



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Que para obtener el Título de Químico Farmacobiologo

Presenta:

P. Q.F.B. David Vargas Tejeda

Título de la Tesis:

**Vectores de expresión de genes que codifican para
proteínas fluorescentes para *Mucor circinelloides***

Asesor: D.C. Víctor Meza-Carmen

Morelia Michoacán, Marzo 2017

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero dar gracias a Dios nuestro padre, por haberme dado la vida y permitirme concluir un paso más en ella. Tu mi Dios que nunca me abandonas y que a mi lado siempre caminas, y a pesar de las dificultades que me acecharon en recorrer este camino, tú me diste la fuerza para salir adelante.

A mis padres, Dr. Antonio Vargas García y Sra. Josefina Tejeda Guzmán por su amor, su apoyo incondicional, su orientación, consejo y sobre todo su paciencia, por haberme acompañado en este largo caminar que fue mi preparación profesional; por cada uno de los esfuerzos que dieron para que cada uno de sus hijos pudiera desarrollarse. Qué más puedo decir si me han dado todo lo que he necesitado.

A cada uno de mis hermanos Manuel, Israel, Josefina, Ernestina, María, Gregorio, Antonio, porque yo siendo el menor de los 8 de cada uno de ustedes recibí diferentes consejos, apoyo tanto emocional como económico y que siempre tuvieron fe en mí de que saldría adelante y querían que fuera el mejor, con cada uno de ustedes me desarrolle de manera diferente y de todos he aprendido.

De manera especial deseo agradecer a mi tío paterno Pbro. José Vargas García, por su apoyo en todo momento que lo necesite, por sus consejos y amistad, por escucharme y motivarme a seguir adelante.

A mis amigos Arian Orozco, Cristina Zamudio, Fernando Dueñas, Sanjuana Robles, Nicolás Reyes y a todos los que iniciamos este sueño juntos desde primer

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

semestre y hoy cada uno de nosotros tomamos poco a poco el camino que Dios nos ha destinado, agradezco su amistad y compañía en los momentos difíciles.

Un agradecimiento a mi asesor el Dr. Víctor Meza Carmen por brindarme la oportunidad de participar en sus proyectos de investigación, a la Dra. Martha Isela Ramírez Díaz por permitirme realizar el proyecto en el laboratorio de Microbiología en el IIQB; un especial agradecimiento a la M en C Martha Patricia Chávez Moctezuma por su total apoyo y enseñanza durante el periodo que trabaje en el proyecto.

Me gustaría agradecer a cada uno de los profesores que tuve durante los 5 años en la carrera, de una manera especial a la M. en C. Sandra Barbosa Muñoz de la cual aprendí mucho y que además siempre he sentido su apoyo, y qué decir que gracias a ella yo he podido ayudar a diferentes alumnos con asesorías.

A los estudiantes y tesistas de los laboratorios de Biotecnología Microbiana y Microbiología con los cuales conviví durante la realización del proyecto, gracias por sus consejos, enseñanzas y los momentos de liberar estrés.

Un agradecimiento especial al D.C. Victoriano Garre de la Universidad de Murcia y a su equipo de trabajo, por su colaboración en el proyecto.

GRACIAS

ÍNDICE

Índice de figuras	iv
Índice de Tablas	v
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Proteínas fluorescentes	3
1.1.1. Generalidades	3
1.1.2. Estructura y función	4
1.1.3. Evolución y diversidad de colores	7
1.1.4. Aplicaciones biológicas	8
1.1.5. Las proteínas fluorescentes en Hongos	9
1.2. <i>Mucor circinelloides</i>	10
1.2.1. Generalidades	10
1.2.2. Ciclo de vida	12
1.2.3. Dimorfismo	13
2. Justificación	15
3. Objetivos	15
4. Estrategia experimental	16
5. Materiales y Métodos	17
5.1. Cepas utilizadas	17
5.2. Medios de cultivo	17
5.3. Plásmidos	20
5.4. Amplificación de los genes de proteínas fluorescentes por PCR	21
5.5. Aislamiento de plásmidos	23
5.6. Electroforesis en geles de agarosa	23
5.7. Tratamiento con nucleasas	24
5.8. Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación	24
5.9. Obtención y conteo de esporas	25
5.10. Crecimiento en aerobiosis	25
6. Resultados	26
6.1. Amplificación de los genes que expresan para proteínas fluorescentes	26
6.2. Clonación de los genes que codifican para proteínas fluorescentes	26
6.3. Sub-clonación de los genes que codifican para proteínas fluorescentes	34
6.4. Comparación del micelio de la cepa silvestre con la cepa transformada con el gen <i>EGFP</i>	41
6.5. Comparación del micelio de la cepa silvestre con la cepa transformada con el gen <i>RFP</i>	44
6.6. Comparación del micelio de la cepa silvestre con la cepa transformada con el gen <i>CFP</i>	47
6.7. Comparación de la autofluorescencia en los diferentes rangos del espectro para cada una de las cepas.	49
6.8. Autofluorescencia de <i>Mucor circinelloides</i> en su forma	

levaduriforme	56
6.9. Evaluación de la autofluorescencia de las cepas transformadas de <i>Mucor circinelloides</i> R7B	57
7. Discusión	58
8. Conclusión	60
9. Referencias	60

Índice de figuras

Figura 1. Estructuras de la proteína y cromóforo	4
Figura 2. Alineación de secuencias de las proteínas derivadas de GFP	5
Figura 3 Amplificación de los genes que codifican para FPS por PCR	26
Figura 4 Clonación del gen <i>EGFP</i> (Enhanced Green Fluorescent Protein)	27
Figura 5 Clonación del gen <i>RFP</i> (Red Fluorescent Protein)	28
Figura 6 Clonación del gen <i>CFP</i> (Cyan Fluorescent Protein)	29
Figura 7 Clonación del gen <i>CherryFP</i>	30
Figura 8 Clonación del gen <i>OrangeFP</i>	31
Figura 9 Clonación del gen <i>StrawberryFP</i>	32
Figura 10 Sub-clonación del gen <i>EGFP</i> en el vector pEUK4	34
Figura 11 Sub-clonación del gen <i>RFP</i> en el vector pEUK4	35
Figura 12 Sub-clonación del gen <i>CFP</i> en el vector pEUK4	36
Figura 13 Sub-clonación del gen <i>CherryFP</i> en el vector pEUK4	37
Figura 14 Sub-clonación del gen <i>OrangeFP</i> en el vector pEUK4	38
Figura 15 Sub-clonación del gen <i>StrawberryFP</i> en el vector pEUK4	39
Figura 16 Autofluorescencia de la cepa <i>Mucor circinelloides</i> R7B en el espectro verde	41
Figura 17 Comparación de la fluorescencia entre la cepa control y la transformante EGFP de <i>Mucor circinelloides</i>	42
Figura 18 Autofluorescencia de la cepa <i>Mucor circinelloides</i> R7B en el espectro rojo	44
Figura 19 Comparación de la fluorescencia entre la cepa control y la transformante RFP de <i>Mucor circinelloides</i>	45
Figura 20 Autofluorescencia de la cepa <i>Mucor circinelloides</i> R7B en el espectro azul	46
Figura 21 Comparación de la fluorescencia entre la cepa control y la transformante CFP de <i>Mucor circinelloides</i>	47
Figura 22 Incidencia de los tres tipos de laser en la cepa control de <i>Mucor circinelloides</i> R7B	48
Figura 23 Incidencia de los tres tipos de laser en la cepa transformada de <i>Mucor circinelloides</i> R7B con el gen <i>EGFP</i>	49
Figura 24 Incidencia de los tres tipos de laser en la cepa transformada de <i>Mucor circinelloides</i> R7B con el gen <i>RFP</i>	50
Figura 25 Incidencia de los tres tipos de laser en la cepa transformada de <i>Mucor circinelloides</i> R7B con el gen <i>CFP</i>	51

