5 y 20 min, sin embargo, a los 30 y 60 min después del estímulo mostró una alta acumulación del transcrito. En la mutante Δ *tgf-1*, la inducción de *dcr-2* ocurrió 7 y 10 min después del pulso, sin embargo a los 30 y 60 min observó escasa acumulación de *dcr-2* comparada con la cepa wt (**Figura 14c**). Por otra parte, la expresión de los genes *ago* se indujeron por luz azul en la cepa silvestre y fueron desregulados en Δ *tgf-1*. El gen *ago-1* mostró altos niveles de inducción en la cepa wt a los 5 min y 20 min en respuesta al estímulo luminoso. Sin embargo en la mutante Δ *tgf-1*, el transcrito de *ago-1* se acumuló a los 10 min, pero los niveles son inferiores con respecto a la cepa wt. La inducción de *ago-2* en la cepa silvestre ocurrió a los 5 y 60 min, mientras que en el resto de los tiempos evaluados no se observaron diferencias marcadas con respecto al control (**Figura 14e**). La ausencia de *tgf-1* afectó la expresión temprana del gen *ago-2*, ésta se observó 10 min después de la fotoinducción y disminuyó sus niveles a tiempos tardíos (**Figura 14e**). La aplicación de luz azul a la cepa wt, también promovió la transcripción de *ago-3*, con una mayor inducción a los 5 y 60 min. En cambio, en la cepa Δ *tgf-1* el transcrito de *ago-3* se acumuló a los 10 min después del estímulo, exclusivamente (Figura 19f). Los niveles de inducción de los genes *ago1*, *ago-2* y *ago-3* fueron inferiores y tardíos a los observados para la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que TGF-1 regula positivamente la expresión de los genes *dcr* y *ago* en *T. atroviride*.

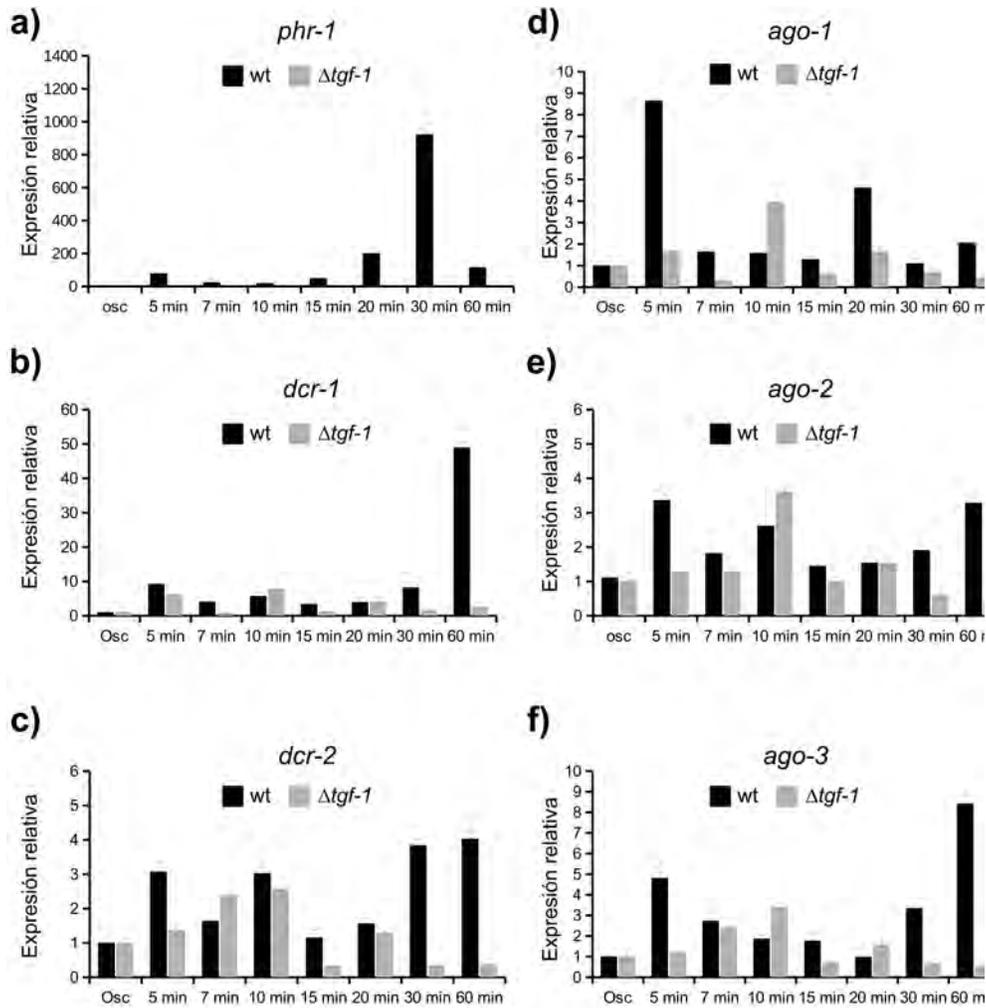


Figura 14. La expresión de los genes *dcr* y *ago* es dependiente de la luz y de la acetiltransferasa de histonas TGF-1. El micelio de las cepas wt y $\Delta\text{tgf-1}$ se creció en la oscuridad por 48 h y posteriormente se expuso a un pulso de luz azul ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y se colectaron los micelios a los tiempos indicados. El micelio colectado se utilizó para analizar la expresión de los genes *phr-1* (a), *dcr-1* (b), *dcr-2* (c), *ago1* a *ago-3* (d-f). Los micelios sin tratamiento se usaron como control. El gen *tef-1* se utilizó como control génico para normalizar la expresión de los genes *dcr* y *ago* por el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Resultados parte II

Constructos de los genes *ago1-ago3*, *hda-2*, *set-5* y *tmk-3* con las etiquetas FLAG y c-Myc para la transformación de *T. atroviride*

Para identificar los RNAs pequeños de *T. atroviride* incorporados en las proteínas argonautas, y sus RNAm blancos, se diseñaron constructos genéticos de los genes *ago* con las etiquetas flag y c-Myc (Materiales y Métodos, parte III), los cuales se integraran en el genoma de la cepa silvestre de *T. atroviride* de manera ectópica.

Se logró amplificar el ORF de los genes *ago1* (3112 pb), *ago2* (3222) y *ago3* (3054 pb) (**Tabla I**), y para su clonación en el sitio de restricción *Sma* I del vector pBHD-3'M y -3'F. En la **figura 15a-d** se indica la clonación y la orientación del ORF de *ago1/ago-3* con los oligonucleótidos qa-2-Fw (1), *ago1-orf-Rv* (2), y *ago3-orf-Rv* (3) (**Tabla I**). Los productos de PCR con la orientación correcta son: *ago1* de 4.1 kb, y *ago3* de 4.3 kb (**Figura 15c y d**). Se logró generar los constructos *ago1-3'F*, *ago1-3'M*, *ago3-3'F* y *ago3-3'M* (**Figura 15**). Después de varios intentos no se logró obtener la construcción de *ago2* con ninguna de las dos etiquetas.

Por otra parte para determinar las proteínas que interactúan con HDA-2 y SET-5, así como la unión de ambas proteínas en los promotores de los genes de respuesta a la luz en *T. atroviride*, se utilizó la estrategia descrita anteriormente (Materiales y Métodos, parte II). Se logró amplificar por PCR el ORF de *hda-2* (1488 pb) y de *set-5* (922 pb) a partir de DNA genómico de *T. atroviride* como molde con los oligonucleótidos exclusivos para cada gen (ver **Tabla I**). Los fragmentos purificados de *hda-2* y *set-5* se clonaron en el sitio de restricción *Sma* I del vector de expresión pBHD-3'M y -3'F (**Figura 16a y b**). La clonación del ORF de *hda-2* o *set-5* y su orientación se verificó por PCR con los oligonucleótidos qa-2-Fw (1), *hda-2-orf-Rv* (4), *set-5-orf-Rv* (5) (**Tabla I**) (**Figura 21a y b**). Los amplicones con la orientación correcta son: *had-2-3'F*: 2.6 kb, y *set-5-3'F*: 2 kb (**Figura 16c y d**). Los constructos *hda-2-3'F*, *set-5-3'F* obtenidos se utilizaron para la transformación de la cepa silvestre de *T. atroviride*. Únicamente, se obtuvieron dos transformantes *hda-2* con la etiqueta FLAG localizada en el extremo 3' (*hda-2-1-3'F* y *hda-2-4-3'F*), ambas presentaron resistencia a 200 µg de higromicina (**Figura 16e**).

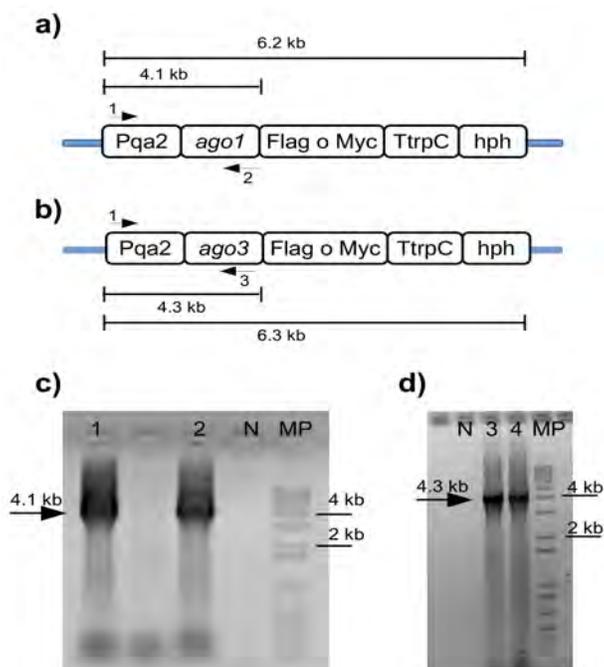


Figura 15. Confirmación de la clonación y la orientación de los genes *ago* en el vector de expresión pBHD-3'F o pBHD-3'M. El esquema muestra el sitio de la clonación del inserto *ago1* (a) y *ago3* (b) con las etiquetas FLAG o c-Myc en el extremo 3'. Las flechas con los números sobre el esquema indican el sitio de unión de los oligonucleótidos utilizados y las líneas indican el tamaño del fragmento de PCR esperado. **c** y **d**) La amplificación por PCR del promotor *pqa2* y el ORF de *ago1* o *ago3*. MP: Marcador de peso, N: Control negativo, 1: *ago1*-3'F, 2: *ago1*-3'M, 3: *ago3*-3'F, 4: *ago3*-3'M.

Las transformantes *hda-2-1-3'F* y *hda-2-1-3'F* amplificaron para el casete de *hph*, y el fragmento que corresponde al promotor de *Pqa-2* y el ORF del gen *hda-2*. En el caso de las transformantes *set-5* obtenidas, todas mostraron resistencia a 200 μg de higromicina, pero fueron negativas para la amplificación de la construcción de *set-5*. La caracterización de una de las dos transformantes *hda-2-1-3'F* obtenidas por la integración ectópica de la construcción *hda-2 3'F* mostró anillos de conidias de mayor tamaño con la pigmentación verde más intensa que la cepa silvestre a 0.3, 0.6 y 0.8% ácido quínico (QA), en la presencia de 12 h luz/oscuridad y después de un pulso de luz azul ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Además, en la condición sin QA, las cepas *hda-2-1-3'F* presentaron mayor conidiación (**Figura 17a y b**). Es necesario realizar otros ensayos de caracterización para discernir otras diferencias entre *hda-2-1-3'F* y la cepa silvestre.

