



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“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 que presenta

Gema Rosa Cristóbal Mondragón

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias de Biología Molecular

Director de Tesis

Dr. J. Sergio Casas Flores

San Luis Potosí, S.L.P., 2 diciembre de 2011

Constancia de aprobación de tesis

La tesis "**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***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Gema Rosa Cristóbal Mondragón** y aprobada el **02 de diciembre de 2011** 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.



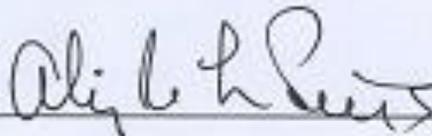
Dr. J. Sergio Casas Flores

Director de la tesis



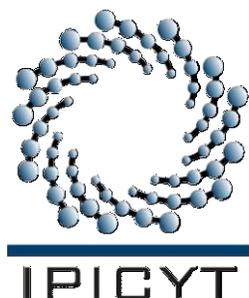
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Asesora de la tesis



Dr. Alejandro De Las Peñas Nava

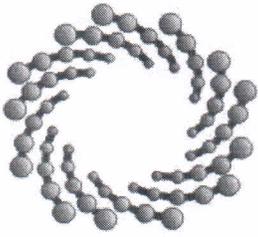
Asesor de la tesis



Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del **Dr. J. Sergio Casas Flores**.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**No. 333183**) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. **PROYECTO SEP- CONACYT 83798** otorgado a **Alfredo Herrera Estrella y J. Sergio Casas Flores** en el esquema de apoyo a iniciativas de colaboración entre un cuerpo académico o entre un grupo de investigación, consolidados y otro cuerpo académico o grupo en formación o en consolidación.



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

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de diciembre del año 2011, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Alejandro De Las Peñas Nava	Presidente	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Gema Rosa Cristóbal Mondragón

sobre la Tesis intitulada:

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

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. J. Sergio Casas Flores

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes de diciembre de 2011.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Marcial Bonilla Marín
Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



DEDICATORIAS

A mis padres Elvia Rosa Mondragón Jaramillo y Alejandro Castro Leodegario por el amor y el apoyo que me han otorgado durante toda mi vida. Son unos excelentes padres, han cuidado de mí siempre, han confiado en mí siempre y han sacrificado muchas cosas en su vida con el único propósito de sacarme adelante. Amo a mis padres con todo mi corazón.

A mis hermanas Fátima, Roció y Alondra por su cariño y hermosos momentos compartidos, las amo hermanas y estoy orgullosa de cada una de ustedes. A Noemí, para mí eres como una hermana.

A mi abuelita Efigenia Jaramillo Silva por sus consejos, cuidados y cariño otorgado, es la persona más fuerte que conozco y logró sobrevivir ante el más grande reto que la vida le ha puesto en el camino.

A Josué Obed Jaramillo Polanco, eres un hombre bueno e inteligente y te admiro mucho, además has estado a mi lado tanto en los momentos buenos como en los momentos malos, compartiendo toda clase de sentimientos, ya son siete, te amo.

A mi gran amigo Chucho porque a pesar de la distancia, continúa siendo mi mejor amigo. A mi amiga y comadre Dody, porque sin proponérselo nuestra amistad se hace cada día más fuerte.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darnos la vida, la fuerza espiritual y física para realizar este proyecto.

Al IPICYT y a sus profesores por todas sus enseñanzas y por permitirme formar parte de tan bonito instituto.

A mi director de tesis: Dr. Sergio Casas Flores por invertir su tiempo en el diseño y dirección de este trabajo, por el apoyo moral y académico brindado y por contagiar con su entusiasmo para poner más empeño en el desarrollo de la ciencia y por todas sus enseñanzas.

A mis sinodales: Dra. Lina Raquel Riego Ruíz y Alejandro De Las Peñas Nava por dedicar parte de su valioso tiempo en la revisión y corrección de este trabajo.

A mis amigos del laboratorio 8: Javier, Chuy, Ángel, Paco, Macarito, Gerardo y Miguelón, porque son muy buenos amigos y unos excelentes compañeros de trabajo. A las valiosas mujeres de este laboratorio Elida, Berenice, Claudia, Tania, Noemí y la técnico María Isabel Isordia Jasso son realmente muy buenas amigas fue un verdadero placer compartir todas las horas de trabajo con tan agradables mujeres, a donde quiera que vaya, sé que no será igual. Y muy especialmente a Edith y Mayte por todas sus enseñanzas y por su apoyo al guiarme en el transcurso de este proyecto.

Gracias a todos...con cariño Gema.

CONTENIDO

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE TESIS.....	¡Error! Marcador no definido.
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	iii
ACTA DE EXÁMEN.....	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
Importancia de la luz para los seres vivos	1
Importancia de la luz para los hongos	3
<i>Trichoderma atroviride</i> como modelo fotomorfogénico	3
Regulación de la expresión de los genes a nivel epigenético	5
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Cepas.....	9
Plásmidos	9
Medios y condiciones de cultivo	9
Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de cDNA.....	10
Generación de construcciones para reemplazar a los genes <i>tarsc-9</i> , <i>tahos-2</i> y <i>taset-5</i>	10
Transformación de <i>T. atroviride</i> por el método de protoplastos	10
Escrutinio de las mutantes en los genes Δ <i>tarsc-9</i> , Δ <i>taset-5</i> y Δ <i>tahos-2</i>	11
Ensayo de fotoconidiación y fotoinducción	12
Análisis microscópico de las cepas WT y Δ <i>tahos-2</i>	13
Cuantificación de conidias por espectrofotometría	13
RESULTADOS	15
Obtención de las mutantes Δ <i>tahos-2</i> , Δ <i>taset-5</i> y Δ <i>tarsc-9</i>	15
La cepa Δ <i>tahos-2</i> no conidia en respuesta a luz azul.....	16
La cepa Δ <i>taset-5</i> presenta un fenotipo de hipersensibilidad a la luz azul	21
Las cepas Δ <i>tahos-2</i> y Δ <i>taset-5</i> responden diferencialmente al daño mecánico.....	25
En las cepas Δ <i>taset-5</i> y Δ <i>tahos-2</i> se afecta la expresión de genes que responden a luz azul.	25
DISCUSIÓN.....	29
La proteína TAHOS-2 es importante para el desarrollo de <i>T. atroviride</i>	29
La proteína TASET-5 participa en la regulación negativa de la conidiación en respuesta a la luz azul y al daño mecánico en <i>T. atroviride</i>	32
CONCLUSIONES	35
PERSPECTIVAS	36
REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.Representación esquemática de las proteínas TARSC-9, TAHOS-2 y TASET-5.....	17
Figura 2.Análisis de las mutantes $\Delta tarsc-9$, $\Delta taset-5$ y $\Delta tahos-2$ por PCR..	18
Figura 3.Ausencia de los genes mutados.	19
Figura 4.Fenotipo de las mutantes $\Delta tahos-2$ y $\Delta taset-5$	20
Figura 5.Ensayo de fotoconidiación y análisis microscópico de la mutante $\Delta tahos-2$	22
Figura 6.Ensayo de fotoconidiación de las cepa WT y de la cepa $\Delta taset-5$	23
Figura 7.Ensayo de fotoinducción dosis-respuesta de la cepa $\Delta taset-5$..	24
Figura 8.Conidiación por daño mecánico de las mutantes $\Delta taset-5$ y $\Delta tahos-2$..	27
Figura 9.Ensayo de RT-PCR de los genes que responden a la luz azul en las cepas $\Delta tahos-2$ y $\Delta taset-5$..	28

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1. Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo..	37
Figura suplementaria 1. Representación esquemática del plasmido pBHY70 y de las construcciones generadas para transformar a <i>T. atroviride</i>	40
Figura suplementaria 2. Determinación de la relación existente entre la DO ₅₅₀ y la cantidad de conidias en <i>T. atroviride</i>	41

RESUMEN

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*

La luz solar es muy importante para la vida, debido a que regula procesos metabólicos y del desarrollo en los seres vivos. La luz se usa como fuente de energía (fotosíntesis) o de información (ritmo circadiano). En los hongos, la luz regula la conidiación, los ritmos circadianos y la síntesis de β -carotenos, entre otros procesos. El hongo filamentoso *Trichoderma atroviride* se utiliza como modelo fotomorfogénico, debido a que después de un pulso de luz azul, forma un anillo de conidias en la periferia de la colonia. Las proteínas BLR-1 y BLR-2 de *T. atroviride* forman el complejo fotorreceptor que regula la fotoconidiación y la transcripción de genes que responden a la luz azul. En los organismos eucariotas el DNA se encuentra asociado a las histonas y forman una estructura denominada cromatina. Las colas amino terminales de las histonas son susceptibles de modificaciones, incluyendo la metilación, la acetilación y la desacetilación, que son llevadas a cabo por las metiltransferasas de histonas (HMT), las acetil transferasas de histonas (HAT) y las desacetilasas de histonas (HDAC) respectivamente. Estas modificaciones pueden ser únicas o en combinación y se ha propuesto que en conjunto representan un “código de histonas”, que afecta la expresión génica. En este trabajo generamos mutantes de los genes *tahos-2* y *taset-5*, cuyos productos son una HDAC putativa y una HMT putativa respectivamente. La cepa Δ *tahos-2* está alterada en el desarrollo de los conidióforos y no presenta fotoconidiación. La cepa Δ *taset-5* es más sensible a la luz azul con respecto a la cepa WT. La cepa Δ *tahos-2* es incapaz de conidiar en respuesta al daño mecánico, mientras que la cepa Δ *taset-5* muestra una mayor conidiación por este estímulo con respecto a la cepa WT. En ambas mutantes se vio alterada la expresión de algunos genes responsivos a luz azul. En resumen, las proteínas TAHOS-2 y TASET-5 juegan un papel clave en el desarrollo y en la respuesta a la luz azul en *T. atroviride*.

PALABRAS CLAVE. *Trichoderma atroviride*, Regulación por luz azul, Regulación epigenética.

ABSTRACT

Involvement of chromatin modifying proteins TAHOS-2, TARSC-9 and TASET-5 in response to blue light in *Trichoderma atroviride*

Sun light is essential for life, it regulates many physiological and developmental processes in living organisms. Light is used as energy source, (photosynthesis) or as an information source (circadian rhythm). In fungi, light regulates among other processes, conidiation, circadian clocks and synthesis of β -carotenes. *Trichoderma atroviride* is a filamentous fungus used as a photomorphogenetic model due to its ability to form a ring of green conidia at the colony periphery after light exposure. *T. atroviride* BLR-1 and BLR-2 proteins form a photoreceptor complex and are key transcriptional regulators of photoconidiation and light responsive genes. Gene expression depends not only on cis-specific sequences in the promoter but also on the chromatin modifications. In eukaryotes, DNA interacts with histones, forming a structure named chromatin. The amino termini of histones are subject to modifications, including methylation conducted by histone methyltransferases (HMTs), acetylation performed by histone acetyltransferases (HATs) and deacetylation caused by histone deacetyltransferases (HDACs). These histones modifications can occurred alone, sequentially or in combination, and has been proposed the existence of a "histone code". In this work we generated mutants in *tahos2* and *taset5* genes whose products encode for a putative HDAC class I and a putative HMT respectively. We demonstrated that Δ *tahos2* mutant strain is impaired in conidiophore development and photoconidiation. Δ *taset5* mutant strain is more sensitive to light that the wild type strain. Furthermore, both mutants are altered in gene expression of some photoinducible genes. Δ *tahos2* is unable to conidiate in response to mechanical injury, whereas Δ *taset5* showed hyperconidiation in response to this stimulus. Our results demonstrate that TAHOS2 and TASET5 play important roles in development and in response to blue light in *T. atroviride*.

KEY WORDS. *Trichoderma atroviride*, Blue Light Regulation. Epigenetic regulation.

INTRODUCCIÓN

Importancia de la luz para los seres vivos

La luz solar es un factor muy importante para la vida en la tierra debido a que regula procesos metabólicos y del desarrollo en casi todos los organismos. La luz, puede ser utilizada como fuente de energía (la fotosíntesis en las plantas) o como fuente de información. Los efectos de la luz pueden ser tanto benéficos o como dañinos. La capacidad de percibir rápidamente a la señal luminosa es crucial para adaptarse al entorno y poder sobrevivir. Se han descrito una gran variedad de procesos biológicos en respuesta a casi todo el espectro de luz visible. En los seres vivos la información de la señal luminosa se percibe y se transmite mediante proteínas receptoras conocidas como fotorreceptores, las cuales están asociadas a un cromóforo y, dependiendo del tipo, pueden percibir y responder a diferencias en el color, la intensidad, la dirección y la duración de la luz (Terzaghi y Cashmore, 1995; Falciatore y Bowler, 2005).

Las rodopsinas son fotorreceptores que unen al cromóforo retinal y perciben la luz verde-naranja ($\lambda=500\sim620$). Se ha reportado que funcionan como bombas de canales de iones y que también controlan el movimiento en bacterias y algas en respuesta a las variaciones en luz (Kouyama y Murakami, 2010). Recientemente se describió que en el hongo *Neurospora crassa* la rodopsina NOP-1 tiene un papel regulatorio de los genes de conidiación *con-10* y *con-6* (Olmedo *et al.*, 2010)

Los fitocromos son fotorreceptores asociados a un tetrapirrol que sufre isomerización *cis-trans* después de absorber la luz roja o roja lejana ($\lambda=620-750$). Estos fotorreceptores regulan el crecimiento y el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (Casal *et al.*, 2003), la biosíntesis del aparato fotosintético en *Rhodospseudomonas palustris* (Rockwell *et al.*, 2006) y el desarrollo sexual en *Aspergillus nidulans* (Rodríguez-Romero *et al.*, 2010).

Existe una gran variedad de receptores de luz azul ($\lambda=400-500$) presentes en los tres dominios de la vida. Los criptocromos son fotorreceptores parecidos a fotoliasas que unen flavina (FAD), pterina y deazaflavina como posibles cromóforos. Dentro de las respuestas mediadas por los criptocromos están la fotomorfogénesis en *Arabidopsis* (Cashmore, 1997), la regulación del metabolismo y de los ritmos circadianos en plantas y animales (Cashmore, 2003). También se ha reportado la presencia de criptocromos en hongos filamentosos; sin embargo, no se ha observado un fenotipo aparente en respuesta a la luz azul (Froehlich *et al.*, 2010).