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Figura 26 Incidencia de los tres tipos de laser en la cepa transformada de <i>Mucor circinelloides</i> R7B con el gen <i>CherryFP</i>	52
Figura 27 Incidencia de los tres tipos de laser en la cepa transformada de <i>Mucor circinelloides</i> R7B con el gen <i>OrangeFP</i>	53
Figura 28 Incidencia de los tres tipos de laser en la cepa transformada de <i>Mucor circinelloides</i> R7B con el gen <i>StrawberryFP</i>	54
Figura 29 Autofluorescencia de la fase levaduriforme de la cepa <i>Mucor circinelloides</i> R7B	55
Figura 30 Levaduras de cepas transformantes de <i>Mucor circinelloides</i> R7B	56

Índice de tablas

Tabla 1 Cepas obtenidas y utilizadas en el presente trabajo	17
Tabla 2 Tabla de plásmidos	19
Tabla 3 Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de los genes de proteínas fluorescentes	21
Tabla 4 Condiciones empleadas en las reacciones de PCR para la amplificación de cada uno de los genes que codifican para proteínas fluorescentes	21

Resumen

Las proteínas fluorescentes son cadenas de aminoácidos con una característica muy especial, contienen grupos que al recibir cierta longitud de onda permiten la emisión de un espectro de luz diferente al recibido (fluorocromos) es decir producen fluorescencia. La formación del fluorocromo se lleva a cabo en presencia de O₂ molecular por una oxidación en la región central de la proteína, donde se encuentra una secuencia de aminoácidos específica que en la proteína verde fluorescente (GFP) es, Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷, produciendo fluorescencia que se observa como luz verde. Debido a que el fluorocromo de la GFP se forma espontáneamente está puede ser usada como marcador a prácticamente cualquier proteína. Las PFs son grandes herramientas utilizadas como marcadores moleculares para el monitoreo de procesos *in vivo*, estas proteínas han sido utilizadas en diferentes tipos de organismos, mamíferos, plantas y algunos hongos. *Mucor circinelloides* es un zigomiceto dimórfico, para el cual no existe una herramienta molecular que permita la observación de procesos *in vivo*. En el equipo de trabajo se realizaron diferentes construcciones que contienen genes que codifican para distintas proteínas fluorescentes. Las cuales se encuentran en cepas transformadas de *M. circinelloides* (R7B). Por lo cual fue de nuestro interés evaluar la posible fluorescencia de diversas PFs en la cepa de *Mucor circinelloides* R7B. Nuestros resultados mostraron una autofluorescencia muy fuerte en la cepa R7B, en los espectros verde, rojo y azul siendo éste último el que presenta la mayor intensidad. Se desconoce las moléculas implicadas en dicha autofluorescencia. En las cepas transformadas con los plásmidos que expresan las PFs, la fluorescencia fue la misma que en la emitida por la misma cepa control, por lo que no se observó una expresión de las proteínas fluorescentes. Por lo tanto la autofluorescencia de la cepa R7B de *M. circinelloides* es muy fuerte impidiendo observar una expresión clara de las proteínas fluorescentes que fueron analizadas.

Palabras clave: *Mucor circinelloides*, proteínas fluorescentes, autofluorescencia.

Abstract

Fluorescent proteins are special polypeptides; they have a chromophore group in their structure. This group has the ability to produce fluorescence in specific conditions; when the protein is excited at certain wavelength in presence of molecular oxygen (O₂) an oxidation reaction occurs that renders the chromophore formation. In the middle of the protein there are three amino acids, they are the responsible of the activation of the chromophore. Those residues are 65 – 67 in the Green Fluorescent Protein-GFP (Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷). The GFP protein has been used as a great marker since it was cloned in 1992. *GFP* gene has been expressed in different organisms, from bacteria followed by yeast, mammals, plants and filamentous fungi. Fluorescent Proteins are one of the greatest molecular tools that are used as molecular markers to understand life process.

Mucor circinelloides is a dimorphic fungus belonging to the *Zygomycete* class; there is not a fluorescent protein tool to be used in this fungal organism. In this work, we have made different expression plasmids with fluorescent protein genes. All the plasmids were transformed into *M. circinelloides* R7B strain. We evaluated the fluorescence of these FP's in R7B strain. However, our results showed a high level of autofluorescence in this fungus on green, red and blue colors of the visible spectrum, the blue was the highest autofluorescence. The transformed strains showed the same fluorescent respect to the control strain plasmidless, indicating not enough fluorescent protein expression to overcome the autofluorescence of *M. circinelloides*. Therefore the strong autofluorescence of *M. circinelloides* R7B strain was the main reason that did not see the fluorescent proteins expression.

Key words: Fluorescent proteins, chromophore, *Mucor circinelloides*, autofluorescence, *GFP*.

1. Introducción

1.1. Proteínas fluorescentes

1.1.1. Generalidades

La proteína verde fluorescente (GFP) por sus siglas en inglés, fue descubierta hace 45 años (Shimomura y col., 1962). La GFP de *Aequorea victoria* fue ganando más atención después de su clonación en el año de 1992 (Prasher y col., 1992), una demostración de la utilidad de esta proteína como etiqueta fluorescente fue como marcador para la expresión genética en el gen **Mec 7** de *C. elegans* el cual codifica para una β -tubulina (Chalfie y col., 1994).

Se han descubierto un gran número de proteínas que producen bioluminiscencia como la GFP en especies como *Anthozoa* (Matz y col., 1999) e *Hydrozoa* (Shagin y col., 2004).

El descubrimiento y desarrollo de las múltiples variantes de proteínas fluorescentes han revolucionado el estudio de los sistemas vivos. Todos estos acontecimientos fueron reconocidos por el premio nobel en química en el año 2008 otorgado a Dres Shimomura, Chalfie y Tsien que participaron escalonadamente en dilucidar la estructura y función de la proteína verde fluorescente (GFP).

Actualmente el uso de la GFP, variantes y homologas de diferentes colores son usadas en diversas aplicaciones para estudiar la organización y función de las moléculas en los sistemas vivos (Dimitriy y col., 2009).

