



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Epigenética del sistema visual y del fenómeno de
micoparasitismo en *Trichoderma atroviride*: Un
análisis del gen ortólogo a *GCN5***

Tesis que presenta

Edith Elena Uresti Rivera

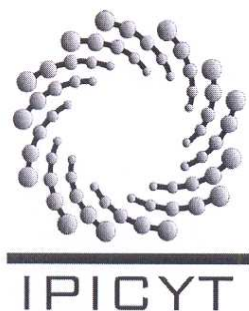
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. J. Sergio Casas Flores

San Luis Potosí, S.L.P., julio de 2008



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “(Epigenética del sistema visual y del fenómeno de micoparasitismo en *Trichoderma atroviride*: Un análisis del gen ortólogo a GCN5)” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por (Edith Elena Uresti Rivera) y aprobada el 15 de 07 de 2008 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
(Asesor de la tesis)

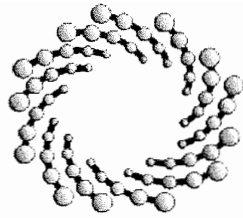
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas 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. de registro 204122**) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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 Primero del Libro 052 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 julio del año 2008, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	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.

Edith Elena Uresti Rivera

sobre la Tesis intitulada:

*Epigenética del sistema visual y del fenómeno de micoparasitismo en Trichoderma atroviride:
Un análisis del gen ortólogo a GCN5*

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 17:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé 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 julio de 2008.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatoria

*A: **Dios**, a mis padres, a mis
hermanos y a mi sobrino.*

Agradecimientos

Principalmente doy gracias a **Dios** por permitirme terminar esta etapa de mi vida académica, agradezco a mi familia: A **mis padres**, que siempre me han apoyado, a **mis hermanos**, y a **mi sobrino**.

A mi asesor de tesis, el **Dr. Sergio Casas Flores** por darme la oportunidad de realizar la maestría, porque de él aprendí muchísimas cosas tanto en el plano académico como en lo personal, por el apoyo que me brindó, por confiar mucho en mí, por sus consejos y sobre todo por su valiosa amistad. Al **Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís** por permitirme realizar la tesis en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Gracias a mis coasesores: la **Dra. Lina Raquel Riego Ruiz** y muy especialmente al **Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**; a ellos gracias por toda su ayuda, su apoyo y sus consejos durante la realización de esta tesis.

A mis compañeros del grupo de trabajo **Mayte, Aída, Miguel Ángel Salas y Miguel Ángel Silva**. Gracias por toda su ayuda, su apoyo, sus consejos y principalmente por ser mis amigos. También quiero agradecer a aquellas personas que alguna vez formaron parte de este grupo y que tuve la oportunidad de conocerlos y trabajar a su lado: **Sandra, Marcela, Vero** y muy especialmente a dos personas con las conviví más tiempo y que aprecio mucho: **Zayra y Memo**, muchísimas gracias por su amistad.

A todos los integrantes del Laboratorio 1: A la **Sra. Rosy**, porque gracias a ella podemos sacar nuestro trabajo adelante, a **Rosy y Chava**, por mantener el orden y facilitarnos el trabajo en el laboratorio, a **Benita, Yair, Iliana, Jesús, Omar, Elida, Bernardo, Lucy, Vero, Armando, Elvira, Pablo, Aurora**, y muy especialmente a **Mariana y Josefát**.

A todos los integrantes de la generación 2006-2008 en especial a **Gaby, Marcela, Griselda, Ángel, Hugo**.

A mis amigos: **Alejandro, Claudia, Vero, Mariana Cárdenas, Mariana Haydeé, Ricardo, Georgina**.

ÍNDICE

	Página
Portada	i
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Índice	vii
Resumen	x
Abstract	xi

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La luz.....	1
1.1.1 Fotorreceptores.....	2
1.1.2 Luz azul.....	3
1.1.3 Luz roja.....	3
1.2 Percepción de la señal luminosa en hongos.....	4
1.2.1 <i>Neurospora crassa</i>	5
1.2.2 <i>Phycomyces blakesleeianus</i>	6
1.2.3 <i>Aspergillus nidulans</i>	7
1.3 El género <i>Trichoderma</i>	7
1.3.1 <i>Trichoderma atroviride</i> como agente de control biológico.....	8
1.3.2 <i>T. atroviride</i> como modelo fotomorfogénico.....	9
1.4 Organización del ADN.....	10
1.5 Epigenética.....	11
1.5.1 Acetilación de histonas.....	12
1.5.1.1 Las acetil transferasas GCN5.....	12
1.5.1.2 El papel de GCN5 en respuestas a la luz en <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
1.5.1.3 GCN5 de <i>Neurospora crassa</i>	13
1.5.2 Desacetilasas de histonas.....	14
1.5.2.1 Inhibidores de desacetilasas de histonas.....	15
1.5.2.2 Tricostatina A.....	15

II. JUSTIFICACIÓN	16
III. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
IV. METODOLOGÍA	18
4.1 Cepas y condiciones de cultivo.....	18
4.1.1 Hongos.....	18
4.1.2 Bacterias.....	18
4.2 Extracción y manipulación de ácidos nucleicos.....	18
4.3 Identificación <i>in silico</i> del gen <i>tago-2</i> de <i>T. atroviride</i>	19
4.4 Identificación <i>in silico</i> del gen que codifica para la histona H3 de <i>T. atroviride</i>	19
4.5 Determinación de la estructura de la proteína TAGO-2.....	20
4.6 Interrupción del gen <i>tago-2</i>	20
4.7 Expresión constitutiva del gen <i>tago-2</i>	21
4.8 Generación de la construcción de la mutante H3K14Q.....	21
4.9 Obtención y transformación de protoplastos.....	22
4.10 Escrutinio para la obtención de la cepa Δ <i>tago-2</i>	22
4.11 Ensayos de fotoinducción y tratamiento con TSA.....	23
4.12 Ensayos de confrontación <i>Trichoderma atroviride</i> vs. Fitopatógeno.....	24
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1 Efecto del TSA.....	25
5.1.1 Efecto del TSA en el fenotipo de conidiación de la cepa IMI206040.....	25
5.1.2 Efecto del TSA en la expresión de genes de respuesta a luz azul de la IMI206040.....	27
5.2 Identificación y aislamiento del gen <i>tago-2</i> de <i>T. atroviride</i>	30
5.3 Generación de cepas transformantes.....	34
5.3.1 Interrupción del gen <i>tago-2</i>	34
5.3.1.1 Obtención de la construcción para generar la mutante <i>tago-2</i>	35

5.3.1.2 Obtención de la mutante <i>tago-2</i>	36
5.3.1.3 Análisis fenotípico de crecimiento y morfología de la mutante <i>tago-2</i>	40
5.3.2 Obtención de cepas transformantes que sobreexpresen el gen <i>tago-2</i>	41
5.3.2.1 Obtención de la construcción para generar la sobreexpresante <i>tago-2</i>	42
5.3.2.2 Obtención y análisis fenotípico de crecimiento y morfología de las transformantes <i>tago-2</i>	43
5.3.3 Obtención de cepas transformantes con mutación en la lisina 14 de la histona H3, (H3 ^{K14Q}).....	44
5.3.3.1 Obtención de la construcción para generar la mutante H3 ^{K14Q}	45
5.3.3.2 Obtención y análisis fenotípico de crecimiento y morfología de las transformantes H3 ^{K14Q}	46
5.4 Ensayos de confrontación de las cepas transformantes y mutantes obtenidas de <i>Trichoderma atroviride</i> vs. <i>Sclerotium rolfsii</i>	47
5.4.1 Ensayo de confrontación mutante <i>tago-2</i> vs. <i>Sclerotium rolfsii</i>	47
5.4.2 Ensayo de confrontación sobreexpresante <i>tago-2</i> vs. <i>Sclerotium rolfsii</i>	48
VI. CONCLUSIONES	50
VII. PERSPECTIVAS	51
VIII. BIBLIOGRAFÍA	52

Resumen

La luz es un factor clave para la existencia de la vida en nuestro planeta, regula una amplia variedad de procesos fisiológicos y del desarrollo en los seres vivos a través de la alteración en la expresión de diversos genes que responden a la señal luminosa. En los organismos eucariotes un obstáculo para que se lleve a cabo la eficiente expresión de dichos genes es el alto grado de empaquetamiento en que se encuentra organizado el ADN nuclear formando una estructura denominada cromatina. Esta estructura está sujeta a modificaciones covalentes cuyo blanco son principalmente las histonas, las cuales juegan un papel muy importante en la regulación de la transcripción. Se sabe que la acetilación reversible de los tallos amino terminal de las histonas, principalmente H3 y H4 por proteínas Acetil Transferasas de Histonas (HAT) trae como consecuencia una débil interacción entre el nucleosoma y el ADN, permitiendo que éste se encuentre accesible a la maquinaria transcripcional, razón por la cual la acetilación está asociada a la activación transcripcional de diversos genes. *Trichoderma atroviride* es un hongo del suelo que parasita un amplio rango de hongos patógenos de plantas, motivo por el cual es comúnmente utilizado como agente de control biológico de hongos fitopatógenos. Este hongo responde a la luz azul formando un anillo de conidias en el perímetro de la colonia donde fue dado el estímulo luminoso. En el presente trabajo se analizó el patrón de expresión que presentaban los genes de respuesta a luz *phr-1* y *bld-2* de *Trichoderma atroviride*, en presencia de un inhibidor de desacetilasas de histonas. Nuestros resultados indican que dichos genes se encuentran regulados por procesos de acetilación-desacetilación. Se obtuvo una mutante del gen homólogo a Gcn5 de *Saccharomyces cerevisiae* a la cual se llamo *tago-2*. Esta mutante presentó un fenotipo muy particular, ya que mostró una fuerte reducción en su crecimiento en comparación con la cepa silvestre, su conidiación fue escasa y después de un pulso de luz azul no presenta el anillo de conidiación característico de la cepa silvestre. Adicionalmente mostró una reducción significativa en su capacidad como micoparásita frente al fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*. También, se obtuvo una cepa transformante que sobreexpresa el gen *tago-2*, esta cepa muestra un crecimiento similar al de la cepa silvestre, sin embargo es más eficiente en detener el crecimiento de *Sclerotium rolfsii*. Por último se generó una cepa transformante con sustitución de la lisina 14 de la histona H3 por glutamina. Con estos resultados proponemos que el gen *tago-2* de *Trichoderma atroviride* está involucrado en el crecimiento, desarrollo y capacidad micoparásita, así como la conidiación inducida por luz azul en este hongo.

PALABRAS CLAVE: *Trichoderma atroviride*, luz azul, acetilación de histonas.

Abstract

The light is a key factor for the existence of the life in our planet, due regulates a wide variety of physiological and development processes in the living organisms beings across the alteration in the expression of diverse genes that answer to the luminous sign. In eukaryotes an obstacle for carried out the efficient expression of the above mentioned genes is the high degree of packing in which the nuclear DNA is organized, forming a structure named chromatin. This structure is subject to post-translational modifications, whose targets are principally the histones, which play a very important role in the regulation of the transcription. It is known that the reversible acetylation of the amino-terminal tails of the core histones, principally H3 and H4, by Histone Acetyl Transferases (HAT), brings as consequence a weak interaction between the nucleosome and the DNA, allowing that this one being accessible to the transcripcional machinery, therefore the acetylation is associated with the transcripcional activation of diverse genes. *Trichoderma atroviride* is a common soil fungus widely used as a biocontrol agent due to its capacity to parasitize phytopathogenic fungi of major agricultural importance. In this fungus a pulse of blue/UVA light induces the synchronous production of conidia situated at the colony perimeter where the pulse was received. In this work we analyzed the expression pattern of the blue-light-regulated genes *phr-1* and *bld-2* of *Trichoderma atroviride*, in presence of an inhibitor of the histone deacetylases. Our results indicate that the above mentioned genes are regulated by processes of acetylation-deacetylation. We obtained a mutant of the equivalent gene to Gcn5 of *Saccharomyces cerevisiae* to which we named *tago-2*. This mutant presented a very particular phenotype, because it showed a strong reduction in its growth in comparison with the wild type strain, its conidiation was poor and after a pulse of blue light it doesn't show the conidiation ring typically of the wild type strain. Additional *tago-2* strain showed a significant reduction in its capacity as mycoparasite fungus when was confronted to the phytopathogenic *Sclerotium rolfsii*. Also we obtained a transforming that overexpressing the *tago-2* gene, this strain shows a growth similar to that of the wild type, nevertheless it is more efficient in stopping the growth of *Sclerotium rolfsii*. Finally a transforming strain was obtained by substitution of the lysine 14 of the histone H3 for glutamine. With these results we propose that the *tago-2* gene of *Trichoderma atroviride* is involved in the growth, development and mycoparasite capacity, as well as the conidiación induced by blue light in this fungus.

KEY WORDS: *Trichoderma atroviride*, blue light, histone acetylation.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La luz

El espectro electromagnético se compone de distintas longitudes de onda comprendidas dentro de un intervalo definido de diversas frecuencias y abarca desde los rayos cósmicos, rayos gamma, rayos x, ondas de radio y televisión, pasando por la radiación infrarroja, la cual oscila a una frecuencia menor y lleva consigo menor energía, hasta la radiación ultravioleta, la cual oscila más rápidamente, y porta una mayor cantidad de energía. En el rango del ultravioleta al rojo lejano es donde se dan inicio las reacciones fotoquímicas de importancia biológica. Dentro del espectro electromagnético, la luz visible es tan sólo uno de los muchos tipos de radiación, y ocupa un pequeño rango de la totalidad de éste, dentro del cual encontramos a la luz azul que tiene un rango que comprende de los 400 a 500 nanómetros (nm) de longitud de onda (Figura 1).

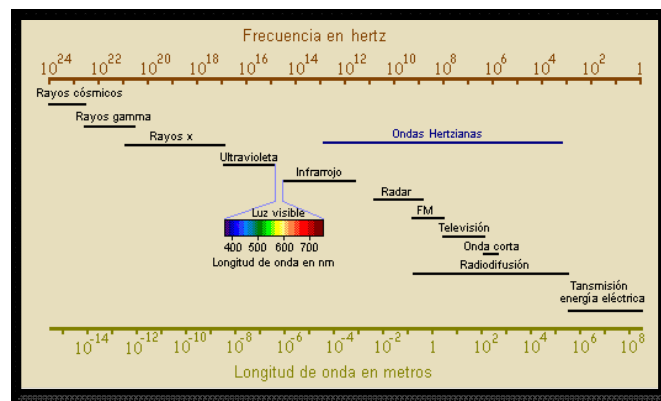


Figura 1. Espectro electromagnético (Tomado de http://edison.upc.edu/curs/llum/luz_vision/luz.html)

La vida y el comportamiento de todos los seres vivos dependen de una manera muy importante de la luz proveniente del sol, ya que regula una amplia variedad de procesos fisiológicos y del desarrollo, a través de la alteración en la expresión de diversos genes que responden a este estímulo (Ma *et al.*, 2001; Linden *et al.*, 1997). La habilidad de percibir la luz es crucial para lograr la supervivencia de los organismos, ya que esto les permite adaptarse y

responder de manera adecuada a los distintos cambios en las condiciones medioambientales (Linden H, 2002).

1.1.1 Fotorreceptores.

La percepción de la luz en los seres vivos, se lleva a cabo por moléculas denominadas fotorreceptores las cuales se componen de proteínas o complejos de proteínas asociadas a uno o más cromóforos con capacidad para cosechar la luz. Éstos últimos son pequeñas moléculas de naturaleza no proteica e incluyen principalmente: Retinoles, tetrapirroles y flavinas (Herrera y Horwitz, 2007). La señal luminosa es percibida y transmitida por el cromóforo y resulta en cambios conformacionales del fotorreceptor, con lo cual inicia la transducción de una cascada de señalización derivada del estímulo luminoso inicial; a la larga esto desencadena en las respuestas a la luz del organismo involucrado. (Schwerdtfeger y Linden, 2003). Los fotorreceptores en animales incluye a las opsinas, las cuales presentan siete dominios transmembranales y unen como cromóforo al retinol, también incluyen a los criptocromos, los cuales unen flavinas y pterinas y están relacionados a la familia de la fotoliasa, pero no tienen función de reparar ADN. Ambos receptores perciben a la luz azul. Las plantas contienen numerosos fotorreceptores incluyendo criptocromos y fototropinas los cuales perciben la luz por medio de las flavinas. Los fitocromos de las plantas unen una molécula de tetrapirrol y son capaces de detectar a la luz roja y roja lejana para controlar el reloj circadiano junto con los criptocromos. (Alexander Idnurm y Joseph Heitman; 2005). Dentro de los fotorreceptores hasta ahora descritos para los hongos encontramos: receptores de la luz azul como las proteínas WC-1 y BLR-1 de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride* respectivamente, así como a las opsinas, los criptocromos, los fitocromos y a las DNA fotoliasas (Idnurm y Heitman, 2005; Corrochano y Galland, 2006; Purschwitz *et al.*, 2006). Estos fotorreceptores dotan a los organismos de la capacidad de responder adecuadamente a la cantidad y calidad de luz con lo cual llevarán a cabo exitosamente sus funciones fisiología y del desarrollo.