Existe otra clase de fotorreceptores de luz azul que contienen dominios PAS (Per-Arnt-Sim) (Vreede *et al.*, 2003) especializados, denominados LOV (Luz-Oxígeno y Voltaje), los cuales unen flavinas y se han identificado cuatro familias principales en eucariotas (Krauss *et al.*, 2009). **Las fototropinas** en plantas que regulan el fototropismo, la relocalización del cloroplasto y la apertura de las estomas (Huala *et al.*, 1997; Kagawa *et al.*, 2004; Ohgishi *et al.*, 2004). **Los aureocromos** (AUREO1 y 2), de los cuales AUREO1 funcionan como activador transcripcional regulado por luz azul y junto con AUREO2 regulan la fotomorfogénesis en algas fotosintéticas (Takahashi *et al.*, 2007). **La familia ZTL/ADO/FKF1** constituida por la proteína zeitlupe (ZTL) y las proteínas Kelch con repetidos F-box de unión a flavina (FKF1), que regulan la floración y el foto-periodo circadiano en plantas (Nelson *et al.*, 2000; Somers *et al.*, 2000). Y finalmente los fotoreceptores fúngicos **White-collar-1/Blue Light Regulator-1** (WC-1/BLR-1) (Ballario *et al.*, 1996; Casas-Flores *et al.*, 2004) y **VIVID/ENVOY** (Schwerdtfeger y Linden, 2003; Schmoll *et al.*, 2007). Recientemente se identificó una cinasa con un dominio LOV en la bacteria patógena *Brucella abortus*, la cual regula positivamente la proliferación de la bacteria dentro de macrófagos expuestos a la luz azul (Swartz *et al.*, 2007).

Importancia de la luz para los hongos

Los hongos son microorganismos eucariotas que utilizan la luz como fuente de información con respecto del medio que los rodea. Se han descrito aproximadamente 100 especies de hongos representando todos los phyla que responden a la luz. Dentro de las respuestas a la luz en hongos están: el fototropismo, la fotomorfogénesis, el control del ritmo circadiano, la regulación del desarrollo sexual y asexual, la maduración de cuerpos fructíferos (Rodríguez-Romero *et al.*, 2010), el metabolismo de los carotenoides, el metabolismo de polisacáridos y carbohidratos, el metabolismo de nucleósidos y nucleótidos, y la producción de metabolitos secundarios (Tisch *et al.*, 2011). El primer fotorreceptor fúngico identificado fue WC-1 de *N. crassa*, el cual tiene tres dominios PAS, de los cuales uno es un dominio LOV que une FAD como cromóforo. La proteína WC-2 tiene un dominio PAS con el cual interactúa con WC-1 para formar el complejo WCC (White Collar Complex). Ambas proteínas (WC-1 y -2) son factores de transcripción con dedos de zinc tipo GATA. Además, WC-1 posee tramos de poliglutaminas cerca del amino y carboxilo terminal de la molécula, que funcionan como dominios de activación de la transcripción (Ballario *et al.*, 1996). Después de un pulso de luz azul el cromóforo se une covalentemente a una cisteína conservada en el dominio LOV, llevando a un cambio de conformación en la proteína, lo que promueve que se una a los promotores de genes que responden a luz, activando su expresión (Chen y Loros, 2009). Todas las respuestas a la luz azul descritas en *N. crassa* son reguladas por el WCC. Se han identificado fotorreceptores homólogos a las proteínas WC en *T. atroviride* (Casas-Flores *et al.*, 2004), en *T. reesei* (Schmoll *et al.*, 2007), en *A. nidulans* (Purschwitz *et al.*, 2008) y en varios hongos distribuidos en tres filas (Ascomicetos, Zigomicetos y Basidiomicetos) (Herrera-Estrella y Horwitz, 2007).

***Trichoderma atroviride* como modelo fotomorfogénico**

Trichoderma atroviride es un hongo filamentoso utilizado como modelo fotomorfogénico debido a su habilidad de conidiar cuando se expone a la luz azul

(Galun y Gressel, 1966). Los cambios fisiológicos inducidos por luz en *Trichoderma spp.* incluyen cambios en el potencial de membrana, en las concentraciones intracelulares de ATP, AMP cíclico (Gresik *et al.*, 1988), cambios en el patrón de fosforilación de proteínas y un incremento en la actividad de la adenilato ciclasa (Gresik *et al.*, 1989). En *T. atroviride*, los genes *blr-1* y *-2*, son los ortólogos a *wc-1* y *-2* de *N. crassa* (Casas-Flores *et al.*, 2004). Las proteínas BLR contienen dominios PAS y dominios de unión a DNA tipo GATA lo cual sugiere que son factores de transcripción. Uno de los tres dominios PAS de BLR-1, es del tipo LOV, lo cual le confiere la característica de fotorreceptor. A diferencia de WC-1, BLR-1 no posee el dominio de activación, pero se ha demostrado que este no es necesario para la percepción de la luz y la transducción de la señal (Ambra *et al.*, 2004). Los productos de los genes *blr-1* y *blr-2* juegan un papel fundamental en la fotoconidiación, el crecimiento micelial y la transcripción de genes responsivos a la luz azul. Las mutates *blr* conidian por daño mecánico y por limitación de nitrógeno, pero no por limitación de carbono, lo cual sugiere que el estrés oxidativo y los cambios redox intracelulares deben jugar un papel importante en la conidiación y que existe una comunicación cruzada entre la percepción de la señal luminosa y la conidiación por limitación de carbono (Casas-Flores *et al.*, 2006).

Se han identificado al menos 10 genes inducibles por la luz azul (*blu*: blue light up-regulated), y 2 genes que se reprimen por este estímulo (*bld*: blue light down-regulated). El gen *phr-1* (*blu-2*), codifica para una DNA fotoliasa (enzima reparadora del DNA), y es el gen que más se ha utilizado como representativo de genes inducidos por luz azul en *T. atroviride*. La expresión de los genes *blu* y *bld* es dependiente del complejo BLR (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006).

Existe otro posible fotorreceptor descrito en *Trichoderma*, la proteína ENVOY (codificada por *env-1*), ortóloga de VIVID de *N. crassa*. Se ha determinado que ENVOY juega un papel muy importante en las respuestas a la luz azul. Mutantes \square *env-1* presentan periodos largos de expresión de los genes responsivos a la luz azul bajo iluminación constante, lo que sugiere que ENVOY es un regulador negativo de la respuesta a la luz azul en *Trichoderma* (Castellanos

et al., 2010). A pesar de que ENVOY tiene una similitud muy alta con VIVID, el gen *env-1* no complementa una mutante *vivid*, lo cual sugiere mecanismos de regulación distintos para estos fotorreceptores (Schmoll *et al.*, 2007).

Cepas de *T. atroviride* que sobreexpresan al gen *blr-2*, presentan una mayor fotosensibilidad y fotoconidiación en comparación con la cepa silvestre (WT). Lo cual indica que *blr-2* es el factor limitante en la percepción y la transducción de la señal luminosa (Esquivel-Naranjo y Herrera-Estrella, 2007).

Adicionalmente, se ha descrito que el producto del gen *phr-1*, podría estar regulando su propia transcripción de manera dependiente de la luz, posiblemente modulando la expresión de los genes *blr*. Esta actividad regulatoria es atribuida por primera vez a una DNA fotoliasa, cuya función moduladora solo ha sido asignada a criptocromos (Berrocal-Tito *et al.*, 2007).

Regulación de la expresión de los genes a nivel epigenético

La regulación de la expresión génica se ha dividido en 3 niveles. El primero es a nivel de las secuencias nucleotídicas que se codifican en la molécula de ADN. El segundo nivel involucra la estructura de la cromatina, donde la regulación de la expresión de un gen depende de su organización y de la regulación epigenética asociada a ésta. El tercer nivel involucra la organización espacial del genoma al interior del núcleo (Driel *et al.*, 2003).

En eucariontes el genoma se encuentra altamente empaquetado en una estructura denominada cromatina, la cual juega un papel importante en la regulación de la expresión de genes. La cromatina es un complejo DNA-proteína cuya unidad fundamental organizadora es el nucleosoma. Cada nucleosoma consiste de dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, arregladas en un octámero que organiza 146 pares de bases de DNA (Driel *et al.*, 2003). Cada histona que conforma el octámero tiene un extremo N-terminal que se extiende fuera del nucleosoma y está sujeta a numerosas modificaciones covalentes, entre las cuales destacan la acetilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la sumoilación

y la ADP ribosilación (Reid *et al.*, 2009). La modificación de las colas de las histonas más estudiada, es la acetilación y se ha determinado que tiene implicaciones muy importantes en la activación de la transcripción de genes (Struhl, 2001). La acetilación de las histonas se lleva a cabo por las acetiltransferasas de histonas (HATs), esta modificación está asociada con la activación de la transcripción (Lee y Workman, 2007). La acetilación de las lisinas (K) resulta en una neutralización de las cargas positivas de las colas de las histonas y el DNA, facilitando el acceso a activadores transcripcionales. Recientemente se reportó que en *N. crassa*, el residuo K14 de la histona H3 se acetila después de un pulso de luz azul y que esta acetilación está mediada por la HAT GCN5. Mutantes en *gcn-5* o en la K14 de la histona H3, asemejan a un fenotipo ciego como la mutante $\Delta wc-1$ (Grimaldi *et al.*, 2006).

Por otro lado, la desacetilación de las histonas la llevan a cabo las desacetilasas de histonas (HDACs). La desacetilación de las lisinas conlleva a que las cargas positivas de las colas de las histonas se reestablezcan, impidiendo el acceso a activadores transcripcionales; por lo cual, la desacetilación está relacionada con la represión transcripcional (Graessle *et al.*, 2001). En *A. thaliana* se demostró que la HAT GCN5 y la HDAC HD1 son requeridas para la expresión génica y crecimiento regulados por luz (Benhamed *et al.*, 2006).

Otra de las modificaciones de las colas de las histonas es la metilación, mediada por las metiltransferasas de histonas (HMTs) (Zhang y Reinberg, 2001). La metilación de lisinas, con la excepción de la K79 de la histona H3, es catalizada exclusivamente por proteínas de la familia de dominio conservado SET (Su (var) 3-9, Enhancer of zeste, Thritorax domain) (Tschiersch *et al.*, 1994). La metilación de las lisinas de las histonas H3 y H4 está relacionada tanto a la activación como al silenciamiento de la transcripción, dependiendo del residuo específico modificado (Lachner y Jenuwein, 2002). Por ejemplo, la metilación de la K4 de la histona H3 está asociada con cromatina transcripcionalmente activa. La transferencia de más de un grupo metilo al amino terminal de las histonas, depende de la metiltransferasa que cataliza esa reacción y del residuo en cuestión. Por ejemplo,

la metiltransferasa SET7/9, dimetila la K4 de la histona H3, transfiriendo un grupo metilo a la vez, sin despegarse del sustrato Kwuon *et al.*, 2003. La dimetilación de la K4 de la histona H3 por Set1 correlaciona con transcripción basal, mientras que la trimetilación de la K4 de la histona H3 se observa en promotores totalmente activados (Quian y Zhou, 2006).

Hoy en día existen pocos estudios acerca del papel de las HMT en hongos. Se ha reportado el análisis bioquímico de tres metiltransferasas de arginina (RmtA a RmtC) en el hongo modelo *Aspergillus nidulans* (Trojer *et al.*, 2004); sin embargo, el análisis fenotípico de las mutantes no ha sido reportado. Para el caso de *Schizosaccharomyces pombe* se ha determinado que una mutación en la HMT Ctr4 conlleva a una desrepresión del loci del apareamiento (Ekwall y Ruusala, 1994), a un incremento en la pérdida de cromosomas (Allshire *et al.*, 1995), a una segregación inapropiada de los cromosomas, y a un crecimiento lento, entre otros defectos (Ekwall *et al.*, 1996). La interrupción de la HMT DIM-5 en *N. crassa* genera la pérdida de la trimetilación de la K9 de la histona H3, un decremento en la metilación del DNA y anomalías en el crecimiento (Tamaru y Selker, 2001).

Además, existen proteínas remodeladoras de la cromatina, dependientes de ATP que ayudan al desplazamiento de los nucleosomas para permitir o impedir el acceso de la maquinaria de transcripción al DNA (Vignali *et al.*, 2000). Los complejos remodeladores de la cromatina son complejos grandes que consisten de 4 a 17 subunidades. El primer complejo remodelador descrito fue el complejo SWI/SNF (por sus siglas en inglés: mating-type SWItching (SWI)) and sucrose fermentation (Sucrose Non Fermenting - SNF) en *S. cerevisiae*. Un complejo relacionado a SWI/SNF llamado RSC (por sus siglas en inglés Remodelling the Structure of Chromatin) fue identificado también en *S. cerevisiae*. Ambos complejos tienen efectos importantes en la regulación de la transcripción; sin embargo, RSC tiene como blanco un amplio espectro de genes, lo cual lo hace indispensable para la sobrevivencia de la célula (Tang *et al.*, 2010).

Las proteínas remodeladoras de la cromatina dependientes de ATP, las proteínas que realizan modificaciones en las histonas y los factores de transcripción actúan en conjunto para llevar a cabo la regulación de la expresión de los genes (Workman y Kingston, 1998; Zhang y Reinberg, 2001). Las modificaciones epigenéticas pueden llevarse a cabo solas, secuencialmente o en combinación y en conjunto se ha propuesto que representan un “código de histonas”, el cual repercute en la regulación de la expresión genética (Jenuwein y Allis, 2001).

Recientemente, se realizó un análisis bioinformático sobre los genomas de tres especies del género *Trichoderma spp* para identificar a los componentes de la maquinaria epigenética, y se encontraron un total de 205 proteínas modificadoras y remodeladoras de la cromatina (Casas-Flores *et al.*, en preparación). En un análisis transcripcional (por secuenciación masiva) de *T. atroviride* en respuesta a la luz azul, se observó que algunos de los genes que codifican para proteínas remodeladoras o modificadoras de la cromatina se inducen después del estímulo luminoso, entre ellos *tarsc9*, *tahos2* y *taset5* (Herrera-Estrella comunicación personal). El gen *tarsc-9* codifica putativamente para la proteína TARSC-9, ortóloga a Rsc9 de *S. cerevisiae*, una proteína componente de RSC (Damelin *et al.*, 2002). El gen *tahos-2* codifica para una posible desacetilasa de histonas tipo RPD3 de clase I, ortóloga a Hos2 de *S. cerevisiae* (Kim *et al.*, 1998), mientras que el gen *taset-5* codifica para una posible metiltransferasa de histonas dependiente de S-adenosylmetionina, ortóloga a Set5 de *S. cerevisiae* (Nislow *et al.*, 1997).