El gran éxito de estas proteínas se debe a las grandes ventajas que la proteína GFP ha presentado sobre otros marcadores, en primer lugar este tipo de proteínas nos permiten observar procesos *in vivo*, ya que pueden ser detectadas sin dañar el tejido; además de que no requiere del uso de otro sustrato para su visualización (Lorang y col., 2001).

1.1.2. Estructura y función

Las proteínas de la familia de la GFP están conformadas de 220 a 240 residuos aminoacídicos y aproximadamente 25 kDa de peso (Dimitriy y col., 2009); por ejemplo la GFP está conformada por 238 aminoácidos, y tienen un peso de 27 kDa, absorbe una longitud de onda entre 395 y 475 nm, emitiendo una longitud máxima de 508 nm (Lorang y col., 2001).

La cadena de aminoácidos forma un cilindro a base de estructuras β -laminar acopladas en forma de hélice (Ormo y col., 1996). El grupo cromóforo se forma en el centro de este cilindro y está conformado por 3 aminoácidos localizados en las posiciones 65, 66, y 67 (**Figura 1**) (siendo Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ para la GFP) (Dimitriy y col., 2009).

El aminoácido de la posición 65 puede variar, pero Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷ son estrictamente conservadas en todas las proteínas derivadas de la GFP (**Figura 2**). Como ya se mencionó este grupo es localizado en el centro del cilindro, donde es protegido del contacto con solventes que se encuentren en la capa de la proteína. El cilindro es estabilizado por diversas interacciones no covalentes y es extremadamente estable en condiciones de altas temperaturas y muy resistentes ante la proteólisis (Bokman y col., 1981; Tsien y col., 1998).

La fluorescencia de la GFP solo requiere de luz UV o azul, y oxígeno molecular (O₂), por tanto no es como los marcadores como β -glucuronidasa, β -galactoronidasa y otros que dependen de cofactores o sustratos para su actividad (Lorang y col., 2001).

Todas las proteínas derivadas de la GFP tienden a oligomerizarse, La GFP es considerada un monómero, pero a concentraciones altas forma dímeros (Culter y col., 1997). La estructura tetraédrica de las proteínas fluorescentes fue por primera vez revelada en estudios de cristalografía, siendo la proteína fluorescente DsRed de *Discosoma sp* (Wall y col., 2000).

El cromóforo de la proteína verde fluorescentes (GFP) se forma por la ciclación de los aminoácidos Ser-Tyr-Gly, esto ocurre por la deshidrogenación del C α -C β de la Tyr⁶⁶ catalizada por oxígeno molecular O₂ (Lorang y col., 2001). Esta reacción produce una estructura de dos anillos en la cual se conjuga un sistema π largo, polarizado y lo suficiente plano para poder absorber y emitir luz en el espectro visible (Dimitriy y col., 2009).

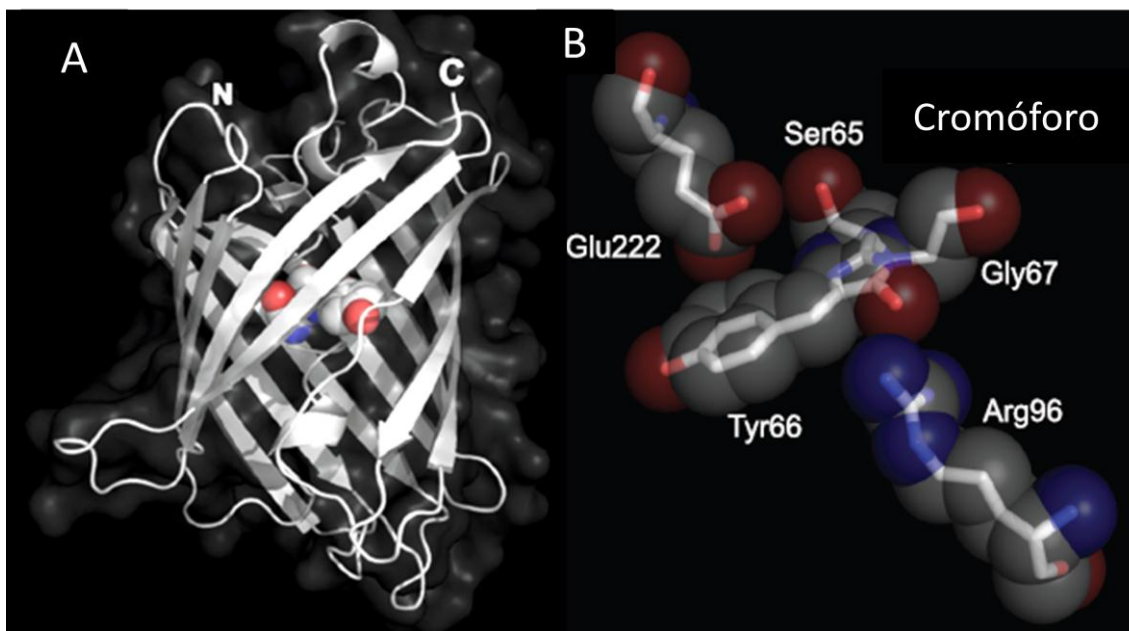


Figura 1. Estructuras de la proteína y cromóforo de la proteína GFP.
A Estructura tridimensional de la proteína GFP, la cual muestra la forma del cilindro que forman las láminas β y el grupo cromóforo en el centro de este. B Estructura tridimensional del cromóforo de la GFP compuesto por los aminoácidos Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ (Modificada Dimitriy y col., 2009).



Figura 2. Alineación de secuencias de las proteínas derivadas de GFP.

En la imagen se pueden apreciar las cadenas de aminoácidos de diferentes proteínas fluorescentes, y se indica en el recuadro naranja la zona en donde se encuentran los aminoácidos responsables de la formación del cromóforo de cada una de ellas, observando que los últimos dos aminoácidos se conservan como en la GFP silvestre. Las secuencias analizadas se obtuvieron a partir de la base de datos de SNAP GENE

1.1.3. Evolución y diversidad de colores.

La diversidad de cromóforos que existen hoy en día en las diferentes versiones de proteínas fluorescentes se deben principalmente a dos cosas: la primera de ellas a la modificación y manipulación de la proteína GFP silvestre (Labas y col., 2002), la segunda es debido al descubrimiento de más proteínas en organismos diversos que comparten hasta cierto punto un antecedente filogenético con la medusa *Aequora victoria* (Dimitry y col., 2009). Los espectros más comúnmente encontrados son cian, verde y rojo (Labas y col., 2002).

La diversidad natural de proteínas fluorescentes fue extendida por medio de la mutagénesis (Dimitry y col., 2009), pero como se realizó esto, como se mencionó anteriormente las proteínas derivadas de la GFP solo cambian el aminoácido Ser⁶⁵, para la obtención de diferentes colores, pero también se intentó sustituir el aminoácido Tyr⁶⁶ por otros aromáticos tales como Phe, His, y Trp con lo que se obtuvo de resultado proteínas fluorescentes en el espectro del azul.