1.1.2 Luz azul

La habilidad de percibir y responder a la luz azul cuyo rango en el espectro abarca de los 400 a los 500 nm de longitud de onda, parece ser ubicua en la mayoría de los organismos vivos, ya que representa una señal elemental para inducir cambios e influir en el comportamiento de los mismos. El primer reporte que se tiene de una respuesta a la luz azul fue hecho por Darwin, quien describió una respuesta fototrópica en plantas por acción de la luz azul (Purschwitz *et al.*, 2006). Actualmente se sabe que no sólo las plantas responden a este estímulo, sino que han sido ampliamente estudiados los procesos de percepción, transducción de señales y respuestas a la luz azul en organismos como bacterias, hongos y algas. Algunas de las respuestas reportadas por acción de la luz azul son: El fototropismo en plantas y hongos, la inhibición del alargamiento del hipocotilo, así como la apertura de los estomas, (Kaufman *et al.*, 1993; Denisson *et al.*, 1979), la inducción de la síntesis de carotenoides en hongos (Rau *et al.*, 1985), y el encarrilamiento del ritmo circadiano en diversos organismos (Gehring *et al.*, 2003). Un papel claro para un criptocromo de respuesta a la luz azul y ritmo circadiano en animales se ha descrito en *Drosophilla* (Cashmore, 2003). Mutantes en *cry*, que es un gen que codifica para un criptocromo en *Drosophilla* muestran deficiencias en el cambio de fase en respuesta a luz.

1.1.3 Luz roja

Los fitocromos se describieron por primera vez en plantas, y esto basado en la observación de que la germinación de semillas de *Lactuca sativa* se inhibía por acción de la luz roja lejana, pero este efecto era revertido por iluminación subsecuente con luz roja (Borthwick *et al.*, 1952). Desde entonces y hasta hace algunos años se pensaba que la capacidad de detectar a la luz roja y roja lejana por acción de un fitocromo como receptor de luz se limitaba únicamente a las plantas (Falciatore y Bowler 2005), sin embargo, estudios recientes han demostrado que los fitocromos pertenecen a una gran familia de fotorreceptores ampliamente distribuidos en organismos fotosintéticos y no

fotosintéticos tales como: plantas inferiores, bacterias, algas y hongos (Montgomery y Lagarias, 2002).

Son pocos los organismos en los que se ha estudiado el papel de la percepción y respuesta a la luz roja. Esto se debe a que no en todos se ha encontrado una respuesta a este estímulo, o bien una secuencia en su genoma que codifique un fotorreceptor que responda a esta. Por otro lado, aunque en algunos organismos como *N. Crassa* se han reportado receptores putativos a la luz roja como es el caso de los fitocromos PHY 1 Y PHY 2, aún no se conoce una respuesta del hongo a este tipo de luz.

En *Vicia faba* la luz roja estimula el bombeo electrogénico de protones en protoplastos (Serrano *et al.*, 1988), esta acción es requerida para la apertura de los estomas durante la fotosíntesis. La luz roja estimula la respuesta fototrópica en tallos etiolados de chícharo (Kang and Burg, 1974). Más recientemente, se encontró que el hongo *Aspergillus nidulans* reprimía su desarrollo sexual por acción de la luz roja (Blumenstein *et al.*, 2005).

1.2 Percepción de la señal luminosa en hongos

Como ocurre en el resto de los organismos, los hongos también responden a las señales provenientes del medio ambiente, incluyendo la luz, y dado que esta desencadena muchas respuestas en ellos como la conidiación, el fototropismo, el desarrollo sexual, el encarrilamiento del ritmo circadiano, el metabolismo secundario, etc., no es sorprendente que los hongos sean capaces de responder a diferentes tipos de luz, desde el ultravioleta hasta el rojo lejano. Particularmente los hongos son un modelo de estudio ideal en fotobiología, esto debido a que la mayoría presenta una fase haploide, entonces una mutación única frecuentemente da como resultado un fenotipo. Los hongos pueden percibir distintos tipos de luz y ser capaces de responder incluso al estímulo luminoso proveniente de una sola estrella lejana. Además de las evidencias fisiológicas de su respuesta, así como los proyectos de secuenciación de genomas han revelado que las cuatro clases de

fotorreceptores encontrados en otros reinos, se encuentran conservados en los hongos (Purschwitz *et al.*, 2006) (Figura 2).

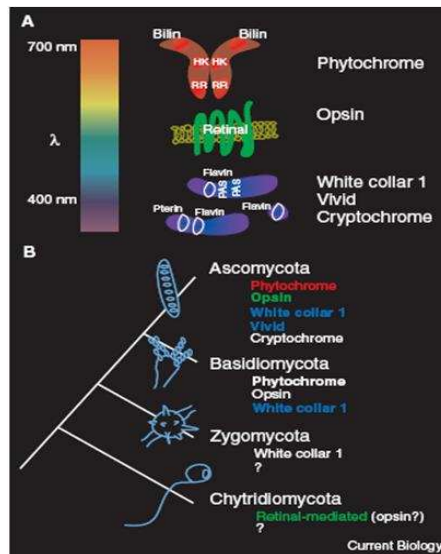


Figura 2. Se muestra a las diferentes proteínas encontradas en los genomas de diversos hongos que que podrian funcionar como fotorreceptores (Tomado de Purschwitz *et al.*, 2006).

1.2.1 *Neurospora crassa*

Probablemente el receptor de luz azul mejor descrito y más estudiado en hongos es la proteína White Collar 1 (WC-1), del hongo ascomiceto *Neurospora crassa*, que junto con la proteína White Collar 2 (WC-2) son esenciales para todas las respuestas descritas a luz azul en este hongo como fototropismo, biosíntesis de carotenoides, inducción del crecimiento de las hifas, formación de conidias y encarrilamiento del ritmo circadiano son mediadas por la luz azul y casi todas dependen del complejo White collar (WCC) (Ballario *et al.*, 1996; Linden y Macino, 1997). Ambas proteínas han sido definidas como factores de transcripción con dominios GATA tipo dedos de zinc de unión a ADN, también contienen dominios tipo PAS (Per-Arnt-Sim) involucrados en detectar señales intra y extracelulares (Ballario *et al.*, 1998). WC-1 presenta tres dominios PAS, de los cuales el primero pertenece a una subfamilia de dominios especializados en percibir señales como luz oxígeno y

voltaje, denominados LOV (luz, oxígeno y voltaje) y unen FAD de manera similar a los primeros dominios LOV descritos en las fototropinas de plantas (Froehlich *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002). Por su parte, WC-2 tiene sólo dominio PAS. Mediante los dominios PAS WC-1 y WC-2 forman un complejo que actúa como activador transcripcional de genes que responden a luz de en forma rápida y tardía. Dentro de los genes que responden a la luz azul, encontramos a *vvd*, cuyo producto, la proteína VIVID contiene un dominio LOV, el cual une FAD. VIVID es receptor de luz azul secundario, ya que depende del complejo White Collar (WCC) y necesario para la adaptación a la iluminación constante y para detectar cambios en la intensidad de luz (Schwerdtfeger y Linden, 2003).

1.2.2 *Phycomyces blakesleeanus*

Phycomyces blakesleeanus es un hongo zigomiceto, el cual produce esporangióforos de más de 10 cm de alto, los cuales presentan un tropismo positivo o crecimiento hacia una fuente de luz azul o cercana al UV, mientras que, presenta un tropismo negativo cuando la radiación está lejos de la región del azul, es decir menor a 310 nm (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1992). En el micelio la luz azul inhibe la formación de micróforos y estimula el desarrollo de los macróforos (Corrochano y Gallan., 2006), además se presenta una acumulación de β -carotenos. Otros estímulos que modifican el crecimiento de los macróforos incluyen a la luz roja, verde, UV, la radiación ionizante, la gravedad, los olores y la presión (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1992).

En los años 60, Laureate MaxDelbrück aisló diversas cepas del hongo *Phycomyces blakesleeanus*, las cuales presentaban defectos en el fototropismo y cuyo gen mutado *madA*, recientemente se descubrió que codifica para un fotorreceptor similar a WC-1 (Idnurm *et al.*, 2006).

1.2.3 *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans es un hongo que se reproduce asexualmente mediante conidiosporas y sexualmente por ascosporas, la luz roja es la señal de detención del desarrollo sexual, pero favorece el desarrollo sexual (Mooney *et al.*, 1990). En la oscuridad el desarrollo sexual se ve exacerbado. La mutación del gen *fphA*, el cual codifica para un fitocromo, resultó en una insensibilidad a la supresión del desarrollo sexual por acción de la luz roja. La producción de la proteína en *Escherichia coli* y su purificación, mostraron que unía biliverdina y absorbía la luz en el rojo y rojo lejano (Blumenstein *et al.*, 2005),

El desarrollo en *Aspergillus nidulans* está predominante mediado por la respuesta a luz roja, sin embargo, se caracterizó una cepa mutante *bliA* (blue light inducible) capaz de sensor luz azul presentando los efectos opuestos de la luz roja (Champe *et al.* 1994).

1.3 El género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* incluye varias especies de hongos filamentosos clasificados como Ascomicetos, Serie Pyrenomycetes, Orden Hipocreales, Género Hypocrea. Aunque se ha descrito la fase sexual para *Trichoderma*, en general su ciclo de vida es asexual en el que se alternan micelio y conidias. El micelio se caracteriza por poseer hifas más o menos ramificadas, tabicadas y con más de un núcleo por célula. Las conidias presentan un único núcleo haploide, su morfología es esférica de color verde, se forman sobre estructuras denominadas conidióforos que a su vez se sitúan sobre células denominadas fiálides (Rosen *et al.*, 1974). En determinadas condiciones nutricionales o frente a condiciones de estrés como la desecación producen estructuras de resistencia denominadas clamidiosporas (Papavizas *et al.*, 1984).

1.3.1 *T. atroviride* como agente de control biológico.

Los hongos filamentosos del genero *Trichoderma*, han sido clasificados como agentes para el control biológico de enfermedades de las plantas. Estos organismos de vida libre se distribuyen de manera ubicua en el suelo y están siendo exitosamente utilizados y comercializados para combatir una amplia gama de hongos fitopatógenos tales como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora ultimum* y *Botrytis cinerea* (Hjeljord *et al.*, 2000; Desai *et al.*, 2002; Fravel, 2005). *Trichoderma spp.* puede impactar directamente a los hongos: después de detectar al huésped adecuado, *Trichoderma* responde con la producción de antibióticos, la formación de estructuras especializadas tipo apresorio y la degradación de la pared celular, seguido por la asimilación del contenido celular del huésped, a este proceso se le denomina micoparasitismo (Chet y Chernin, 2002, Steyaert *et al* 2003; Benítez *et al.*, 2004). Los mecanismos de micoparasitismo, antibiosis y competencia llevados a cabo por *Trichoderma spp.* han sido ampliamente estudiados (Howell, 2003, Harman *et al.*, 2004). Se han descrito más de 100 diferentes metabolitos con actividad antimicrobiana, incluyendo enzimas degradadoras de la pared celular, peptaiboles y un amplio espectro de antibióticos como la gliotoxina (Lorito *et al.*, 1996; Wiest *et al.*, 2002). (Figura 3).

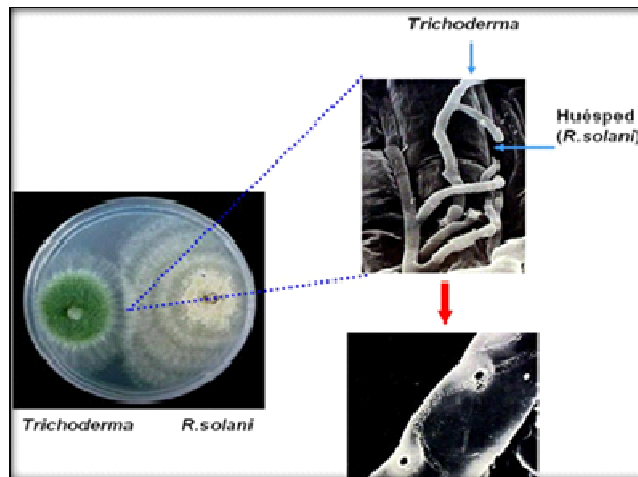


Figura 3. Ensayo de confrontación in vitro de *Trichoderma virens* vs *Rhizoctonia solani*. En el lado izquierdo del panel, puede observarse que la colonia de *Trichoderma virens* (izquierda) sobrecrece a *Rhizoctonia solani*. En la parte derecha de panel se muestra un acercamiento de la zona de interacción y pueden observarse los detalles microscópicos de la interacción entre *Trichoderma* y *Rhizoctonia solani*, nótese las cicatrices producidas en *R. solani* por acción de las enzimas líticas de *Trichoderma* (Elad *et al.*, 1983; Kulling *et al.*, 2000)

1.3.2 *T. atroviride* como modelo fotomorfogénico

En *Trichoderma atroviride* como en muchos otros organismos, la luz azul regula varios procesos fisiológicos y del desarrollo. Se ha reportado que en *Trichoderma atroviride*, un pulso de luz azul induce la producción de conidias en el perímetro de la colonia donde fue dado el estímulo luminoso (Horwitz *et al.*, 1985). Este patrón definido y localizado denominado fotoconidiación permite utilizar a *Trichoderma* como modelo para estudiar el proceso de percepción de la luz. Entre las respuestas fisiológicas tempranas inducidas por la luz en *Trichoderma* se generan cambios en los patrones de la fosforilación de proteínas, cambios en el potencial de membrana, incrementos en la actividad de la adenilato ciclasa y la transcripción de genes (Berrocal-Tito *et al.*, 2000). Recientemente se reportó la identificación y caracterización de los genes *blr-1* y *blr-2*, los ortólogos a *wc-1* y *wc-2* de *N. crassa*. Ambos genes *blr* son esenciales para la conidiación y la expresión de *phr-1* inducida por luz (Casas-Flores *et al.*, 2004). En un análisis por microarreglos de DNA en

respuesta a la luz de *T. atroviride*, se identificaron una serie de genes dependientes e independientes de los genes *blr*, así como genes que se reprimen por la luz azul (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006), como es el caso del gen *bld-2*, (Figura 4). Este dato abre la posibilidad de estudiar y descubrir nuevos mecanismos epigenéticos en la regulación de la transcripción por la luz en hongos.

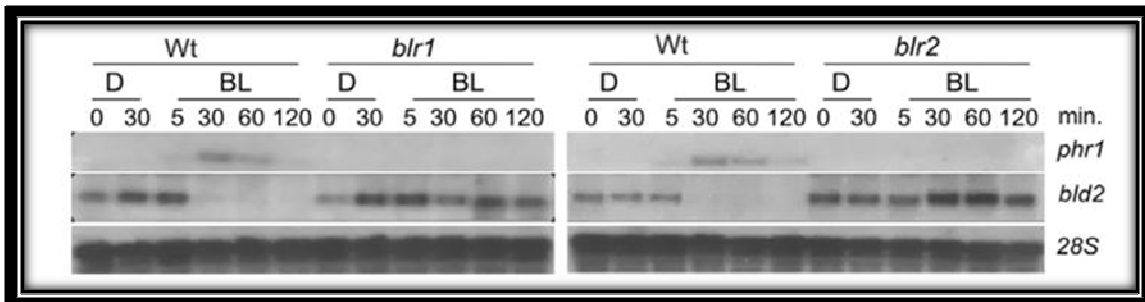


Figura 4. Análisis tipo northern en las mutantes *blr* y en la cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*. En el panel se muestran genes que se inducen por la luz azul (*phr-1*) o que se reprimen (*bld-2*), la respuesta a la luz azul de estos genes muestra una clara dependencia de dichos genes por las proteínas BLR-1 y BLR-2.