En el presente trabajo planteamos investigar el papel que juegan los productos de los genes *tarsc-9*, *tahos-2* y *taset-5* en la percepción y/o en la transducción de la señal luminosa en *T. atroviride*. Para lograr este objetivo, se generaron mutantes nulas en los genes *tahos-2* y *taset-5*, y se evaluaron sus fenotipos morfológicos y moleculares. En el caso del gen *tarsc-9*, este resultó ser esencial como en *S. cerevisiae* (Damelin *et al.*, 2002). Adicionalmente, se demostró que el gen *tahos-2* juega un papel muy importante en el desarrollo de conidióforos, la fotoconidiación y conidiación por daño mecánico. La interrupción

del gen *taset-5* llevó a un incremento en la fotosensibilidad. La cepa Δ *tahos-2* es incapaz de conidiar en respuesta al daño mecánico, mientras que la cepa Δ *taset-5* mostró una alteración en la conidiación por este estímulo en comparación con la cepa WT. En ambas mutantes se observó una alteración en la expresión de un grupo de genes responsivos a la luz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

En este proyecto se utilizó la cepa IMI 206040 de *Trichoderma atroviride* (ATCC 32173) como cepa silvestre. Para la manipulación genética y transformación de plásmidos se utilizó la cepa de *Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen).

Plásmidos

Los plásmidos utilizados fueron pGEM-T Easy (Promega) y pBHY70 (Casas-Flores *et al.*, 2004). El plásmido pBHY70 porta al gen de la fosfotransferasa de higromicina B (*hph*) de *E. coli* bajo el promotor *gpdA* y el terminador *trpC* de *Aspergillus nidulans* (Punt *et al.*, 1987; Casas-Flores *et al.*, 2006). Esto último, permite clonar en sus extremos fragmentos 5' y 3' de genes, para generar constructos que son utilizados para el reemplazo génico por doble recombinación homóloga.

Medios y condiciones de cultivo

Para los ensayos de fotoconidiación y fotoinducción los cultivos de *T. atroviride* se crecieron a 28°C en cajas de Petri con medio mínimo Vogel's con agar (Sales Vogel's 1X y Dextrosa 0.1 M disponible en <http://www.fgsc.net/methods/vogels.html>). Para la recolección del micelio de las cajas de Petri con medio Vogel's, se colocó un pliegue circular de papel celofán previamente esterilizado sobre el medio sólido. Para la transformación de protoplastos se utilizó el medio Vogel's con 100 µg/mL de higromicina como

antibiótico de selección, cubierto con agar suave al 0.8% (100 µg/mL de higromicina). Los cultivos bacterianos se crecieron en LB (1% Triptona DIFCO™, 0.5% de extracto de levadura DIFCO™ y 1% de NaCl). Cuando fue necesario se agregó carbenicilina (100µg/mL) o IPTG 0.5 mM y X-Gal 80 µg/ml.

Extracción de ácidos nucleicos y síntesis de cDNA

El DNA total de *T. atroviride* se extrajo según el protocolo descrito por Raeder y Broda (1985). El DNA plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 2001). El RNA total de *T. atroviride* se aisló utilizando el método de TRIzol® Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para la síntesis de cDNA se utilizó la SuperScript™ II Reverse Transcriptase de Invitrogen siguiendo el protocolo sugerido del fabricante.

Generación de construcciones para reemplazar a los genes *tarsc-9*, *tahos-2* y *taset-5*.

Las regiones flanqueantes al 5' y al 3' de cada gen se amplificaron por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando DNA de *T. atroviride* como molde. Para cada extremo 5'y 3' de cada gen se diseñaron oligonucleótidos que además de ser complementarios a las secuencias de cada gen, también incluyeran sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción (Tabla suplementaria 1). Posteriormente, los fragmentos amplificados se clonaron en los sitios correspondientes del plásmido pBHY70, obteniendo así una construcción en donde se sustituía el marco de lectura abierto (ORF por sus siglas en inglés, Open Reading Frame) de cada gen por el *cassette hph* (Figura suplementaria 1). Por medio de digestión con enzimas de restricción que flanquean a la construcción, se escindieron estas construcciones y se purificaron con el kit PCR Clean- Up System (Promega) para posteriormente transformar protoplastos de *T. atroviride*.

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

La obtención de protoplastos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Baek y Kenerley (1998), con ligeras modificaciones. Se inocularon 10^8 conidias en 50 ml de PDYCB (Caldo, Papa dextrosa, DIFCO™ 24g/L, extracto de levadura 2g/L y casaminoácidos 1,2g/L) y se incubaron por 24 h a 28°C con agitación a 250 rpm. El micelio se colectó por filtración, se lavó con agua y 0.5 gramos (peso húmedo) fueron resuspendidos en Osmoticum (CaCl₂ 50 mM, manitol 0.5 M y MES pH 5.5, 50 mM) con 15 mg/ml de Enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (LET) (Sigma). La mezcla fue incubada a 28°C con agitación suave por 5 h. Los protoplastos se recolectaron filtrándolos a través de una malla de nylon estéril con poros de 100 µm y posteriormente se agregaron 5 ml de Osmoticum sobre las mallas de nylon para recuperar los protoplastos que pudieran haberse quedado atrapados en éstas. La muestra se centrifugó a 4000 rpm y finalmente se resuspendieron en Osmoticum a una concentración de 1×10^8 protoplastos/ml y se tomaron 10 µl de la suspensión para observar la integridad de los protoplastos en el microscopio. A 250 µl de protoplastos se les agregó de 10-20 µg de DNA transformante. La mezcla se incubó en hielo por 20 min, posteriormente se agregaron 250 µl de PEG-4000 al 60% en Osmoticum y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. De la mezcla obtenida se hicieron diferentes diluciones y se mezclaron con 7 ml de medio de selección con agar suave y se vaciaron a cajas de Petri con medio selectivo. Las cajas se incubaron a 25°C por 72 h y se aislaron las transformantes obtenidas.

Escrutinio de las mutantes en los genes $\Delta tarsc-9$, $\Delta taset-5$ y $\Delta tahos-2$

Con la finalidad de verificar el reemplazo génico por doble recombinación homóloga, a cada una de las cepas transformantes obtenidas se les extrajo el DNA y se realizó una PCR con oligonucleótidos diseñados estratégicamente. Para la región 5' utilizada en las construcciones se utilizó un oligonucleótido sentido (oligonucleótido 13 para $\Delta taset-5$, 15 para $\Delta tahos-2$ y 17 para $\Delta tarsc-9$) que alineaba sobre el genoma río arriba pero fuera de la región 5' utilizada para las construcciones y otro reverso (oligonucleótido 20) que alinea sobre el *cassette* de *hph* (Tabla suplementaria 1). Para la región 3' se utilizó un oligonucleótido sentido

(oligonucleótido 19) que alinea sobre el *cassette* de *hph* y uno reverso (oligonucleótido 14 para $\Delta taset-5$, 16 para $\Delta tahos-2$ y 18 para $\Delta tarsc-9$) que alinea sobre el genoma, pero fuera de la región 3' utilizada para generar la construcción (Tabla suplementaria 1). También realizamos una PCR utilizando DNA genómico sobre el ORF para verificar la ausencia de cada uno de los genes, en las distintas cepas transformantes $\Delta taset-5$ (oligonucleótidos 21 y 22), $\Delta tarsc-9$ (oligonucleótidos 23 y 24), $\Delta tahos-2$ (oligonucleótidos 25 y 26) (Tabla suplementaria 1).

Ensayo de fotoconidiación y fotoinducción

Cada una de las cepas fueron crecidas en oscuridad por 36 h y con ayuda de un sacabocados, se tomaron pequeños discos de la periferia de la colonia, se inocularon en el centro de cajas de Petri con medio Vogel's y se incubaron a 28°C en oscuridad durante 48 hrs. Para la cepa $\Delta tahos2$ el tiempo de incubación en oscuridad fue de 96 hrs para que esta alcanzara el crecimiento de la cepa silvestre. Transcurrido este tiempo, las diferentes cepas se expusieron a luz azul ($1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en una cámara oscura sellada que contiene dos lámparas fluorescentes de luz fría con filtro azul (LEE #183: con una intensidad de $3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz). En el caso del ensayo de fotoconidiación dosis-respuesta para $\Delta taset5$ y la cepa silvestre las dosis de luz azul fueron 25, 50, 75, 100, 300, 500, 1000 y $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Después del pulso de luz azul, las diferentes cepas se incubaron en la oscuridad a 28 °C por 36 h para determinar su fenotipo de conidiación. Como control se incluyó micelio no expuesto a la luz. Para los ensayos de fotoinducción, se recolectó el micelio a los 30 y 120 min después del pulso de luz azul con ayuda de un bisturí. El micelio recolectado se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Todos los ensayos se llevaron a cabo, bajo luz roja de seguridad (filtro rojo de acrílico LEE #106 con una intensidad de $0.1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz).

Análisis microscópico de las cepas WT y $\Delta tahos-2$

Con ayuda de una cinta adherente y transparente se tomaron muestras de la superficie de las colonias de las cepas WT y $\Delta tahos-2$ que habían sido previamente sometidas a un ensayo de fotoconidiación, con sus respectivos controles de crecimiento en oscuridad. Las cintas adherentes con las muestras se colocaron sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón y se observaron al microscopio (LEICA DME) con el objetivo 40x. Las fotografías se tomaron con una cámara fotográfica (LEICA DC300).

Cuantificación de conidias por espectrofotometría

Dado que no hay reportes para *T. atroviride* para la determinación de conidias y para facilitar el conteo de las mismas, se decidió implementar un método de conteo por espectrofotometría. Con ayuda de una espátula de vidrio se recolectaron las conidias de las cajas de Petri con agua MilliQ estéril. Con un agitador vortex se homogenizaron las suspensiones y se separaron las conidias del micelio por filtración con filtros de 100 μm . Posteriormente las conidias se sedimentaron por centrifugación (centrifuga Sorvall ST16R Thermo Scientific FIBERLite® Rotor F15-6 x 100) a 10,000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en 3 ml de agua MilliQ estéril. A partir de un stock de conidias se realizaron diluciones 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 a un volumen final de 1 mL. De dichas diluciones se tomaron 2 μL para realizar una segunda dilución 1:10 en un volumen final de 20 μL , del cual se tomaron los 20 μL para cuantificar las conidias en un hemocitómetro (HC) (MARIENFELD Germany). El conteo se realizó en cuatro cuadrantes de cada cámara del HC, se promedió el número de conidias de las dos cámaras, se multiplicó por el factor de dilución y por un factor F (Factor de corrección que convierte la profundidad de 1 mm^3 a 1 mL) igual de 10^4 .

Para medir la absorbancia se utilizó el espectrofotómetro (UV-1700 pharmaSpec SHIMADZU) a una longitud de onda de 550 nm, según lo reportado por Valdez y Piccolo (2006). El equipo fue calibrado a una absorbancia de cero con la solución blanco (agua MilliQ estéril) y después se depositó 1 mL de cada una de las

diluciones cuantificadas en HC (a las muestras que mostraron una absorbancia mayor de 0.8 se diluyeron aún más y el resultado se multiplicó por el factor de dilución). Para evitar la precipitación de las conidias por gravedad, estas se mezclaron por inversión de la celdilla de 2 a 4 veces inmediatamente antes de realizar la lectura. Las mediciones obtenidas del HC (eje X) y del espectrofotómetro (eje Y) se analizaron por el método de regresión lineal simple. La ecuación que estima la regresión lineal entre las lecturas de la absorbancia y las cuantificaciones del HC fue $y = 0.0002x + 0.2872$, donde y representa el valor de la absorbancia y x es la concentración de conidias. Se obtuvo una R^2 de 0.99 (Figura suplementaria 2A). Una vez estandarizado el método proseguimos a cuantificar por absorbancia un total 54 muestras de conidias recolectadas del ensayo de fotoconidiación dosis-respuesta de las cepas WT y $\Delta taset-5$ en 9 condiciones diferentes de luz (oscuridad, 25, 50, 75, 100, 300, 500, 1000 y 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz azul) cada una por triplicado. Se calculó el número de conidias en base a los valores de absorbancia obtenidos, se graficaron los promedios y se calculó la desviación estándar para cada triplicado (Figura suplementaria 2B).

RESULTADOS

Obtención de las mutantes $\Delta tahos-2$, $\Delta taset-5$ y $\Delta tarsc-9$

Con la finalidad de identificar y caracterizar a los componentes de la maquinaria epigenética en tres especies del género *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. virens* y *T. reesei*), se realizó un análisis bioinformático de los genomas de estos hongos, identificando un total de 205 proteínas modificadoras y remodeladoras de la cromatina (Casas-Flores *et al.*, en preparación). De este grupo de genes se eligieron a *tarsc-9* (ID 212148), *tahos-2* (ID 261454) y *taset-5* (ID 269531) (<http://genome.jgi.doe.gov/Triat2/Triat2.home.html>) ya que además, se inducen por un pulso de luz azul 8.5, 6.5 y 8.5 veces respectivamente (Herrera-Estrella, comunicación personal).

El hecho de que estos genes sean inducidos por luz azul, sugiere que podrían estar involucrados en la regulación epigenética de genes que responden a luz azul en *T. atroviride* ante este estímulo. Los genes seleccionados codifican putativamente para la proteína TARSC-9 (*tarsc-9*), ortóloga a RSC9 de *S. cerevisiae*, un componente de RSC. El gen *tahos-2* codifica para una posible desacetilasa de histonas de clase I, ortóloga a Hos2 de *S. cerevisiae*, mientras que el gen *taset-5* codifica para una posible metiltransferasa de histonas dependiente de S-adenosylmetionina reportada en *S. cerevisiae* (Figura 1).

En base a lo anterior, decidimos generar construcciones genéticas para reemplazar los marcos de lectura abiertos por el *cassette* de *hph* por doble recombinación homóloga (Figura suplementaria 1). Para confirmar el reemplazo génico, se realizó un análisis de la estructura del genoma por medio de PCR, utilizando DNA genómico de las transformantes como molde, con oligonucleótidos diseñados estratégicamente (Figura 2A). Se amplificaron los fragmentos esperados de 1587 pb y de 2346 pb correspondientes al 5' y 3' de $\Delta tahos-2$ (Figura 2B) y fragmentos de 1620 pb y de 2332 pb del 5' y 3' de $\Delta taset-5$ respectivamente (Figura 2C). En cuanto a la obtención de la mutante $\Delta tarsc-9$, se realizaron varios intentos para aislar cepas transformantes, pero no fue posible. Esto sugiere que

este gen es esencial para la viabilidad de la célula, como se ha reportado para su ortólogo en *S. cerevisiae* (Damelin *et al.*, 2002).