Las proteínas resultantes del uso del Trp en la posición 66 fueron las de color Cian con una emisión de 475 nm para una absorción de 435 nm, entre ellas ECFP (Heim y col., 1994, 1996), mTurquoise (Goedhart y col., 2010), TagCFP (Evrogen JSC) entre otras. El resultado del uso de la His en la posición 67 fueron las que poseían cromóforos de color azul como la EBFP (Heim y col., 1995, Yang TT y col., 1998), EBFP (Ai HW y col., 2007), azurita (Mena y col., 2006), las cuales tienen una longitud de onda de excitación de 383 nm y una longitud de emisión de 448 nm (Heim y col., 1994).

Para la obtención de la proteína YFP se realizó una sustitución en el aminoácido Thr²⁰³ por Tyr, el cual se une al cromóforo de la GFP por medio de un enlace π - π entre Tyr²⁶ y Tyr²⁰³ provocando la fluorescencia amarilla, esto fue comprobado por medio de cristalografía (Ormo y col., 1996, Wachter y col., 1999). Años después se descubrió una proteína silvestre a la que se le llamo phiYFP, la cual fue clonada posteriormente (Shagin y col., 2004).

Las proteínas mutantes provenientes de la GFP han eliminado las desventajas de la misma tales como el los plegamientos inadecuados a altas temperaturas y el fotoblanqueo (Cubitt y col., 1995; Lippincott-Schwartz y col., 2003).

Las proteínas RFP's (mStrawberry, mPlumb entre otras) contienen cromóforos derivados de la DsRED (Verkhusha y col., 2004), los cuáles en forma de anión poseen una excitación y una emisión de 560–580 y 570-610 nm respectivamente (Ilanushevich y col., 2003, Labas y col., 2002). La variante mOrange surge de la introducción del aminoácido Thr⁶⁵ en el cromóforo DsRED (Shu y col., 2006).

1.1.4. Aplicaciones biológicas

Debido a que la GFP y las demás FP's tienen demasiadas ventajas, utilizándola como marcador *in vivo* para monitorear procesos dinámicos en células u organismos, tales como que su fluorescencia puede ser medible directamente sin proteínas, sustratos o cofactores adicionales (Chalfie y col., 1994; Gubin y col., 1997). Las proteínas fluorescentes tienen una gran variedad de aplicaciones en el campo de la biología molecular relacionada con el estudio de sistemas vivos, y estas aplicaciones día a día se expanden (Dimitry y col., 2009).

Uno de ellas es el uso de proteínas fluorescentes para el etiquetado de proteínas de interés, esto es realizado por medio de una construcción genética en la cual la FP es añadida a la proteína; la cual podrá ser vista y localizada *in vivo* gracias a la fluorescencia emitida, la primer demostración de ello se llevó a cabo en el año de 1994 (Wang y col., 1994). Hoy en día el etiquetado de proteínas es una de las aplicaciones más populares de las FP's.

Otra aplicación son las técnicas de foto-blanqueamiento las cuales pueden ser utilizadas para estimar la movilidad de las proteínas en células vivas, así como observar la influencia de factores externos en esta movilidad (Lippincott-Schwartz y col., 2003).

Este tipo de proteínas también pueden ser utilizadas para el análisis de expresión de promotores heterologos, estas PF's son clonadas bajo el control de un

promotor de interés, una proteína fluorescente puede resaltar la actividad del promotor en una condición determinada (Chen y col., 2006; Plautz y col., 1996).

Hablando del uso de las FP's fusionadas a promotores heterologos, siendo fusionadas a un promotor específico pueden ayudar a visualizar cierto tipo de células dentro de un organismo completo, pudiendo utilizarse en el área de la neurobiología (Livet y col., 2007; Young y col., 2004), el estudio del cáncer (Hofman, 2008, Turchin y col., 2008), además del estudio de expresión de genes implicados en la patogénesis durante el desarrollo de una infección fúngica (Kahmann y col., 2001, Di pietro y col., 2001).

1.1.5. Las Proteínas fluorescentes en hongos

Como ya se ha mencionado las proteínas fluorescentes son una poderosa herramienta molecular para el estudio *in vivo* de diversos células, tejidos, y organismos. Desde la clonación de la proteína GFP de *Aqueora victoria* (Prasher y col., 1992), está se ha utilizado en diversos organismos como una herramienta de estudio en diversos procesos, desde el etiquetamiento de proteínas hasta la realización de estudios de la interacción hongo-planta (Lorang y col., 2001).

La vasta mayoría de los estudios realizados en organismos fúngicos utilizando la expresión de *GFP* son en levaduras (Cormack y col., 1998), sin embargo ya se han realizado varios trabajos utilizando la GFP o alguna de sus variantes en hongos filamentosos (Fernández-Abalos y col., 1998; Suelmann y col., 2000).

Siendo *U. maydis* el primer hongo filamentosos en el cuál se llevó a cabo con éxito la expresión del gen *GFP* de *Aqueora victoria* (Spellig y col., 1996), seguido de *Aspergillus nidulans* (Suelmann y col., 1997) y *Aureobasidium pullulans* (Vanden y col., 1997).

Gracias a la fusión del gen *GFP* al gen *Tub1*, que codifica una tubulina en el hongo filamentosos *U. maydis*, se comprobó *in vivo* cómo se producen los cambios en el citoesqueleto en la transición entre la forma levaduriforme y la forma filamentosa que ocurre durante el proceso de infección (Steinberg y col., 2001).

El núcleo de *A. nidulans* fue marcado y visualizado en tiempo real, para observar la migración y mitosis, por primera vez se vio el comportamiento específico del núcleo en varias etapas de desarrollo (Fernández-Abalos y col., 1998).

La detección *In vivo* a lo largo del tiempo es quizás el sello distintivo de la GFP más apreciado a la hora de estudiar la biología celular de los hongos filamentosos. Debido a su anatomía simple y al rápido crecimiento, los hongos filamentosos son adecuados para tales investigaciones. Esto se ha demostrado en *A. nidulans* (Suelmann y col., 1997; 2000).

El gen GFP también ha sido utilizado en el análisis de expresión de genes en hongos mediante su fusión a los promotores de interés (Kahmann y col., 2001; Lorang y col., 2001). En *Fusarium oxysporum* se visualizó el proceso completo de infección de la planta huésped por parte del hongo empleando el promotor *gpdA* de *A. nidulans* para dirigir la expresión del gen *GFP* (Di Pietro y col., 2001)

El gen *EGFP* y sus derivados han sido expresados satisfactoriamente en células de *Caenorhabditis elegans* (Chalfie M y col., 1994), en levaduras (Flach J, y col., 1995; Niedenthal y col., 1996), en mamíferos (Pines y col., 1995), y hongos filamentosos (Spellig y col., 1996)

1.2. *Mucor circinelloides*

Mucor circinelloides es un hongo filamentoso perteneciente a la clase de los Zygomycetes, dentro del orden de los mucorales (Blasco, 2001) Esta clase incluye más de 3000 especies conocidas, las cuales pueden ser encontradas en diferentes ambientes del mundo. Todas las especies de esta clase se caracterizan por presentar una reproducción sexual por medio de zigosporas. La mayor parte de los zigomicetos presentan hifas aseptadas, formando una sola célula multinucleada (Jordan, 2014).