1.4 Organización del ADN

En las células eucariotas el ADN se encuentra organizado de un modo muy peculiar, ya que se encuentra empaquetado en una estructura proteica denominada cromatina. La unidad fundamental que se repite a lo largo de esta estructura es el nucleosoma, una estructura de aproximadamente 10 nm de diámetro, compuesta por un octámero de histonas que incluyen dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 y aproximadamente 160 pb de ADN. En este contexto de un complejo heterocromático usualmente no se lleva a cabo el inicio de la transcripción (Struhul *et al.*, 1999) ya que la cromatina funge como una barrera que impide el paso de la maquinaria transcripcional al ADN. Sin embargo, se sabe que la cromatina está sujeta a modificaciones covalentes cuyo blanco son principalmente las histonas; estas modificaciones postranscripcionales, dadas principalmente en las colas amino terminal de las mismas, permiten el incremento o la disminución de la accesibilidad del ADN

por los complejos transcripcionales, generando dos estados de la cromatina: Abierta o cerrada, respectivamente (Imhof, 2003). Dentro de las modificaciones que sufren las histonas se incluye a la fosforilación, la ubiquitinación, la acetilación, la ADP ribosilación y la metilación, (Figura 5). Estas modificaciones, se pueden encontrar en combinación formando un patrón en un estado activo y una combinación diferente en un estado inactivo transcripcionalmente, por lo que se ha propuesto que existe un “código de histonas” (Jenuwein, 2001). A todas estas modificaciones que sufre tanto el ADN (sin alterar la secuencia de éste) así como las proteínas histonas y no histonas se le denomina epigenesis.

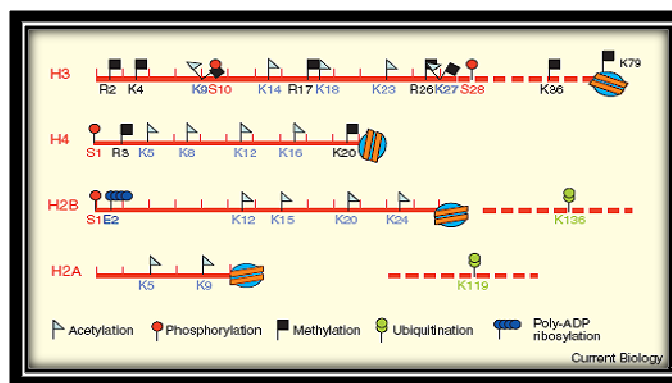


Figura 5. Modificaciones covalentes a las cuales están sujetas las histonas. El tallo amino terminal de las histonas se ve modificado por la unión covalente de diferentes grupos químicos, lo cual se sugiere genera un código epigenético que regula la transcripción génica, dependiendo de las combinaciones de estas modificaciones (Tomado de Axel Imhof, 2003).

1.5 Epigenética

La palabra “epigenética” literalmente significa “además de los cambios en la secuencia genética”. El término ha evolucionado para incluir cualquier proceso que altere la actividad del gen sin cambiar la secuencia del ADN, y conduce a modificaciones que pueden transmitirse a células hijas. La epigenesis juega un papel fundamental en la regulación transcripcional. Distintos eventos epigenéticos dan como resultado diversos patrones de expresión para

diferentes copias de un mismo gen en una célula en particular (Gasser *et al.*, 1998).

1.5.1 Acetilación de histonas

Una de las modificaciones de las histonas mejor estudiadas hasta ahora ha sido la acetilación, la cual se lleva a cabo por enzimas denominadas Acetil Transferasas de Histonas (HAT por sus siglas en inglés), las cuales transfieren un grupo acetilo proveniente del Acetil coenzima A, a las lisinas de las colas amino terminal de las histonas, principalmente H3 y H4. La acetilación de las histonas, resulta en una neutralización de las cargas positivas de las lisinas lo que trae como consecuencia una débil interacción entre el nucleosoma y el ADN, permitiendo de esta manera que el ADN se encuentre accesible a la maquinaria transcripcional, razón por la cual la acetilación está asociada a la activación de genes (Hong, 1993). Es posible que la acetilación del núcleo de histonas cause la desestabilización de la cromatina permitiendo la disociación de la histona H1 (Perry y Annuziato, 1989). Todas estas transiciones estructurales pueden contribuir a facilitar la transcripción (Wolffe y Hayes, 1999). Se pueden ubicar a las HAT's en prácticamente dos grupos: Las de tipo A localizadas en el núcleo (Brownell *et al.*, 1996) y las de tipo B que se encuentran en el citoplasma, estas últimas al parecer participan acetilando las histonas libres que han sido recién sintetizadas en el citoplasma para su transporte al núcleo donde pueden ser desacetiladas e incorporadas a la cromatina (Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975; Allis *et al.*, 1985).

1.5.1.1 La Acetil transferasas GCN5

La primer proteína identificada con actividad HAT de tipo A se descubrió en preparaciones macronucleares del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* (Brownell *et al.*, 1996) utilizando un ensayo de actividad en gel, el cual reveló que un polipéptido de 55 kDa (p55) presentaba actividad de acetilación en

histonas libres (Brownll y Allis; 1995). La subsecuente secuenciación de la proteína mostró que era homóloga a Gcn5 (General control nonderepressible-5) de *Sacharomyces cerevisiae* (Georgakopoulos *et al.*, 1992) la cual ya estaba identificada como un regulador transcripcional (Berger *et al.*, 1992; Marcus *et al.*, 1994; Silverman *et al.*, 1994). El descubrimiento aportó fuerte evidencia molecular de una relación directa entre regulación transcripcional y acetilación de histonas. Varios genes ortologos a Gcn5 han sido clonados y secuenciados en diversos organismos como el humano (Candau *et al.*, 1996), el ratón (Xu *et al.*, 1998), *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* (Smith *et al.*, 1998), *Arabidopsis thaliana*, y *Toxoplasma gondii* (Hettmann *et al.*, 1999), sugiriendo que su función está altamente conservada en eucariotes.

1.5.1.2 El papel deGCN5 en respuestas a la luz en *Arabidopsis thaliana*

En el año 2006 (Benhamed *et al.*, 2006), en *Arabidopsis thaliana* encontraron que *GCN5* era requerido para la regulación del crecimiento dependiente de la luz y para la expresión de genes. La mutante en *GCN5* mostro un fenotipo de hipocotilo largo y una expresión reducida de genes inducibles por luz, la mutación en una desacetilasa de histonas denominada HD1 mostro un fenotipo opuesto al mostrado por la mutante en le gen *GCN5*. En la mutante *gcn5* se redujo la acetilación de las histonas H3 y H4 mayoritariamente en las regiones del promotor, la acetilación de la lisina 14 de la histona H3 (H3K14) fue dependiente sólo de *GCN5*. También se demostró que *GCN5* se encontraba directamente relacionado a los promotores de respuesta a luz.

1.5.1.3 *GCN5* de *Neurospora crassa*

Neurospora crassa ha sido un hongo ampliamente utilizado como modelo para el estudios de fotobiología, recientemente lo es también para estudios epigenéticos, más específicamente la acetilación de las histonas; clara muestra

de ello es un trabajo publicado por Grimaldi *et al.*, 2006, donde el grupo de autores generaron una mutante en *Neurospora*, a la cual llamaron *ngf-1*, cuya proteína codifica una HAT homóloga a Gcn5 de *Saccharomyces cerevisiae*. Ellos encontraron que el residuo K14 de la histona H3 está asociado con la acetilación transitoria del promotor del gen inducible por luz *albino-3 (al-3)* después de la fotoinducción, esta acetilación fue dependiente del fotoreceptor WC-1. La cepa mutante en la lisina 14 presentó un fenotipo similar a una mutante *wc-1* y mostró una fuerte reducción de la activación transcripcional inducida por luz del gen *al-3* y de *vivid*. Adicionalmente la mutante en *GCN5* mostró un fenotipo alterado en el crecimiento y en la producción de conidias, ya que se vio disminuido en ambos casos.

1.5.2 Desacetilasas de histonas

La acetilación de las histonas es un evento muy importante que se lleva a cabo en diferentes organismos con el fin de regular diversos procesos celulares, sin embargo tiene que existir un balance que determine el adecuado funcionamiento fisiológico y metabólico del organismo. Esta modificación es revertida por enzimas denominadas desacetilasas de histonas (HDACs por sus siglas en inglés). La función de estas proteínas es remover el grupo acetilo de las histonas utilizando un mecanismo de “relevo de carga” donde participan dos residuos adyacentes de histidina, dos residuos de aspartato y un residuo de tirosina, y es crucial para este mecanismo un ion Zn^{2+} , el cual se encuentra en el fondo del bolsillo del sitio catalítico de la enzima (Finnin *et al.*, 1999). Hasta ahora han sido identificadas un gran número de desacetilasas de histonas, muchas de las cuales actúan como correpresores de la transcripción. Las HDACs de levadura Hda1 y Rpd3 son reclutadas a los promotores por proteínas represoras causando con ello la desacetilación de la cromatina (Wu *et al.*, 2000). Esta modificación de las histonas se ha visto asociada con la represión transcripcional.

La desacetilación de la lisina 16 de H4 parece ser importante para la interacción de las HDACs dependientes de NAD Sir3 y Sir4, con el

subsecuente esparcimiento de la heterocromatina, la inhibición de la actividad de las HDACs y la inactivación de sitios de hipacetilación en la histona H4 interrumpe la formación de las regiones heterocromáticas.

1.5.2.1 Inhibidores de desacetilasas de histonas

En 1978 se descubrió el primer inhibidor no específico de desacetilasas de histonas, que fue el butirato (Candido *et al.*, 1978; Sealy *et al.*, 1998; Vidali *et al.*, 1978), sin embargo, en 1990 se describió el primer inhibidor específico, el antifúngico Tricostatina A (TSA) (Yoshida *et al.*, 1990).

Los inhibidores de HDACs pueden dividirse en varias clases incluyendo hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos, benzamidas y cetonas electrofílicas. Todos los efectos que estos inhibidores causan en los organismos se cree que son provocados en parte por la acumulación de proteínas acetiladas como las histonas de los nucleosomas, generando con esto un estado hiperacetilado, lo cual juega un papel muy importante en la regulación transcripcional (Jenuwein *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Agalioti *et al.*, 2002).

1.5.2.2 Trichostatina A

Uno de los inhibidores más empleados y estudiados para estudios epigenéticos es el fármaco Trichostatina A (TSA), el cual se aisló por primera vez de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, (Tsuji *et al.*, 1976), este metabolito es un antibiótico antifúngico usado contra *Trichophyton*. El TSA es un compuesto en cuya estructura se destaca la presencia del grupo ácido hidroxámico, el cual entra en contacto con el sitio activo de las HDACs quelando el ion Zn^{2+} e inhibiendo la enzima a concentraciones nanomolares.

II. JUSTIFICACIÓN

Organismos del genero *Trichoderma* han sido utilizados como agentes de control biológico (Chet, 1987) y para la producción de enzimas hidrolíticas, antibióticos (Meyer, 1991) y proteínas heterólogas (Cheng *et al.*, 1990).

Hasta la fecha los esfuerzos que se han hecho por entender el fenómeno de esporulación y la percepción de la luz en *Trichoderma*, se han enfocado principalmente en estudios fotobiológicos y bioquímicos. Los estudios genéticos y moleculares han sido escasos y no han llevado a resultados concluyentes. Los procesos involucrados con la respuesta a luz azul en *T. atroviride* han sido estudiados y analizados, sin embargo, hasta donde se sabe ningún grupo de investigación ha estudiado el papel que juega la acetilación en la expresión de genes en *Trichoderma*, y no ha habido reportes en este hongo de la participación de la acetil transferasa de histonas (HAT) ortóloga a GCN5 de *Saccharomyces cerevisiae* en este proceso y en los procesos de conidiación y micoparasitismo. Sin duda alguna el entendimiento de los mecanismos genéticos y moleculares ayudaría a diseñar mejores estrategias para manipular los diferentes procesos fisiológicos y del desarrollo y así lograr un aprovechamiento óptimo de *Trichoderma* en la generación de productos importantes para la industria, la medicina y como agente de control biológico.

En base a los antecedentes presentados de la percepción a luz en diferentes organismos, planteamos la posibilidad de encontrar el papel que juega una acetil transferasa de histonas en la respuesta a luz azul en este organismo, esto mediante la generación de mutantes y transformantes que nos ayuden a entender los mecanismos genéticos y moleculares de la percepción de la luz azul y la fotoconidiación.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar el papel que juega la HAT (homóloga a *GCN5*) en la epigenética del hongo micoparasítico *Trichoderma atroviride*.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto que tiene el inhibidor de desacetilasas de histonas Trichostatina A en el patrón de expresión de *phr-1* y *bld-2*, así como en el proceso de conidiación.
2. Identificar y clonar el gen ortólogo a *GCN5* de *Saccharomyces cerevisiae* en el genoma de *Trichoderma atroviride*.
3. Generar una cepa mutante por doble recombinación homóloga del gen que codifica para *gcn-5* de *Trichoderma atroviride*.
4. Generar cepas que expresen diferentes niveles del gen *gcn-5* de *T. atroviride*.
5. Generar cepas mutantes individuales en las lisinas 9 y 14 de la histona H3 así como la doble mutante de las mismas.
6. Determinar el patrón de expresión por RT-PCR punto final de los genes *phr-1* y *bld-2* en cada una de las mutantes arriba mencionadas.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Cepas y condiciones de cultivo

4.1.1 Hongos

Durante la realización de este trabajo se utilizó la cepa IMI206040 de *Trichoderma atroviride*. Los cultivos de esta cepa se crecieron a 28°C en cajas con PDA (Papa Dextrosa Agar, DIFCO™). Para los ensayos de inducción por luz se utilizó medio PDYCA (Potato Dextrose Agar 3,9% extracto de levadura 0,2% y casaminoácidos 0,12%), medio PDYCB (Caldo, Papa Dextrosa, DIFCO™ 24g/L, extracto de levadura 2g/L y casaminoácidos 1,2g/L) y el fármaco inhibidor de desacetilasas de histonas Tricostatina A (TSA) 200ng/ml. Para la selección de cepas transformantes se utilizó PDA con 100 µg/ml de higromicina cubiertos con medio selectivo con agarosa al 0.8 % (100 µg /ml de higromicina).

4.1.2 Bacterias

Para la manipulación y amplificación de plásmidos se utilizaron las cepas DH5α y JM109 de *Escherichia coli*. Estas cepas fueron crecidas y mantenidas en medio LB (1% de Triptona, DIFCO™, 0.5% de extracto de levadura, DIFCO y 1% de NaCl). Cuando fue necesario se agregó carbenicilina (100 µg/ml). Los plásmidos utilizados fueron: pGFP-Hyg y pBHY70 , ambos incluyen el gen de la higromicina fosfotransferasa (*hph*) de *E. coli* bajo el control del promotor *trpC* de *A. nidulans*.

4.2 Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

Se extrajo DNA total de micelio de *T. atroviride* según el protocolo descrito por Raeder y Broda (1985). El DNA plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Se aisló el RNA total del micelio de las diferentes muestras de *T. atroviride* utilizando el protocolo descrito por Jones *et al.* (1989). El análisis tipo Northern de las muestras de RNA se realizó según

Sambrook *et al.* (1989). Para el análisis tipo Northern se utilizó como sonda un fragmento de 430 pb del gen *bld-2* de *T. atroviride*. Este fragmento fue marcado con [³²P]dCTP por el método de “Random Priming” (marcaje aleatorio) y utilizados para detectar los mensajeros correspondientes al gen. Como control de carga de RNA se hibridaron las membranas con un fragmento de 500 pb del gen β -actina de *T. atroviride*.

4.3 Identificación *in silico* del gen *Tago-2* de *T. atroviride*

Para identificar a la HAT de *T. atroviride* ortóloga a *GCN5* de *Saccharomyces cerevisiae*, primeramente se realizó un análisis tipo n-blast utilizando como sonda la secuencia de nucleótidos del gen ortólogo de *GCN5* de *S. Cerevisiae* en *N. Crassa*. Con los resultados obtenidos, se llevó a cabo un alineamiento entre varias HATs pertenecientes a hongos filamentosos, plantas y humano, se identificó una región altamente conservada y se utilizó como “sonda electrónica” para buscar en el genoma de *T. atroviride*, en cual está secuenciado en su totalidad (<http://www.jgi.doe.gov>). La sonda hizo blanco con una región y se tomaron aproximadamente 5 kbps hacia el 5' y otro tanto hacia el 3' para abarcar al gen completo. Una vez obtenida la secuencia se determinó *in silico* el marco de lectura abierto (ORF) (GEN SCAN, <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>, Burge y Karlin, 1997), lo cual nos arrojó un gen con un ORF de 1336 pb así como dos intrones, los cuales fueron confirmados posteriormente por secuenciación.