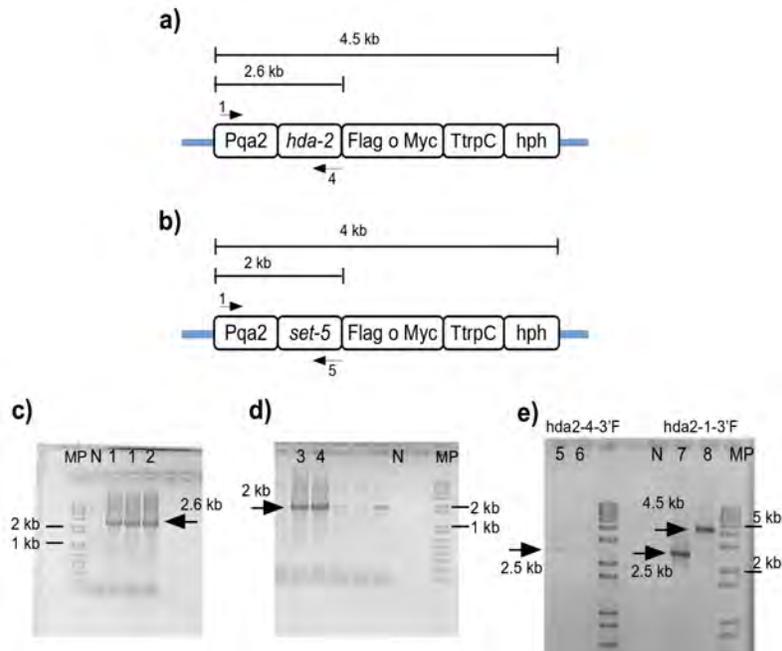


Figura 16. Confirmación de la clonación y la orientación de los genes *hda-2* y *set-5* en el vector de expresión pBHD-3'F o pBHD-3'M. El esquema muestra el sitio de la clonación del inserto *hda-2* (a) y *set-5* (b) con las etiquetas FLAG o c-Myc en el extremo 3'. Las flechas con los números sobre el esquema indican el sitio de unión de los oligonucleótidos utilizados y las líneas indican el tamaño del fragmento de PCR esperado. c y d) La amplificación del promotor *Pqa-2* y el ORF de *hda-2* o *set-5* por PCR. MP: Marcador de peso, N: Control negativo, 1: *hda-2*-3'F, 2: *hda-2*-3'M, 3: *set-5*-3'F, 4: *set-5*-3'M.

Se ha reportado que la la MAPK TMK-3 regula la respuesta a señales ambientales de *T. atroviride* (Esquivel-Naranjo et al., 2016). De manera interesante, HDA-2 es necesaria para regular la respuesta a la luz y al estrés oxidante en este hongo (Osorio-Concepción et al 2017). Para establecer el vínculo entre TMK-3 y HDA-2 para regular la transcripción génica en respuesta a la luz o estrés oxidante en *T. atroviride*, decidimos generar versiones etiquetadas de TMK-3 con la estrategia descrita en material y métodos, (**parte III**). El ORF de *tmk-3* (1727 pb) se logró amplificar y se clonó en el vector de expresión pBHD-3'F y -3'M para obtener el constructo de *tmk-3* con la etiqueta FLAG y c-Myc localizada en el extremo 3'; *tmk-3*-3'F y *tmk-3*-3'M, respectivamente (**Figura 18a y b**). Las transformantes *tmk-3*-3'F y *tmk-3*-3'M obtenidas contienen el ORF de *tmk-3* en la orientación correcta

(Figura 18 a y b), la cual se verificó por PCR con los oligonucleótidos qa-2-Fw (1), tmk-3-orf-Rv (6) (Tabla I). El fragmento de PCR con la orientación correcta fue de 2800 pb, aproximadamente, tanto para tmk-3-3'M y tmk-3-3'F. Los constructos tmk-3-3'M y tmk-3-3'F se utilizarán para la transformación de la cepa wt.

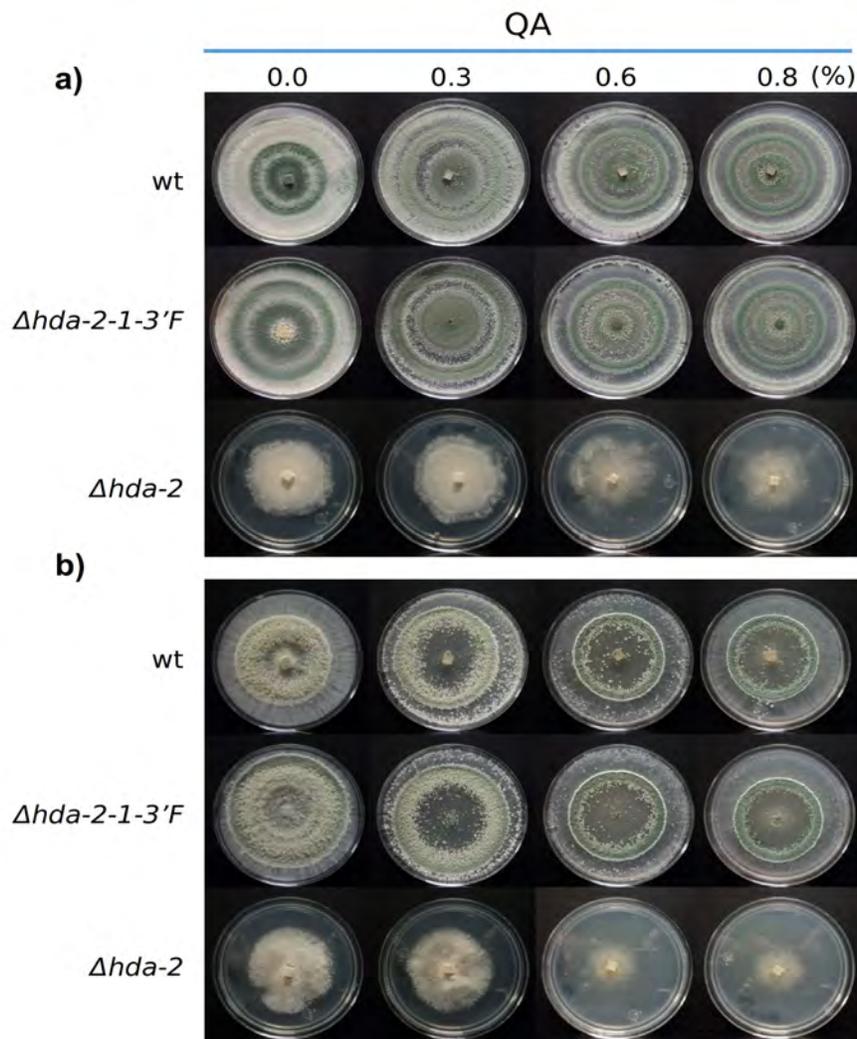


Figura 17. Fenotipo de la transformante *hda-2-1-3'F* en la presencia de ácido quínico (QA). Las cepas wt, *hda-2-1-3'F*, y $\Delta hda-2$, se crecieron en medio MMV adicionada con diferentes concentraciones de QA y se incubaron a 28 °C en ciclos de 12 h luz/oscuridad (a). Las colonias con 48 h de crecimiento en la oscuridad se les aplicó un pulso de luz azul (b). Las fotografías se capturaron después de 96 h y 48 h de su inoculación y fotoinducción.

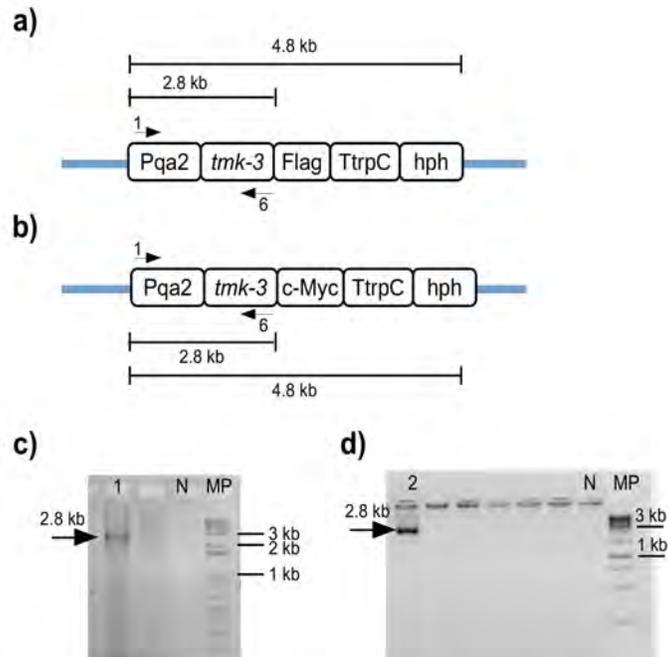


Figura 18. Confirmación de la clonación y la orientación del gen *tmk-3* en el vector pBHD-3'F o pBHD-3'M. El esquema muestra el sitio de la clonación del inserto *tmk-3* con las etiquetas FLAG (a) o c-Myc (b) en el extremo 3'. Las flechas con los números sobre el esquema indican el sitio de unión de los oligonucleótidos utilizados y las líneas indican el tamaño del fragmento de PCR esperado. c y d) La amplificación por PCR del promotor *pqa2* y el ORF de *tmk-3*. MP: Marcador de peso, N: Control negativo, 1: *tmk-3*-3'F, 2: *tmk-3*-3'M.

Discusión parte I

Estudios recientes indican que las modificaciones en la estructura de la cromatina por las desacetilasas de histonas (HDACs) son importantes en la regulación de la transcripción génica para generar la respuesta apropiada a los cambios ambientales. La interrupción del gen *set-5* en *T. atroviride* afectó la fotoconidiación de *T. atroviride* (Cristóbal-Mondragón, 2011). Ensayos de dosis respuesta de luz azul revelaron que la cepa $\Delta set-5$ es más fotosensible (**Figura 6**) como se ha reportado (Cristóbal-Mondragón, 2011). La desregulación de los genes responsivos a la luz y de la conidiación explicaría la amplificación de la esporulación asexual en la cepa $\Delta set-5$. Los datos apoyan el papel de este tipo de proteínas para regular diversos procesos, por ejemplo; la metiltransferasa de histonas SET1 de *Neurospora crassa* modula la respuesta circadiana y a la luz (Raduwan, Isola and Belden, 2013). Algunos genes de respuesta temprana a la luz, tales como *phr-1* y *al-3*, en la mutante $\Delta set-5$ presentaron niveles de transcripción de manera similar a la cepa silvestre (**Figura 7a-d**). Este dato sugiere que $\Delta set-5$, probablemente, no está afectada en la percepción de la luz. Sin embargo, la rápida acumulación del RNAm de *con-1* en $\Delta set-5$ después del estímulo luminoso (**Figura 7c**), indica que la proteína SET-5 modula de manera negativa la expresión de los genes de la conidiación, probablemente a través de la condensación de la cromatina. La ausencia de SET-5 favorece la formación de las conidias. Por lo tanto, la metiltransferasa parece tener un rol río abajo de la percepción de la señal luminosa en *T. atroviride*. Es necesario realizar estudios adicionales para determinar la función de SET-5 en la regulación génica, formación de conidióforos y la conidiación.