1.2.1. Generalidades

Mucor es un género que engloba a aquellas especies que producen el moho comúnmente encontrado en aceite, plantas y vegetales en proceso de

descomposición. Las colonias de este género son de color blanco a cierto tono beige, aunque después de tiempo por la maduración de sus esporas llegan a verse de color gris o marrón (Blasco, 2001).

M. circinelloides es un zigomiceto dimórfico (Lübbehüsen y col., 2003). Éste es un buen modelo de estudio en la diferenciación celular por respuestas celulares a la luz (Murcia-Flores y col., 2007). Es considerado como un patógeno emergente en pacientes inmunocomprometidos (Bastidas y col., 2012), además se le ha asociado a la contaminación de frutos como el noni (Nishijima y col., 2011). Recientemente, se han realizado estudios acerca de la posibilidad de utilizar a *M. circinelloides* para la producción de biodiesel, debido a la acumulación de lípidos que realiza por transesterificación, dando lugar a una nueva fuente de energía que podría competir con las biomasas vegetales (Vicente y col 2009; Xia y col., 2011). Se ha investigado su metabolismo para la obtención de etanol, y evaluado el rendimiento de la producción modificando condiciones de crecimiento (Wikandari y col., 2012).

El evento más estudiado en el hongo *M. circinelloides* es el dimorfismo (Lübbehüsen y col., 2003), éste presenta otro tipo de eventos diferenciativos, tal como la síntesis de carotenos, inducida por la presencia de luz (Murcia-Flores y col., 2008) provocando la generación de colonias de tonalidad amarillenta a diferencia de las crecidas en oscuridad que resultan ser albinas. Además de que es notable el desarrollo acelerado de estructuras reproductivas y de la esporulación, debido a la presencia de luz.

Se ha estudiado a *M. circinelloides* como huésped heterólogo para la producción de enzimas de importancia industrial, como el estudio del efecto del dimorfismo en el proceso de producción y actividad enzimática de glucosa oxidas. En el cual se encontró una mayor producción de esta enzima durante el estado de levadura (Bredenkamp y col. 2010).

El genoma de este organismo ya ha sido secuenciado y se encuentra disponible en la red (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>). Su material

genético está distribuido en 9 cromosomas tratándose de 11,719 genes en 36.6 millones de pares de bases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2804>). Se trata de un genoma muy parecido en comparación con otros hongos, como por ejemplo los zigomicetos *R. oryzae* con 45.3 Mb (Ma y col., 2009) y *P. blakesleeianus* con 30Mb (Corrochano y Ruiz-Albert, 2004), y otros como *Saccharomyces cerevisiae* de 12Mb (Kruglyak y col., 2000).

1.2.2. Ciclo de vida

M. circinelloides presenta dos diferentes ciclos de vida, sexual y asexual. El sexual permite la recombinación genética, apareciendo nuevas combinaciones en la descendencia, mientras el asexual permite la reproducción mediante mitosis del hongo. (Jordan, 2014)

M. circinelloides es capaz de generar tres tipos diferentes de esporas: 1) zigosporas que son productos de recombinación genética, 2) esporangioesporas que sirven como mecanismo de dispersión y 3) atrosporas las cuales aseguran la supervivencia bajo condiciones adversas de crecimiento (Orlowski, 1991; Lübbehüsen y col., 2003).

Ciclo asexual

Este ciclo comienza con la germinación de las esporas, las cuales son multinucleadas. Estas comienzan a emitir hifas que crecen en la superficie de crecimiento, hasta que se diferencian para producir hifas aéreas, ramificadas que forman esporangioforos que darán lugar a los esporangios que contendrán las nuevas esporangiosporas. (Jordan, 2014)

Ciclo sexual

La reproducción sexual se lleva a cabo cuando existe la fusión de hifas de origen heterotálico que llevan finalmente a la formación de zigosporas.

La zigospora permanece en reposo antes de germinar y producir una estructura alargada conocida como esporangióforo el cual presenta un cuerpo esférico en la punta conocida como esporangio del cual se desprenderán las esporangioesporas. Éstas son elipsoidales y aunque derivan exclusivamente del hábitat miceliar de *Mucor* son capaces de desarrollar hacia la morfología levaduriforme o miceliar dependiendo de la disponibilidad del oxígeno y de los nutrientes como la fuente de carbono (Lübbenhüsen y col., 2003).

1.2.3. Dimorfismo

Algunas especies de hongos se caracterizan por su crecimiento alternativo entre hifa y levadura, dependiendo de las condiciones ambientales. A este cambio peculiar en el crecimiento se le denomina dimorfismo. Ésta es una característica muy importante en muchos patógenos de plantas como de animales y humanos, siendo normalmente una de las dos morfologías la que causa la patogenicidad (Jordan, 2014). Normalmente *Mucor* no afecta a los humanos, pero cuando llega a hacerlo siempre es en su morfología de hifa (Blasco y col., 2001). Además, recientemente se ha corroborado que el tamaño de la esporangiospora es importante en la virulencia (Li y col., 2010). Conocer las bases moleculares del cambio entre cada una de las morfologías en los hongos patógenos es de gran importancia para poder controlar la enfermedad. Donde más se ha estudiado este tipo de cambios es en ascomicetos patógenos humanos, como *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis* o *Histoplasma capsulatum*, patógenos humanos. (Jordan, 2014)

El dimorfismo en *M. circinelloides* es un proceso totalmente reversible dependiendo de las condiciones de crecimiento. Si las esporangiosporas se crecen en anaerobiosis se favorece el crecimiento isotrópico (levadura), mientras que en aerobiosis el crecimiento de *M. circinelloides* es polarizado (filamentos). Además que en el ambiente gaseoso, el crecimiento levaduriforme requiere de una fuente de carbono fermentable (Bartnicki-Garcia, 1968).

Los crecimientos filamentosos y levaduriformes de *M. circinelloides* no son terminales y puede haber conversión de levadura a micelio o de micelio a levadura modificando las condiciones de crecimiento (McIntyre y col., 2002). Las hifas del género *Mucor* son multinucleadas y cenocíticas. Las levaduras presentan forma esférica y son multinucleadas también. (Ocampo y col., 2012).

La artrospora es la estructura menos estudiada y entendida del género *Mucor*, y se ha propuesto la funcionalidad de esta como un mecanismo de supervivencia ya que se forma al final del crecimiento logarítmico o bajo condiciones nutricionales desfavorables (Orlowski, 1991).