Una vez determinado el reemplazo génico para *tahos-2* y *taset-5*, se verificó la ausencia del gen por PCR, utilizando DNA genómico como molde, con pares de oligonucleótidos internos al ORF. Como se observa en la Figura 3 en ninguna de las mutantes se amplificó el fragmento correspondiente al DNA genómico del gen, a diferencia del control positivo, cuyos ácidos nucleicos corresponden a la cepa silvestre. La cepa Δ *tahos-2* presentó un crecimiento lento en comparación con la cepa silvestre, no formó conidióforos, ni conidias y tampoco se observó el color verde que caracteriza a la cepa silvestre, la presencia de micelio aéreo fue escasa o nula. La mutante Δ *taset-5* mostró un fenotipo de crecimiento similar al de la cepa silvestre (Figura 4).

La cepa Δ *tahos-2* no conidia en respuesta a luz azul

Para caracterizar la respuesta a la luz azul de Δ *tahos-2*, se decidió realizar un ensayo de fotoconidiación. Como se observa en la Figura 5A, la cepa silvestre creció como micelio hialino en condiciones de oscuridad y 48 hrs después de la exposición a la luz azul formó el característico anillo de conidias verdes; sin embargo, la cepa Δ *tahos-2* creció lentamente y con escasa presencia de micelio, no mostró diferencias tanto en condiciones de oscuridad como en presencia de luz azul.

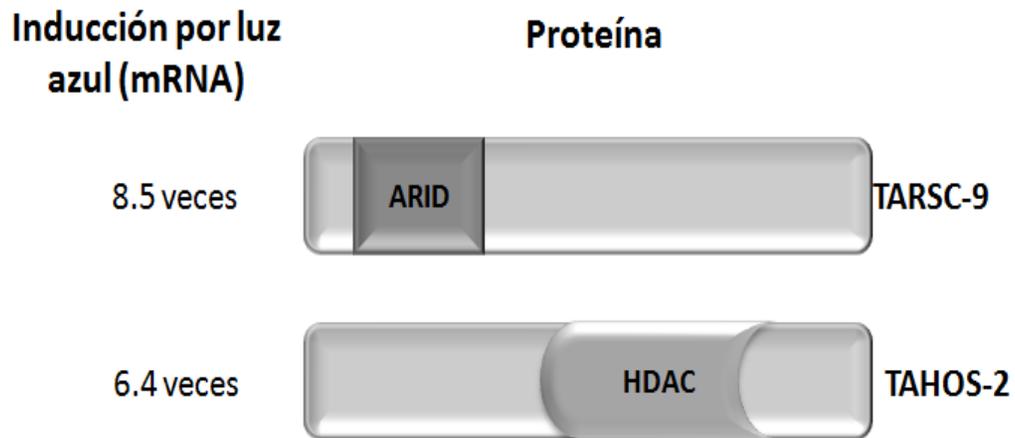


Figura 1. Representación esquemática de las proteínas TARSC-9, TAHOS-2 y TASET-5. La figura muestra el número de veces que el mRNA se induce en respuesta a luz azul (panel izquierdo). La figura muestra los dominios predichos para cada proteína hipotética (panel derecho). ARID (AT-rich interaction domain (dominio de interacción rico en A-T)). HDAC (Histone deacetylase domain). SET ((Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax) domain)).

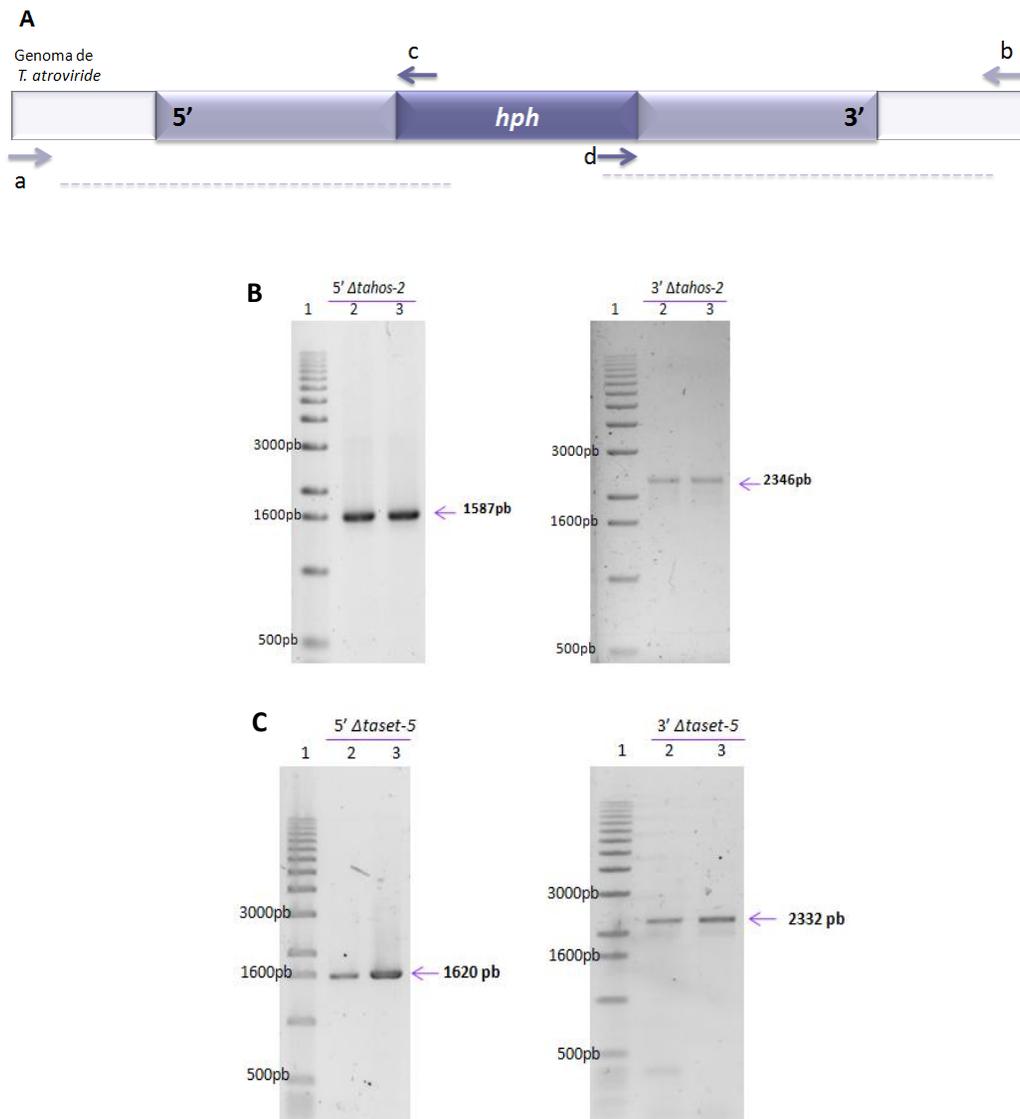


Figura 2. Análisis de las mutantes $\Delta tarsc-9$, $\Delta taset-5$ y $\Delta tahos-2$ por PCR. **A.** El DNA de las colonias resistentes a higromicina B fue analizado por PCR usando los oligonucleótidos (a y c) para amplificar el extremo 5' y los oligonucleótidos (d y b) para amplificar el extremo 3'. **B.** Amplicones de 1587 pb (con oligos 3 y 7) y de 2346 pb (con oligos 4 y 8) correspondiente al 5' y 3' de $\Delta tahos-2$ (carriles 2 y 3); **C.** Amplicones de 1620 pb (con oligos 1 y 7) y 2332 pb (con oligos 2 y 8) correspondientes al 5' y 3' de $\Delta taset-5$ (carriles 3 y 4), MPM (Marcador de Peso Molecular) (carriles # 1).

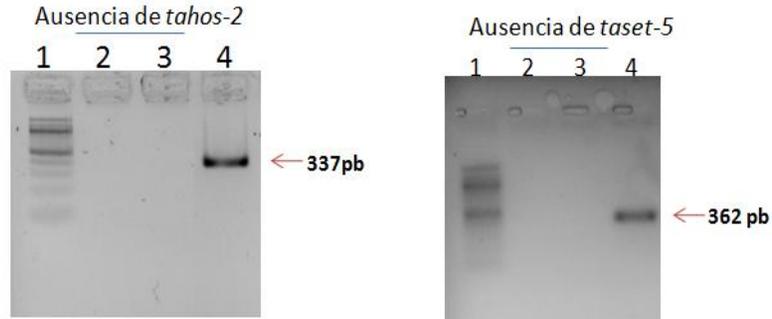


Figura 3. Las cepas Δ *tahos-2* y Δ *taset-5* no presentan el respectivo gen silvestre. A. Con los oligonucleótidos 25 y 26 se hizo un PCR para amplificar el ORF de *tahos-2* de 337 pb, el cual se observa para la cepa silvestre (carril 4), mientras que estuvo ausente en las 2 cepas mutantes Δ *tahos-2* (carriles 2 y 3). **B.** Con los oligonucleótidos 21 y 22 se hizo un PCR para amplificar el ORF de Δ *taset-5* de 362 pb, el cual estuvo ausente de las 2 cepas mutantes Δ *taset-5* (carriles 2 y 3), pero presentó amplificación para la cepa silvestre (carril 4). Carril 1 en ambas figuras corresponde al MPM.

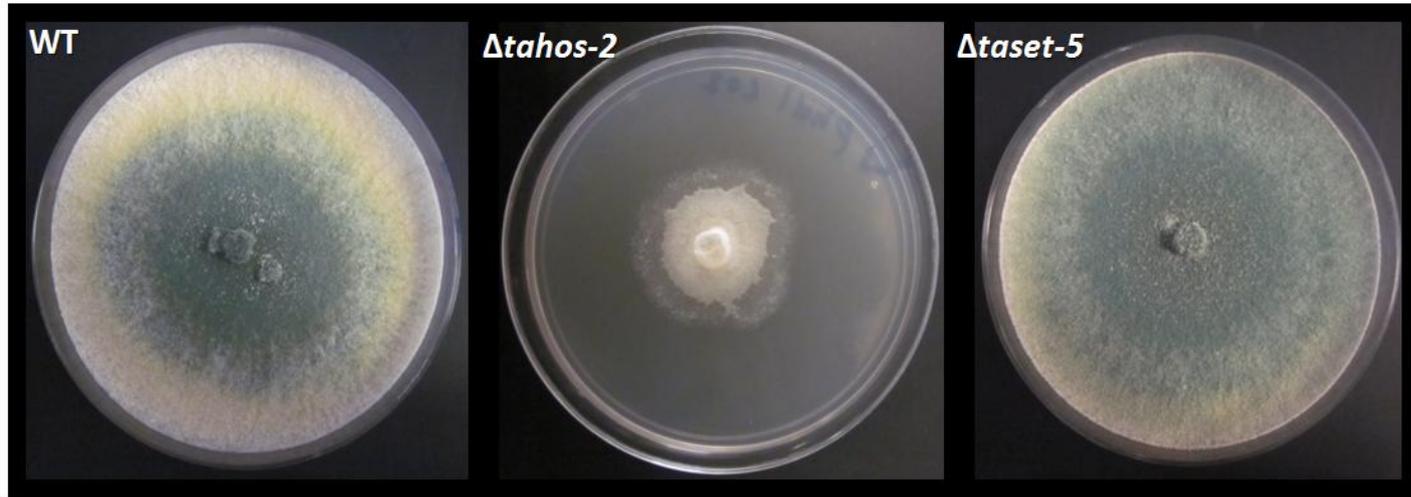


Figura 4. Fenotipo de las mutantes $\Delta tahos-2$ y $\Delta taset-5$.

La cepa silvestre (WT) y las cepas mutantes $\Delta tahos-2$ y $\Delta taset-5$ se inocularon en cajas con medio Vogel's a 28 °C por 72 hrs en presencia de luz.

El análisis microscópico de la mutante corroboró la ausencia de conidias en condiciones de luz y oscuridad; sin embargo, se observaron estructuras de reproducción asexual denominadas clamidosporas, cuya frecuencia fue mayor en la cepa mutante expuesta a luz azul. Estas estructuras no se observaron en la cepa silvestre (Figura 5B).

La cepa $\Delta taset-5$ presenta un fenotipo de hipersensibilidad a la luz azul

Ensayos de fotoconidiación para $\Delta taset-5$ muestran que en condiciones de oscuridad la cepa silvestre y la mutante crecieron como micelio hialino y sólo después del pulso de luz azul ambas cepas formaron el anillo de conidias; sin embargo, para la mutante $\Delta taset-5$ el anillo de conidias parecía ser más abundante, en comparación con la cepa silvestre (Figura 6). Debido a que el fenotipo no fue muy claro, se decidió realizar un ensayo de fotoconidiación “dosis-respuesta”, exponiendo a la mutante y a la cepa silvestre a 8 diferentes cantidades de luz azul (25, 50, 75, 100, 300, 500, 1000 y 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Con este ensayo se determinó que la cepa silvestre requiere aproximadamente 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz azul para formar un anillo de conidias bien definido, en cambio $\Delta taset-5$ es capaz de formar este anillo con solo 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz azul. Además, en la mutante $\Delta taset-5$ la maduración de conidias es evidente desde las 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz, en cambio en la cepa silvestre esto se observa hasta las 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz azul (cantidad aplicada en los experimentos de rutina) (Figura 7A). Para sustentar mejor este resultado decidimos determinar la concentración de conidias mediante espectrofotometría de luz visible (validando el resultado por cuantificación directa en un hemocitómetro). Al graficar las distintas concentraciones de conidias contra las cantidades de conidias, se obtuvo un índice de correlación de 0.99 (Figura suplementaria 2A). En la grafica se observa que la cepa $\Delta taset-5$ produce el doble de conidias en comparación con la cepa silvestre.