4.4 Identificación *in silico* del gen que codifica para la histona H3 de *T. atroviride*

Con la finalidad de identificar y clonar al gen que codifica para la histona H3 de *T. Atroviride*, se siguió el mismo procedimiento utilizado para identificar el gen *Tago-2*. Una vez obtenida la secuencia se determinó el marco de lectura abierto (ORF), de 1174 pb y una secuencia codificante de 510 pb, predichas por el programa GENSCAN (Burge y Karlin, 1997).

4.5 Determinación de la estructura de la proteína TAGO-2

El análisis de la composición de dominios para la secuencia se realizó con el programa Pfam (Bateman *et al.*, 2002) con un valor de 10 y el alineamiento de los dominios fue llevado a cabo con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1997).

4.6 Interrupción del gen *tago-2*

A partir del ADN obtenido de la cepa silvestre IMI206040 de *Trichoderma atroviride* se amplificó un fragmento de 2324 pb correspondiente a la región 5' inmediata al ORF del gen *tago-2* utilizando los oligonucleótidos F5 (5'GGGGTACCCCCCGTGGGATATGGCGAAGTGTA 3') y R5 (5'CCCAAGCTTGGGACGGGAGACGCTGGTTGGAGAT3') y una región de 1008 pb correspondiente a la región 3' inmediata al ORF de la HAT, las bases subrayadas corresponden a sitios de restricción de las enzimas *Kpn I*, *Hind III* respectivamente. Con los oligonucleótidos F3 (5'AACTGCAGCTGCATGGCCGTTCCCTCG3') y R3 (5'GCTCTAGAGTACTTTGTGTGCAATCGAG3'), las bases subrayadas corresponden a sitios de restricción de las enzimas *Pst I* y *Xba I* respectivamente y fueron añadidos a los oligos para facilitar su clonación. Los fragmentos amplificados correspondientes al 5'upstream y 3'upstream de *tago-2*, se clonaron en el plásmido pBHY70; el fragmento 5' se clonó río arriba del casete de higromicina y el fragmento 3' río abajo del mismo en una misma dirección, siguiendo la polaridad del gen. La construcción generada se digirió con las enzimas de restricción *Kpn I* y *Xba I* de New England **Biolabs** siguiendo las especificaciones del fabricante, el fragmento obtenido de 4732 pb fue utilizado para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

4.7 Expresión constitutiva del gen *tago-2*

Para expresar constitutivamente al gen *Tago-2*, el cDNA correspondiente se amplificó utilizando a los oligonucleótidos OeF (5'TCTAGAATGGCCGACATCAAAGAAG3') y OeR (5'ATGCATCTATTTGTCCGGCTCGAG3') los cuales incluyen a los sitios de restricción *Xba I* y *Nsi I*, que además están presentes en el plásmido pHYG-GFP (bases subrayadas), quedando bajo el influjo del promotor de *pki* del gen que codifica para la piruvato cinasa y el terminador *cbh2* del gen que codifica para la celobiohidrolasa 2 de *Trichoderma reesei* (Mach *et al.*, 1994). La construcción obtenida se confirmó por secuenciación por el método enzimático de Sanger *et al.*, 1987 y fue utilizada para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

4.8 Generación de la construcción para la mutante H3K14Q

Para realizar la sustitución de la lisina 14 de la histona H3 por glutamina, se utilizó un oligo mutagénico que portaba las mutaciones puntuales justo en el triplete de bases codificantes para lisina correspondiente a la posición 14, (AAG reemplazado por CAG en la posición 14), este oligo junto con el reverso se utilizaron para amplificar a partir de ADN genómico de la IMI 206040, la región correspondiente al ORF de la histona H3 de *T. Atroviride*. El oligonucleótido mutagénico incluyó adicionalmente el sitio para la enzima de restricción *Xba I* y el reverso el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Nsi I*. El fragmento obtenido de 1174 pb y fue utilizado para clonarlo en fase en los sitios *Xba I* y *Nsi I* presentes en el plásmido pHYG-GFP, quedando bajo la dirección del promotor del gen *pki* y el terminador *cbh2* (Mach *et al.*, 1994). La construcción obtenida fue verificada por secuenciación por el método enzimático de Sanger *et al.*, 1987 y fue utilizada para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

4.9 Obtención y transformación de protoplastos

La obtención de protoplastos fue realizada de acuerdo a Baek y Kenerley 1998 con ligeras modificaciones. Se inocularon 108 conidias en 100 ml de PDYC y se incubaron por 24 h a 25°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 Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (LET) (Sigma). La mezcla fue incubada a 25°C con agitación suave por 3.5 h. Se recolectaron los protoplastos filtrándolos a través de una malla de nylon estéril con poros de 1 mm y posteriormente se realizó un segundo pase a través de una malla de nylon con orificios de 100 µm. Se agregaron 5 ml de Osmoticum sobre las mallas de nylon para recuperar los protoplastos que pudieran haberse quedado atrapados en éstas, se centrifugaron a baja velocidad y finalmente se resuspendieron en Osmoticum a una concentración de 1x10⁸ protoplastos/ml. 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.

4.10 Escrutinio para la obtención de la cepa Δ *tago-2*

Para comprobar los eventos de reemplazamiento del gen silvestre por el mutante, se obtuvo DNA de las colonias transformantes y se realizaron varias rondas de amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos cuya secuencia se encuentra río arriba del gen *Tago-2* genómico (5'TGTTGGCCAGCCCCCTATTTG 3') y (5'CTCATTTTCGCGTTGAAAAAGTCTC3') pero no en la construcción. Estos oligonucleótidos se combinaron en una reacción de PCR con un oligonucleótido localizado en el gen *hph* (5'GATAGTGGAAACCGACGCCCC3') de la

construcción. A las colonias que dieron amplificación positiva se les indujo la esporulación por luz y se sembraron esporas a diferentes diluciones en medio selectivo 32 con Tritón X-100 al 0.5% con la finalidad de obtener cultivos monospóricos. Este procedimiento se realizó tres veces. Durante los pases por medio selectivo para obtener cultivos monospóricos se observaron los fenotipos de las transformantes para seleccionar a las posibles *tago-2*.

4.11 Ensayos de fotoinducción y tratamiento con TSA

Con ayuda de un sacabocados, se inoculó micelio de cultivos de las diferentes cepas, previamente crecidos por 48 h a 25°C. Posteriormente, se inocularon fragmentos de la periferia de la colonia en cajas de 9 cm con PDA con un papel filtro Whatman™ No. 50 de 8 cm de diámetro que cubre a un segundo papel filtro Whatman™ No. 1, a su vez cubiertos con un papel celofán y 3 ml de PDYCB. Los cultivos se crecieron 36 h a 28°C en oscuridad, periodo en el cual alcanzaron un diámetro aproximado de 4.5-5.0 cm. finalizado el tiempo a la mitad de las muestras se les aplicó una concentración final de TSA 100ng/ml y se incubaron nuevamente por 6 horas a 28°C. Posteriormente, las colonias fueron fotoinducidas exponiéndolas a una fuente de luz azul, con una intensidad de 1200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ proveniente de un dispositivo que contiene dos lámparas fluorescentes de luz blanca fría y un filtro azul de acrílico (LEE #183; con una intensidad de 3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$). El micelio fue colectado con ayuda de un bisturí bajo luz roja de seguridad (filtro LEE #106; con una intensidad de 0.1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$) a los tiempos de 0, 5, 15, 30 y 60 min después de la exposición a la luz e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Los ensayos de fotoconidiación no incluyeron el celofán y fueron colocados en la oscuridad por 24-36 h después del pulso de luz y fijados con metanol al 80%.

4.12 Ensayos de confrontación *Trichoderma atroviride* vs. Fitopatógeno

Para realizar los ensayos de confrontación de las diferentes cepas de *Trichoderma atroviride* contra hongos fitopatógenos, se inoculó un fragmento del en un extremo de una caja con PDA, y en el otro extremo se inoculó a los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solana* y *Sclerotium rolfsii*, para posteriormente incubarlos en condiciones de luz continua y oscuridad a 28°C durante 5 días.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Efecto del TSA

5.1.1 Efecto del TSA en el fenotipo de conidiación de la IMI 206040

En *Trichoderma* la conidiación puede ser inducida por varias señales como el estrés nutricional, el daño mecánico y la luz. Cuando la conidiación es inducida por estrés nutricional la formación de conidias tiene lugar principalmente en la parte central de la colonia (Horwitz et al., 1985), donde los nutrientes se han agotado. Cuando la conidiación es inducida por luz, un pulso luminoso es suficiente para inducir la conidiación en una colonia que crece en oscuridad y a las 24 aproximadamente se forma un anillo de conidias localizado en lo que era la periferia de la colonia al momento de la iluminación (Betina, 1984). Cuando la conidiación es inducida por daño mecánico, ésta se da en el área donde fue provocado el daño (Casas-Flores et al., 2004). *Trichoderma* no es capaz de conidiar en completa oscuridad.

El TSA, un compuesto de origen bacteriano, funciona como inhibidor de desacetilasas de histonas y se determinó que es capaz de provocar distintos efectos fenotípicos y cambios transcripcionales en varios organismos (Pile et al., 2001; Ikegami et al., 1993; Grewal et al. 1998). No se conoce el mecanismo exacto por el que la inhibición de desacetilasas de histonas conlleva a la represión o activación de algunos genes, sin embargo, se cree que al menos en parte es debido al estado hiperacetilado que se genera directa o indirectamente en los promotores de los genes, ya que al existir una descompensación por el efecto del inhibidor entre el balance acetilación-desacetilación. Este incremento en la acetilación puede tener un efecto importante en la regulación de la transcripción (Jenuwein et al., 2001; Zhang et al., 2001; Agaloti et al., 2002). La disrupción en la regulación puede ocasionar que se expresen genes que en condiciones normales no son expresados.

Con estos antecedentes, nos hicimos la pregunta de: ¿cuál podría ser el efecto del TSA en la conidiación y en la expresión de genes en *Trichoderma atroviride*? En base a esta pregunta, se aplicó una concentración de 100ng/ml

de TSA durante 6 horas a una colonia fotocompetente de *Trichoderma* a la que posteriormente se le aplicó un pulso de luz azul. Los resultados nos muestran que el TSA es capaz de inducir la esporulación de la colonia incluso en condiciones de completa oscuridad (Figura 6)

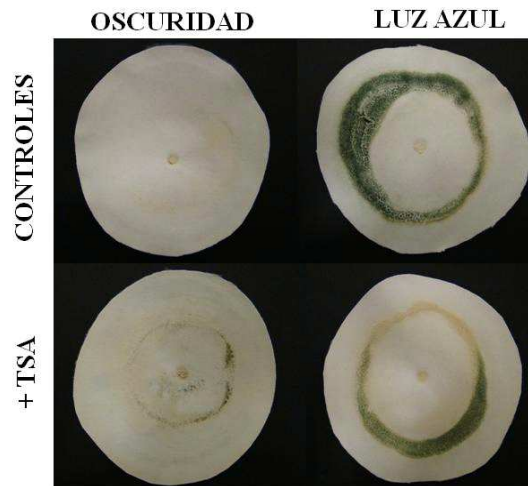


Figura 6. Ensayo de fotoconidiación para *T. atroviride* en ausencia (controles) y en presencia de TSA (+TSA). Las fotografías muestran las colonias crecidas en oscuridad y expuestas a 100 ng/mL de TSA y después de un pulso de luz azul, el micelio hialino no es visible en papel filtro blanco. Nótese la conidiación de la colonia en oscuridad y presencia de TSA.

Este resultado muestra que el TSA está afectando directa o indirectamente los genes involucrados en la conidiación. El mecanismo por el cual se observa este efecto no se conoce, pero probablemente que se esté generando un estado hiperacetilado por efecto del inhibidor de HDACs en los genes **con** responsables de la conidiación, lo que lleva a un aumento en la conidiación de la colonia en condiciones en las que no conidia normalmente.

5.1.2 Efecto del TSA en la expresión de genes de respuesta a luz azul de la IMI 206040

Se tiene reportado que en *Trichoderma atroviride* 2,8% de sus genes responden a la luz azul, de los cuales, el 2% se activan, a estos genes se les denominó genes **blu** (**blue-light-upregulated**), mientras que el 0,8% restante se ve reprimido bajo esa condición y fueron llamados genes **bld** (**blue-light-downregulated**) (Rosales-Saavedra *et al.*, 2006).

Se conoce que la acetilación que sufren las histonas del nucleosoma está relacionada con activación transcripcional (Wolffe y Hayes, 1999). Mientras que la desacetilación de las mismas se asocia a la represión de genes. La mayoría de los organismos vivos son capaces de detectar a la luz, desencadenando la alteración en la expresión de diversos genes que responden a este estímulo (Ma *et al.*, 2001; Linden *et al.*, 1997, 2002). Actualmente se tiene reportado en varios modelos de estudio una participación conjunta de la luz y la acetilación como sinergismo para la adecuada respuesta y expresión de los genes responsivos a la luz (Benhamed *et al.*, 2006; Grimaldi *et al.*, 2006)

La expresión de los genes *bld-2* (gen reprimido por un pulso de luz azul) y *phr-1* (gen inducido por un pulso de luz azul) en el hongo *Trichoderma atroviride* se ven alterados por la acción de la luz azul, sin embargo, ¿la transcripción de estos genes es dependiente de la acetilación como se ha demostrado para genes de respuesta a la luz azul como en *Neurospora crassa* y *Arabidopsis thaliana*? Si esto es cierto, ¿la expresión de los genes es el resultado de una influencia de la luz sobre la acetilación y ésta a su vez activa o reprime la transcripción?

En este trabajo nos planteamos el tratar de responder estas preguntas. Entonces aplicamos a *Trichoderma atroviride* un inhibidor de desacetilasas de histonas como lo es la Tricostatina A (TSA), con lo cual se simulará un estado hiperacetilado en el hongo, posteriormente realizamos el ensayo de fotoinducción aplicando 1200 μ M de luz azul a colonias del hongo, para posteriormente colectar el micelio a diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60 y 120 min después de la exposición a la luz). El ARN se extrajo de estas muestras y

se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR y Northern blot con el fin de determinar el efecto del TSA en la expresión de los mensajeros de los genes *bld-2* y *phr-1*. Nuestros resultados nos indican que hubo un efecto del TSA sobre los genes, ya que la expresión de éstos se vio alterada en comparación de los controles (sin TSA). El gen *phr-1* codifica para una fotoliasa encargada de reparar el daño que pudiera sufrir el ADN por acción de la luz, este gen se comporta de un modo muy peculiar, ya que en oscuridad no se observa el mensajero, es decir no hay expresión del gen, sin embargo, cuando el hongo percibe luz en el rango UV-B luz azul, presenta una acumulación en el transcrito 15 min después de que se le es dado el estímulo luminoso, teniendo su máxima expresión a los 30min, y éste va decayendo a los 120 min (Berrocal-Tito *et al.*, 1999, 2000). El resultado que se obtuvo en este trabajo es que al aplicar un inhibidor de desacetilasas de histonas (TSA) el gen *phr-1* ya no se comporta de la manera anteriormente descrita, sino que su expresión se ve exacerbada en presencia del inhibidor, y aun y cuando en la muestra control (sin inhibidor) el nivel del mensajero empieza a decaer a los 60 min, en la muestra tratada se observó que a ese tiempo la expresión del gen era equiparable a la máxima expresión observada en la muestra control (Figura 7). El gen *bld-2* cuyo producto proteico predicho es una deshidrogenasa con diferentes especificidades también sufrió una alteración en su expresión. Este gen aportó un dato particularmente interesante cuando fue analizado, ya que su expresión se ve reprimida cuando le es dado un pulso de luz azul (Rosales- Saavedra *et al.*, 2004); actualmente no existe un caso reportado de represión por luz en los hongos. Cuando se analizó su comportamiento en presencia del inhibidor, resultó que a diferencia de la muestra no tratada su expresión no disminuía por acción de la luz (Figuras 7 y 8).



Figura 7. Ensayo de RT-PCR sobre el efecto de la aplicación de TSA en la inducción y represión de genes por la luz azul en *Trichoderma atroviride*. El fármaco ocasiona una elevada expresión de los dos genes que no se observa en las cepas no tratadas.