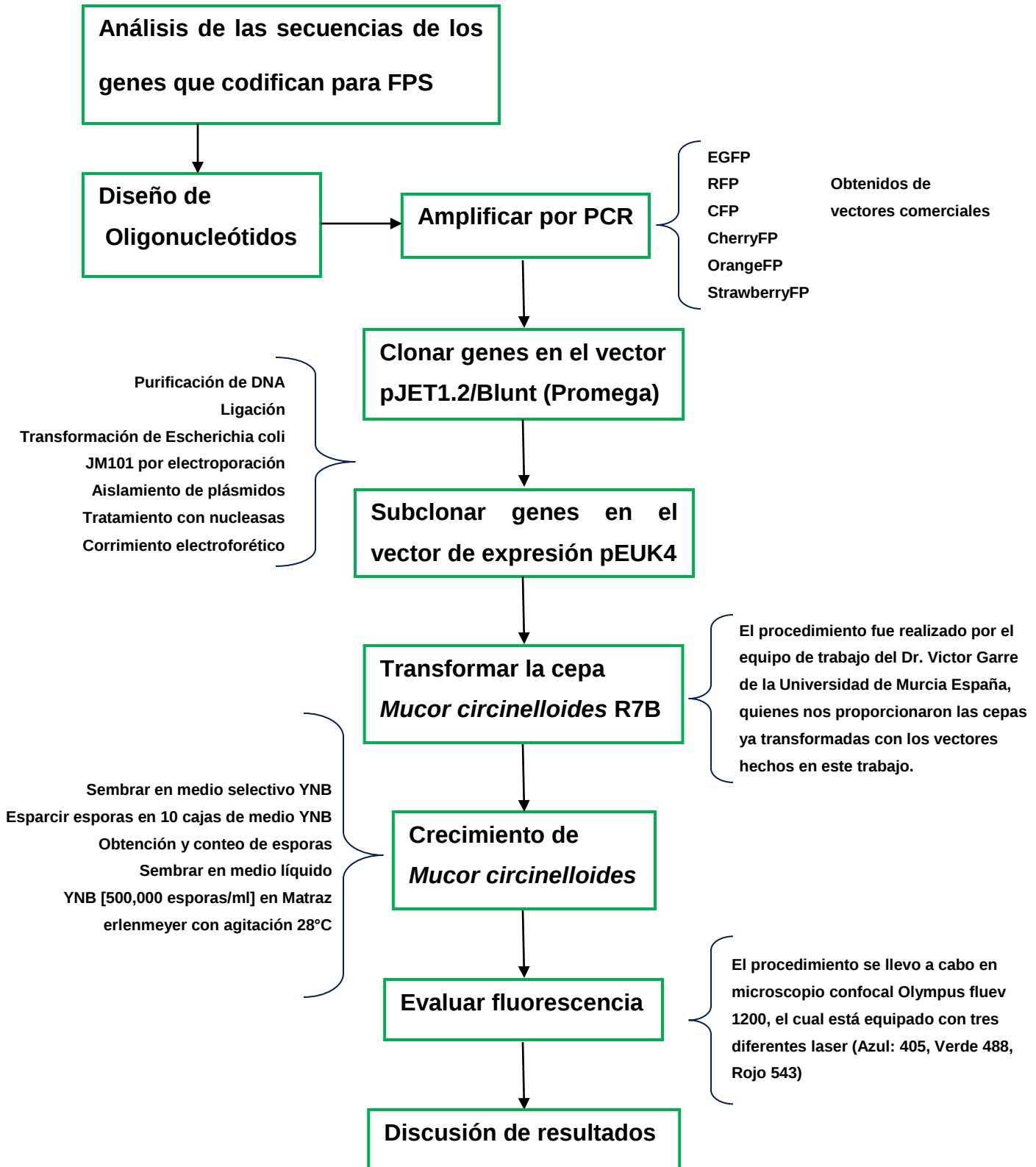
2. Justificación

Para *Mucor circinelloides* no existe una herramienta permita la visualización in vivo de la presencia de moléculas como es el uso de las proteínas fluorescentes para la observación de las mismas. Por lo tanto es de nuestro interés obtener una herramienta molecular la cual pueda ser utilizada en nuestro modelo de estudio.

3. Objetivos

- Observar la expresión de proteínas fluorescentes en el crecimiento micelial de *M. circinelloides*
- Observar la expresión de proteínas fluorescentes en el crecimiento levaduriforme de *M. circinelloides*

4. Estrategia experimental



5. Materiales y métodos

5.1. Cepas utilizadas

Las cepas de *Escherichia coli* se utilizaron como receptoras de los vectores de clonación y subclonación creados con los genes que codifican para proteínas fluorescentes y las cepas de *M. circinelloides* transformadas con los vectores derivados del pEUKA4 que fueron utilizadas para la expresión de los genes que codifican para proteínas fluorescentes (PF) Se describen en la **Tabla 1**.

5.2. Medios de cultivo

LB (Luria Bertani) (Peptona de Caseína, Extracto de levadura, Cloruro de Sodio)

Cada litro de medio LB contenía 10 g de Peptona de Caseína, 5 g de Extracto de levadura, 5 g de Cloruro de Sodio, para la preparación del medio sólido se añade agar (15 g/L) previamente a su esterilización en autoclave a 121°C durante 15 min. Cuando se necesitó, posterior a su esterilización, se añadió el antibiótico ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL.

YNB (Yeast Nitrogen Base)

Medio mínimo sin aminoácidos, cada litro de medio YNB contenía 20 g de dextrosa (BD Bioxon), 6.7 g de Yeast Nitrogen Base (SIGMA); para la preparación del medio sólido se le añade 20 g de agar bacteriológico.

YPG (Glucosa, Peptona de Gelatina, Extracto de Levadura)

Cada litro de medio YPG contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de dextrosa (BD Bioxon); para la preparación del medio sólido se le añade 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) antes de llevarlo a esterilizar (Bartnicki-García, 1968).

TABLA 1. Cepas obtenidas y utilizadas en el presente trabajo

Cepa	Descripción
<i>Escherichia coli</i> JM101	Cepa estándar de laboratorio. Utilizada como portadora de los vectores de clonación y subclonación.
<i>Escherichia coli</i> JM101 pJET-EGFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pJET-EGFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pJET-RFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pJET- RFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pJET-CFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pJET- CFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pJET-CherryFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pJET- CherryFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pJET-OrangeFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pJET- OrangeFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pJET-StrawberryFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pJET- StrawberryFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pEUK4-EGFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pEUK4-EGFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pEUK4-RFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pEUK4-RFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pEUK4-CFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pEUK4-CFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pEUK4-CherryFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pEUK4-CherryFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pEUK4-OrangeFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pEUK4- OrangeFP
<i>Escherichia coli</i> JM101 pEUK4-StrawberryFP	Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada como portadora del vector pEUK4- StrawberryFP
<i>M. circinelloides</i> R7B	ATCC 90680, cepa auxótrofa a leucina derivada de la cepa ATCC 1216b (Roncero y col., 1989).