Por la cercanía que tiene la luz azul a la región ultravioleta del espectro, la cual es altamente dañina para el DNA y estimula la formación de EORs, se percibe como una señal de alerta para los organismos (Hirayama, Cho and Sassone-Corsi, 2007). En este contexto, la adición de diferentes condiciones de H₂O₂ y la presencia de la luz ejerció un efecto aditivo en la inhibición del crecimiento de la cepa silvestre. Los niveles de EORs generados por ambos factores sobrepasan la capacidad antioxidante de la célula, lo cual afecta el crecimiento micelial (Hansberg and Aguirre, 1990; Michán, Lledías and Hansberg, 2003). La ausencia de SET-5 parece favorecer la capacidad antioxidante para contender contra EORs producidos del H₂O₂ debido a que la mutante $\Delta set-5$ mostró menor inhibición en el crecimiento radial por este estímulo. Este hallazgo sugiere que la HMT SET-5 regula negativamente la tolerancia a H₂O₂. Sin embargo, la presencia de otros agentes oxidantes reveló un rol positivo de SET-5 para la respuesta a menadiona

y terc-butilo ya que presentó mayor inhibición en su crecimiento. Mutantes en los ortólogos SET-1 de *S. cerevisiae*, encargada de metilar a H3K4, son más sensibles a agentes que dañan la pared celular (Liu *et al.*, 2015). Por lo tanto, no descartamos que un mecanismo similar regula la capacidad antioxidante de *T. atroviride*. Además de su función a nivel de micelio, la proteína SET-5 parece tener un rol negativo en la tolerancia de las conidias al estrés oxidante debido a que estas presentaron un mayor porcentaje de viabilidad que la cepa wt después del tratamiento con H₂O₂. Analizar el perfil de expresión de algunos genes relacionados a EORs podrían sustentar los fenotipos resistentes y sensibles de la mutante SET-5 a H₂O₂ y menadiona, respectivamente. De manera distinta a este resultado la mutante $\Delta hda-2$ fue más sensible al estrés oxidante en la oscuridad y en la presencia de la luz (Osorio-Concepción *et al.*, 2017). El crecimiento micelial de *hda-2* se inhibió totalmente en las diferentes concentraciones de terc-butilo, mientras que en menadiona y H₂O₂ presentó ligero crecimiento (**Figura 11a-d**). A pesar de que las desacetilasas de histonas se consideran corepresores transcripcionales, los resultados sugieren que la actividad de HDA-2 es crucial para conferir la tolerancia a agentes generadores de EORs como H₂O₂, menadiona y terc-butilo. Las EORs pueden oxidar a las proteínas, los lípidos de la membrana celular, y a los ácidos nucleicos (Aguirre *et al.*, 2005).

La hipótesis de que ambas proteínas (HDA-2 y SET-5) regulan la transcripción génica para neutralizar EORs se apoya en el análisis del perfil de expresión de los genes relacionados a EORs, que incluyen: *sod-1*, *cat-3*, *gpx* y *gst-1*. Los productos de estos genes dismutan el superóxido, remueven el H₂O₂ y los hidroperóxidos, respectivamente. El análisis de la expresión génica indica que HDA-2 regula positivamente a *cat-3* y a *sod-1* en la presencia de H₂O₂ y menadiona, respectivamente. La sensibilidad de la mutante $\Delta hda-2$ podría deberse a la disminución en los niveles de *cat-3*, *sod-1*, y *gpx* (Osorio-Concepción *et al.*, 2017). Adicionalmente, HDA-2 es importante para mantener los niveles basales de *gst-1*. A pesar de que la desacetilación se asocia con la represión transcripcional, existen reportes de que ésta modificación puede activar la expresión génica evitando la unión de represores (Bernstein, Tong and Schreiber, 2000). La temprana inducción de *gpx* en la mutante $\Delta set-5$ (**Figura 12**) explican el fenotipo ligeramente resistente a H₂O₂. Es importante mencionar que *cat-3* no se transcribe en $\Delta set-5$ (**Figura 12**) en la presencia de H₂O₂, a pesar que su producto cataliza la reducción H₂O₂, lo cual indica que SET-5 regula positivamente a *cat-3*. Además de las catalasas, las enzimas glutatión peroxidasas también presentan afinidad por el H₂O₂ (Lledias and Hansberg, 2000). La rápida acumulación del transcrito de *gpx*

(Figura 12) en la mutante $\Delta set-5$, podría compensar la ausencia de CAT-3. A pesar de la transcripción de *gpx* y *gst-1* en la mutante $\Delta set-5$, su crecimiento se vió más afectado que la cepa wt en la presencia de distintas condiciones de t-BOOH. Probablemente, los productos de *gpx* y *gst-1* no son las principales enzimas que neutralizan los radicales peróxidos generados de t-BOOH. El análisis de otros genes relacionados a EORs podrían explicar el fenotipo sensible de $\Delta set-5$ en presencia de t-BOOH. La inducción rápida de algunos genes relacionados a EORs en las conidias de la mutante $\Delta set-5$, explicaría la mayor tolerancia al H₂O₂ comparado con la wt (Figura 13). La acumulación de *sod-1* en $\Delta set-5$, cuyo producto dismuta el superóxido, no correlaciona con su sensibilidad a menadiona. Evaluar la sensibilidad a bajas concentraciones de menadiona ayudarían a discernir las diferencias entre la cepa silvestre y $\Delta set-5$ en la capacidad de respuesta al estrés oxidante. Nuestros datos sugieren que SET-5 es un modulador negativo para *sod-1*, *gpx*, y positivo para *cat-3*, mientras que *gpx* parece no ser regulado por SET-5.

En *T. atroviride* los genes *dicer* y *ago* son necesarios para el desarrollo normal y para la expresión de los genes responsivos a la luz (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013). Nuestros resultados indican que los genes *dcr-1*, *dcr-2*, *ago1*, *ago2* y *ago3* son regulados por la luz a través de TGF-1 en *T. atroviride* (Figura 19). En la mutante $\Delta tgf-1$, la expresión de estos genes se indujeron de forma temprana y/o disminuyeron sus niveles en algunos casos (Figura 14). La expresión de los genes *ago* es congruente con los reportes de (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013), donde los niveles de expresión de los genes *ago-1* y *ago-2* disminuyeron 15 y 30 min después del pulso de luz (Figura 14). Adicionalmente, nuestros resultados mostraron que estos dos genes se inducen rápidamente (5 min). La acumulación de los transcritos de los genes que codifican para proteínas AGO y DCR sugieren la activación de la producción de los RNAs pequeños por la luz azul. No se descarta la posibilidad de que los RNAs pequeños sean cruciales para regular la percepción de la luz azul y la fotoconidiación por la rápida inducción de las proteínas AGO y DCR (Figura 19). Sin embargo, más estudios son necesarios para demostrar esta hipótesis. En *Arabidopsis thaliana* se postuló que la proteína GCN5 regula negativamente a los genes de la maquinaria de la biogénesis de los microRNAs (miRNAs) a través de un represor común por el incremento en los niveles de *DICER LIKE1 (DCL1)*, *SERRATE (SE)*, *HYPONASTIC LEAVES (HYL1)*, y *AGO1* en una mutante $\Delta gcn5$ (Kim *et al.*, 2009). Por la similitud de los resultados para los genes *ago* y *dcr-2*, pero no para *dcr-1*, proponemos que en nuestro modelo de estudio, puede actuar un mecanismo similar para la formación de RNAs

pequeños. Sin embargo, la disminución de los niveles de *dcr-1* en la mutante *tgf-1* en respuesta a la luz, sugiere que la proteína TGF-1 regula positivamente a *dcr-1* (**Figura 19**). En nuestro grupo de trabajo se ha catalogado a TGF-1 como coactivador de los genes responsivos a la luz azul en *T. atroviride* (Uresti-Rivera, 2013).

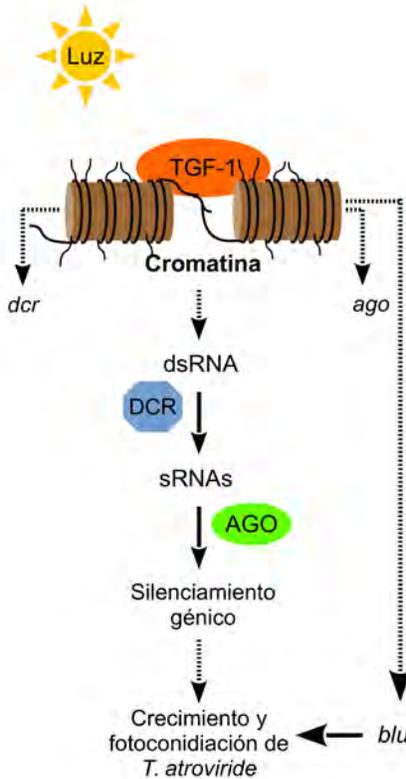


Figura 19. Modelo de la regulación de la expresión de la maquinaria del RNAi por TGF-1 en *Trichoderma atroviride*. En respuesta a la fotoinducción, la HAT TGF-1 modula la transcripción de los genes *dcr*, *ago*, *blu* y los precursores de los sRNAs (dsRNA), a través de la modificación de la cromatina. Los sRNAs son generados por la enzimas DCR a partir de RNAs de doble cadena (dsRNA) e incorporados en las proteínas AGOs para el silenciamiento génico y la regulación del desarrollo de *T. atroviride*. Los productos de los genes *blu* regulan la fotoconidiación de *T. atroviride*.

Discusión parte II

Los vectores de clonación diseñados por (Hernández-Díaz, 2013) contienen secuencias que codifican para una sola copia de las etiquetas FLAG y c-Myc, lo cual nos permitirá identificar a los elementos con los que interactúa, así como purificar a las proteínas HDA-2, SET-5, AGO1, AGO2 y TMK-3. Adicionalmente, se podrá modular la expresión de los genes de interés y por lo tanto, muy probablemente sus productos (*hda-2*, *argonautas*, *set-5* y *tmk-3*), ya que los vectores de expresión pBHD-3'F y pBHD-3'M contienen el promotor del gen *qa-2* de *N. crassa*, inducible por ácido quínico. Datos de nuestro grupo de trabajo indican que HDA-2 es un regulador positivo del desarrollo de *T. atroviride* en respuesta a factores como la luz y estrés oxidante (Osorio-Concepción *et al.*, 2017). La versión etiquetada de HDA-2 ayudará a identificar, si interactúa con complejos transcripcionales para llevar a cabo su función, como se ha reportado para algunas desacetilasas de histonas (Baidyaroy *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2010; Tribus *et al.*, 2010). Recientemente, se reportó que la proteína MAPK TMK-3 es importante para la respuesta a diversas señales de estrés (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016). En este sentido, los constructos de los genes *tmk-3* y *hda-2* con las etiquetas FLAG y/o c-Myc, serán fundamentales para revelar la probable interacción de TMK-3 con HDA-2. Ambas proteínas regulan de manera positiva la tolerancia al estrés oxidante y la transcripción de los genes responsivos a la luz (Esquivel-Naranjo *et al.*, 2016; Osorio-Concepción *et al.*, 2017). La ausencia de la proteína SET-5 amplifica la conidiación con menor cantidad de luz (Cristóbal-Mondragón, 2011). Por lo tanto, los constructos de *set-5* FLAG o c-Myc ayudarán a evidenciar si SET-5 actúa sobre los promotores de algunos genes responsivos a la luz a través de la interacción con complejos transcripcionales. La rápida acumulación de *hymA* y *con-1* en Δ *set-5*, indican que SET-5 es un modulador negativo de los genes de respuesta tardía a la luz. En *N. crassa*, la metiltransferasa de histonas DIM-5, SET1 y SET-2 regulan negativamente la expresión de *frq* inducida por la luz a través de la metilación su región promotora. Adicionalmente, la ausencia de la proteína DIM-5 incrementa la formación de conidias en respuesta a la luz (Miller *et al.*, 2001; Raduwan, Isola and Belden, 2013; Ruesch *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016).