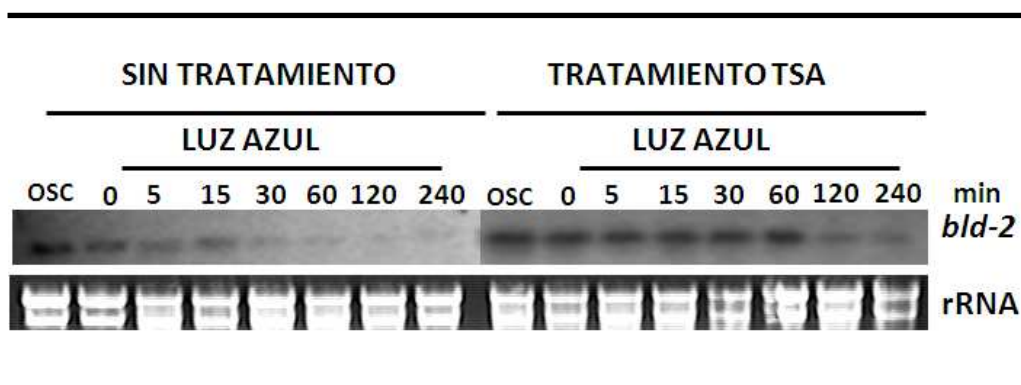


Figura 8. Análisis tipo Northern del gen *bld-2* después del tratamiento con TSA. En la figura se puede observar que la expresión del gen *bld-2* no disminuye después de un pulso de luz azul, con un tratamiento con TSA, por el contrario, cuando la colonia no fue expuesta al inhibidor la expresión del gen va disminuyendo conforme transcurre el tiempo después del pulso de luz.

Estos resultados nos llevan a proponer lo siguiente: se ha reportado en la literatura que la acetilación en las colas amino terminales de las histonas en residuos específicos de lisina, es un mecanismo importante que permite la accesibilidad de factores de transcripción al ADN resultando en un evento importante de regulación transcripcional (Cheung *et al.*, 2000). Nosotros

creemos que estamos generando un estado hiperacetilado en *Trichoderma* como consecuencia de la inhibición de parte de las desacetilasas de histonas presentes en el organismo, utilizando al inhibidor TSA. Al generar una mayor acetilación de las histonas los niveles de expresión de los genes *bld-2* y *phr-1* se ven afectados de una manera positiva, ya que éstos permanecen encendidos durante un tiempo considerable en presencia de TSA en comparación con la cepa en condiciones control, nuestros resultados concuerdan entonces con los resultados reportados en la literatura, donde se ha visto por regla general que la acetilación de histonas es sinónimo de activación transcripcional, mientras que la desacetilación se refleja en una represión de la transcripción. Cabe mencionar un punto interesante, y es que el gen *bld-2* como ya se explicó presenta transcripción en oscuridad y ésta no se lleva a cabo en presencia de luz, sin embargo con la aplicación de TSA la expresión del gen parece ser constitutiva. Grimaldi y colaboradores en el 2006, demostraron que una mutante del gen homólogo a GCN5 (NGF-1) en el hongo *Neurospora crassa* daba como resultado una expresión constitutiva, incluso en la oscuridad de un gen inducible por luz (*al-3*), y es que en oscuridad en la cepa silvestre no se observa transcrito del gen *al-3*, esto los llevó a la conclusión de que la acetil transferasa de histonas *ngf-1* podría participar en el mecanismo de represión en la oscuridad del gen *al-3* de *Neurospora crassa*. Nuestros datos nos sugieren por tanto que probablemente la acetil transferasa de histonas que participa en la acetilación del gen *bld-2* en *Trichoderma atroviride* (y que ésta podría ser aquella homóloga a GCN5 de *Saccharomyces cerevisiae*) quizás esté involucrada en el mecanismo de represión del gen *bld-2* en presencia de luz.

5.2 Identificación y aislamiento del gen *tago-2* de *T. atroviride*

En *Saccharomyces cerevisiae* la histona H3 es preferencialmente acetilada por el coactivador Gcn5p (Georgakopoulos y Thireos, 1992). Gcn5p y sus homólogos interactúan con la cromatina dentro de complejos multiprotéicos, como ADA y SAGA (Grant *et al.*, 1997), SAGA es un complejo

de multiproteínas donde Gcn5p posee actividad de acetil transferasa de histonas, acetila varios residuos de lisina en las histonas H3 y H4, incluyendo K9 y K14 de la histona H3, y K8 y K16 de la histona H4 (Kuo *et al.*, 1996). Se ha estimado que el complejo SAGA en *Saccharomyces* regula la expresión de aproximadamente el 10% de los genes y alrededor de un tercio de ellos presentan una regulación negativa (Lee *et al.*, 2000). Dentro de su estructura Gcn5 presenta un dominio denominado bromodominio, éste se encuentra presente y conservado en varias proteínas relacionadas a modificaciones de la cromatina, incluyendo a las HAT's nucleares (Dhalluin *et al.*, 1999; Jacobson *et al.*, 2000) y es partícipe de la remodelación del nucleosoma y la activación transcripcional (Syntichaki *et al.*, 2000).

En el año 2006, Grimaldi *et al.*, reportaron que mutantes en el gen ortólogo a GCN5 de *Saccharomyces cerevisiae* en *Neurospora crassa*, se vieron afectadas en la respuesta a la luz azul. Adicionalmente, describieron que las histonas localizadas en el promotor se acetilaban de manera preferencial en la lisina 14 de la histona H3. Mutantes en la histona H3 que generaron el cambio de la lisina 14 por glutamina, asemejaron el fenotipo de una mutante en el fotorreceptor WC-1.

Adicionalmente, mutantes de *A. Thaliana* en GCN5, vieron afectadas su respuestas a la luz azul como el alargamiento del hipocotilo y la inducción de genes por luz azul (Benhamed *et al.*, 2006).

Basándonos en estos antecedentes, nos dimos a la tarea de investigar si la HAT de *Trichoderma atroviride* homóloga a Gcn5 de *Saccharomyces* era la responsable del posible efecto de hiperacetilación llevado a cabo en los genes *bld-2* y *phr-1*. Para lograr esto, primero identificamos esa proteína en el genoma de *Trichoderma*, llevamos a cabo un alineamiento entre varias HAT's pertenecientes a hongos filamentosos, plantas y humano, posteriormente identificamos las regiones más altamente conservadas entre ellas y de una de éstas obtuvimos una especie de "sonda electrónica" buscando esta región conservada en el genoma de *T. atroviride*, del cual dispone nuestro grupo de trabajo. La sonda hizo blanco con una región y se tomaron aproximadamente 5

Kbps hacia el 5' y otro tanto hacia el 3' y con ello tratar de abarcar al gen completo. Una vez obtenida la secuencia se determinó *in silico* el marco de lectura abierto (ORF) utilizando el programa GENSCAN (Burge y Karlin, 1997), lo que nos arrojó un marco de lectura abierto de 1336 pb, el contenía dos intrones. Como el programa GENSCAN también nos genera la secuencia de aminoácidos, esta se sometió a un alineamiento utilizando el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) y se buscaron dominios conservados con ayuda del programa SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Figura 9) obteniendo una alta similitud entre proteínas con actividad de acetil transferasa de histonas.

Dentro de la secuencia obtenida para la proteína predicha las regiones que desplegaron una gran cantidad de identidades y similitudes corresponden a los dominios: Catalítico de acetilación y al bromodominio que se une a las lisinas acetiladas, este dominio se encuentra altamente conservado en las HAT's como describe la literatura (Dhalluin *et al.*, 1999; Jacobson *et al.*, 2000) lo cual indicaba que muy probablemente se trataba del ortólogo a GCN5 de *S. cerevisiae*, por lo que se decidió trabajar con esta secuencia y con ella diseñar la construcción y poder así generar la mutante en GCN5 y de este modo tratar de determinar posible papel en la regulación epigenética que ésta juega en *T. atroviride*.

<i>S. cerevisiae</i>	FQKQLPKMPKEYIARLVYDRSHLSMAVIRKPLTVWGGITYRPFDKREFAEIVFCAISSTE	183
<i>C. albicans</i>	FQKQLPKMPREYISRLVYDRSHLSMAVVRKPLTVWGGITYRPFNNRQFAEIVFCAISSTE	198
<i>N. crassa</i>	FQKQLPKMPKDYIARLVYDRTHLSIAIVKKPLEWVGGITYRPFKGRQFAEIVFCAISSDQ	168
<i>T. atroviride</i>	FQKQLPKMPKDYIARLVYDRTHLSIAIVKKPLEWVGGITYRPFKGRQFAEIVFCAISSDQ	146
<i>A. terreus</i>	FQKQLPKMPKDYIARLVYDRSHLSIAIVKHPLWVGGITYRPFNSRKF AEIVFCAISSDQ	170
<i>A. thaliana</i>	FARQLPNMPKEYIVRLMDRKHKSVMVLRG-NLWVGGITYRPHYSQKFGEIAFCAITADE	299
	*:****::** ** : ** . * * : : : ***** : . : * . * . * : : :	
<i>S. cerevisiae</i>	QVRGYGAHLMNHLKDYVRNTSNIKYFLTYADNYAI GYFKKQGFITKEITLTKSIWMGYIKD	243
<i>C. albicans</i>	QVRGYGAHLMNHLKDYVRATSPIKYPLTYADNYAI GYFKKQGFITKEISLDKSVWMGYIKD	258
<i>N. crassa</i>	QVKGYGAHLMHLKDYVKATSDVMHFLTYADNYAI GYFKKQGFITKEITLTKSVWMGYIKD	228
<i>T. atroviride</i>	QVKGYGAHLMHLKDYVKATSDVMHFLTYADNYAI GYFKKQGFITKEITLTKSVWMGYIKD	206
<i>A. terreus</i>	QVKGYGAHLMHLKDYVKATSPIMHFLTYADNYAI GYFKKQGFITKEITLTKSIWMGYIKD	230
<i>A. thaliana</i>	QVKGYGTRLMNHLKCHARDVDGLTHFLTYADNNAVGYFVKQGFITKEITLTKSVWMGYIKD	359
	** : *	
<i>S. cerevisiae</i>	YEGGTLMQCSMLP-RI RYLDAGKILLLQEAALRRKIRTISKSHIVRPGLEQFKDLNINKP	302
<i>C. albicans</i>	YEGGTLMQCSMLPSILRYLDSGKILLLQKAAIERKIRSRKSKIVRPGLVQFKTNKWT-	317
<i>N. crassa</i>	YEGGTLMQCSMLP-RVRYLEMGRMLLKQKECVQAKIRAYSKSHIVHQPQKWK--NGVTP	285
<i>T. atroviride</i>	YEGGTLMQCSMLP-RI RYLEMGRMLLKQKECVQAKIRAYSKSHNIHPPPKWK--NGIRE	263
<i>A. terreus</i>	YEGGTLMQCSMLP-KI RYLEVGRMLLKQREAVHAKIRAFSRSHIHPPPKWK--NGPCK	287
<i>A. thaliana</i>	YDGGLLMECKIDP-KL PYTDLSSMIRQQRKAI DERIRELSNCQNVYKIEFVKNEAGIPR	418
	** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>S. cerevisiae</i>	--IDPMTIPGLKEAGWTPMDALAQ-----P-KRGPDAAIQNILTELQNHAAAW	350
<i>C. albicans</i>	--LDPKDIPGLAAGWSEEMDKLAOK-----P-KRGPYHNFVILFSEIQNHPSAW	365
<i>N. crassa</i>	--IDPLSVEAIRASGWSPDMDELARQ-----P-RHGPNYNQLIHLNLDQNHASAW	333
<i>T. atroviride</i>	--INPLDIPAIRASGWSPDMDELARQ-----P-RHGPNYNQLIHLNLDQNHNSAW	311
<i>A. terreus</i>	--IDPLSIPAIRKESGWSPDMDELARQ-----P-RHGPNYNQLIHLNLDQNHSAW	335
<i>A. thaliana</i>	KI IKVEEIRGLREAGWTPDQWGHTRFKLFNGSADMVFNQKQLNALMRALLKTMQHDADAW	478
	: : : : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : * : * : *	
<i>S. cerevisiae</i>	PFLQPVNKEVDPDYDFIKEPMDLSTIMEIKLESNK-YQKMEDFIYDARLVFNCRMYNGE	409
<i>C. albicans</i>	PFVAVANKEVDPDYRVEHPIDLATIEQKLENNL-YLKFTDFVDDIKLMPNCRAYNSE	424
<i>N. crassa</i>	PFLVVPVKDVEHDYDFVIKEPMDLSTIMEKLEKDYNTPEDFIKDAKLIFINCRKYNNE	392
<i>T. atroviride</i>	PFLVVPVNRDVAADYDFVIKEPMDLSTIMEKLEADQ-YATPEDFIKDARLIFINCRKYNNE	370
<i>A. terreus</i>	PFTQPVNRDVEPDYDFVIKEPMDLSTIMEEKHEKIM-YPTPQDFIKDAMLIFINCRKYNNE	394
<i>A. thaliana</i>	PFKEPVDSDVDPDYDFI IKDPIDLVIAKRVESQYYVTLDMFVADARRMNNCRTYNSE	538
	** . * : : * * * . * : * : * : . : : * : * . * : * : * * * * *	
<i>S. cerevisiae</i>	NTSYKYANRLEKFFNNKVKIEIPEYSHLID-- 439	
<i>C. albicans</i>	TTIYYKNANKLEKFMNKLKDCSEV----- 449	
<i>N. crassa</i>	NTPYAKCANKLEKYMWQIKAIPEWSHLEP-- 422	
<i>T. atroviride</i>	STPYAKSANKLERFMWQIKAVPEWSHLEPDK 402	
<i>A. terreus</i>	NTPYAKSANKLEKFMWQIRNIPWSHSLADGH 426	
<i>A. thaliana</i>	DTIYYKCATRLETHFH SKVQAGLQSGAKSQ-- 568	
	* * * * . * * : : : :	



 DOMINIO CATALÍTICO ACETILACIÓN
 BROMODOMINIO

Figura 9. Alineamiento de secuencias de proteínas de GCN-5 de *T. Atroviride* con los ortólogos a esta proteína de diferentes organismos. La proteína predicha para el gen *gcn-5* de *T. Atroviride*, la cual fue denominada TAGO-2 fue sometida a un alineamiento de secuencias de aa utilizando el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1997), contra las proteínas GCN5 de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *N. crassa*, *A. terreus* y *A. thaliana*. La región sombreada en gris claro corresponde al dominio catalítico de acetilación y la región que está en gris fuerte corresponde al bromodominio, ambos dominios despliegan una gran identidad entre todas las proteínas. Se muestra únicamente el alineamiento del aa 123 al 402 de *T. atroviride*.

5.3 Generación de cepas mutantes y transformantes

5.3.1 Interrupción del gen *Tago-2*

Mucho se ha trabajado en diversos organismos con la finalidad de discernir el papel que juegan los homólogos respectivos de Gcn5. Estos esfuerzos han llevado a realizar mutantes de la HAT ortóloga a Gcn5 y los fenotipos resultantes han sido tan variados como interesantes. No obstante, existe información muy peculiar en dos organismos diferentes como lo son *Arabidopsis thaliana* y el hongo filamentoso *Neurospora crassa*, en ellos se estudió no sólo el efecto fenotípico que poseía una mutante en Gcn5 sino además se analizó la participación conjunta de la luz como señal y la acetilación llevada a cabo por Gcn5, como dos procesos interrelacionados para lograr la adecuada expresión de genes de respuesta a luz. En *Arabidopsis thaliana* se encontró que *GCN5* era requerido para la regulación por luz del crecimiento y la expresión de genes, la mutación de *GCN5* resultó en un fenotipo de hipocotilo alargado y una expresión reducida de genes inducibles por luz. La mutante *gcn5* redujo la acetilación de las histonas H3 y H4 mayoritariamente en las regiones del promotor, la acetilación de la lisina 14 de la histona H3 (H3K14) fue dependiente sólo de *GCN5*. También se demostró que *GCN5* se encontraba directamente relacionado a los promotores de respuesta a luz (Benhamed *et al.*, 2006).

En *Neurospora crassa* una mutante en Gcn5 mostró un fenotipo de crecimiento muy pobre y produjo pocas conidias, se encontró que el residuo K14 de la histona H3 se asoció con la acetilación transitoria del promotor del gen inducible por luz *albino-3* (*al-3*) después de la fotoinducción, dicha acetilación fue dependiente de la proteína WC-1. La cepa mutante en la lisina 14 se comportó de manera similar a la mutante *wc-1* y mostró una fuerte reducción de la activación transcripcional inducida por luz del gen *al-3* y de *vivid*, otro gen que responde a la luz azul.

Teniendo como referencia estos antecedentes nos decidimos a interrumpir el gen que en *Trichoderma atroviride* codifica para la HAT homóloga

a Gcn5 de *Saccharomyces*. Con el fin de analizar si esta acetil transferasa de histonas se encuentra involucrada en los mecanismos de expresión de los genes responsivos a luz *bld-2* y *phr-1*. Una vez que mediante análisis *in silico* se predijo cuál era la región codificante de este gen, procedimos a realizar la interrupción del mismo. Para lograr este objetivo se como se describe en ,ateriales y metodos. La figura 10 muestra la posición de los oligonucleotidos utilizados en el analisis y generacion de la mutante en el gen *Tago-2*.