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

<i>M. circinelloides</i> R7B pEUK4-EGFP	Cepa de <i>Mucor circinelloides</i> R7B transformada con el vector pEUK4-EGFP (Proporcionada por el grupo de trabajo del Dr. Víctor Garre de la Universidad de Murcia España)
<i>M. circinelloides</i> R7B pEUK4-RFP	Cepa de <i>Mucor circinelloides</i> R7B transformada con el vector pEUK4-RFP (Proporcionada por el grupo de trabajo del Dr. Víctor Garre de la Universidad de Murcia España)
<i>M. circinelloides</i> R7B pEUK4-CFP	Cepa de <i>Mucor circinelloides</i> R7B transformada con el vector pEUK4-CFP (Proporcionada por el grupo de trabajo del Dr. Víctor Garre de la Universidad de Murcia España)
<i>M. circinelloides</i> R7B pEUK4-CherryFP	Cepa de <i>Mucor circinelloides</i> R7B transformada con el vector pEUK4-CherryFP (Proporcionada por el grupo de trabajo del Dr. Víctor Garre de la Universidad de Murcia España)
<i>M. circinelloides</i> R7B pEUK4-OrangeFP	Cepa de <i>Mucor circinelloides</i> R7B transformada con el vector pEUK4-OrangeFP (Proporcionada por el grupo de trabajo del Dr. Víctor Garre de la Universidad de Murcia España)
<i>M. circinelloides</i> R7B pEUK4-StrawberryFP	Cepa de <i>Mucor circinelloides</i> R7B transformada con el vector pEUK4-StrawberryFP (Proporcionada por el grupo de trabajo del Dr. Víctor Garre de la Universidad de Murcia España)

5.3. Plásmidos

Para las clonaciones se utilizó el vector **pJET 1.2/Blunt** con un tamaño de 2.974 Kpb el cual tiene un sitio múltiple de clonación, con un gen de selección resistencia para Ampicilina (Ap). (CloneJet)

El vector utilizado para la subclonación fue **pEUKA4-gox1** el cual es un vector de expresión de 9.993 Kpb diseñado para la cepa R7B de *M. circinelloides*, con sitio múltiple de replicación con un gen que otorga resistencia contra Ampicilina (Ap); con una región para leucina. Con sitios de Restricción 5' – 3' *XhoI* – *NotI*. Un gen de Glucosa Oxidasa insertado en las posiciones 3058 – 4875, en el sitio de expresión. En la **Tabla 2** se muestran todas las construcciones realizadas con los vectores.

TABLA 2. Tabla de plásmidos.

Plásmidos	Descripción
pJET-EGFP	Plásmido de 3708 pb, resultante de clonar el vector pJET1.2/Blunt con regiones río arriba y abajo del gen EGFP (720 pb) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pJET-RFP	Plásmido de 4449 pb, resultante de clonar el vector pJET1.2/Blunt con regiones río arriba y abajo del gen RFP (1.1 Kb) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pJET-CFP	Plásmido de 3720 pb, resultante de clonar el vector pJET1.2/Blunt con regiones río arriba y abajo del gen CFP (732 pb) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pJET-CherryFP	Plásmido de 3696 pb, resultante de clonar el vector pJET1.2/Blunt con regiones río arriba y abajo del gen CherryFP (708 pb) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pJET-OrangeFP	Plásmido de 3699 pb, resultante de clonar el vector pJET1.2/Blunt con regiones río arriba y abajo del gen OrangeFP (711 pb) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pJET-StrawberryFP	Plásmido de 3699 pb, resultante de clonar el vector pJET1.2/Blunt con regiones río arriba y abajo del gen

	StrawberryFP (711 pb) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pEUK4-EGFP	Plásmido de 8891 pb resultante de clonar el vector pEUK4 con regiones río arriba y abajo del gen EGFP (720 PB) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pEUK4-RFP	Plásmido de 9632 pb resultante de clonar el vector pEUK4 con regiones río arriba y abajo del gen RFP (1.1 kB) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pEUK4-CFP	Plásmido de 8903 pb resultante de clonar el vector pEUK4 con regiones río arriba y abajo del gen CFP (732 PB) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pEUK4-CherryFP	Plásmido de 8879 pb resultante de clonar el vector pEUK4 con regiones río arriba y abajo del gen CherryFP (708 PB) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pEUK4-OrangeFP	Plásmido de 8882 pb resultante de clonar el vector pEUK4 con regiones río arriba y abajo del gen OrangeFP (711 PB) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)
pEUK4-StrawberryFP	Plásmido de 8891 pb resultante de clonar el vector pEUK4 con regiones río arriba y abajo del gen StrawberryFP (711 PB) Con sitios <i>XhoI</i> – <i>NotI</i> (En este trabajo)

5.4. Amplificación de los genes de proteínas fluorescentes por PCR

Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de las secuencias analizadas en el software DNASTART Seq-Builder los cuales se muestran en la **Tabla 3**. Para la amplificación por PCR se realizó una mezcla de reacción en la cual se agregó 1 µL del plásmido pEGFP y en otra el pYFP (La RFP se amplificó a partir de DNA total de *Arabidopsis thaliana*), los oligonucleótidos Directo y Reverso se utilizaron a una concentración de 20 picomoles (se agregó 1 µL), a la reacción se le agregó 12.5 µL de una mezcla llamada Master Mix (Promega), la cual contiene la enzima Taq polimerasa, MgCl₂, dNTPs y un amortiguador de reacción. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 25 µL. Las PCR se llevaron a cabo empleando un termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cyce utilizando las condiciones descritas en la **Tabla 4**.

TABLA 3. Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de los genes de PF.

GEN	Oligonucleótido	Secuencia 5'  3'	Orientación
<i>EGFP</i>	G,B,YFP-FWD	^A <u>CTCGAGAT</u> GGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	Directo
	G,BFP-REV	^B GCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	Reverso
<i>EYFP</i>	G,B,YFP-FWD	^A <u>CTCGAGAT</u> GGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG	Directo
	YFP-REV	^B <u>GCGGCCGCT</u> ACAGCTCGTCCATGCCGAGAG	Reverso
<i>RFP</i>	Cherry-FWD	^A <u>CTCGAGAT</u> GGTGAGCAAGGGCGAGGAGGAT	Directo
<i>SFP</i>			
<i>OFP</i>	Cherry-REV	^B <u>GCGGCCGCA</u> CTTGTACAGCTCGTCCATGCC	Reverso
<i>CFP</i>			

En la secuencia se tienen subrayados los sitios de restricción para las enzimas ^A*Xho*I y ^B*Not*I.

TABLA 4. Condiciones de PCR para la amplificación de los genes que codifican para PF.