Por otra parte, la maquinaria de la biogénesis de los RNAs pequeños y los efectores del mecanismo del silenciamiento mediada por moléculas de RNA son importantes en la fisiología de *T. atroviride* (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013). Las ARGONAUTAS incorporan RNAs pequeños que sirven como guía para el mecanismo de silenciamiento génico (Hutvagner and Simard, 2008). Las versiones

etiquetadas de las ARGONAUTAS permitirán la identificación de aquellos RNAs pequeños y sus mRNA blancos importantes para la fotoconidiación y otros procesos en *T. atroviride*. Existe poca información acerca del mecanismo de RNA de interferencia en *T. atroviride*. Por lo tanto los genes con las etiquetas serán cruciales para entender a detalle este proceso de regulación.

Conclusiones

1. El gen *hda-2* de *T. atroviride* se induce por la luz azul y por estrés oxidante.
2. La desacetilasa de histonas HDA-2 regula positivamente el crecimiento, la conidiación, la expresión de los genes responsivos a la luz y la respuesta al estrés oxidante (Publicación, Osorio-Concepción *et al.*, 2017).
3. La proteína HDA-2 y el complejo BLR regulan la transcripción de los genes relacionados a EORs y la acetilación de la histona H3 en el promotor de *cat-3* y *gst-1* (Publicación, Osorio-Concepción *et al.*, 2017).
4. La MTH SET-5 regula negativamente la conidiación, y la transcripción de *sod-1* y *gpx* que codifican para proteínas antioxidantes.
5. La delección de SET-5 incrementa la tolerancia de las conidias a H₂O₂.
6. SET-5 tiene un papel menor en la tolerancia de *T. atroviride* a H₂O₂, menadiona y terc-butilo a nivel de micelio.
7. Los genes *dicer* y *ago* son regulados por la luz en *T. atroviride*
8. La proteína TGF-1 regula diferencialmente la expresión de los genes *dcr* y *ago* implicados en la biogénesis de los RNAs pequeños

Perspectivas

1. Complementar a la mutante $\Delta set-5$ con el gen silvestre respectivo.
2. Medir la expresión de *set-5* en la respuesta al estrés oxidante.
3. Determinar los niveles de metilación y acetilación en los promotores de los genes responsivos a la luz en la cepa $\Delta set-5$.
4. Determinar los niveles de metilación en los promotores de los genes relacionados a EORs en la cepa $\Delta set-5$ expuesta a estrés oxidante.
5. Determinar la probable interacción de HDA-2 con la MAPK TMK3 para regular la respuesta al estrés oxidante.
6. Determinar la unión del complejo BLR sobre el promotor de *hda-2*, y de HDA-2 sobre el promotor de *blr-1*.
7. Determinar si las proteínas HDA-2 y SET-5 interactúan con el complejo BLR para la regulación transcripcional de genes responsivos a la luz y al estrés oxidante.

8. Realizar la mutagénesis sitio-dirigida del dominio HDAC de HDA-2 y evaluar la expresión de los genes responsivos a la luz.
9. Medir la acetilación en los promotores de algunos genes responsivos a la luz en la transformante HDA-2 con el dominio mutado.
10. Generar la mutación del dominio de unión putativo para la HDAC en la proteína BLR-2.
11. Determinar la expresión diferencial de los RNAs pequeños en la cepa wt y mutante $\Delta tgf-1$ en respuesta a la luz.
12. Identificar los mRNA blancos y determinar la función de silenciamiento de los RNAs pequeños diferenciales implicados en la fotoconidiación de *T. atroviride*.

Anexos

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo

Gen	JGI* ID	Secuencia (5' a 3')	Nombre del oligonucleótido	Temperatura de alineamiento (°C)	Amplicón (pb)	Experimento
<i>Pqa-2</i>		CAGGGGCGGGCTTGATTCCGCCT A	(1) qa-2-Fw	60		Clonación y Orientación del inserto
<i>ago1</i>	245602	GATATAGTACATGCTGTCCCTGAG ATGGCCTTCAAGTGAGTCTTC	(2) ago1-orf-Rv ago1-orf-Fw	59	3112	ORF del gen <i>ago1</i> y orientación del inserto
<i>ago3</i>	36522	GATGTACCACATGGTGCTTC	(3) ago3-orf-Rv ago3-orf-Fw	61	3054	ORF del gen <i>ago3</i> y orientación del inserto
<i>hda-2</i>	212638	GAATCCATGGCGGTTCCCG ATGGACGCCTACAGATTCCG	(4) hda-2-orf-Rv hda-2-orf-Fw	59	1488	ORF del gen <i>hda-2</i> y orientación del inserto
<i>set-5</i>	94162	TGCTCCTCTCTCAATTGGTCG ATGGGAATTGACGCCGGG	(5) set-5-orf-Rv set-5-orf-Fw	60	922	ORF del gen <i>set-5</i> y orientación del inserto
<i>tmk-3</i>	301235	TTGTGGGGGGAATTGTTG ATGGCCGAGTTGTGCGT	(6) tmk-3-orf-Rv tmk-3-orf-Fw	60	1727	ORF del gen <i>tmk-3</i> y orientación del inserto
<i>al-3</i>	160158	TTCCGTGCCAGCTCATCTCCTC GCCACCCGTCTATTCCCCACCAT	al-3-Fw al-3-Rv	60	385	RT-qPCR
<i>frq</i>	131340	GGCACCCTAAGAGGCAAGAACA TCAGAGGGCGCAGACATCAGTG	frq-TR-Fw frq-TR-Rv	60	100	RT-qPCR
<i>blr-2</i>	42429	GCGGATGGCTACCGGTAA AATTCGGCATCGCCTTT	blr-2-TR-Fw blr-2-TR-Rv	60	63	RT-qPCR
<i>tef1</i>	300828	AGGCCGAGCGTGAGCGTGGTAT ATGGGGACGAAGGCAACGGTCTT	tef1-TR-Fw tef1-TR-Rv	60	68	RT-qPCR
<i>phr-1</i>	302457	TTATGATCGGCCGGAGAAAAAT CAGCGTCGACAATGGGAAATC	phr1-TR-Fw phr1-TR-Rv	60	99	RT-qPCR
<i>hymA</i>	177297	CGGATGCCTTTACGACCTT GGTCAAGTTGGTGGAGAGA	hymA-TR-Fw hymA-TR-Rv	60	81	RT-qPCR
<i>ago-1</i>	245602	CTGCTCCACCATCTGACA GCCTGCCATTTGAGCCAT	ago1-TR-Fw ago1-TR-Rv	60	66	RT-qPCR
<i>ago-2</i>	20708	CGCAGGATCTCAACGGTA AGCGATTCCAGTGCTTGC	ago2-TR-Fw ago2-TR-Rv	59	62	RT-qPCR
<i>ago-3</i>	36522	GTTCAATTACCGTTCCTGGCA AGGGCTGTTCTTGTGCTGAA	ago3-TR-Fw ago3-TR-Rv	60	130	RT-qPCR
<i>dcr-1</i>	292263	GCCTTGCAAGAAGACTACCG TGTATCATTAGCGCGCAGAG	dcr1-TR-Fw dcr1-TR-Rv	60	125	RT-qPCR
<i>dcr-2</i>	291296	AAGAATGCCACCAAAGATGC ATCTCATCCGCTTTGAATGG	dcr2-TR-Fw dcr2-TR-Rv	60	98	RT-qPCR
<i>sod-1</i>	298583	GCGGATGGCTACCGGTAA AATTCGGCATCGCCTTT	sod1-TR-Fw sod1-TR-Rv	60	61	RT-qPCR
<i>gst-1</i>	93766	GCCGAGCCGCGAATTC CTGGACATGCCGGTAGTC	gst1-TR-Fw gst1-TR-Rv	60	65	RT-qPCR
<i>cat-3</i>	283309	CCTCGCTGCGTCACATCA TGCCGTCTCTTTGGTGAAC	cat3-TR-Fw cat3-TR-Rv	60	71	RT-qPCR
<i>gpx</i>	94401	TGCTCCCTGGACCAAAA GTCGCCGTTGACGTTGAT	gpx-TR-Fw gpx-TR-Rv	60	68	RT-qPCR

JGI*, Joint Genome Institute.

Materiales y métodos, parte I

Cepas y condiciones de cultivo: Se utilizaron las cepas de *Trichoderma atroviride* IMI 206040, $\Delta set-5$ y $\Delta hda-2$ (Cristóbal-Mondragón, 2011). Se generaron preinóculos de 48 h de crecimiento en condiciones de oscuridad a 28°C para su posterior inoculación en medio sólido de Vogel según el tipo de ensayo a realizar.

Para los ensayos de expresión génica y para la secuenciación de las muestras: Los preinóculos de *T. atroviride* se sembraron en medio mínimo sólido de Vogel suplementado con 2% de glucosa y se incubaron por 48 h en la oscuridad. A las colonias de 48 h de crecimiento se les aplicó un pulso de luz azul ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [3 min]). El micelio se colectó a 5, 15, 30 min, y 2, 3, 6 y 12 h después de aplicar el estímulo luminoso. El micelio en oscuridad se utilizó como control.

Para el ensayo de fotoconidiación de una dosis-respuesta para $\Delta set5$ y la cepa silvestre, se emplearon: 25, 75, y $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las colonias fotoinducidas se incubaron por 48 h en la oscuridad. Como control se crecieron las distintas cepas en la oscuridad.

Para los ensayos de estrés oxidativo, las cepas de *T. atroviride* se inocularon en medio mínimo sólido de Vogel adicionada con distintas concentraciones de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) (16, 30 y 60 mM), Menadiona (0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mM) y Terc-butilo (0.125, 0.25, 0.5 mM) y se incubaron a 28°C por 96 h. Micelio sin la exposición a agentes oxidantes se utilizaron como control.

Extracción de RNA y síntesis de DNA complementario (cDNA)

La extracción de RNA total se llevó a cabo por el método del Trizol® como describe el proveedor (Invitrogen). La calidad del RNA se validó por métodos espectrofotométricos en el equipo Epoch™ Microplate Spectrophotometer (Bio-Tek instruments) y por electroforesis de RNA en gel de agarosa-formaldehído al 1%. También, se consideró la relación 2:1 del RNA ribosomal 28S/18S. 5 μg de RNA total se trató con DNase I (Ambion). Para la síntesis de cDNA se utilizó la enzima transcriptasa reversa SuperScript™ II (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El cDNA se utilizó como molde para las reacciones de RT-qPCR con los oligonucleótidos específicos para cada gen de interés y SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

Análisis de la expresión de los genes de la conidiación: Para el análisis RT-qPCR de los genes que codifican para proteínas implicadas en la conidiación se diseñaron oligonucleótidos en el programa GenScript Real-time PCR con las

siguientes características: Longitud de 18 pb, T_m de 60°C, longitud de producto de 60 pb. Las mezclas de reacción consistió en: 10 µl de mezcla maestra de Sybr green (Applied Biosystems), 2 µl de cDNA templado (50ng/µl) y 1µl (10uM) de cada uno de los iniciadores. El programa de PCR fue el siguiente: un ciclo a 95° C por 5 min, 40 ciclos de (95 °C por 30 s, 65° C por 30 s, y 72° C por 40 s). La expresión relativa se normalizó con los niveles de expresión del gen *tef-1* por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Liva and Schmittgen et al., 2001).