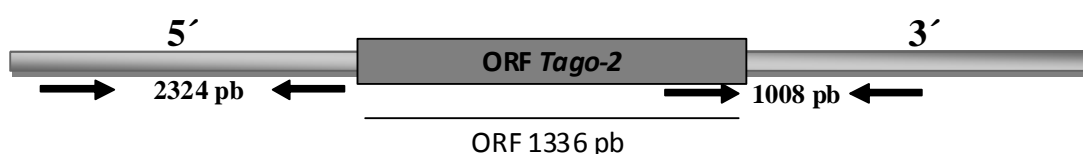


Figura 10. Representación esquemática del ORF del gen *Tago-2*, las barras gris claro representan la región genómica 5'y 3' aledañas al ORF que está representado en una caja gris fuerte. Las flechas negras indican la posición de los oligos y el tamaño que éstos amplifican para realizar la doble recombinación homóloga.

5.3.1.1 Obtención de la construcción para generar la mutante *tago-2*

Una vez amplificadas las regiones arriba mencionadas se procedió a clonaras en el vector pBHY70, el cual lleva un casete de resistencia a higromicina (hph), dirigido por el promotor *TrpC* de *A. nidulans*, para la selección en *T. atroviride*, ambos fragmentos se clonaron cada uno al lado del casete de higromicina, con esto obtuvimos la construcción pBHY70-5'3'-GCN5 (Figura 11) para transformar a *T. atroviride* y con esto generar la mutante por doble recombinación homóloga reemplazando el ORF de *tago-2* por el casete de higromicina.

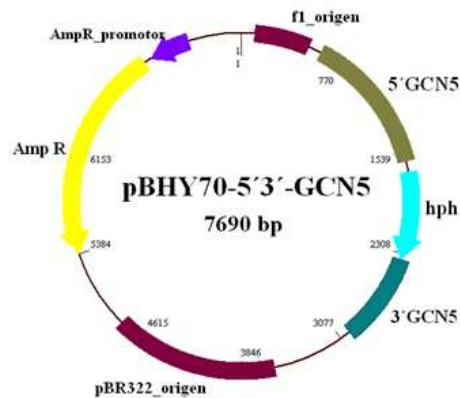


Figura 11. Muestra el plásmido pBHY70-ΔGCN5 con un casete de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias y un casete de resistencia a higromicina para su selección en hongos, este último flanqueado por las regiones de *T. atroviride* aledañas al ORF de *Tago-2* utilizado para transformar *T. atroviride* y llevar a cabo el reemplazamiento del gen.

5.3.1.2 Obtención de la mutante *tago-2*

La construcción obtenida, se utilizó para transformar a *T. atroviride* por el método de protoplastos, descrito anteriormente en la metodología del presente trabajo, y de acuerdo a la teoría de la doble recombinación homóloga, en donde al transformar en un organismo pares de secuencias que presenten una homología suficientemente extensa (para el caso de *Trichoderma atroviride*) la célula lleva a cabo un proceso de recombinación en donde se pierde la copia del gen endógeno, mientras se sustituye por el gen de interés. En nuestro caso el ORF de *tago-2* se eliminará por doble recombinación homóloga de los extremos 5'y 3' de la construcción conteniendo el gen de la higromicina fosfotransferasa (Figura 12). Por esta razón la selección de transformantes conteniendo la versión del gen interrumpido se hará evaluando la capacidad de las colonias de presentar resistencia al antibiótico higromicina.

De este modo obtuvimos una gran cantidad de colonias resistentes al antibiótico. Se colectaron las esporas de las transformantes y posteriormente se sembraron en cajas de Petri con medio selectivo (PDA + higromicina 100µg/ml) para obtener cultivos monospóricos. Esto se realizó tres veces para

asegurar la presencia de núcleos transformantes únicamente. De este escrutinio se obtuvieron 4 posibles mutantes que presentaron un fenotipo alterado en el crecimiento, las candidatas crecían muy lento en comparación con la cepa silvestre. Basándonos en lo reportado en la literatura para *Neurospora crassa*, un hongo filamentoso, donde la pérdida del gen homólogo a Gcn5 resultaba en un fenotipo de crecimiento lento (Grimaldi *et al.*, 2006), nos dimos a la tarea de analizar molecularmente a estas cepas transformantes para determinar si presentaban el reemplazamiento génico. Con ADN genómico de las transformantes se realizaron reacciones de amplificación por PCR, con dos oligonucleótidos que hibridan en la secuencia del gen *tago-2* ubicados fuera de la secuencia construcción y otro oligo que hibridaba dentro de la secuencia del gen *hph* presente en la construcción, de igual forma, se utilizaron oligonucleotidos diseñados para amplificar el ORF de *tago-2* y determinar su ausencia (Figura 13).

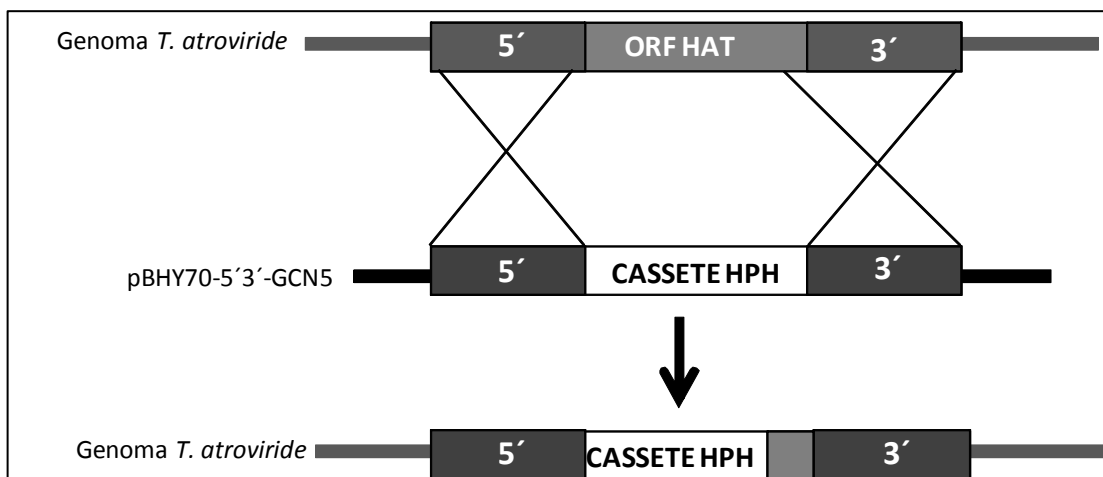


Figura 12. Muestra en posible evento de doble recombinación homóloga llevado a cabo en *T. atroviride*. Un plásmido llamado pBHY70-5'3'-GCN5 fue construido para reemplazar la secuencia que codifican los aminoácidos 1-314 de la proteína que presenta un total de 402 aminoácidos por el gen Higromicina fosfotransferasa (*hph*) utilizado como marcador de selección.

Nuestros resultados muestran que en las cepas transformadas con la construcción no hubo amplificación del gen *tago-2* a diferencia de la cepa silvestre (Figura 14A), para la cual se amplificó una banda de 1336 pb, correspondiente al gen silvestre, lo cual sugirió que se trataba de las mutantes por delección de *tago-2*. Con la finalidad de reafirmar los resultados observados para las candidatas, se procedió a realizar una PCR con un oligonucleótido ubicado en el casete de higromicina y dos en el 5' del genoma, pero que no incluye las secuencias de la construcción. En el caso de todas las cepas con la combinación de oligos 6 y 7 (Figura 14B), se observa una banda de aproximadamente 2555 pb, correspondiente a la región 5' utilizada para la recombinación (2324 pb) más la región que amplifica el oligo fuera de las coordenadas de la construcción (141 pb) y la región que se amplifica del gen de higromicina (90 pb). Mientras que para la combinación de oligos 5 y 7 (Figura 14C), se observó una banda en las cepas 2, 3 y 4 de 2640 pb, correspondiente a la región 5' utilizada para la recombinación (2324 pb) más la región que amplifica el oligo fuera de las coordenadas de la construcción (226 pb) y la región que se amplifica del gen de higromicina (90 pb). La figura 14D nos muestra que en las 4 cepas mutantes está presente el casete de *hph* ya que éste amplifica en aquéllas y no en la cepa silvestre. Con estos resultados confirmamos que tenemos nuestra mutante por delección en el gen ortólogo a *Gcn5*.

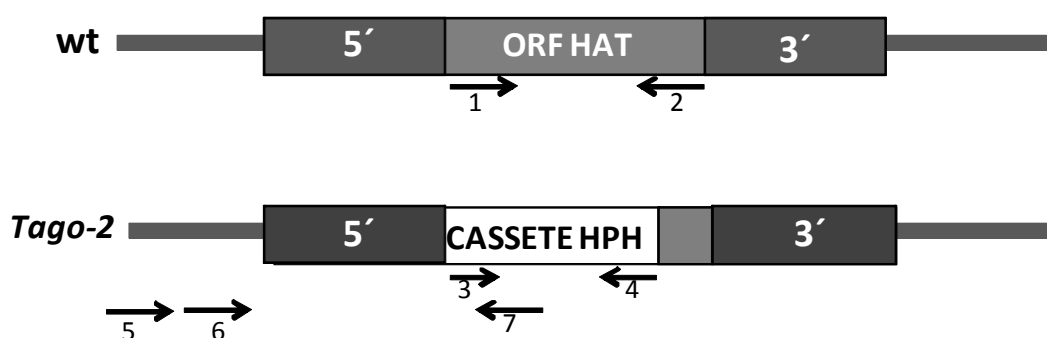


Figura 13. Ubicación de los oligos utilizados para identificar la mutante en HAT así como los oligos utilizados para amplificar el ORF de HAT en la cepa silvestre.

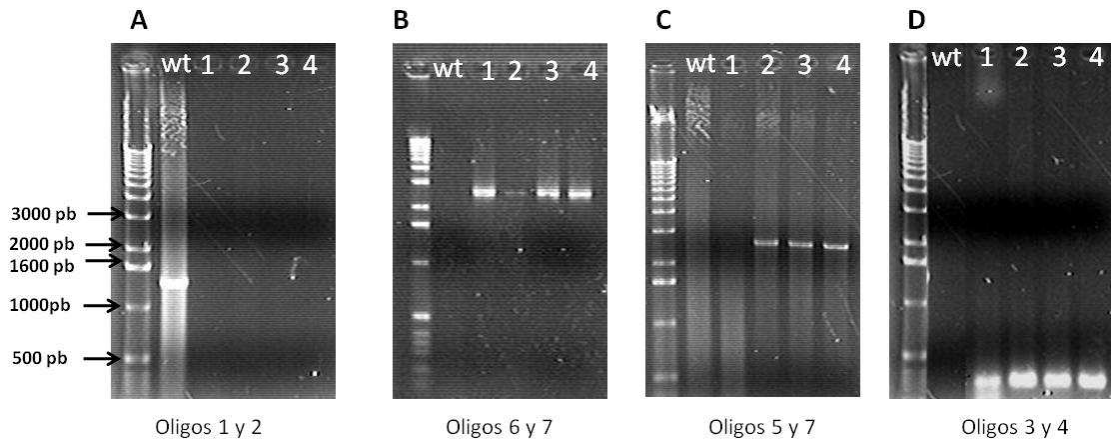


Figura 14. Análisis por PCR de las candidatas a mutantes *tago-2*. El ADN de varias transformantes y la cepa silvestre fueron utilizados para llevar a cabo reacciones de PCR con los oligonucleótidos señalados. Wt = cepa silvestre, 1, 2, 3 y 4 = cepas mutantes. A) Se utilizaron oligos que amplifican el ORF de GCN5. B) y C) Oligos que identifican la mutante por inserción del casete de higromicina. D) Oligos que amplifican una región del casete de higromicina.

Con estos resultados optamos por trabajar con la cepa 4 ya que los resultados indican claramente que se llevó a cabo la interrupción del gen al observar que: 1) En esta cepa hubo amplificación del casete de higromicina. 2) No hubo amplificación del gen GCN5 silvestre. Y 3) Se obtuvo amplificación con las combinaciones de oligos utilizados para comprobar la adecuada inserción del gen de higromicina por el gen GCN5. A esta mutante la llamamos *tago-2* (Por Trichoderma atroviride gcn5 ortólogo).

Nosotros no pudimos deletar el marco de lectura abierto del gen de interés en su totalidad, ya que la secuencia obtenida del hongo en la región 3' aledaña al ORF presenta muchas ambigüedades, por lo cual nos fue imposible diseñar oligos que amplificaran por lo menos 1000 pb ya que es lo recomendable en nuestro modelo de estudio debido a que ése es el mínimo de pb que se requieren para obtener una buena eficiencia de recombinación. Como consecuencia de esto, diseñamos uno de los oligos para amplificar la parte 3' dentro de la región del ORF como lo muestra la figura 10, aun así deletamos la mayor parte de la proteína; ésta se compone de 402 aminoácidos y eliminamos un total de 314 de los mismos. Hay que resaltar que dentro de la

región eliminada se encontraba el dominio catalítico de acetilación, (predicho por el programa SMART), y de esta manera nos aseguramos de que dicha modificación no se lleve a cabo en las lisinas blanco.

5.3.1.3 Análisis fenotípico de crecimiento y morfología de la mutante *Tago-2*

Como habíamos mencionado anteriormente la mutante en *gcn5* del hongo *Neurospora crassa* mostró un crecimiento muy lento y con poca producción de conidias, además el color que presentaba, rosa pálido era un tanto diferente al de la silvestre (Grimaldi *et al.*, 2006). Nosotros analizamos el fenotipo que presentaba nuestra mutante, hay que recordar que *T. atroviride* silvestre se comporta de un modo muy característico, ya que en oscuridad la colonia no conidia y sí lo hace después de dado un pulso de luz azul (Horwitz *et al.*, 1985), además la velocidad de crecimiento es mayor cuando esta en la oscuridad, a diferencia de cuando se crece en luz. Las conidias presentan un único núcleo haploide, su morfología es esférica de color verde, se forman sobre estructuras denominadas conidióforos que a su vez se sitúan sobre células denominadas fiálides (Rosen *et al.*, 1974). La mutante *tago-2* obtenida en este trabajo, concuerda con lo reportado para *Neurospora* ya que la colonia a nivel morfológico muestra un crecimiento muy lento en comparación con la silvestre, la conidiación es escasa y dichas conidias no muestran el característico color verde de la cepa silvestre, además se observa como la colonia muestra un patrón de crecimiento anormal, ya que en comparación con la silvestre que crece de forma radial, la mutante crece sin seguir el típico curso de la silvestre, por el contrario lo hace de un modo aberrante. El color de la colonia también es distinto, se observa micelio amarillo y la secreción de un pigmento café-amarillento al medio (Figura 15). Todos los defectos mencionados están involucrados en la respuesta a luz de *Trichoderma*, por lo que suponemos que este gen que hemos interrumpido está probablemente implicado en la regulación y respuesta a luz de algunos genes, aún no sabemos si es la misma cantidad que en *Saccharomyces* (10% de los genes totales) (Lee *et al.*,

2000), eso habría que analizarlo eventualmente bajo el fondo genético de la mutante. Lo que sí podemos inferir es que el gen *tago-2* está involucrado directa o indirectamente en la regulación de genes que controlan la conidiación en *Trichoderma*, debido a la poca producción de estas estructuras en la mutante, adicionalmente los genes que participan en la pigmentación de las mismas, dotándolas de su típico color verde, se encuentran alterados, pues la mutante no presenta dicho color en sus conidias. Lo que también está claro es que están afectados los genes de desarrollo debido al pobre crecimiento que exhibió la cepa.

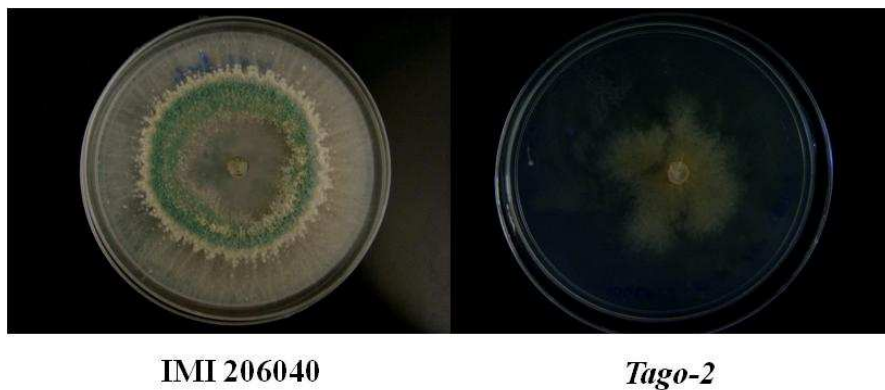


Figura 15. Fenotipos de la cepa silvestre (IMI 206040) de *Trichoderma atroviride* y la mutante en el gen ortólogo a GCN5, *tago-2*. Como se puede observar esta última muestra un fenotipo de morfología y crecimiento muy distinto a la silvestre.