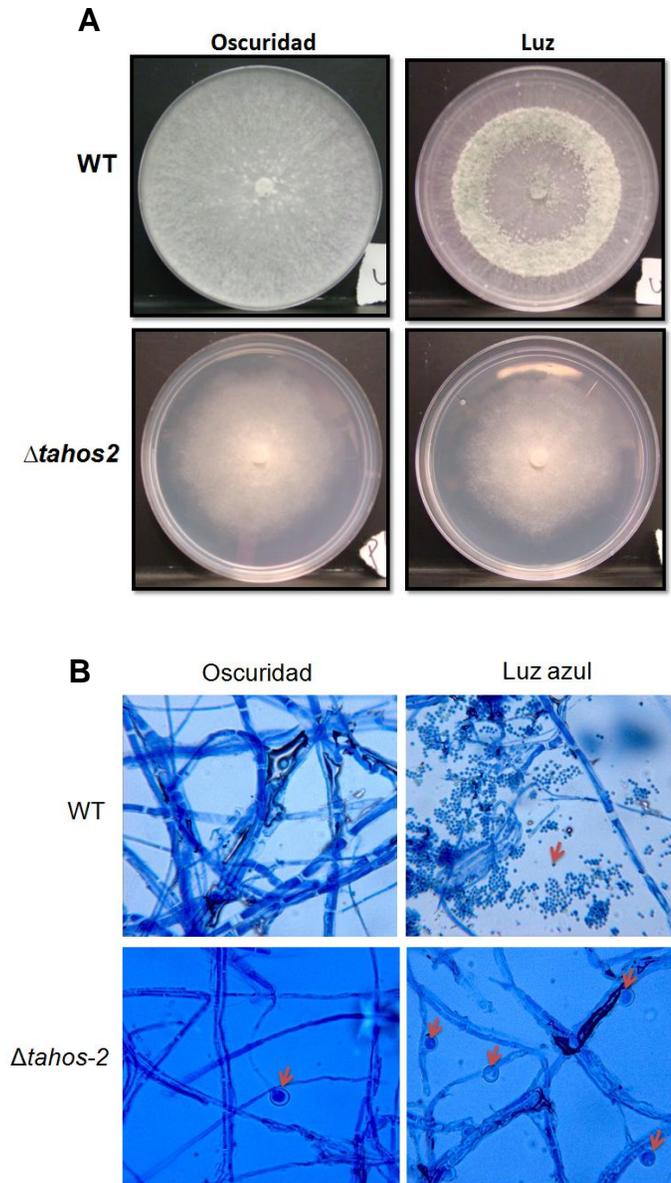


Figura 5. Ensayo de fotoconidiación y análisis microscópico de la mutante $\Delta tahos-2$. **A.** Las cepas WT y $\Delta tahos-2$ después de un ensayo de fotoconidiación. La cepa WT presenta el anillo característico de conidias verdes en respuesta a la luz azul, la cepa $\Delta tahos-2$ no formó este anillo de conidias. **B.** Microscopía con objetivo de 40X de las cepas sometidas al ensayo de fotoconidiación. La WT no presenta conidias en la oscuridad pero sí después del pulso de luz azul (señaladas por la flecha roja). La cepa $\Delta tahos-2$ solo presenta estructuras denominadas clamidosporas (señaladas por la flecha roja) con mayor frecuencia después del pulso de luz azul.

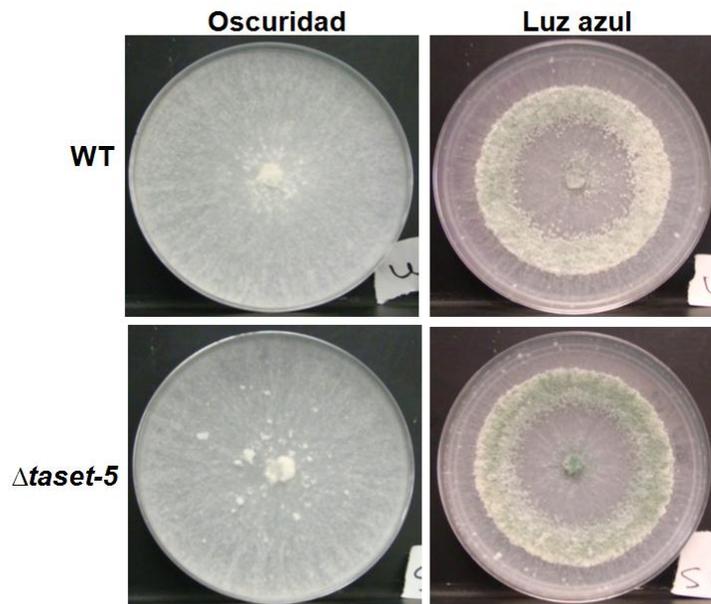


Figura 6. Ensayo de fotoconidiación de la cepa WT y de la cepa $\Delta taset-5$. Ambas cepas fueron crecidas en la oscuridad por 48 h y expuestas a 1200 μM de luz azul, e incubadas por 48 h más en la oscuridad. Cepas mantenidas en la oscuridad fueron utilizadas como control.

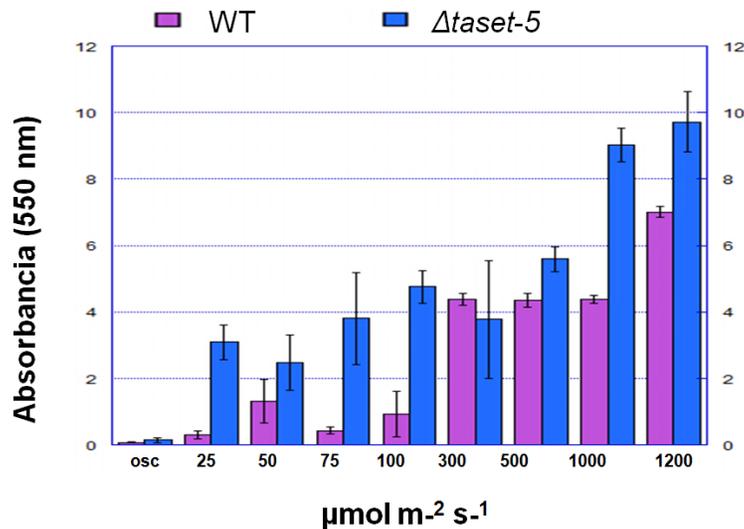
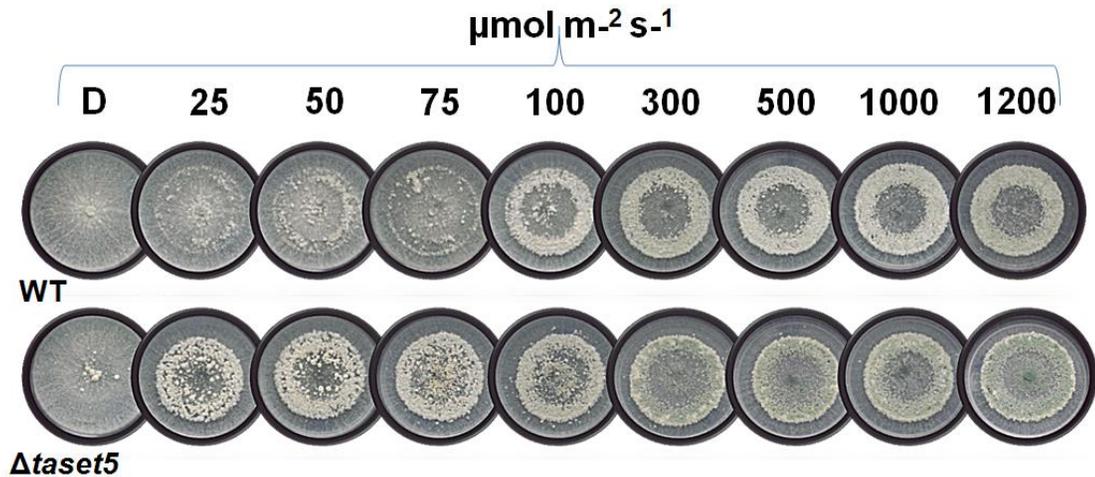


Figura 7. Ensayo de fotoinducción dosis-respuesta de $\Delta taset5$. **A.** Fotografías de las cepas silvestre (WT) y $\Delta taset5$ después de un ensayo de fotoconidiación con 9 diferentes concentraciones de luz azul (señaladas en la parte superior de cada caja como $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **B.** Determinación de la concentración de conidias (absorbancia 500 nm) en las cepas WT y $\Delta taset5$ (eje de las Y) en respuesta a las diferentes concentraciones de luz azul en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (eje de las X). Cada una de las columnas representa el promedio de los triplicados de un experimento. Las barras representan la desviación estándar.

La cepa silvestre produjo la misma cantidad de conidias con 300, 500 y 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz y aumenta la producción de conidias hasta 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz. En cambio, la cepa $\Delta taset-5$ produce el mismo número de conidias desde 75 hasta 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e incrementa este número con 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz, sin haber un aumento significativo en las 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Con estos datos podemos afirmar con mayor seguridad que la $\Delta taset-5$ es más sensible a un estímulo luminoso en comparación con la cepa silvestre y que el sistema de percepción de la señal luminosa en la cepa mutante alcanza un umbral de acción con una cantidad menor de luz azul, comparada con la cepa silvestre (Figura 7B y Figura suplementaria 2B).

Las cepas $\Delta tahos-2$ y $\Delta taset-5$ responden diferencialmente al daño mecánico

Se sabe que *T. atroviride* conidia en respuesta al daño mecánico; sin embargo, no se ha dilucidado el proceso que da lugar a esta respuesta. Con la finalidad de determinar si las mutantes generadas están afectadas en la conidiación por daño mecánico, se realizó un experimento en donde se cortó el micelio de las mutantes $\Delta tahos-2$ y $\Delta taset-5$, incluyendo a la cepa silvestre como control. Al igual que la cepa silvestre la cepa $\Delta taset-5$ conidió en respuesta al daño mecánico, pero aparentemente formó más conidias; sin embargo, estas conidias se acumularon en el centro de la colonia y no exactamente en el área dañada como lo hace la cepa silvestre. La cepa $\Delta tahos2$ en cambio no mostró conidiación en respuesta al daño mecánico (Figura 8).

En las cepas $\Delta taset-5$ y $\Delta tahos-2$ se afecta la expresión de genes que responden a luz azul.

Debido a que las mutantes $\Delta taset-5$ y $\Delta tahos-2$ presentan alteraciones fenotípicas en la respuesta a luz azul, el siguiente paso fue analizar la expresión de genes que responden a luz azul en los fondos genéticos mutantes, incluyendo genes inducibles (*phr-1*, *al-3*, *grg-1* y *env-1*) y que se reprimen (*bld-2*) por luz azul. Como se observa en la Figura 9A, en la cepa WT, el transcrito de *phr-1* se hace evidente a los 30 min después del pulso de luz azul y este comienza a disminuir a los 120

min; sin embargo, en la mutante $\Delta tahos-2$, la intensidad de la banda a los 30 min es mayor y a los 120 min decae drásticamente. En cuanto a los genes *al-3* y *grg-1*, estos presentan un aumento en la expresión a los 30 min después del pulso de luz azul en la cepa WT, sin embargo; en la cepa $\Delta tahos-2$, esta expresión es mucho mayor y no decae a los 120 min, como se observa en la cepa WT. El gen *env-1* no se expresa en la oscuridad, pero es detectado a los 30 min después del pulso de luz azul y disminuye a los 120 min. En cambio en la mutante $\Delta tahos-2$ la expresión a los 30 min es muy débil e incrementó ligeramente a los 120 min. Para el gen represible por luz azul *bld-2*, se observó que en la cepa WT, el transcrito disminuye paulatinamente a los 30 y 120 min después del pulso de luz azul, en cambio en la mutante $\Delta tahos-2$, la expresión de este gen se vuelve imperceptible a los 120 min.

En la cepa $\Delta taset-5$, la expresión de genes responsivos a luz azul, también se observó alterada (Figura 9B). Los genes *phr-1* y *al-3* presentan el mismo patrón de expresión tanto en la cepa WT como en la cepa $\Delta taset-5$; sin embargo, la intensidad de las bandas es menor en la mutante. Los genes *grg-1* y *env-1*, presentaron un patrón de expresión diferente al observado en la cepa WT, ya que el pico máximo de expresión de estos genes se presenta a los 120 min, contrario a lo observado en la cepa WT, en donde el pico máximo de expresión aparece a los 30 min disminuyendo a los 120 min. Finalmente, se observó que el gen *bld-2*, presenta una disminución del transcrito a los 30 min en ambas cepas; sin embargo, contrario a lo observado en la cepa WT, el transcrito de este gen aumenta a los 120 min en la cepa $\Delta taset-5$.

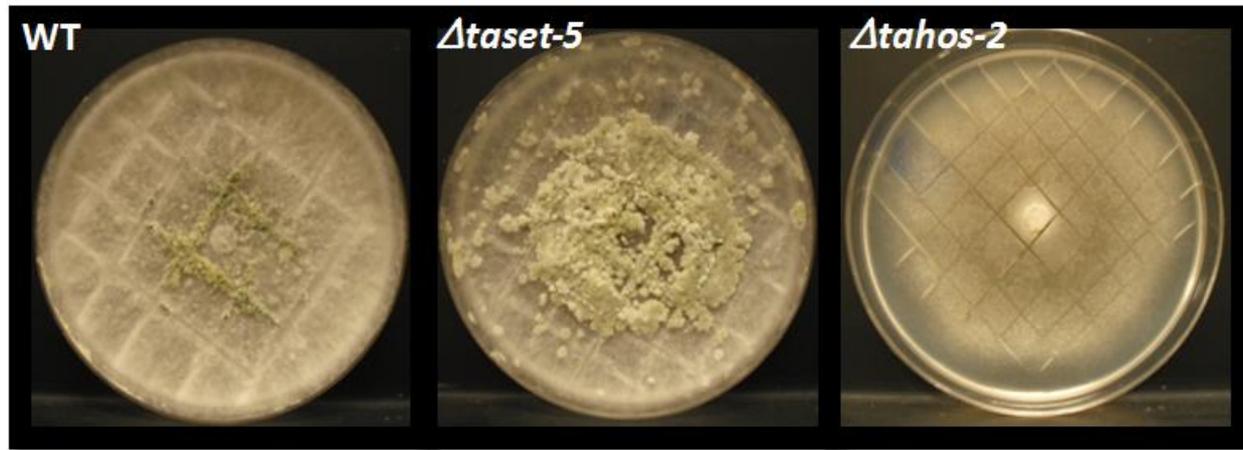


Figura 8. Conidiación por daño mecánico de las mutantes $\Delta taset-5$ y $\Delta tahos-2$. Las cepas mutantes y la silvestre fueron crecidas a 28°C por 48 hrs en la oscuridad para posteriormente, cortarlas con un bisturí bajo luz roja de seguridad. Las cajas se incuban a 28°C por 36 hrs más en la oscuridad.