Ensayos de resistencia de las conidias a H₂O₂: El porcentaje de la viabilidad de las conidias de las cepas wt y $\Delta set-5$ en la presencia de estrés oxidante se determinó cuantificando las colonias formadas después del tratamiento con diferentes concentraciones de H₂O₂ durante 30 min. Después del tratamiento se sembraron 150 conidias en medio mínimo sólido de Vogel adicionada con 0.09% desoxicolato de sodio y se incubaron a 28 °C por 48h en ciclos de 12 h luz/oscuridad. Las colonias sin tratamiento se utilizaron como control. El porcentaje de la viabilidad se determinó de la siguiente manera: Viabilidad (%): [(Control-Tratamiento)/(Control)] x 100.

Materiales y métodos Parte II

Cepas y condiciones de cultivo: Se utilizaron las cepas de *Trichoderma atroviride* IMI 206040 y la mutante $\Delta tgf-1$. Los preinóculos de la cepa wt se generaron a partir de la inoculación del micelio del hongo en el centro de una caja petri con MMV sólido en la oscuridad a 28 °C por 48 h. Bloques de micelio se inocularon en el centro de cajas petri con MMV sólido cubiertas con papel celofán estéril y se incubaron a 28 °C por 48 h en la oscuridad. El micelio de la mutante $\Delta tgf-1$ se inoculó en MMV líquido a 28 °C en agitación constante a 200 rpm por 72 h y se usó como preinóculo. 10 ml del preinóculo se vertió sobre cajas de petri con MMV sólido cubierto con papel celofán y se incubaron a 28 °C por 48 h en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, las colonias se les aplicó un pulso de luz azul (5 min [1200 µmol/m² s⁻¹]). El micelio se colectó a los 5, 15, 30 y 60 min después del estímulo luminoso con la ayuda de un bisturí bajo luz roja de seguridad para la extracción de RNA total y el análisis de la expresión de los genes de interés. El micelio sin la fotoinducción se utilizaron como control.

Extracción y purificación de los pequeños RNAs: Para la extracción y secuenciación de los RNAs pequeños se utilizó el kit mirVana™ miRNA Isolation,

de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el proveedor. Para ello, las cepas se crecieron en medio mínimo líquido de Vogel por 96 h en la oscuridad con agitación constante. Al micelio se le aplicó un pulso de luz azul (5 min) y se colectó el micelio a 5, 15 min después. Micelio sin el estímulo se utilizó como control.

Extracción de RNA total y síntesis de cDNA: La extracción del RNA total se llevó a cabo por el método del Trizol® a partir del micelio de las cepas de *T. atroviride* fotoinducidas. Para eliminar el DNA genómico, el RNA se trató con DNasa I (Ambion). Para sintetizar el cDNA se utilizó la enzima transcriptasa reversa SuperScript™ II (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Análisis transcripcional cuantitativo de los genes que codifican para las proteínas involucradas en la biogénesis de los RNAs pequeños: Para el análisis de RT-qPCR de los genes *ago* y *dcr* se diseñaron oligonucleótidos (**tabla III**) con el programa GenScript Real-time PCR con las siguientes características: Longitud de 18 pb, T_m de 60°C, longitud del producto de 60 pb. Las mezclas de reacción fueron: 10 µl de mezcla maestra de Sybr green (Applied Biosystems), 2 µl de cDNA templado (50ng/µl) y 1µl (10µM) de cada uno de los iniciadores. El programa de PCR consistió en: un ciclo a 95 °C por 5 min, 40 ciclos de (95 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, y 72 °C por 40 s).

Materiales y métodos, parte III

Diseño de los constructos con las etiquetas FLAG y c-Myc: El marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) sin el codón de paro de los genes *hda-2*, *set-5*, *ago1-3*, y *tmk-3* se amplificaron por PCR punto final a partir del DNA genómico de *T. atroviride* con los oligonucleótidos específicos para cada gene (**Tabla I**). Los productos se clonaron en el sitio de restricción *Sma* I presente en el vector de expresión pBHD-3'F y -3'M, bajo la dirección del promotor inducible por ácido quínico Pqa-2 que contiene el casete de resistencia a higromicina. Las construcciones generadas para *hda-2*, *set-5*, *ago1-3*, y *tmk-3* en pBHD-3'F y -3'M se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos pa-2-Fw y hph-Rv para la obtención los constructos *hda-2*, *set-5*, *ago1-3*, y *tmk-3* con las etiquetas FLAG o c-Myc. Los constructos se usarán para transformar los protoplastos de *T. atroviride*. Todas las amplificaciones por PCR se realizaron con la polimerasa de alta fidelidad Herculase II (Agilent Technologies), la cual no presenta actividad de transferasa terminal).

Obtención de protoplastos de *T. atroviride*: La generación de protoplastos se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por (Baek and Kenerley, 1998) con algunas modificaciones: Se inocularon 10^6 conidias/ml en 100 ml de medio PDYCB (24 g/L de Caldo papa dextrosa [DIFCOTM], 2 g/L de Extracto de levadura y 1.2 g/L de Casaaminoácidos), y se incubaron a 28 °C por 48 h con agitación constante a 250 rpm. El micelio se colectó por filtración, se lavó con agua y 0.5 g (Peso húmedo) se resuspendió en Osmoticum (50 mM de CaCl₂, 0.5 M de manitol, 50 mM de morfolinetano sulfónico [MES], pH 5.5) con 15 mg/ml de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (L1412;Sigma). La mezcla se incubó a 28 °C con agitación suave por 5 h. Los protoplastos se colectaron por filtración a través de una malla de nylon esteril con poros de 100 µm, se agregaron 5 ml de Osmoticum sobre la malla de nylon para recuperar los protoplastos retenidos. El filtrado se centrifugó a 1500 rpm por 20 min y el precipitado se resuspendió en Osmoticum a una concentración de 1×10^8 protoplastos/ml.

Transformación genética de *T. atroviride*: A 250 µl de protoplastos se le agregó de 10-20 µg de los constructos etiquetados con Flag y c-Myc. La mezcla se incubó en hielo por 20 min y se le agregó 250 µl de PEG-4000 al 60 % y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. De la muestra se realizaron diferentes diluciones y se mezclaron con 7 ml de medio de selección (agar suave 0.8 % y 50 µg/ml de higromicina). Las diluciones se vaciaron en cajas petri con medio selectivo. Las cajas se incubaron a 28°C por 72 h y se aislaron los protoplastos regenerados resistentes a higromicina. Las transformantes se seleccionaron al transferir tres veces una sola colonia a medios de cultivos de PDA adicionada con 300µg/ml de higromicina. Para confirmar la integración de la construcción, el DNA genómico de las transformantes resistentes a higromicina se utilizó para amplificar el ORF de cada gen de interés y el promotor qa-2 con los oligonucleótidos correspondientes (**Tabla III**).

Ensayos de inducción con ácido quínico (AQ): La transformante hda-2-1-3'F y la cepa wt se crecieron en medio mínimo sólido de Vogel 1X (Vogel, 1956) adicionada con 2% de glucosa sin ácido quínico (-QA) o suplementados con 0.1% de glucosa y 0.3%, 0.6%, 0.8% de QA. Las colonias con 48 h de crecimiento en la oscuridad se les aplicó un pulso de luz azul (5 min) o se incubaron por 96 h en ciclos de 12 h luz/oscuridad.

Participación en otros trabajos



Histone Deacetylase HDA-2 Regulates *Trichoderma atroviride* Growth, Conidiation, Blue Light Perception, and Oxidative Stress Responses

Macario Osorio-Concepción,^a Gema Rosa Cristóbal-Mondragón,^a
Braulio Gutiérrez-Medina,^b Sergio Casas-Flores^a

IPICYT, División de Biología Molecular, San Luis Potosí, México^a; IPICYT, División de Materiales Avanzados, San Luis Potosí, México^b

ABSTRACT Fungal blue-light photoreceptors have been proposed as integrators of light and oxidative stress. However, additional elements participating in the integrative pathway remain to be identified. In *Trichoderma atroviride*, the blue-light regulator (BLR) proteins BLR-1 and -2 are known to regulate gene transcription, mycelial growth, and asexual development upon illumination, and recent global transcriptional analysis revealed that the histone deacetylase-encoding gene *hda-2* is induced by light. Here, by assessing responses to stimuli in wild-type and $\Delta hda-2$ backgrounds, we evaluate the role of HDA-2 in the regulation of genes responsive to light and oxidative stress. $\Delta hda-2$ strains present reduced growth, misregulation of the *con-1* gene, and absence of conidia in response to light and mechanical injury. We found that the expression of *hda-2* is BLR-1 dependent and HDA-2 in turn is essential for the transcription of early and late light-responsive genes that include *blr-1*, indicating a regulatory feedback loop. When subjected to reactive oxygen species (ROS), $\Delta hda-2$ mutants display high sensitivity whereas Δblr strains exhibit the opposite phenotype. Consistently, in the presence of ROS, ROS-related genes show high transcription levels in wild-type and Δblr strains but misregulation in $\Delta hda-2$ mutants. Finally, chromatin immunoprecipitations of histone H3 acetylated at Lys9/Lys14 on *cat-3* and *gst-1* promoters display low accumulation of H3K9K14ac in Δblr and $\Delta hda-2$ strains, suggesting indirect regulation of ROS-related genes by HDA-2. Our results point to a mutual dependence between HDA-2 and BLR proteins and reveal the role of these proteins in an intricate gene regulation landscape in response to blue light and ROS.

IMPORTANCE *Trichoderma atroviride* is a free-living fungus commonly found in soil or colonizing plant roots and is widely used as an agent in biocontrol as it parasitizes other fungi, stimulates plant growth, and induces the plant defense system. To survive in various environments, fungi constantly sense and respond to potentially threatening external factors, such as light. In particular, UV light can damage biomolecules by producing free-radical reactions, in most cases involving reactive oxygen species (ROS). In *T. atroviride*, conidiation is essential for its survival, which is induced by light and mechanical injury. Notably, conidia are typically used as the inoculum in the field during biocontrol. Therefore, understanding the linkages between responses to light and exposure to ROS in *T. atroviride* is of major basic and practical relevance. Here, the histone deacetylase-encoding gene *hda-2* is induced by light and ROS, and its product regulates growth, conidiation, blue light perception, and oxidative stress responses.

KEYWORDS *Trichoderma*, blue light, oxidative stress, BLR proteins, histone acetylation, histone deacetylases, HDA-2, Hos2p, *Trichoderma*

Received 20 October 2016. Accepted 13 November 2016.

Accepted manuscript posted online 18 November 2016.