5.3.2 Obtención de cepas transformantes que sobreexpresen el gen *tago-2*

Con la finalidad de analizar si una cepa que sobreexpresara el gen *tago-2* tendría efectos opuestos a los observados en la mutante del mismo gen y si además esta cepa sería capaz de llevar a cabo en mayor medida la acetilación de las lisinas de las histonas, generando el estado hiperacetilado que discutimos anteriormente con el efecto del TSA en la cepa silvestre, y de este modo de acuerdo a la relación mayor acetilación mayor actividad transcripcional, quizá podamos observar en los genes de respuesta a luz aquí mencionados el efecto que se obtuvo con el tratamiento del inhibidor de

desacetilasas de histonas TSA. Para analizar esto nos decidimos a generar cepas transformantes que sobreexpresaran el gen *tago-2*.

5.3.2.1 Obtención de la construcción para generar la sobreexpresante *tago-2*

Para la obtención de la construcción con la cual generamos las transformantes extrajimos ARN total de una cepa silvestre de *Trichoderma atroviride*, posteriormente realizamos una retrotranscripción con la enzima SuperScript RT (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante con el fin de obtener cDNA. Una vez obtenido éste procedimos a realizar la amplificación del marco de lectura abierto del gen *tago-2*, mediante los oligos OeF (5'TCTAGAATGGCCGACATCAAAGAAG3') y OeR (5'ATGCATCTATTTGTCCGGCTCGAG3') y éste se clonó en fase en los sitios *Xba I* y *Nsi I* presentes en el plásmido pHYG-GFP y en los oligos generados (bases subrayadas), quedando bajo el promotor constitutivo de piruvato cinasa de *Trichoderma reesei* (*pki*) y el terminador *cbh2* (celobiohidrolasa) (Mach *et al.*, 1994). La construcción obtenida pZEGAOEGCN5 (Figura 16) se secuenció por el método enzimático de Sanger *et al.*, 1987, y se linearizó para transformar protoplastos de *T. atroviride*.

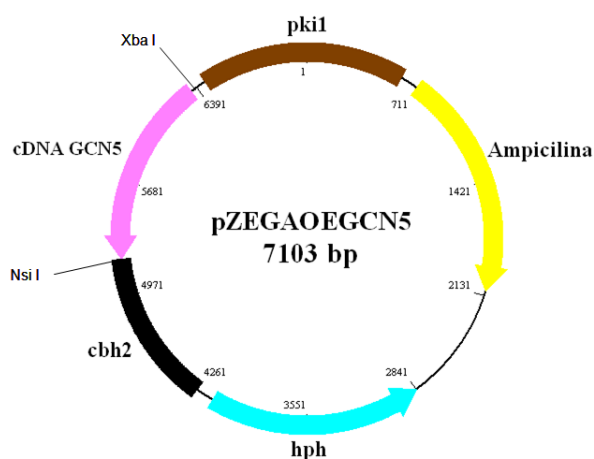


Figura 16. Representación esquemática del plásmido pZEGAOEGCN5 con un casete de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias y un casete de resistencia a higromicina para su selección en hongos, el ORF del gen de *tago-2* se encuentra clonado en fase bajo la dirección del promotor constitutivo *pki*, y tiene un terminador de *cbh2*.

La finalidad de clonar y transformar cDNA del ORF del gen *tago-2* y no el gen completo y a partir de genómico, es tratar de que efectivamente este gen se esté sobreexpresando, por eso no incluimos su propio promotor, ya que este gen puede encontrarse regulado de diferentes maneras y no expresarse siempre, razón por la cual lo clonamos bajo un promotor constitutivo, tampoco clonamos el gen a partir de genómico, ya que la presencia de intrones también juega un papel importante en la regulación de la expresión de los genes eucariotas y esto puede ser un obstáculo en la eficiencia de expresión. Y en miras de obtener realmente una elevada expresión del gen es que seguimos estos puntos.

5.3.2.2 Obtención y análisis fenotípico de crecimiento y morfología de las transformantes *Tago-2*

La obtención de las cepas transformantes se realizó digiriendo la construcción con el fin de linearizar el plásmido y facilitar su integración en el genoma. Para esto se utilizó la enzima *Eco RI* (New England **Biolabs**), siguiendo las especificaciones del fabricante, La transformación de protoplastos se llevó a cabo como se describió en el apartado de metodología y la selección de las cepas transformantes se realizó de la misma manera que se hizo para la obtención de la mutante *tago-2*, descrito en el apartado: 5.3.1.2 Obtención de la mutante *Tago-2*.

Se obtuvieron una gran cantidad de cepas transformantes con resistencia a higromicina, lo cual nos indicaba que la construcción se insertó en el genoma de *Trichoderma atroviride*, ahora bien el fenotipo que mostraron las cepas resultó muy variado, ya que todas presentaban diferencias en cuanto a: Velocidad de crecimiento, capacidad y modo de conidiación y morfología de la colonia (Figura 17).

Estas diferencias se presentaron debido a que pueden pasar muchas cosas tales como:

1. La inserción de la construcción no fue dirigida, por lo tanto ésta se integró de manera ectópica y al azar en el genoma de *Trichoderma*, el sitio donde haya recombinado influye de manera importante en el fenotipo, ya que se pudieron afectar distintas regiones en el genoma incluyendo partes fundamentales de regulación como promotores o regiones codificantes, etc.
2. El nivel de expresión del gen clonado, ya que no sabemos el número de veces que se insertó, entonces puede haber un matiz diverso de expresión que va incluso desde la nula expresión debido al probable silenciamiento que se puede dar en un gen al haber un alto número de copias, pasando



por una expresión mediana, hasta una muy grande.

Figura 17. Fotografías de las diferentes cepas transformantes obtenidas y que son candidatas como sobreexpresantes del gen *tago-2*, nótese el fenotipo tan variado que presentan en comparación con la silvestre. Las cepas fueron crecidas bajo periodos de luz-oscuridad a 28°C. WT = cepa silvestre, OE1-9 = cepas transformantes.

5.3.3 Obtención de cepas transformantes con mutación en la lisina 14 de la histona H3, (H3^{K14Q})

La modificación que sufren las colas amino terminales de las histonas por acetilación de residuos específicos de lisinas, es un proceso trascendental para la regulación de la transcripción. En varios sistemas los principales blancos de acetilación que conllevan a una activación transcripcional son los residuos 9 y 14 de las lisinas de la histona 3 (H3), siendo el mayoritariamente susceptible de acetilación y por tanto correlacionando con una activación de la transcripción la lisina 14 de H3 (Carrozza *et al.*, 2003). Por este motivo se tomó en cuenta la posibilidad de que en nuestro modelo de estudio fuera la lisina 14 de la histona H3 el blanco principal de acetilación en los promotores de los genes *phr-1* y *bld-2*. Para analizar esto construimos una cepa que llevara copias del gen que

codifica para la histona H3 en donde el residuo de la lisina 14 estuviera reemplazado por glutamina. Se escogió este aminoácido, ya que no es blanco de acetilación, y además es de características fisicoquímicas similares a las de la lisina con lo cual pretendemos no afectar el correcto plegamiento y estructura de la proteína mutante final.

5.3.3.1 Obtención de la construcción para generar la mutante H3^{K14Q}

Para realizar la sustitución de la lisina 14 de la histona H3 por glutamina, se utilizó un oligo mutagénico puntual en donde justo en el triplete de bases codificantes para lisina correspondiente a la posición 14, había un cambio de base que permitiría realizar la mutagénesis (**AAG** reemplazado por **CAG** en la posición 14), esto permitirá que en la posición 14 ahora se codifique el aminoácido glutamina en lugar de la lisina, este oligo junto con el reverso se utilizaron para amplificar a partir de ADN genómico de la IMI 206040, la región correspondiente al ORF de la histona H3 de *T. atroviride*, el fragmento obtenido de 1174 pb se clonó en fase en los sitios *Xba I* y *Nsi I* presentes en el plásmido pHYG-GFP y en los oligos generados, quedando bajo el promotor de *pki* y el terminador *cbh2* (Mach *et al.*, 1994) obteniendo de este modo la construcción pZEGAH3K14Q (Figura 18). Esta construcción se linearizó y se transformó a protoplastos de *Trichoderma*.

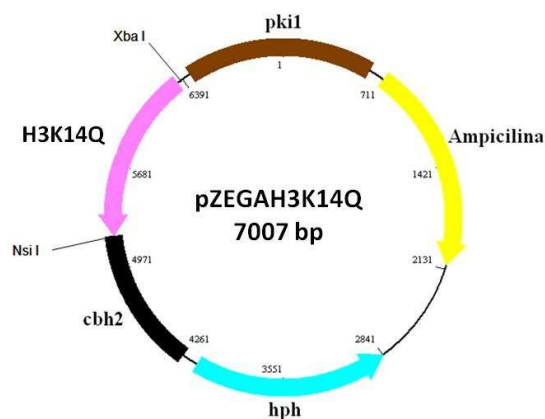


Figura 18. Representación esquemática del plásmido pZEGAH3K14Q con un casete de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias y un casete de resistencia a higromicina para su selección en hongos, el ORF del gen de la histona H3 se encuentra clonado en fase bajo la dirección del promotor constitutivo *pki*, y tiene un terminador de *cbh2*.

5.3.3.2 Obtención y análisis fenotípico de crecimiento y morfología de las transformantes H3K14Q

La transformación de protoplastos y selección de las cepas transformantes se realizó de un modo semejante que para la obtención de las cepas mutantes y transformantes del gen *tago-2* (Ver metodología y apartados de obtención de mutantes y transformantes del gen *tago-2*). De un modo igual que para las transformantes que sobreexpresan el gen *tago-2* se comportaron estas cepas, ya que también mostraron diferencias a nivel fenotipo correspondiente a velocidad de crecimiento, capacidad y modo de conidiación y morfología de la colonia (Figura 17). Las posibles causas de esto pueden ser: el efecto de la integración ectópica del gen de la histona H3 cuyas consecuencias fueron ya detalladas en la parte: 5.3.2.2 Obtención y análisis fenotípico de crecimiento y morfología de las transformantes *tago-2*. O bien que efectivamente su fenotipo sea consecuencia de la mutación puntual de la lisina 14 de la histona H3, y de este modo no se esté llevando a cabo acetilación en ese residuo específico de la histona H3 lo que trae como consecuencia una alteración en la expresión de genes regulados en parte por la acetilación de dicha histona.

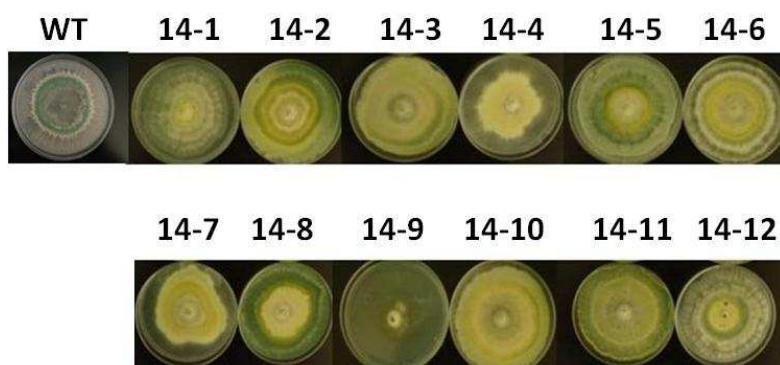


Figura 19. Fotografías de las diferentes cepas transformantes obtenidas y que son candidatas de llevar una o varias copias del gen de la histona H3 con un reemplazo de la lisina 14 por glutamina., nótese el fenotipo tan variado que presentan en comparación con la silvestre. Las cepas fueron crecidas bajo periodos de luz-oscuridad a 28°C. WT = cepa silvestre, 14 - 1-12 = cepas transformantes.

5.4 Ensayos de confrontación de las cepas transformantes y mutantes obtenidas de *Trichoderma atroviride* vs. *Sclerotium rolfsii*

Trichoderma sp es un género de ascomicetos que ha sido utilizado como agente de control biológico de varias especies de hongos fitopatógenos que atacan cultivos de importancia agrícola (Chet, 1987). Debido a esta relevancia se ha trabajado considerablemente en la obtención mediante la modificación genética de cepas mejoradas de este género que lleven a cabo de una manera más eficiente el control biológico. Una vez que se obtuvieron las cepas transformantes y mutantes del gen *tago-2*, se decidió probar si aún eran capaces de realizar su efecto micoparasítico frente a hongos fitopatógenos. Para comprobar esto se realizaron ensayos de confrontación tanto de la cepa mutante *tago-2* así como una de las cepas transformantes candidatas a sobreexpresar el gen *tago-2*, (que se seleccionó porque presentaba una velocidad de crecimiento mayor en comparación con el resto de las cepas) con una cepa de *Sclerotium rolfsii*, el cual posee una distribución mundial y es patógeno de más de 180 especies de plantas y (Aycok, 1961). Ataca diversas fases del desarrollo de sus hospederos, desde la semilla hasta los productos agrícolas aun después de cosechados (Taubenhaus, 1919).

5.4.1 Ensayo de confrontación mutante *tago-2* vs. *Sclerotium rolfsii*

Nuestros resultados indican que la mutante que tiene interrumpido el gen *tago-2* no es capaz de detener el crecimiento del hongo *Sclerotium rolfsii*, como lo hace la silvestre, ya que el fitopatógeno sobrepasa e invade con su micelio, la colonia de la cepa mutante, no obstante la capacidad de la mutante de lisar las células de *Sclerotium* no se pierde, aunque disminuye su eficiencia. Esto se observa claramente en la figura 20 donde se puede apreciar como la cepa silvestre detiene el crecimiento de *Sclerotium* y empieza a utilizar los mecanismos propios para lisar las células, por el contrario la mutante *tago-2*, no es capaz de detener el crecimiento de *Sclerotium*, ya que en una etapa tardía de la confrontación se observa como el fitopatógeno ya invadió completamente la zona en la que se inoculó la mutante *tago-2*, sin embargo, se

observa una zona donde el micelio de *Sclerotium* es muy escaso y esto resultado de la lisis que ejerció *Trichoderma* sobre aquél, por lo que podemos suponer que la eliminación del gen *tago-2* se encuentra afectada no sólo en los genes de desarrollo sino también en los que participan en la respuesta micoparásita de *T. atroviride*.

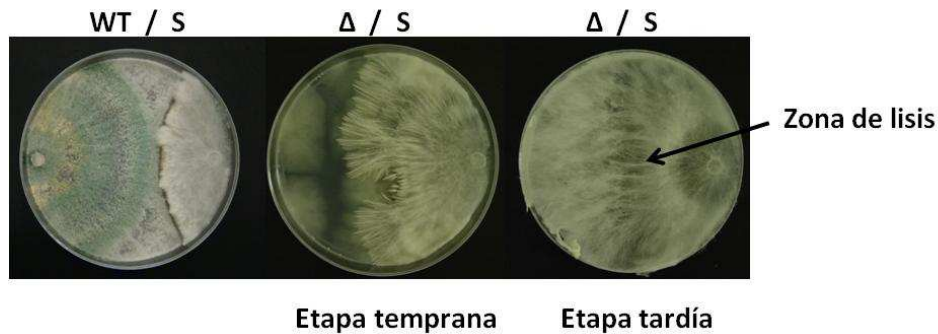


Figura 20. Fotografías que muestran la confrontación realizada entre *T. atroviride* mutante en el gen *tago-2* y *Sclerotium rolfsii*. Como se puede observar la mutante no es capaz de detener el crecimiento del hongo fitopatógeno, aunque sigue teniendo efecto lítico sobre las células de éste, lo cual se ve claramente en la zona de lisis formada entre la interacción de ambos hongos. WT=cepa silvestre, S= *Sclerotium rolfsii*, Δ=mutante *tago-2*.