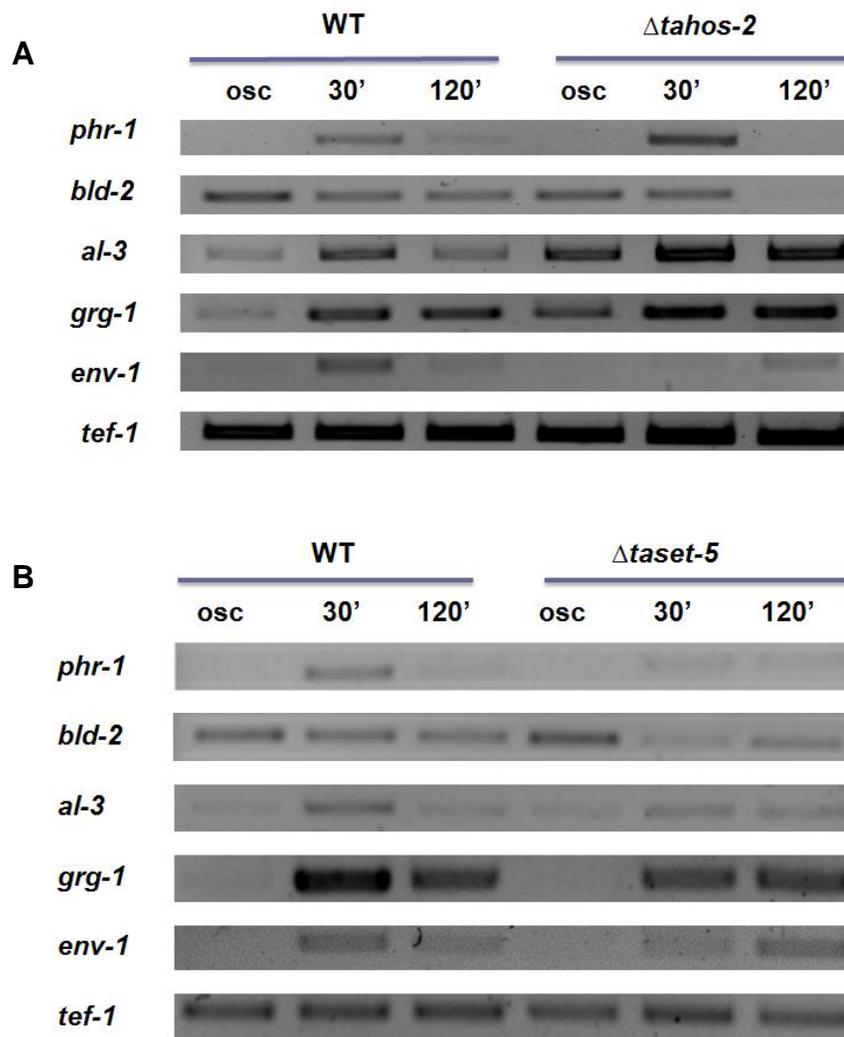


Figura 9. Ensayo de RT-PCR de los genes regulables por luz azul en las cepas mutantes $\Delta tahos-2$ y $\Delta taset-5$. Se realizó un ensayo de fotoinducción exponiendo a todas las cepas a $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz azul. La extracción de RNA se realizó a los 30 y 120 min después del pulso de luz azul. También se extrajo RNA de cepas crecidas y mantenidas en oscuridad como control (osc). **A.** RT-PCR de genes que responden a luz azul en la cepa WT y en la mutante *tahos-2*. **B.** RT-PCR de genes que responden a luz azul en la cepa WT y en la mutante *taset-5*.

DISCUSIÓN

La proteína TAHOS-2 es importante para el desarrollo de *T. atroviride*

Existen trabajos que describen la participación de proteínas modificadoras de la cromatina en la respuesta a la luz. Por ejemplo en *Arabidopsis* se demostró que la acetiltransferasa de histonas GCN5 y la desacetilasa de histonas HD1 son requeridas para la expresión de genes, el crecimiento y desarrollo regulados por luz (Benhamed *et al.*, 2006).

En *T. atroviride* existen aproximadamente 200 proteínas modificadoras de la cromatina (Casas-Flores *et al.*, en preparación) y recientemente se observó que algunos genes que codifican para este tipo de proteínas son inducidos después de un pulso de luz azul (Herrera-Estrella, comunicación personal), incluyendo a los genes *tahos-2*, *tarsc-9* y *taset-5*. Bajo el supuesto de que pueden estar involucrados en la respuesta a la luz azul por el hecho de responder a este estímulo, decidimos investigar si los productos de estos genes participan en la respuesta a la luz azul en *T. atroviride*. El gen *tahos-2* (*Trichoderma atroviride* HDA one similar) (Graessle *et al.*, 2001), codifica putativamente para una desacetilasa de histonas clase I. En este trabajo se generó la mutante Δ *tahos-2*, la cual está alterada en el desarrollo, ya que su crecimiento es lento, presenta escaso micelio aéreo y además es incapaz de conidiar en respuesta a la luz azul o al daño mecánico (Figuras 4, 5 y 8). Nuestros resultados sugieren que la ausencia de conidiación, se debe a que la mutante es incapaz de desarrollar conidióforos, estructuras de reproducción asexual que dan origen a las conidias. Se han reportado resultados similares para otra desacetilasa de histonas (*phd1*) en *S. pombe*, en donde la mutante de ese gen es viable pero incapaz de llevar a cabo la meiosis y por lo tanto de formar ascosporas (Kim *et al.*, 1998). A diferencia del trabajo de Kim *et al* (1998), nosotros analizamos un proceso mitótico denominado conidiación, por lo cual sugerimos que la proteína TAHOS-2 es importante para el desarrollo, y la formación de conidióforos y por lo tanto para la conidiación. El análisis al microscopio de la mutante Δ *tahos-2*, también nos permitió identificar la

presencia de estructuras de resistencia denominadas clamidosporas. Se ha reportado que la formación de clamidosporas es inducida por factores ambientales como la luz y la humedad en otros hongos (Kües, 2000), y se consideran estructuras de sobrevivencia en ambientes hostiles (Lin y Heitman 2005). En el presente trabajo determinamos que en *T. atroviride* estas estructuras se presentan con baja frecuencia en la cepa silvestre; sin embargo, en la cepa $\Delta tahos-2$ se observó una gran cantidad de clamidosporas en condiciones de oscuridad y esta cantidad se vió exacerbada después del pulso de luz azul. Esto sugiere que TAHOS-2 es un regulador negativo de la formación de clamidosporas y un regulador positivo de la conidiogénesis en *T. atroviride*. Nuestros datos también mostraron que la luz azul es un factor que estimula la formación de estas estructuras de resistencia debido al estrés causado por este factor. En *Fusarium oxysporum* se encontró que la mutante FoSTUA (codifica una proteína básica hélice-vuelta-hélice) está afectada en el desarrollo del conidióforo y en la formación de conidias y la formación de clamidosporas se potenció. Estos resultados sugieren que la proteína FoSTUA está jugando un papel dual, al regular positivamente la conidiogénesis y negativamente la formación de clamidosporas (Ohara y Tsuge, 2004). A diferencia de la proteína FoSTUA, la cual está catalogada como un factor de transcripción, la proteína TAHOS-2 contiene un dominio de desacetilasa de histonas, lo cual sugiere un papel regulatorio de la transcripción por esta HDAC a nivel epigenético. En base a nuestros resultados, hipotetizamos que TAHOS-2 podría estar regulando de manera negativa a un represor de la formación del conidióforo ante diferentes estímulos, mientras que por otro lado, estaría regulando negativamente a los activadores responsables de la formación de clamidosporas. La identificación de genes blanco de TAHOS-2 será importante para entender los mecanismos moleculares de la formación de clamidosporas en nuestro modelo de estudio.

T. atroviride tiene la capacidad de conidiar por daño mecánico. Se ha propuesto que al dañar las hifas o el micelio, estos entran en contacto con el oxígeno del aire, generando un ambiente oxidante que lleva a la formación de conidias (Slater, 1984). Además, al igual que otros hongos, *T. atroviride* también conidia por la falta

de nutrientes. Cuando el crecimiento de la colonia llena por completo la caja, comienza a conidiar por limitación de nutrientes (Casas-Flores *et al.*, 2006). En este trabajo al dañar mecánicamente con un bisturí a la cepa $\Delta tahos-2$, esta fue incapaz de conidiar en el área dañada (Figura 8). Además, cultivos de varias semanas de la cepa $\Delta tahos-2$ no presentaron conidiación al llenar la caja. Estos resultados sugieren que la proteína TAHOS-2 es esencial para la conidiación en respuesta a diferentes tipos de estrés en *T. atroviride*.

Al analizar la expresión de los genes inducibles por luz azul en la mutante $\Delta tahos-2$, se observó que la mayoría de estos genes (*phr-1*, *al-3* y *grg-1*) presentan el mismo patrón de expresión en respuesta a la luz azul; sin embargo, el aumento de la expresión en respuesta a este estímulo, fue más fuerte en la cepa $\Delta tahos-2$ en comparación con la cepa WT, a excepción del gen *env-1*, el cual presentó un rezago en su expresión en respuesta a la luz azul. Estos resultados sugieren que la proteína TAHOS-2, es requerida para que el gen *env-1* responda a la luz azul a tiempos más tempranos. Debido a que la expresión del gen *env-1* es dependiente del complejo BLR, es posible que TAHOS-2 esté interactuando con este complejo a través de su dominio de interacción con HDAC y que su ausencia afecte indirectamente la rápida inducción de *env-1* en respuesta a la luz azul. Sin embargo, la participación redundante de otras desacetilasas de histonas compensa la ausencia de TAHOS-2, permitiendo que *env-1* se exprese a tiempos más tardíos. Nosotros hipotetizamos, que la alteración de la expresión de los genes responsivos a luz azul *phr-1*, *al-3* y *grg-1*, se debe en sí, a la misma alteración de la expresión del gen *env-1* provocada por la ausencia de la proteína TAHOS-2, ya que se ha reportado que la proteína ENVOY, es un regulador negativo de genes que responde a luz azul (Castellanos *et al.*, 2010). Por lo tanto, la ausencia de TAHOS-2, podría estar provocando indirectamente, que la proteína ENVOY cumpla correctamente su función como regulador de los genes responsivos a luz azul analizados en este trabajo. Por otro lado, la ausencia de la proteína TAHOS-2 también afecta la expresión del gen represible por luz azul *bd-2*. Análisis cuantitativos de la transcripción de genes responsivos a la luz azul,

ayudarán a determinar el posible efecto de la mutación en el gen *tahos-2* en *T. atroviride*.

La proteína TASET-5 participa en la regulación negativa de la conidiación en respuesta a la luz azul y al daño mecánico en *T. atroviride*

El gen *taset-5* (*Trichoderma atroviride*; Su (var) 3-9, enhancer of zeste, Thritorax domain) (Tschiersch *et al.*, 1994), codifica putativamente para una metiltransferasa de lisinas en las histonas H3 y H4. Las proteínas con dominio SET juegan un papel importante en diversos aspectos de la morfología de la célula y control del crecimiento (Nislow *et al.*, 1997). También se ha reportado que la metilación de las lisinas de las histonas H3 y H4 está relacionada tanto a la activación como al silenciamiento de la transcripción, dependiendo del residuo específico modificado (Lachner y Jenuwein, 2002). Por ejemplo, la metilación de la K4 de la histona H3 está asociada con cromatina transcripcionalmente activa. La dimetilación de la K4 de la histona H3 por Set1 correlaciona con transcripción basal, mientras que la trimetilación de la K4 de la histona H3 es observada en promotores totalmente activados (Quian y Zhou, 2006).

En el presente trabajo, la interrupción del gen *taset-5* resultó en una cepa que requiere menos cantidad de luz para formar el anillo de esporas en comparación con la cepa silvestre, mostrando un fenotipo de hiperconidiación (Figura 7A y B). Además, al realizar el daño mecánico a la cepa $\Delta taset-5$, esta presentó un fenotipo de hiperconidiación en el centro de la colonia y no el área dañada como lo hace la cepa silvestre. Esto sugiere que la proteína TASET-5 juega un papel importante en la modulación de la conidiación inducida por luz azul y por daño mecánico (Figura 8). En *S. cerevisiae* se reportó que una proteína con dominio SET (la proteína SET1) tiene un grupo de genes blanco involucrados en la regulación transcripcional, crecimiento, control del ciclo celular y meiosis (Nislow *et al.*, 1997). Por lo cual es posible que alguno de los genes regulados por SET1 sea también blanco de TASET-5 en nuestro modelo, entre ellos, genes involucrados en la modulación de la conidiación.

También se ha reportado que las proteínas con dominio SET además de transferir grupos metilo a las lisinas, participan en la interacción proteína-proteína con otras proteínas modificadoras de la cromatina (Pijnappel *et al.*, 2001). Es muy factible que TASET-5 sea solo parte de un complejo de proteínas encargadas de regular negativamente la transcripción de genes de conidiación. A diferencia de otros reportes, en el presente trabajo la cepa mutante en el gen *taset-5* presenta un crecimiento similar al de la cepa silvestre, y el patrón de conidiación en respuesta a la luz azul, es también muy similar al de cepa de referencia. Se ha reportado que mutantes en *S. pombe* y *N. crasa* en genes que codifican para proteínas con dominios SET (Clr4 y DIM-5 respectivamente) presentan anomalías en el crecimiento (Ekwall y Ruusala, 1994; Ekwall 1996; Tamaru y Selker, 2001). También se sabe que hay segregación errónea y pérdida de cromosomas en mutantes Clr4 de *S. pombe* (Allshire *et al.*, 1995; Ekwall *et al.*, 1996); sin embargo, por los patrones de crecimiento de la mutante $\Delta taset-5$, parece no tener problemas de este tipo, pero sí tendría un papel importante en la sensibilidad a la luz azul como modulador.

Al analizar la expresión de los genes de respuesta a luz azul en esta mutante, se observó que todos los genes presentaban ligeras alteraciones en su expresión; sin embargo el patrón era muy similar al de la cepa silvestre. Sólo los genes *env-1* y *grg-1* presentaron alteraciones en el patrón de expresión, retardándose la aparición del pico máximo del transcrito. Esto sugiere que al igual que TAHOS-2, la proteína TASET-5 está involucrada en la regulación positiva de la expresión de estos genes en respuesta a la luz azul. El fenotipo de hiperconidiación en respuesta a luz azul y al daño mecánico sugiere que la proteína TASET-5 puede estar regulando genes de respuesta tardía, ya que los genes de conidiación se inducen tardíamente en respuesta a la luz azul y al daño mecánico (Steyaert *et al.*, 2010). Por lo tanto es necesario analizar si hay un cambio en la expresión de estos y otros genes de respuesta tardía como los de conidiación en el fondo genético $\Delta taset-5$.