Citation Osorio-Concepción M, Cristóbal-Mondragón GR, Gutiérrez-Medina B, Casas-Flores S. 2017. Histone deacetylase HDA-2 regulates *Trichoderma atroviride* growth, conidiation, blue light perception, and oxidative stress responses. Appl Environ Microbiol 83:e02922-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02922-16>.

Editor Haruyuki Atomi, Kyoto University

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Sergio Casas-Flores, scasas@ipicyt.edu.mx.



The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species

Monika Schmöll,^a Christoph Dattenböck,^a Nohemi Carreras-Villaseñor,^b Artemio Mendoza-Mendoza,^c Doris Tisch,^d Mario Ivan Alemán,^e Scott E. Baker,^f Christopher Brown,^g Mayte Guadalupe Cervantes-Badillo,^h José Cetz-Chel,^b Gema Rosa Cristobal-Mondragon,^h Luis Delayo,^e Edgardo Ulises Esquivel-Naranjo,^{b*} Alexa Frischmann,^d Jose de Jesus Gallardo-Negrete,^h Monica García-Esquivel,^b Elida Yazmin Gomez-Rodriguez,^h David R. Greenwood,ⁱ Miguel Hernández-Oñate,^{b*} Joanna S. Kruszewska,^j Robert Lawry,^c Hector M. Mora-Montes,^k Tania Muñoz-Centeno,^h Maria Fernanda Nieto-Jacobo,^c Guillermo Nogueira Lopez,^c Vianey Olmedo-Monfil,^h Macario Osorio-Concepcion,^h Sebastian Pišsyk,^l Kyle R. Pomraning,^f Aroa Rodriguez-Iglesias,^a Maria Teresa Rosales-Saavedra,^h J. Alejandro Sánchez-Arreguín,^b Verena Seidl-Seiboth,^g Alison Stewart,^l Edith Elena Uresti-Rivera,^h Chih-Li Wang,^m Ting-Fang Wang,ⁿ Susanne Zellinger,^{d,o} Sergio Casas-Flores,^h Alfredo Herrera-Estrella^p

Austrian Institute of Technology, Department Health and Environment, Bioresources Unit, Tulln, Austria^a; LANGEBIO, National Laboratory of Genomics for Biodiversity, Cinvestav-Irapuato, Guanajuato, Mexico^b; Lincoln University, Bio-Protection Research Centre, Lincoln, Canterbury, New Zealand^c; Research Division Biotechnology and Microbiology, Institute of Chemical Engineering, TU Wien, Vienna, Austria^d; Cinvestav, Department of Genetic Engineering, Irapuato, Guanajuato, Mexico^e; Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington, USA^f; University of Otago, Biochemistry Department and Genetics, Dunedin, New Zealand^g; IPICYT, Molecular Biology Division, San Luis Potosí, Mexico^h; The University of Auckland, School of Biological Sciences, Auckland, New Zealandⁱ; Polish Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Biophysics, Laboratory of Fungal Glycobiology, Warsaw, Poland^j; University of Guanajuato, Department of Biology, Guanajuato, Guanajuato, Mexico^k; Marrone Bio Innovations, Davis, California, USA^l; National Chung-Hsing University, Department of Plant Pathology, Taichung, Taiwan^m; Academia Sinica, Institute of Molecular Biology, Taipei, Taiwanⁿ; University of Innsbruck, Institute of Microbiology, Innsbruck, Austria^o

SUMMARY	208
INTRODUCTION	209
GENOME INTEGRITY	210
Genome Defense Mechanisms	210
RNA-dependent silencing	210
Conclusions	211
DNA Repair	211
Direct reversion of base modifications	211
Photoreactivation	211
Repair of alkylated DNA	212
DNA repair by excision	212
(i) BER	213
(ii) NER	213

(continued)

Published 10 February 2016

Citation Schmöll M, Dattenböck C, Carreras-Villaseñor N, Mendoza-Mendoza A, Tisch D, Alemán MI, Baker SE, Brown C, Cervantes-Badillo MG, Cetz-Chel J, Cristobal-Mondragon GR, Delayo L, Esquivel-Naranjo EU, Frischmann A, Gallardo-Negrete JDJ, García-Esquivel M, Gomez-Rodriguez EY, Greenwood DR, Hernández-Oñate M, Kruszewska JS, Lawry R, Mora-Montes HM, Muñoz-Centeno T, Nieto-Jacobo MF, Nogueira Lopez G, Olmedo-Monfil V, Osorio-Concepcion M, Pišsyk S, Pomraning KR, Rodriguez-Iglesias A, Rosales-Saavedra MT, Sánchez-Arreguín JA, Seidl-Seiboth V, Stewart A, Uresti-Rivera EE, Wang C-L, Wang T-F, Zellinger S, Casas-Flores S, Herrera-Estrella A. 2016. The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma* species. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:205–327. doi:10.1128/MMBR.00040-15.

Address correspondence to Monika Schmöll, monika.schmoll@ait.ac.at, or Alfredo Herrera-Estrella, aherrera@langebio.cinvestav.mx.

* Present address: Edgardo Ulises Esquivel-Naranjo, Autonomous University of Queretaro, Faculty of Natural Sciences, Unit for Basic and Applied Microbiology, Queretaro, Mexico; Miguel Hernández-Oñate, Coordination of Food Technology of Plant Origin, Research Center for Food and Development, Hermosillo, Sonora, Mexico.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00040-15>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Bibliografía

- Adachi, T., Pimentel, D. R., Heibeck, T., Hou, X., Lee, Y. J., Jiang, B., Ido, Y. and Cohen, R. A.** (2004) 'S-glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 279(28), pp. 29857–62. doi: 10.1074/jbc.M313320200.
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D. and Hansberg, W.** (2005) 'Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes', *Trends in Microbiology*, 13(3), pp. 111–118. doi: 10.1016/j.tim.2005.01.007.
- Baek, J. M. and Kenerley, C. M.** (1998) 'The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system.', *Fungal genetics and biology: FG & B*, 23(1), pp. 34–44. doi: 10.1006/fgbi.1997.1025.
- Bahn, Y.-S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J. and Cardenas, M. E.** (2007) 'Sensing the environment: lessons from fungi', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 5(1), pp. 57–69. doi: 10.1038/nrmicro1578.
- Baidyaroy, D., Brosch, G., Ahn, J. H., Graessle, S., Wegener, S., Tonukari, N. J., Caballero, O., Loidl, P. and Walton, J. D.** (2001) 'A gene related to yeast HOS2 histone deacetylase affects extracellular depolymerase expression and virulence in a plant pathogenic fungus.', *The Plant cell*, 13(7), pp. 1609–1624. doi: 10.1105/TPC.010168.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K.** (2007) 'High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome', *Cell*, 129(4), pp. 823–837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009.
- Bedard, K. and Krause, K.-H.** (2007) 'The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology', *Physiological Reviews*, 87(1).
- Berger, S. L.** (2007) 'The complex language of chromatin regulation during transcription.', *Nature*, 447(7143), pp. 407–412. doi: 10.1038/nature05915.
- Bernstein, B. E., Tong, J. K. and Schreiber, S. L.** (2000) 'Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), pp. 13708–13. doi: 10.1073/pnas.250477697.
- Berrocal-Tito, G. M.** (1999) Caracterización del gen *phr1*, que codifica a la CPD-fotoliasa del hongo del suelo *Trichoderma harzianum*, y su papel en las respuestas a la luz azul. Centro de investigación y de estudios avanzados (CINVESTAV).
- Berrocal-Tito, G. M., Rosales-Saavedra, T., Herrera-Estrella, A., and Horwitz, B. A.,** (2000) 'Characterization of blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr1* in *Trichoderma harzianum*.'. *Photochemistry and photobiology*, 71(5), pp.662–668. doi:10.1562/0031-8655(2000)071<0662:COBLAD>2.0.CO;2.
- Betina, V.** (1995) 'Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*', *Folia Microbiologica*. Springer Netherlands, 40(3), pp. 219–224. doi: 10.1007/BF02814196.
- Brenna, A., Grimaldi, B., Filetici, P. and Ballario, P.** (2012) 'Physical association of the WC-1 photoreceptor and the histone acetyltransferase NGF-1 is required for blue light signal transduction in *Neurospora crassa*', *Molecular Biology of the Cell*, 23(19), pp. 3863–3872. doi: 10.1091/mbc.E12-02-0142.

- Brotman, Y., Kapuganti, J. G. and Viterbo, A.** (2010) 'Trichoderma. Quick guide', *Current Biology*, 20(9), pp. 390–391. doi: 10.1016/j.cub.2010.02.042.
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. and Allis, C. D.** (1996) 'Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation', *Cell*, 84(6), pp. 843–851.
- Carreras-Villaseñor, N.** (2013) *SERCHING FOR SMALL RNAs IN THE FILAMENTOUS FUNGUS Trichoderma atroviride*. CENTER OF RESEARCH AND ADVANCED STUDIES OF THE NATIONAL POLYTECHNIC INSTITUTE.
- Carreras-Villaseñor, N., Esquivel-Naranjo, E. U., Villalobos-Escobedo, J. M., Abreu-Goodger, C. and Herrera-Estrella, A.** (2013) 'The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*', *Molecular Microbiology*, 89(1), pp. 96–112. doi: 10.1111/mmi.12261.
- Casas-Flores, S. and Herrera-Estrella, A.** (2013) 'The influence of light on the biology of *Trichoderma*', in Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Mala Mukherjee, Schmoll, M. (ed.) *Trichoderma: biology and applications*. Wallingford: CABI, pp. 43–66. doi: 10.1079/9781780642475.0043.
- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P. and Herrera-Estrella, A.** (2004) 'BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*', *Microbiology*, 150(11), pp. 3561–3569. doi: 10.1099/mic.0.27346-0.
- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Rosales-Saavedra, T., Martínez-Hernández, P., Olmedo-Monfil, V. and Herrera-Estrella, A.** (2006) 'Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway.', *Eukaryotic cell*. American Society for Microbiology (ASM), 5(3), pp. 499–506. doi: 10.1128/EC.5.3.499-506.2006.
- Cetz-Chel, J. E., Balcázar-López, E., Esquivel-Naranjo, E. U. and Herrera-Estrella, A.** (2016) 'The *Trichoderma atroviride* putative transcription factor Blu7 controls light responsiveness and tolerance.', *BMC genomics*. BioMed Central, 17, p. 327. doi: 10.1186/s12864-016-2639-9.
- 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. Departamento de biología molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT), A. C., San Luis Potosí, México.
- Crosson, S. and Moffat, K.** (2002) 'Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch.', *The Plant cell*. American Society of Plant Biologists, 14(5), pp. 1067–75. doi:10.1105/TPC.010475.
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.-B., Vinh, J. and Toledano, M. B.** (2002) 'A Thiol Peroxidase Is an H₂O₂ Receptor and Redox-Transducer in Gene Activation', *Cell*, 111(4), pp. 471–481. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01048-6.
- Ding, S.-L., Liu, W., Iliuk, A., Ribot, C., Vallet, J., Tao, A., Wang, Y., Lebrun, M.-H. and Xu, J.-R.** (2010) 'The Tig1 Histone Deacetylase Complex Regulates Infectious Growth in the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*', *THE PLANT CELL ONLINE*. American Society of Plant Biologists, 22(7), pp. 2495–2508. doi: 10.1105/tpc.110.074302.
- Druzhinina, I. S., Komoń-Zelazowska, M., Ismaiel, A., Jaklitsch, W., Mullaw, T., Samuels, G. J. and Kubicek, C. P.** (2012) 'Molecular phylogeny and species delimitation in the section Longibrachiatum of *Trichoderma*', *Fungal Genetics and Biology*, 49(5), pp. 358–368. doi: 10.1016/j.fgb.2012.02.004.

- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. a, Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V and Kubicek, C. P.** (2011) 'Trichoderma: the genomics of opportunistic success.', *Nature reviews. Microbiology*, 9(10), pp. 749–759. doi: 10.1038/nrmicro2637.
- Esquivel-Naranjo, E.** (2007) 'ANÁLISIS MOLECULAR DE LA PERCEPCIÓN DE LUZ EN *Trichoderma atroviride*', *Tesis de doctorado*, pp. 1–104.
- Esquivel-Naranjo, E. U., García-Esquivel, M., Medina-Castellanos, E., Correa-Pérez, V. A., Parra-Arriaga, J. L., Landeros-Jaime, F., Cervantes-Chávez, J. A. and Herrera-Estrella, A.** (2016) 'A *Trichoderma atroviride* stress-activated MAPK pathway integrates stress and light signals', *Molecular Microbiology*, 100(5), pp. 860–876. doi: 10.1111/mmi.13355.
- Farazi, T. A., Juranek, S. A. and Tuschl, T.** (2008) 'The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members', *Development*, 135(7).
- Fierz, B. and Muir, T. W.** (2012) 'Chromatin as an expansive canvas for chemical biology', *Nature Chemical Biology*. Nature Publishing Group, 8(5), pp. 417–427. doi: 10.1038/nchembio.938.
- Finkel, T.** (2003) 'Oxidant signals and oxidative stress', *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), pp. 247–254. doi: 10.1016/S0955-0674(03)00002-4.
- Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R. and Pavletich, N. P.** (1999) 'Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors.', *Nature*, 401(6749), pp. 188–193. doi: 10.1038/43710.
- Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W. and Verdin, E.** (2002) 'Enzymatic Activity Associated with Class II HDACs Is Dependent on a Multiprotein Complex Containing HDAC3 and SMRT/N-CoR', *Molecular Cell*, 9(1), pp. 45–57. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00429-4.
- Fletcher, T. M. and Hansen, J. C.** (1996) 'The Nucleosomal Array: Structure/Function Relationships', *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. Begel House Inc., 6(2–3), pp. 149–188. doi: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v6.i2-3.40.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H. F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D. G., Davies, J. M. and Dolan, L.** (2003) 'Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth', *Nature*. Nature Publishing Group, 422(6930), pp. 442–446. doi: 10.1038/nature01485.
- Georgakopoulos, T. and Thireos, G.** (1992) 'Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 11(11), pp. 4145–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1396595>.
- Gresik, M., Kolarova, N. and Farkas, V.** (1988) 'Membrane potential, ATP, and cyclic AMP changes induced by light in *Trichoderma viride*', *Experimental Mycology*, 12(4), pp. 295–301. doi: 10.1016/0147-5975(88)90021-7.
- Gressel, J. and Galun, E.** (1967) 'Morphogenesis in *Trichoderma*: Photoinduction and RNA', *Developmental Biology*. Academic Press, 15(6), pp. 575–598. doi: 10.1016/0012-1606(67)90054-1.
- Grimaldi, B., Coiro, P., Filetici, P., Berge, E., Dobosy, J. R., Freitag, M., Selker, E. U. and Ballario, P.** (2006) 'The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent Blue Light Response Requires Acetylation of Histone H3 Lysine 14 by NGF-1', *Molecular Biology of the Cell*, 17(10), pp. 4576–4583. doi: 10.1091/mbc.E06-03-0232.

- Hansberg, W. and Aguirre, J.** (1990) 'Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen', *Journal of Theoretical Biology*, 142(2), pp. 201–221. doi: 10.1016/S0022-5193(05)80222-X.
- Heintzman, N. D., Hon, G. C., Hawkins, R. D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L. F., Ye, Z., Lee, L. K., Stuart, R. K., Ching, C. W., Ching, K. A., Antosiewicz-Bourget, J. E., Liu, H., Zhang, X., Green, R. D., Lobanenko, V. V., Stewart, R., Thomson, J. A., Crawford, G. E., Kellis, M. and Ren, B.** (2009) 'Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression', *Nature*. Nature Publishing Group, 459(7243), pp. 108–112. doi: 10.1038/nature07829.
- Heller, J. and Tudzynski, P.** (2011) 'Reactive Oxygen Species in Phytopathogenic Fungi: Signaling, Development, and Disease', *Annual Review of Phytopathology*. Annual Reviews , 49(1), pp. 369–390. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095355.
- Hermosa, R., Rubio, M. B., Cardoza, R. E., Nicolás, C., Monte, E. and Gutiérrez, S.** (2013) 'The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense.', *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 16(2), pp. 69–80. doi: 10.2436/20.1501.01.181.
- Hernández-Díaz, Y.** (2013) 'Construcción de vectores para la generación de cepas knockdown y sobreexpresantes con proteínas etiquetadas en el hongo filamentoso *Trichoderma atroviride*', Tesis de maestría. Departamento de biología molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT), A. C., San Luis Potosí, México.
- Hernández-Oñate, M. a, Esquivel-Naranjo, E. U., Mendoza-Mendoza, A., Stewart, A. and Herrera-Estrella, A. H.** (2012) 'An injury-response mechanism conserved across kingdoms determines entry of the fungus *Trichoderma atroviride* into development.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), pp. 14918–23. doi: 10.1073/pnas.1209396109.
- Hirayama, J., Cho, S. and Sassone-Corsi, P.** (2007) 'Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 104(40), pp. 15747–52. doi: 10.1073/pnas.0705614104.
- Hodawadekar, S. C. and Marmorstein, R.** (2007) 'Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 26(37), pp. 5528–5540. doi: 10.1038/sj.onc.1210619.
- Hombach, S. and Kretz, M.** (2016) 'Biology and Functioning'. doi: 10.1007/978-3-319-42059-2.
- Horwitz, B. A., Perlman, A. and Gressel, J.** (1990) 'Induction of *Trichoderma* sporulation by nanosecond laser pulses: evidence against cryptochrome cycling.', *Photochemistry and photobiology*, 51(1), pp. 99–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2304982>.
- Horwitz, B. A., Weisenseel, M. H., Dorn, A. and Gressel, J.** (1984) 'Electric Currents around Growing *Trichoderma* Hyphae, before and after Photoinduction of Conidiation.', *Plant physiology*. American Society of Plant Biologists, 74(4), pp. 912–6. doi: 10.1104/PP.74.4.912.
- Horwitz, B. a, Gressel, J., Malkin, S. and Epel, B. L.** (1985) 'Modified cryptochrome in vivo absorption in dim photosporulation mutants of *Trichoderma*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(9), pp. 2736–2740. doi: 10.1073/pnas.82.9.2736.
- Hutvagner, G. and Simard, M. J.** (2008) 'Argonaute proteins: key players in RNA silencing.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(1), pp. 22–32. doi: 10.1038/nrm2321.

- Jenuwein, T. and Allis, C. D.** (2001) 'Translating the Histone Code', *Science*, 293(5532).
- Jiang, L., Wei, C. and Li, Y.** (2012) 'Viral suppression of RNA silencing', *Science China Life Sciences*, 55(2), pp. 109–118. doi: 10.1007/s11427-012-4279-x.
- Jiang, N., Yang, Y., Janbon, G., Pan, J. and Zhu, X.** (2012) 'Identification and Functional Demonstration of miRNAs in the Fungus *Cryptococcus neoformans*', *PLoS ONE*, 7(12), pp. 20–25. doi: 10.1371/journal.pone.0052734.
- Kim, W., Benhamed, M., Servet, C., Latrasse, D., Zhang, W., Delarue, M. and Zhou, D.-X.** (2009) 'Histone acetyltransferase GCN5 interferes with the miRNA pathway in *Arabidopsis*.', *Cell research*, 19(7), pp. 899–909. doi: 10.1038/cr.2009.59.
- Kölle, D., Sarg, B., Lindner, H. and Loidl, P.** (1998) 'Substrate and sequential site specificity of cytoplasmic histone acetyltransferases of maize and rat liver', *FEBS Letters*, 421(2), pp. 109–114. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01544-5.
- Kornberg, R. D. and Lorch, Y.** (1999) 'Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome', *Cell*, 98(3), pp. 285–294. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81958-3.
- Kutter, C. and Svoboda, P.** (2008) 'miRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown.', *RNA biology*, 5(4), pp. 181–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182524>.
- Lee, H.-C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S. K., Pertsemlidis, A., Lewis, Z. a, Freitag, M., Selker, E. U., Mello, C. C. and Liu, Y.** (2010) 'Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi.', *Molecular cell*. Elsevier Ltd, 38(6), pp. 803–14. doi: 10.1016/j.molcel.2010.04.005.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V.** (1993) 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*', *Cell*, 75(5), pp. 843–854.
- Liu, Y., Liu, N., Yin, Y., Chen, Y., Jiang, J. and Ma, Z.** (2015) 'Histone H3K4 methylation regulates hyphal growth, secondary metabolism and multiple stress responses in *Fusarium graminearum*', *Environmental Microbiology*, 17(11), pp. 4615–4630. doi: 10.1111/1462-2920.12993.
- Lledías, F. and Hansberg, W.** (2000) 'Catalase modification as a marker for singlet oxygen.', *Methods in enzymology*, 319, pp. 110–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10907504>.
- Michán, S., Lledías, F. and Hansberg, W.** (2003) 'Asexual development is increased in *Neurospora crassa cat-3*-null mutant strains.', *Eukaryotic cell*. American Society for Microbiology (ASM), 2(4), pp. 798–808. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12912899>.
- Miller, T., Krogan, N. J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., Greenblatt, J. F. and Shilatifard, A.** (2001) 'COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 98(23), pp. 12902–7. doi: 10.1073/pnas.231473398.
- Musselman, C. A., Lalonde, M.-E., Côté, J. and Kutateladze, T. G.** (2012) 'Perceiving the epigenetic landscape through histone readers', *Nature Structural & Molecular Biology*. Nature Research, 19(12), pp. 1218–1227. doi: 10.1038/nsmb.2436.

- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. and Hancock, J. T.** (2002) 'Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants', *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press, 53(372), pp. 1237–1247. doi: 10.1093/jexbot/53.372.1237.
- Nicolás, C., Hermosa, R., Rubio, B., Mukherjee, P. K. and Monte, E.** (2014) 'Trichoderma genes in plants for stress tolerance- status and prospects', *Plant Science*, 228, pp. 71–78. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.03.005.
- Nicolas, F. E., Moxon, S., de Haro, J. P., Calo, S., Grigoriev, I. V., Torres-Martínez, S., Moulton, V., Ruiz-Vázquez, R. M. and Dalmay, T.** (2010) 'Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*', *Nucleic Acids Research*, 38(16), pp. 5535–5541. doi: 10.1093/nar/gkq301.
- Niu, Y., DesMarais, T. L., Tong, Z., Yao, Y. and Costa, M.** (2015) 'Oxidative stress alters global histone modification and DNA methylation', *Free Radical Biology and Medicine*, 82, pp. 22–28. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.028.
- Osorio-Concepción, M., Casas-Flores, S. and Cortés-Penagos, C.** (2013) 'Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz', *Revista mexicana de micología*. Sociedad Mexicana de Micología, 37, pp. 41–50.
- Osorio-Concepción, M., Cristóbal-Mondragón, G. R., Gutiérrez-Medina, B. and Casas-Flores, S.** (2017) 'Histone Deacetylase HDA-2 Regulates *Trichoderma atroviride* Growth, Conidiation, Blue Light Perception, and Oxidative Stress Responses', *Applied and Environmental Microbiology*. 83(3), pp. e02922-16. doi: 10.1128/AEM.02922-16.
- Pandey, R., Müller, A., Napoli, C. A., Selinger, D. A., Pikaard, C. S., Richards, E. J., Bender, J., Mount, D. W. and Jorgensen, R. A.** (2002) 'Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 30(23), pp. 5036–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466527>.
- Parthun, M. R.** (2012) 'Histone acetyltransferase 1: More than just an enzyme?', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(3), pp. 256–263. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.07.006.
- Raduwan, H., Isola, A. L. and Belden, W. J.** (2013) 'Methylation of histone H3 on lysine 4 by the lysine methyltransferase SET1 protein is needed for normal clock gene expression', *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), pp. 8380–8390. doi: 10.1074/jbc.M112.359935.
- Reinheckel, T., Nedeleev, B., Prause, J., Augustin, W., Schulz, H.-U., Lippert, H. and Halangk, W.** (1998) 'Occurrence of Oxidatively Modified Proteins: An Early Event in Experimental Acute Pancreatitis', *Free Radical Biology and Medicine*, 24(3), pp. 393–400. doi: 10.1016/S0891-5849(97)00271-2.
- Rocha-Ramírez, V., Omero, C., Chet, I., Horwitz, B. a. and Herrera-Estrella, A.** (2002) '*Trichoderma atroviride* G-protein α -subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation', *Eukaryotic Cell*, 1(4), pp. 594–605. doi: 10.1128/EC.1.4.594-605.2002.
- Rodríguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, S. and Fischer, R.** (2010) 'Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference.', *Annual review of microbiology*, 64, pp. 585–610. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134000.
- Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E. U., Casas-Flores, S., Martínez-Hernández, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C. and Herrera-Estrella, A.** (2006) 'Novel light-regulated

genes in *Trichoderma atroviride*: A dissection by cDNA microarrays', *Microbiology*, 152(11), pp. 3305–3317. doi: 10.1099/mic.0.29000-0.

Rosen, D., Edelman, M., Galun, E. and Danon, D. (1974) 'Biogenesis of Mitochondria in *Trichoderma viride*: Structural Changes in Mitochondria and Other Spore Constituents during Conidium Maturation and Germination', *Journal of General Microbiology*. Microbiology Society, 83(1), pp. 31–49. doi: 10.1099/00221287-83-1-31.

Ruesch, C. E., Ramakrishnan, M., Park, J., Li, N., Chong, H. S., Zaman, R., Joska, T. M. and Belden, W. J. (2015) 'The Histone H3 Lysine 9 Methyltransferase DIM-5 Modifies Chromatin at frequency and Represses Light-Activated Gene Expression', 5(January), pp. 93–101. doi: 10.1534/g3.114.015446.

Saito, Y., Suzuki, H., Taya, T., Nishizawa, M., Tsugawa, H., Matsuzaki, J., Hirata, K., Saito, H. and Hibi, T. (2012) 'Development of a novel microRNA promoter microarray for ChIP-on-chip assay to identify epigenetically regulated microRNAs', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 426(1), pp. 33–37. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.012.

Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M. I., Baker, S. E., Brown, C., Cervantes-Badillo, M. G., Cetz-Chel, J., Cristobal-Mondragon, G. R., Delaye, L., Esquivel-Naranjo, E. U., Frischmann, A., Gallardo-Negrete, J. de J., García-Esquivel, M., Gomez-Rodriguez, E. Y., Greenwood, D. R., Hernández-Oñate, M., Kruszewska, J. S., Lawry, R., Mora-Montes, H. M., Muñoz-Centeno, T., Nieto-Jacobo, M. F., Nogueira Lopez, G., Olmedo-Monfil, V., Osorio-Concepcion, M., Pilsyk, S., Pomraning, K. R., Rodriguez-Iglesias, A., Rosales-Saavedra, M. T., Sánchez-Arreguín, J. A., Seidl-Seiboth, V., Stewart, A., Uresti-Rivera, E. E., Wang, C.-L., Wang, T.-F., Zeilinger, S., Casas-Flores, S. and Herrera-Estrella, A. (2016) 'The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80(1), pp. 205–327. doi: 10.1128/MMBR.00040-15.

Schmoll, M., Esquivel-Naranjo, E. U. and Herrera-Estrella, A. (2010) '*Trichoderma* in the light of day - Physiology and development', *Fungal Genetics and Biology*. Elsevier Inc., 47(11), pp. 909–916. doi: 10.1016/j.fgb.2010.04.010.

Sharma, V. M., Tomar, R. S., Dempsey, A. E. and Reese, J. C. (2007) 'Histone Deacetylases RPD3 and HOS2 Regulate the Transcriptional Activation of DNA Damage-Inducible Genes', 27(8), pp. 3199–3210. doi: 10.1128/MCB.02311-06.

Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. and Aravin, A. A. (2011) 'PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(4), pp. 246–258. doi: 10.1038/nrm3089.

Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A. and Stewart, A. (2010) 'Reproduction without sex: Conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*', *Microbiology*, 156(10), pp. 2887–2900. doi: 10.1099/mic.0.041715-0.

Steyaert, J. M., Weld, R. J. and Stewart, A. (2010a) 'Ambient pH intrinsically influences *Trichoderma* conidiation and colony morphology', *Fungal Biology*. Elsevier Ltd, 114(2–3), pp. 198–208. doi: 10.1016/j.funbio.2009.12.004.

Steyaert, J. M., Weld, R. J. and Stewart, A. (2010b) 'Isolate-specific conidiation in *Trichoderma* in response to different nitrogen sources', *Fungal Biology*. Elsevier Ltd, 114(2–3), pp. 179–188. doi: 10.1016/j.funbio.2009.12.002.

- Sun, G., Zhou, Z., Liu, X., Gai, K., Liu, Q., Cha, J., Kaleri, F. N., Wang, Y. and He, Q.** (2016) 'Suppression of WHITE COLLAR-independent *frequency* Transcription by Histone H3 Lysine 36 Methyltransferase SET-2 Is Necessary for Clock Function in *Neurospora*', *Journal of Biological Chemistry*, 291(21), pp. 11055–11063. doi: 10.1074/jbc.M115.711333.
- Sun, W., Julie Li, Y.-S., Huang, H.-D., Shyy, J. Y.-J. and Chien, S.** (2010) 'microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems.', *Annual review of biomedical engineering*, 12, pp. 1–27. doi: 10.1146/annurev-bioeng-070909-105314.
- Takemoto, D., Tanaka, A. and Scott, B.** (2007) 'NADPH oxidases in fungi: Diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation', *Fungal Genetics and Biology*, 44(11), pp. 1065–1076. doi: 10.1016/j.fgb.2007.04.011.
- Támová, G., Farkaš, V. and Betina, V.** (1995) 'Relationship between light intensity and the changes in the intracellular level of ATP during photoinduction in *Trichoderma viride*', *Folia Microbiologica*, 40(5), pp. 516–518. doi: 10.1007/BF02814735.
- Taylor, B. L. and Zhulin, I. B.** (1998) 'In search of higher energy: metabolism-dependent behaviour in bacteria.', *Molecular microbiology*, 28(4), pp. 683–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643537>.
- Tribus, M., Bauer, I., Galehr, J., Rieser, G., Trojer, P., Brosch, G., Loidl, P., Haas, H. and Graessle, S.** (2010) 'A novel motif in fungal class 1 histone deacetylases is essential for growth and development of *Aspergillus*.', *Molecular biology of the cell*. American Society for Cell Biology, 21(2), pp. 345–53. doi: 10.1091/mbc.E09-08-0750.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. and Reuter, G.** (1994) 'The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes.', *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 13(16), pp. 3822–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915232>.
- Turner, B. M.** (2007) 'Defining an epigenetic code.', *Nature cell biology*, 9(1), pp. 2–6. doi: 10.1038/ncb0107-2.
- Uresti-Rivera, E.** (2013) 'La acetiltransferasa de histonas TGF-1 es el en *Trichoderma atroviride*', *Tesis de doctorado*. Departamento de biología molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT), A. C., San Luis Potosí, México..
- Veal, E. A., Findlay, V. J., Day, A. M., Bozonet, S. M., Evans, J. M., Quinn, J. and Morgan, B. A.** (2004) 'A 2-Cys Peroxiredoxin Regulates Peroxide-Induced Oxidation and Activation of a Stress-Activated MAP Kinase', *Molecular Cell*, 15(1), pp. 129–139. doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.021.
- Viterbo, A. and Horwitz, B. A.** (2010) 'Mycoparasitism', in *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*. American Society of Microbiology, pp. 676–693. doi: 10.1128/9781555816636.ch42.
- Vogel, H. J.** (1956) 'A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N)', *Microbial Genet. Bull.*, 13, p. 42–43.
- Wang, A., Kurdistani, S. K. and Grunstein, M.** (2002) 'Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast.', *Science (New York, N.Y.)*, 298(5597), pp. 1412–1414. doi: 10.1126/science.1077790.

- Wang, M., Dong, Y., Zhao, Q., Wang, F., Liu, K., Jiang, B. and Fang, X.** (2014) 'Identification of the role of a MAP kinase Tmk2 in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 4, p. 6732. doi: 10.1038/srep06732.
- Watson, A. D., Edmondson, D. G., Bone, J. R., Mukai, Y., Yu, Y., Du, W., Stillman, D. J. and Roth, S. Y.** (2000) 'Ssn6 – Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression', (Carlson 1997), pp. 2737–2744. doi: 10.1101/gad.829100.DNA.
- Workman, J. L. and Kingston, R. E.** (1998) 'ALTERATION OF NUCLEOSOME STRUCTURE AS A MECHANISM OF TRANSCRIPTIONAL REGULATION', *Annual Review of Biochemistry*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , 67(1), pp. 545–579. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.545.
- Wu, J. and Grunstein, M.** (2000) '25 years after the nucleosome model: chromatin modifications', *Trends in Biochemical Sciences*, 25(12), pp. 619–623. doi: 10.1016/S0968-0004(00)01718-7.
- Xhemalce, B., Dawson, M. A., Bannister, A. J., Xhemalce, B., Dawson, M. A. and Bannister, A. J.** (2011) 'Histone Modifications', in *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. doi: 10.1002/3527600906.mcb.201100004.
- Xin, Q., Gong, Y., Lv, X., Chen, G. and Liu, W.** (2013) '*Trichoderma reesei* Histone Acetyltransferase Gcn5 Regulates Fungal Growth, Conidiation, and Cellulase Gene Expression', *Current Microbiology*. Springer US, 67(5), pp. 580–589. doi: 10.1007/s00284-013-0396-4.
- Zhang, K., Sridhar, V. V., Zhu, J., Kapoor, A. and Zhu, J.-K.** (2007) 'Distinctive Core Histone Post-Translational Modification Patterns in *Arabidopsis thaliana*', *PLoS ONE*. Edited by F. Berger. Public Library of Science, 2(11), p. e1210. doi: 10.1371/journal.pone.0001210.