5.4.1 Ensayo de confrontación sobreexpresante *tago-2* vs. *Sclerotium rolfsii*

El ensayo de confrontación realizado entre una de las cepas transformantes que sobreexpresan el gen *tago-2* y *Sclerotium rolfsii* muestra que al parecer esta cepa es más eficiente en controlar el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* a diferencia de la silvestre (Figura 21), ya que se observa como la cepa *Sclerotium rolfsii* presenta un crecimiento menor cuando es confrontada con la cepa transformante de *T. atroviride*; la razón de este hecho puede deberse a que la cepa de *Trichoderma* transformante esté acetilando las histonas en mayor medida que como lo hace la cepa silvestre, y esto debido a que hay mayor número de copias de una acetil transferasa de histonas, con lo cual la expresión de diversos genes se vea favorecida, y quizá se estén viendo

afectados positivamente los genes de micoparasitismo en la cepa transformante.

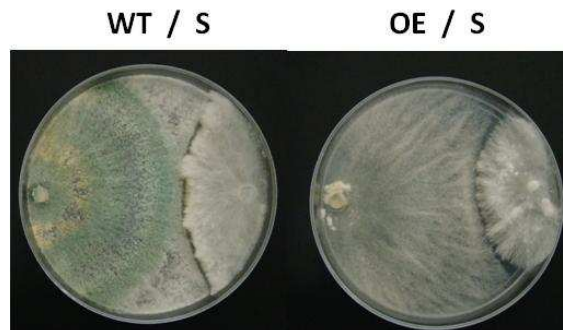


Figura 21. Fotografías que muestran la confrontación realizada entre una cepa de *T. atroviride* al parecer sobreexpresante del gen *tago-2* y *Sclerotium rolfsii*. Como puede observarse la cepa transformante controla de una manera más eficiente el crecimiento del hongo fitopatógeno. WT=cepa silvestre, S= *Sclerotium rolfsii*, OE=sobreexpresante *tago-2*.

VI. CONCLUSIONES

1. La aplicación de un fármaco inhibidor de desacetilasas de histonas en la cepa silvestre, altera el patrón de expresión de los genes de respuesta a luz azul *bld-2* y *phr-1*.
2. Se obtuvo una mutante en *Trichoderma atroviride* con interrupción del gen homólogo a Gcn5 de *Saccharomyces cerevisiae*. El gen se nombró *tago-2*.
3. Se obtuvieron cepas transformantes que sobreexpresan el gen *tago-2*.
4. Se obtuvieron cepas transformantes que poseen copias del gen de la histona H3 cuyo residuo 14 de lisina está reemplazado por glutamina (H3^{K14Q}).
5. El gen *tago-2* es necesario para el correcto desarrollo, conidiación y respuesta a luz de *Trichoderma atroviride*.
6. La cepa mutante *tago-2* se encuentra defectiva en su capacidad micoparasítica.
7. Una de las cepas transformantes que sobreexpresan el gen *tago-2* presenta una capacidad mayor de detener el crecimiento de una cepa de *Sclerotium rolfsii* en comparación con la silvestre.

VII. PERSPECTIVAS

1. Analizar el patrón de expresión de los genes *phr-1* y *bld-2* en la cepa mutante *tago-2*.
2. Comprobar mediante análisis de Northern blot que las cepas transformantes realmente estén sobreexpresando el gen *tago-2*, una vez hecho esto, proceder a analizar el patrón de expresión de los genes *phr-1* y *bld-2* en una de las cepas.
3. Analizar el patrón de expresión de los genes *phr-1* y *bld-2* en las cepas transformantes H3^{K14Q}.
4. Analizar el patrón de acetilación en los promotores de los genes *phr-1* y *bld-2* en cada una de las mutantes arriba mencionadas.
5. Analizar el patrón de expresión por PCR en tiempo real de los genes *phr-1* y *bld-2* en cada una de las mutantes y transformantes arriba mencionadas.
6. Analizar el patrón de expresión de los genes de conidiación en cada una de las mutantes y transformantes generadas.
7. Analizar el patrón de expresión de los genes involucrados en micoparasitismo en cada una de las mutantes y transformantes generadas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agalioti T, Chen G, Thanos D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell*. **111**:381-392.
- Alexander Idnurm and Joseph Heitman (2005). Photosensing Fungi: Phytochrome in the Spotlight. *Current Biology*.**15**:829-832.
- Allis, C. D., L. G. Chicoine, R. Richman, and I. G. Schulman. (1985). Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**:8048–8052.
- Angela Falciatore and Chris Bowler. (2005). The Evolution and Function of Blue and Red Light Photoreceptors. *Current Topics in Developmental Biology*. Vol. **68**:317-350
- Aycok, R.(1961). Summation of Symposium on *Sclerotium rolfsii*. *Phytopath*. **51**:107-108.
- Baek, J. and Kenerley, C. (1998). The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system. *Fungal Genet Biol*. **23**:34-44.
- Ballario P, Talora C, Galli D, Linden H, Macino G. (1998). Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Mol Microbiol*. **29**:719-729.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. & Macino, G. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J*. **15**:1650–1657.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Etwiller, L., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M., and Sonnhammer, E.L.L. (2002). The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Res*. **30**:276-280.
- Benítez, T; Rincón, AM; Limón, MC; Codón, AC. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. **7**: 249-260.
- Berger, S. L., B. Piña, N. Silverman, G. A. Marcus, J. Agapite, J. L. Regier, S. J. Triezenberg, and L. Guarente. (1992). Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell*.**70**:251–265.
- Berrocal-Tito, G., Rosales-Saavedra, M. T., Herrera-Estrella, A. & Horwitz, B. A. (2000). Characterization of blue-light and developmental regulation of the

- photolyase gene *phr-1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochem Photobiol* **71**, 662–668.
- Berrocal-Tito, G., Sametz-Baron, L., Eichenberg, K., Horwitz, B. A. & Herrera-Estrella, A. (1999). Rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene. *J Biol Chem.* **274**:14288–14294.
- Betina, V. (1984). Photoinduced conidiation in *Trichoderma viride*. *Int J Microbiol.* **2**:55-68.
- Bin G. Kang, and Stanley P. Burg. (1974). Red Light Enhancement of the Phototropic Response of Etiolated Pea Stems. *Plant Physiol.* **53**:445-448.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. and Fischer, R. (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome *FphA* represses sexual development in red light. *Curr Biol.* **15**:1833–1838.
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK. (1952). A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc Natl Acad Sci USA* **38**:662-666.
- Brownell, J. E., and C. D. Allis. (1995). An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:6364–6368.
- Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondson, S. Y. Roth, and C. D. Allis. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a transcriptional co-activator linking gene expression to histone acetylation. *Cell.* **84**:843–851.
- Burge, C., and Karlin, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J Mol Biol* **268**:78-94.
- Candau, R., P. A. Moore, L. Wang, N. Barlev, C. Y. Ying, C. A. Rosen, and S. L. Berger. (1996). Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol. Cell. Biol.* **16**:593– 602.
- Candido, E. P., Reeves, R. and Davie, J. R. (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell.* **14**:05–113.
- Carsten Schwerdtfeger and Hartmut Linden (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *The EMBO Journal.* **22**:4846-4855.
- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P. and Herrera-Estrella, A. (2004). BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of

- photoconidiation and mycelial grown in *T. atroviride*. *Microbiology*. **150**:3561–3569.
- Cashmore, A. R. (2003). Cryptochromes: Enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell*. **114**:537–543.
- Champe, S., Nagle, D. and Yager, L. (1994). Sexual sporulation in *Aspergillus*: 50 Years On, Progress in Industrial Microbiology, Vol. 29, edited by S. D. Martinelli and J. R. King horn. Elsevier Science, Amsterdam. 429-454.
- Chet, I. (1987). Innovative approaches to plant disease control, Ilan Chet (editor). Wiley & Sons, Nueva York. 137-160.
- Corrochano, L. and Cerda-Olmedo, E. (1992). Sex, light and carotenes: the development of *Phycomyces*. *Trends Genet* **8**:268-274.
- Corrochano. L. and Galland, P. (2006). Photomorphogenesis and Gravitropism in Fungi. The Mycota I. *Springer-Verlag*. 233-259.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. (1999). *Nature*. **399**:491-6.
- Elba E. Serrano, Eduardo Zeiger and Susumu Hagiwara. (1988). Red light stimulates an electrogenic proton pump in *Vicia* guard cell protoplasts *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**:436-440.
- Falciatore A and Bowler C. (2005). The Evolution and Function of Blue and Red Light Photoreceptors. *Current Topics in Developmental Biology*. **68**: 317-350
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*. **401**:188–93.
- Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J. and Dunlap, J. C. (2002). White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science*. **297**:815–819.
- Gasser, S. M., Parob, R., Stewart, F and Aasland, R. (1998). Epigenetic control of transcription. *Cell. Mol. Life Sci*. **54**: 1–5
- Gehring, W., and Rosbash, M. (2003). The coevolution of blue-light photoreception and circadian rhythms. *J. Mol. Evol*. **57**:S286–S289.
- Georgakopoulos, T., and G. Thireos. (1992). Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J*. **11**:4145–4152.

- Grant, P. A., L. Duggan, J. Cote, S. M. Roberts, J. E. Brownell, R. Candau, R. Ohba, T. Owen-Hughes, C. D. Allis, F. Winston, S. L. Berger, and J. L. Workman. 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* 11:1640–1650.
- Grewal, S. I. S., M. J. Bonaduce, and A. J. S. Klar. (1998). Histone deacetylase homologs regulate epigenetic inheritance of transcriptional silencing and chromosome segregation in fission yeast. *Genetics.* **150**:563-576.
- Harman, GE; Howell, RH; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology.* **2**: 43-56.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K. H. and Liu, Y. (2002). White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science.* **297**:840–843.
- Hettmann, C., and D. Soldati. (1999). Cloning and analysis of a *Toxoplasma gondii* histone acetyltransferase: a novel chromatin remodelling factor in *Apicomplexan* parasites. *Nucleic Acids Res.* **27**:4344–4352.
- Howell, CR. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease.* **87**: 4-10.
- Hong, L., G. P. Schroth, H. R. Matthews, P. Yau, and E. M. Bradbury. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus: thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 “tail” to DNA. *J. Biol. Chem.* **268**:305–314.
- Horwitz, B., Gressel, J. And Malkin, S. (1985). Photoperception mutants of *Trichoderma* : Mutants that sporulate in response to stress but not to light. *Curr Genet.* **9**:605-614.
- Idnurm A, Rodriguez-Romero J, Corrochano LM, Sanz C, Iturriaga EA, Eslava AP, Heitman J. (2006) The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**:4546-4551.
- Ikegami S., Ooe Y., Shimizu T., Kasahara T., Tsuruta T., Kijima, M. (1993). Accumulation of multiacetylated forms of histones by trichostatin A and its developmental consequences on early starfish embryos. *Roux Arch. Dev. Biol.* **202**:144–151.

- Imhof Axel. (2003). Histone Modifications: An Assembly Line for Active Chromatin? *Current Biology*. **13**: R22–R24.
- Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S. and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science*. **288**:1422-5.
- Jenuwein T, Allis CD. (2001). Translating the histone code. *Science*. **293**:1074-1080.
- Kang, B and Burg P. (1974). Red Light Enhancement of the Phototropic Response of Etiolated Pea Stems. *Plant Physiol*. **53**: 445-448.
- Kaufman, L. (1993). Transduction of blue light signals. *Plant Physiol*. **102**:333–337.
- Kuo, M. H., J. E. Brownell, R. E. Sobel, T. A. Ranalli, R. G. Cook, D. G. Edmondson, S. Y. Roth, and C. D. Allis. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature*. **383**:269– 272.
- Kwangwon Lee, Jay C. Dunlap and Jennifer J. Loros. (2003). Roles for *WHITE COLLAR-1* in Circadian and General Photoperception in *Neurospora crassa* *Genetics*. **163**:103–114.
- L. A. Pile, F.W.-H. Lee and D. A. Wassarman. (2001). The histone deacetylase inhibitor trichostatin A influences the development of *Drosophila melanogaster*. *Cell. Mol. Life Sci*. **58**:1715–1718.
- Lee, T. I., H. C. Causton, F. C. Holstege, W. C. Shen, N. Hannett, E. G. Jennings, F. Winston, M. R. Green, and R. A. Young. (2000). Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature*. **405**:701–704.
- Linden, H. & Macino, G. (1997). *White collar 2*, a partner in blue light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J*. **16**:98–109.
- Linden, H., Ballario, P. and Macino, G. (1997). Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*. **22**:141–150.
- Linden, Harmut. (2002). A White Collar Protein Senses Blue Light. *Science*. **297**:777-778.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L y Di Pietro, A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*. **83**: 302-307.

- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H. & Deng, X. W. (2001). Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell*. **13**:2589–2607.
- Mach, R. L., Schindler, M. and Kubicek, C. P. (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Curr Genet*. **25**:567–570.
- Marcus, G. A., N. Silverman, S. L. Berger, J. Horiuchi, and L. Guarente. (1994). Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *EMBO J*. **13**:4807–4815.
- Montgomery, B. L., and Lagarias, J. C. (2002). Phytochrome ancestry: Sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci*. **7**:357–366.
- Mooney, J.L., and Yager, L.N. (1990). Light is required for condiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev*. **4**:1473–1482.
- Moussa Benhamed, Claire Bertrand, Caroline Servet, and Dao-Xiu Zhou. (2006) Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 Interact to Regulate Histone Acetylation Required for Light-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*. **18**:2893–2903.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma and Gliocladium*: Biology, Ecology, and Potential for Biocontrol. *Ann Rev Phytopath*. **23**: 23-54.
- Popi Syntichaki, Irene Topalidou and George Thireos. (2000). The Gcn5 bromodomain co-ordinates nucleosome remodeling. *Nature* **404**:4414-417.
- Purschwitz, J., Muller, S., Kastner, C., and Fischer, R. (2006). Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol*. **9**: 566–571.
- Raeder, U. and Broda, P. (1989). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letts Appl Microbiol*. **1**:17-20.
- Rau, W. & Mitzka-Schnabel, U. (1985). Carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol* **110**: 253–267.
- Rosales-Saavedra, T., Esquivel-Naranjo, E.U., Casas- Flores, S., Martinez-Hernandez, P., Ibarra-Laclette, E., Cortes-Penagos, C., and Herrera-Estrella, A. (2006). Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology*. **152**: 3305–3317.
- Rosen, D., M. Edelman, E. Galun, and D. Danon. (1974). Biogenesis of mitochondria in *Trichoderma viride*: structural changes in mitochondria and

- other spore constituents during conidium maturation and germination. *J. Gen. Microbiol.* **83**: 31-49.
- Ruiz-Carrillo, A., L. J. Wangh, and V. G. Allfrey. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science.* **190**:117–128.
- Sambrook, L.; Fritsch E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd. edn). Cold Spring Harbor. Laboratory Press. New-York.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. (1987). DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**:5463.
- 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.
- Sealy, L. and Chalkley, R. (1978). The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell.* **14**:115–121.
- Serrano, E.E., Zeiger, E., Hagiwara, S. (1988). Red light stimulates an electrogenic proton pump in *Vicia* guard cell protoplasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* **85**:436-440.
- Silverman, N., J. Agapite, and L. Guarente. (1994). Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:11665–11668.
- Smith, E. R., J. M. Belote, R. L. Schiltz, X. J. Yang, P. A. Moore, S. L. Berger, Y. Nakatani, and C. D. Allis. (1998). Cloning of *Drosophila* GCN5: conserved features among metazoan GCN5 family members. *Nucleic Acids Res.* **26**:2948–2954.
- Struhl K (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell.* **98**:1–4.
- Taubenhaus, J. J.(1919). Recent studies on *Sclerotium rolfsii*. *Jour. Agric. Res.* **18**:127-138.
- Thomas Jenuwein and C. David Allis. (2001). Translating the Histone Code *Science.* **293**:1074-1080.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**.4876-4882.

- Tsuij N., Kobayashi M., Nagashima K., Wakisaka Y., and Koizumi K. (1976). A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J. Antibiot.* **29**:1–6.
- Vidali, G., Boffa, L. C., Bradbury, E. M. and Allfrey, V. G. (1978). Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **75**:2239–2243.
- Wiest, A; Grzegorski, D; Xu, B; Goulard, C; Rebuffat, S; Ebbola, DJ; Bodo, B; Kenerley, C. (2002). Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J Biol Chem.* **277**: 20862-20868.
- Wolffe AP, Hayes JJ. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* **27**:711-20.
- Wu J, Grunstein M. (2000). 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci.* **25**:619-623.
- Xu, W., D. G. Edmondson, and S. Y. Roth. 1998. Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5659–5669.
- Yager, L.N., Lee, H.-O., Nagle, D.L., and Zimmerman, J.E. (1998). Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* **149**:1777–1786.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. and Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**:17174–17179.
- Zhang Y, Reinberg D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**:2343-2360.