Adicionalmente, no se pudo obtener la mutante en el gen *tarsc-9* (el cual codifica para un remodelador de la cromatina), esto sugiere que posiblemente, el gen es esencial para el desarrollo y viabilidad de la célula, tal como se ha reportado para su ortólogo en *S. cerevisiae* (Damelin *et al.*, 2002). El análisis del genoma completo de *S. cerevisiae* reveló que RSC9 tiene una gran cantidad de genes blanco, dentro de los cuales predominan genes de respuesta a casi todo tipo de estrés y genes de biosíntesis del ribosoma. Por lo cual al eliminar a *tarsc-9* del genoma de *T. atroviride*, los protoplastos transformados son incapaces de reconstituir su pared celular y desarrollar una colonia completa. Por tal motivo, es necesario diseñar una estrategia diferente que nos permita averiguar el papel que juega este gen en la respuesta a luz azul en *T. atroviride*. Proponemos generar cepas de *tarsc-9*, bajo un promotor inducible. Esto implica sustituir por doble recombinación homóloga el promotor endógeno del gen *tarsc-9* por el promotor del gen *qa-2*. El gen *qa-2* codifica para una enzima involucrada en la utilización del ácido quínico como fuente de carbono en *Neurospora crassa* (Giles *et al.*, 1985). En ausencia del ácido quínico o en presencia de sacarosa, el gen *qa-2* no se expresa. Con esta estrategia se puede regular la expresión del gen *tarsc-9*, controlando la cantidad de inductor agregado al medio, y así regular la expresión del gen *tarsc-9* sin eliminar el gen completamente y poder analizar el comportamiento de la cepa en ausencia de *tarsc-9*.

CONCLUSIONES

- La proteína TAHOS2 es importante para el desarrollo y esencial para la conidiación en respuesta a diferentes tipos de estrés en *T. atroviride*.
- La proteína TAHOS-2 regula negativamente la formación de clamidosporas en *T. atroviride*.
- La proteína TASET-5 es un modulador de la conidiación en respuesta a la luz azul y al daño mecánico.
- En las mutantes $\Delta taset-5$ y $\Delta tahos-2$ se afecta la expresión de genes que responden a la luz azul.
- Es posible que al igual que en *S. cerevisiae*, la proteína TARSC-9 sea esencial para la viabilidad de *T. atroviride*.

PERSPECTIVAS

- Analizar el patrón de expresión de genes de conidiación y de formación del conidióforo en ambas mutantes.
- Identificar a los genes blanco de TAHOS-2 y TASET-5.
- Determinar los cambios epigenéticos de los promotores de genes blanco de TAHOS-2 y TASET-5 en los fondos genéticos silvestre y mutante.
- Determinar si las proteínas TAHOS-2 y TASET-5 interactúan con el complejo BLR para regular la expresión de genes de respuesta a luz azul.
- Generar una nueva construcción que nos permita controlar la expresión del gen *tarsc-9* y así evaluar su papel en la respuesta a luz azul en *T. atroviride*.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Las secuencias subrayadas corresponden a lo sitios de reconocimiento por enzimas de restricción indicados en el nombre de cada oligonucleótido. La posición donde hibridan los oligonucleótidos se muestra de la siguiente manera: el signo negativo representa la posición río arriba partiendo del ATG. El signo positivo representa la posición río abajo partiendo del ATG, cuanto a la numeración que no contiene signo, indica que el oligonucleótido se encuentra dentro del ORF del gen en cuestión.

No	Gen que amplifica Construcciones para interrumpir los genes	Nombre	Secuencia	Posición
1	Amplifica el extremo 5´adyacente al ORF del gen <i>taset5</i>	set5 amino XhoI- Fw set5 amino XhoI- Rv	5' <u>ccgctcgag</u> ccggagctcagtgaaacgac 3'	-1421 a
2			5' <u>ccgctcgag</u> cggaattccaactaaattcactc 3'	-1392 -39 a -1
3	Amplifica el extremo 3´adyacente al ORF del gen <i>taset5</i>	set5 carboxilo EcoRI- Fw set5 carboxilo SmaI- Rv	5' <u>ggaattccc</u> ctatgatcgtggagggggc 3'	+923 a
4			5' <u>tccccgggg</u> gacccgctgccacgacaaagaag 3'	+953 +2261 a +2293
5	Amplifica el extremo 5´del gen <i>tahos2</i>	<i>hos2</i> amino KpnI- fw <i>hos2</i> amino XhoI- Rv	5' <u>ggggtacccc</u> gtggtgcgccctcgtctattcc 3'	-1353 a
6			5' <u>ccgctcgag</u> cggtgctgggtctgctgaaat 3'	-1320 -39 a -1
7	Amplifica el extremo 3´del gen <i>tahos2</i>	<i>hos2</i> carboxilo EcoRI- Fw <i>hos2</i> carboxilo XbaI- Rv	5' <u>ggaattccg</u> actcattatatcttcacccc 3'	+1489 a
8			5' <u>gctctagag</u> cggtcctcccaagtctc 3'	+1525 +2867 a +2894
9	Amplifica el extremo 5´del gen <i>tarsc9</i>	rsc9 amino KpnI- Fw rsc9 amino HindIII- Rv	5' <u>ggggtacccc</u> ggcgcgactgctgtgga 3'	-1338 a
10			5' <u>cccaagctt</u> gggccaataaccagtcgaagtgcg 3'	-1311 -38 a -1

11	Amplifica el extremo 3' de <i>tarsc9</i>	rsc9 carboxilo Smal-Fw	5' <u>tccccggggg</u> aaaaccgctataatcaaagctc 3'	+2944 a +2983
12		rsc9 carboxilo XbaI Rv	5' gctctagagcccacgactcacgcttgctc 3'	+4450 a +4472
No	Escrutinio de las mutantes	Nombre	secuencia	Posición
13	Extremo 5' de Δ <i>taset5</i> con oligonucleótido 20	externo <i>set5</i> Fw	5' cgttcgtgatcgtaagtctc 3'	-1610 a -1591
14	Extremo 3' de Δ <i>taset5</i> con oligonucleótido 19	externo <i>set5</i> Rv	5' cagggggcaagattgtagccc 3'	+2544 a +2564
15	Extremo 5' de Δ <i>hos2</i> con oligonucleótido 20	externo <i>hos2</i> Fw	5' caggtgaagaatagacggcagc 3'	-1579 a -1558
16	Extremo 3' de Δ <i>hos2</i> con oligonucleótido 19	externo <i>hos2</i> Rv	5' ggcaagcccgttgacgctgc 3'	+3126 a +3145
17	Extremo 5' de Δ <i>rsc9</i> con oligonucleótido 20	externo <i>rsc9</i> Fw	5' tgcgaaaatcttgccccagttg 3'	-1751 a -1730
18	Extremo 3' de Δ <i>rsc9</i> con oligonucleótido 19	externo <i>rsc9</i> Rv	5' tgggtgccctcgtgtcctcctg 3'	+4855 a +4876
19	<i>Casset5te hph</i>	identificación de mutante <i>hph</i> Fw	5' ctattccttgccctcggacgagtgtg 3'	-1074 a -1054
20		identificación de mutante <i>hph</i> Rv	5' gatcgacgtaactgatattgaaggag 3'	+1703 a +1723
No	Presencia del Gen	Nombre	secuencia	Posición
21	<i>taset5</i>	set5-Rt-Fw	5' ccggggccatcgcaagtaac 3'	215 a 234
22		set5-Rt-Rv	5' cggcataggtccagctgtgagaag 3'	553 a 576
23	<i>tarsc9</i>	rsc9-rt-Fw	5' aaccgaagccgatgaaaccactcc 3'	788 a 811
24		rsc9-rt-Rv	5' ggccagtcccgggaaagagtcaa 3'	980 a 1002
25	<i>tahos2</i>	<i>hos2</i> -rt-Fw	5' aagccctggcgtctgacactctcc 3'	253 a 276
26		<i>hos2</i> -rt-Rv	5'ggccacctccccacgcaatag 3'	569 a 589
No	RT-PCR	Nombre	secuencia	Posición

27 28	<i>tef-1</i>	Ta-tef-1-fw Ta-tef-1-rv	5' aggccgagcgtgagcgtggtat 3' 5' atggggacgaaggcaacggcttt 3'	747 a 768 1168 a 1190
29 30	<i>env-1</i>	envoy-Fw-pf envoy-Rv-pf	5' ccaatttccatccccgcctgac 3' 5' ccctgatccggctgtctggttg 3'	143 a 165 580 a 603
31 32	<i>al-3</i>	Ta-al-3-Fw Ta-al-3-Rv	5' ttccgtgccagctcatctcctc 3' 5' gccaccgtcttattcccacat 3'	447 a 470 808 a 831
33 34	<i>grg-1</i>	grg-1-Fw grg-1-Rv	5' agggcgctgtctctggtgcta 3' 5' catccttggcggcggtcag 3'	44 a 64 181 a 199
35 36	<i>bld-2</i>	bld-2-fw bld-2-rv	5' acaagtgcggtatcgaggactgtg 3' 5' agttggcgcaccatcatactgaca 3'	445 a 468 579 a 602
37 38	<i>phr-1</i>	phr-1 Fw phr-1 RV	5' tcatgtttggatcagcgaagtcg 3' 5' tactcgggcttgaatggcttgtt 3'	1269 a 1291 1404 a 1496

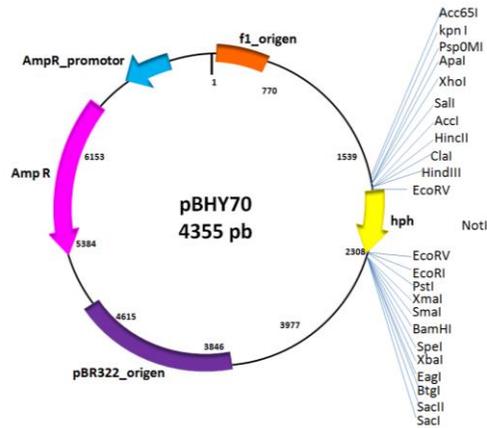
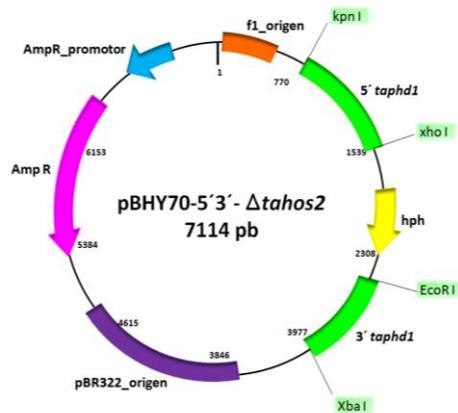
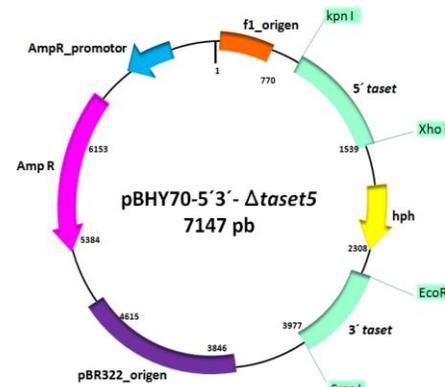
A

Figura suplementaria 1. Representación esquemática del plásmido pBHY70 y de las construcciones generadas para transformar *T. atroviride*. **A.** Plásmido pBHY70 con un *cassette* de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias y un *cassette* de resistencia a higromicina para su selección en hongos. **B.** Plásmido pBHY70 con el *cassette* de higromicina flanqueado por las aledañas del ORF de *tahos-2* utilizadas para transformar a *T. atroviride* y llevar a cabo el reemplazo del gen. **C.** Plásmido pBHY70 con el *cassette* de higromicina flanqueado por las regiones aledañas del ORF de *taset-5* utilizadas para transformar a *T. atroviride* y llevar a cabo el reemplazo del gen.

B**C**

A

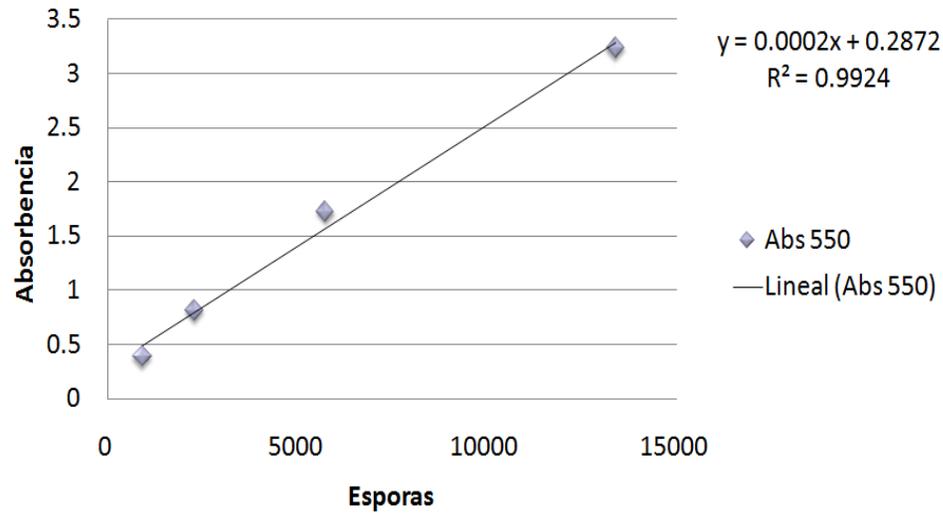
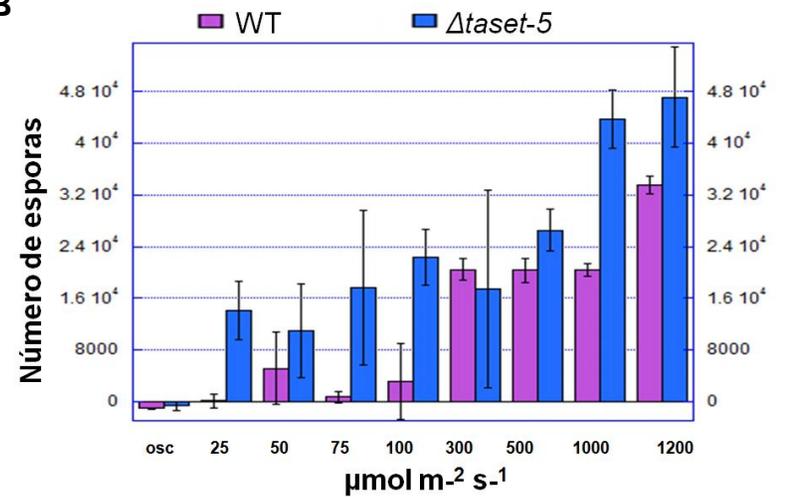


Figura suplementaria 2. Determinación de la relación existente entre la DO_{550} y la cantidad de conidias en *T. atroviride*. **A.** La grafica de dispersión de datos representa la correlación entre la absorbancia y la cantidad de esporas. La formula se obtuvo por análisis de regresión lineal. **B.** Cantidad de esporas en respuesta a las diferentes concentraciones de luz azul.

B



REFERENCIAS

1. **Allshire R. C., E. R. Nimmo, K. Ekwall, J.P. Javerzat and G. Cranston.** 1995. Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev* 9:218-233.
2. **Ambra, R., B. Grimaldi, S. Zamboni, P. Filetici, G. Macino, and P. Ballario.** 2004. Photomorphogenesis in the hypogeous fungus *Tuber borchii*: isolation and characterization of *Tbwc-1*, the homologue of the blue-light photoreceptor of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 41:688-97.
3. **Baek, J. M., and C. M. Kenerley.** 1998. The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system. *Fungal Genet Biol* 23:34-44.
4. **Ballario, P., P. Vittorioso, a Magrelli, C. Talora, a Cabibbo, and G. Macino.** 1996. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J* 15:1650-7.
5. **Benhamed, M., C. Bertrand, C. Servet, and D.-X. Zhou.** 2006. Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant cell* 18:2893-903.
6. **Berrocal-Tito G. M., E. U. Esquivel-Naranjo, B. A. Horwitz, and A. Herrera-Estrella.** 2001. *Trichoderma atroviride* PHR1, a Fungal Photolyase Responsible for DNA repair, Autoregulates Its Own Photoinduction. *Eukaryot Cell* 6:1682-1692.
7. **Casal J. J., L. G. Luccioni, K. A. Oliverio and H. E. Boccalandro.** 2003. Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Photochem Photobiol Sci* 2:625-636.

8. **Casas-Flores, S., M. Rios-Momberg, M. Bibbins, P. Ponce-Noyola, and A. Herrera-Estrella.** 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 150:3561-9.
9. **Casas-Flores, S., M. Rios-Momberg, T. Rosales-Saavedra, P. Martinez-Hernandez, V. Olmedo-Monfil, and A. Herrera-Estrella.** 2006. Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryot Cell* 5:499.
10. **Cashmore, A. R.** 1997. The cryptochrome family of photoreceptors. *PC&E* 20:764-767.
11. **Cashmore, A. R.** 2003. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell* 114:537-43.
12. **Castellanos F., M. Shmoll, P. Martínez, D. Tisch, C. P. Kubicek, A. Herrera-Estrella, E. U. Esquivel-Naranjo.** 2010. Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol* 47:468-476.
13. **Chen, C.-H., and J. J. Loros.** 2009. Neurospora sees the light: light signaling components in a model system. *Commun Integr Biol* 2:448-51.
14. **Damelin, M., I. Simon, T. I. Moy, B. Wilson, S. Komili, P. Tempst, F. P. Roth, R. A. Young, B. R. Cairns, and P. A Silver.** 2002. The genome-wide localization of Rsc9, a component of the RSC chromatin-remodeling complex, changes in response to stress. *Mol Cell* 9:563-73.
15. **Driel, R., Fransz P.F, and P. J. Verschure** 2003. The eukaryotic genome: a system regulated at different hierarchical levels. *JCS* 116:4067-75.

16. **Ekwall, K., and T. Ruusala** 1994. Mutations in rik1, clr2, clr3 and clr4 genes asymmetrically derepress the silent mating-type loci in fission yeast. *Genetics* 136:53–64.
17. **Ekwall, K., E. R. Nimmo, J. P. Javerzat, B. Borgstrøm, R. Egel, G. Cranston, and R. Allshire.** 1996. Mutations in the fission yeast silencing factors clr4_ and rik1_ disrupt the localisation of the chromo domain protein Swi6p and impair centromere function. *J. Cell Sci.* 109:2637–2648
18. **Esquivel-Naranjo, E. U., and A. Herrera-Estrella.** 2007. Enhanced responsiveness and sensitivity to blue light by blr-2 overexpression in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology* 153:3909-22.
19. **Falciatore, A., and C. Bowler.** 2005. The evolution and function of blue and red light photoreceptors. *Curr Top Dev Biol* 68:317-50.
20. **Froehlich A. C., C.H. Chen, W. J. Belden, C. Madeti, T. Roenneberg, M. Merrow, J. Loros and J. C. Dunlap.** 2010. Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 9: 738-750.
21. **Fungal Genetics Stock Center** [<http://www.fgsc.net/methods/vogels.html>]
22. **Galun, E., and J. Gressel.** 1966. Morphogenesis in *Trichoderma*: suppression of photoinduction by 5-fluorouracil. *Science* 151:696.
23. **Giles, N. H., M. E. Case, J. Baum, R. Geever, L. Huiet, V. Patel, and B. Tyler.** 1985. Gene organization and regulation in the qa (quinic acid) gene cluster of *Neurospora crassa*. *Microbiol Rev* 49:338-58.

24. **Graessle, S., P. Loidl, and G. Brosch.** 2001. Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. *Yeast* 58:704- 720.
25. **Gresik, M., N. Kolarova, and V. Farkas.** 1988. Membrane potential, ATP, and cyclic AMP changes induced by light in *Trichoderma viride*. *Exp Mycol* 12:295-301.
26. **Gresik, M., N. Kolarova, and V. Farkas.** 1989. Light-stimulated phosphorylation of proteins in cell-free extracts from *Trichoderma viride*. *FEBS Lett* 248:185-7.
27. **Grimaldi, B., P. Coiro, P. Filetici, E. Berge, J. R. Dobosy, M. Freitag, E. U. Selker, and P. Ballario.** 2006. The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. *Mol Biol Cell* 17:4576.
28. **Herrera-Estrella, A., and B. a Horwitz.** 2007. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol Microbiol* 64:5-15.
29. **Huala, E., P. W. Oeller, E. Liscum, I. S. Han, E. Larsen, and W. R. Briggs.** 1997. Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278:2120-3.
30. **Jenuwein, T., and C. D. Allis.** 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-80.
31. **Kagawa, T., M. Kasahara, T. Abe, S. Yoshida, and M. Wada.** 2004. Function analysis of phototropin2 using fern mutants deficient in blue light-induced chloroplast avoidance movement. *Plant Cell Physiol* 45:416-26.

32. **Kim, Y. B., a Honda, M. Yoshida, and S. Horinouchi.** 1998. *phd1+*, a histone deacetylase gene of *Schizosaccharomyces pombe*, is required for the meiotic cell cycle and resistance to trichostatin A. *FEBS Lett* 436:193-6.
33. **Kouyama, T., and M. Murakami.** 2010. Structural divergence and functional versatility of the rhodopsin superfamily. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology.* RSC 9:1458-65.
34. **Krauss, U., B. Q. Minh, A. Losi, W. Gärtner, T. Eggert, A. von Haeseler, and K.-E. Jaeger.** 2009. Distribution and phylogeny of light-oxygen-voltage-blue-light-signaling proteins in the three kingdoms of life. *J Bacteriol* 191:7234-42.
35. **Kües, U.** 2000. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbio Mol Biol Rev* 64:316-53.
36. **Kwon T., J. H. Chang, E. Kwak, C. W. Lee, A. Joachimiak, Y. C. Kim, J. W. Lee and Y. Cho.** 2003. Mechanism of histone lysine methyl transfer revealed by the structure of SET7T9- AdoMet. *EMBO* 22:292-303.
37. **Lachner, M., and Thomas Jenuwein.** 2002. The many faces oh histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 14:286-298.
38. **Lee, K. K., and J. L. Workman.** 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature Rev Mol Cell Biol* 8:284–295.
39. **Lin, X., and J. Heitman.** 2005. Chlamydospore Formation during Hyphal Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* 4:1746-1754.

40. **Nelson, D. C., J. Lasswell, L. E. Rogg, M. a Cohen, and B. Bartel.** 2000. FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 101:331-40.
41. **Nislow, C., E. Ray, and L. Pillus.** 1997. SET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Mol Biol Cell* 8:2421-36.
42. **Ohara, T., and T. Tsuge.** 2004. FoSTUA, Encoding a Basic Helix-Loop-Helix Protein , Differentially Regulates Development of Three Kinds of Asexual Spores , Macroconidia , Microconidia , and Chlamydospores , in the Fungal Plant Pathogen *Fusarium oxysporum*. *Eucaryot Cell* 3:1412-1422.
43. **Ohgishi, M., K. Saji, K. Okada, and T. Sakai.** 2004. Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2223-8.
44. **Olmedo, M., C. Ruger-Herreros, E. M. Luque, and L. M. Corrochano.** 2010. A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes con-10 and con-6 in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 47:352-63.
45. **Pijnappel, W. W., D. Schaft, a Roguev, a Shevchenko, H. Tekotte, M. Wilm, G. Rigaut, B. Séraphin, R. Aasland, and a F. Stewart.** 2001. The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Gene Dev* 15:2991-3004.
46. **Punt J. P., P. O. Richard, M. A. Dingenmanse, P. H. Pouwels, C. A. M. J. J. van den Hondel.** 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56: 117-124.

47. **Purschwitz, J., S. Müller, C. Kastner, M. Schöser, H. Haas, E. a Espeso, A. Atoui, A. M. Calvo, and R. Fischer.** 2008. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* 18:255-9.
48. **Quian, C., and Zhou M. M.** 2006 SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci* 63 2755-2763.
49. **Raeder, U., and P. Broda.** 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 1:17–20.
50. **Reid, G., R. Gallais, and R. Métivier.** 2009. Marking time: the dynamic role of chromatin and covalent modification in transcription. *IJBCB* 41:155–163.
51. **Rockwell, N. C., Y.-S. Su, and J. C. Lagarias.** 2006. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:837-58.
52. **Rodríguez-Romero, J., M. Hedtke, C. Kastner, S. Müller, and R. Fischer.** 2010. Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Ann Rev Microbiol* 64:585-610.
53. **Rosales-Saavedra, T., E. U. Esquivel-Naranjo, S. Casas-Flores, P. Martínez-Hernández, E. Ibarra-Laclette, C. Cortés-Penagos, and a Herrera-Estrella.** 2006. Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology* 152:3305-17.
54. **Sambrook, L., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual Res Publica-Journal of Undergraduate* third edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

55. **Schmoll, M., L. Franchi, C. P. Kubicek, G. Molinari, R. La, I. Umberto, and V. R. Elena.** 2007. Envoy, a PAS / LOV Domain Protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), Modulates Cellulase Gene Transcription in Response to Light. *Eucaryot Cell* 4:1998-2007.
56. **Schwerdtfeger, C., and Linden, H.** 2003. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J* 22:4846-4855.
57. **Slater, T. F.** 1984. Free-radical mechanisms in tissue injury. *The Biochemical Journal* 222:1-15.
58. **Somers, D. E., T. F. Schultz, M. Milnamow, and S. A. Kay.** 2000. ZEITLUPE Encodes a Novel Clock-Associated PAS Protein from *Arabidopsis*. *Cell* 101:319-329.
59. **Steyaert J. M., R. J. Weld, A. Mendoza-Mendoza and A. Stewart.** 2010. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology* 156:2887-2900.
60. **Struhl, K.** 2001. Histone Acetylation at Promoters Is Differentially Affected by Specific Activators and Repressors. *Mol Cell Biol* 21:2726-2735.
61. **Swartz, T. E., T.-S. Tseng, M. a Frederickson, G. Paris, D. J. Comerchi, G. Rajashekara, J.-G. Kim, M. B. Mudgett, G. a Splitter, R. a Ugalde, F. a Goldbaum, W. R. Briggs, and R. a Bogomolni.** 2007. Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* 317:1090-3.
62. **Takahashi, F., D. Yamagata, M. Ishikawa, Y. Fukamatsu, Y. Ogura, M. Kasahara, T. Kiyosue, M. Kikuyama, M. Wada, and H. Kataoka.** 2007.

- AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles. *Plant Biol* 104:19625-30.
63. **Tamaru, H., and E. U. Selker** 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414:277–283
 64. **Tang L., E. Nogales and C. Ciferri.** 2010. Structure and Function of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes and Mechanistic Implications for Transcription. *Prog Biophys Mol Biol* 102: 122-128.
 65. **Terzaghi, W. B., and A. R. Cashmore.** 1995. Light-regulated transcription. *Annual Review of Plant Biology. Annual Reviews Plant Physiol. USA* 46:445–474.
 66. **Tisch, D., C. P. Kubicek, and M. Schmoll.** 2011. New insights into the mechanism of light modulated signaling by heterotrimeric G-proteins: ENVOY acts on *gna1* and *gna3* and adjusts cAMP levels in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Fungal Genet Biol* 48:631-640.
 67. **Trichoderma atroviride v2.0 – Home** [<http://genome.jgi.doe.gov/Triat2/Triat2.home.html>]
 68. **Trojer, P., M. Dangl, I. Bauer, S. Graessle, P. Loidl, and G. Brosch.** 2004. Histone methyltransferases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a novel enzyme with a unique substrate specificity. *Biochemistry* 43:10834–10843
 69. **Tschiersch, B., A. Hofmann, V. Krauss, R. Dorn, G. Korgel, and G. Reuter.** 1994. The protein encoded by the *Drosophila* position- combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J* 13:3822-3831.

70. **Valdez, J. G., and Piccolo, R. J.** 2006. Use of Spectrophotometry as a Tool to Quantify the Sporulation of *Penicillium allii* in Garlic Lesions. *Fitopatol Bras* 31:595-597.
71. **Vignali, M., A. H. Hassan, K. E. Neely, and J. L. Workman.** 2000. MINIREVIEW ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complexes. *Mol Cell Biol* 20:1899-1910.
72. **Vreede J., M. A. van der Horst, K. J. Hellingwerf, W. Crielaard and D. M. F. van Aalten.** 2003. PAS Domains *The JBC* 278 18434-18439.
73. **Workman, J. L., and R. E. Kingston.** 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Ann Rev Biochem* 67:545-79.
74. **Zhang, Y., and D. Reinberg.** 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Gen Dev* 15:2343-60.