GEN	Desnaturalización Inicial	Condiciones de Amplificación 30 Ciclos			
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión Final
<i>EGFP</i> <i>EYFP</i>	95°C/2'	95°C/30''	60°C/1'	72°C/1'	72°C/5'
<i>RFP</i> <i>SFP</i> <i>OFP</i> <i>Cherry</i> <i>Cyan</i>	95°C/2'	95°C/30''	50°C/1'	72°C/1.30'	72°C/5'

5.5. Aislamiento de plásmidos

El DNA de los plásmidos recombinantes fue obtenido a través del método de lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979; Ish-Horowics y Burke, 1981), de acuerdo al siguiente protocolo:

Se deja crecer un cultivo bacteriano en caldo Luria por 18 H a 37 °C en agitación (220 rpm); se cosechan las bacterias en tubos Eppendorf de 1.5 mL, centrifugando durante 2 min a 12000 rpm. Se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µL de una solución de STE (Sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10Mm pH 8.0) y se le adicionaron 20 µL de enzima lisozima (20 mg/mL), posteriormente se mezcló y se dejó incubando durante 5 min a 37 °C. En el siguiente paso se le agregó 300 µL de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N y SDS (Dodecil sulfato de sodio) 1 %, se agitó y se incubó por 10 min en hielo. Posteriormente se le añadió 200 µL de una solución de acetato de potasio 5 M a pH 4.8, se mezcló y se incubó por 10 min en hielo (formación de precipitado). Se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm y con un palillo estéril se tomaron los restos celulares del fondo del tubo; al sobrenadante se le añadió 500 µL de una mezcla de Fenol-Cloroformo, se agitó moderadamente y se centrifugo durante 10 min a 12000 rpm; se recuperó la fase acuosa superior y se le agregó 1 mL de etanol absoluto frío y se llevó a incubar por 20 min a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 15 min para recuperar el DNA precipitado, el cual se lavó dos veces con 500 µL de etanol al 70 %, centrifugando por 2 min a 12000 rpm. Al finalizar la pastilla se secó a 65 °C y se resuspendió en 50 µL de H₂O grado HPLC estéril, y se le adicionó 5 µL de RNasa (2 mg/mL), se incubó a 37 °C por 30 min; posteriormente se inactivo a 65 °C por 15 min. Las muestras de DNA fueron sometidas a electroforesis o se almacenaron a -20 °C.

5.6. Electroforesis en geles de agarosa

El corrimiento electroforético de las muestras obtenidas en el aislamiento de plásmido se llevaron a cabo en geles de agarosa al 1 % en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M pH 8 y EDTA 0.001 M pH 8). El gel se corrió en una cámara

de electroforesis horizontal con el amortiguador ya mencionado. Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de carga (azul de bromofenol 0.05 %, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5 % y sacarosa 40%). El corrimiento se realizó a un voltaje de 75 volts por 40 min. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01 % por 5 min y se reveló en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta. Como marcador de DNA molecular se utilizó el Lambda DNA ladder digerido con *HindIII* y 1Kb-DNA ladder para los corrimientos de restricciones.

5.7. Tratamientos con nucleasas

Los DNAs plasmídicos fueron digeridos utilizando una unidad de la endonucleasa de restricción (Promega) por μg de DNA e incubando a 37 °C durante toda la noche. Las endonucleasas utilizadas fueron *XhoI* y *NotI*. Posteriormente se realizó corrimiento electroforético de las mezclas de restricción en un gel de agarosa al 1 % para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

5.8. Transformación de *E. coli* por electroporación

Se inocularon 2500 mL de caldo Luria con 4 mL de un cultivo de *E. coli* JM101 crecido a 37 °C toda la noche. Las células se dejaron crecer a 37 °C con agitación hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a 590 nm (de 2 a 3 horas). Posteriormente las células son incubadas en hielo por 20 min para detener el crecimiento, el material debe mantenerse aproximadamente a 4 °C. Las células se cosecharon a 6000 rpm por 10 min a 4 °C. Se les realizaron 2 lavados con agua desionizada estéril y fría, centrifugando a 8000 rpm por 10 min a 4 °C en cada lavado. Al final las células se resuspendieron en 500 μL de glicerol estéril frío al 10 % y se almacenaron en alícuotas de 250 μL a -70 °C.

La transformación de las células electrocompetentes *E. coli* JM101 se realizó por el método de electroporación, la cual se llevó a cabo en un electroporador 2510 (Eppendorf). En un Eppendorf se mezclaron 100 μL de células competentes con 2 μL de DNA plasmídico. Esta mezcla fue colocada en una celda de electroporación estéril y fría, entre sus electrodos. El micropulso fue de 1800 V, por 4-5 milisegundos. De inmediato la mezcla se transfirió a un tubo con 2 mL de caldo

Luria y se dejaron incubar a 37 °C por 1 h para dejar recuperar las células. Posteriormente se esparcieron en placas de agar Luria con Ampicilina (100 µg/mL). Se dejaron incubar las placas toda la noche a 37 °C, al día siguiente se seleccionaron colonias para la realización del aislamiento de plásmido por lisis alcalina.

5.9. Obtención y conteo de esporas

La obtención de las esporas se llevó a cabo de la siguiente forma; primero se inocularon 100 esporas de *M. circinelloides* en placas con medio YNB, las cuales se mantuvieron a una temperatura de 30 °C en presencia de luz alrededor de 7 días. La colección de esporas se llevó a cabo agregando 5 mL de H₂O destilada estéril en cada una de las placas ya crecidas posteriormente se raspó cuidadosamente con un asa de plástico; las esporas se recolectaron con micropipeta y se colocaron en tubos Corning de 50 mL. Se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min para concentrarse y posteriormente se lavaron con H₂O destilada estéril 2 veces centrifugando y decantando. Al final de los lavados las esporas se resuspendieron en 20 mL de H₂O destilada estéril.

El conteo de las esporas obtenidas se llevó a cabo en una cámara de Neubauer observando a través de un objetivo 40X de un microscopio ATC 2000 (Leika), se colocaron 20 µL en cada una de las cámaras (superior e inferior). Se contaron los cuadros de las esquinas y la del centro de cada cámara, haciendo un total de 10 cuadrantes. La suma de esporas obtenida de estos cuadrantes se multiplicó por el factor 2.5×10^3 , el cual está dado por las características de la cámara, el resultado total de esporas se expresa por mililitro de la muestra. Las esporas se conservaron a 4 °C.

5.10. Crecimiento en aerobiosis

Se inocularon 5×10^5 de esporas en matraces Erlenmeyer que contenían medio YNB sin Leucina para las transformantes y con Leucina para la cepa control, a un volumen de 20 mL. Se incubaron por 4, 6 y 8 h a 30 °C con agitación (200 rpm). Esto se realizó para la obtención de micelio.

6. Resultados

6.1. Amplificación de los genes que expresan para proteínas fluorescentes.

La amplificación de los genes que codifican para proteínas fluorescentes se llevó a cabo por PCR, la amplificación de dos de ellas se realizó en las mismas condiciones, amplificando una sola banda para cada gen, de 734 pb para el gen *EGFP*, Y 727 pb para el gen *EYFP* aproximadamente (**Figura 3**).

Para los genes restantes amplificaron en condiciones distintas a las ya mencionadas, amplificando una sola banda para los genes *RFP* de 1.1 kb, y *Strawberry*, *Orange*, *Cyan* y *Cherry* de 700 pb aproximadamente (**Figura 3**).

6.2. Clonación de los genes que codifican para proteínas fluorescentes

Posterior a la amplificación se realizó la clonación de los genes, la cual se llevó a cabo en el vector pJET 1.2/blunt (PROMEGA). Se llevó a cabo la transformación de las células competentes y se les realizó aislamiento de plásmido, y se corroboró la presencia del gen clonado en el vector por medio de un análisis de restricción con las enzimas *XhoI* y *NotI* las cuales liberan el fragmento de DNA correspondiente al gen de interés. Corroborando su presencia en un gel de agarosa al 1 % (**Figura 4-9**).

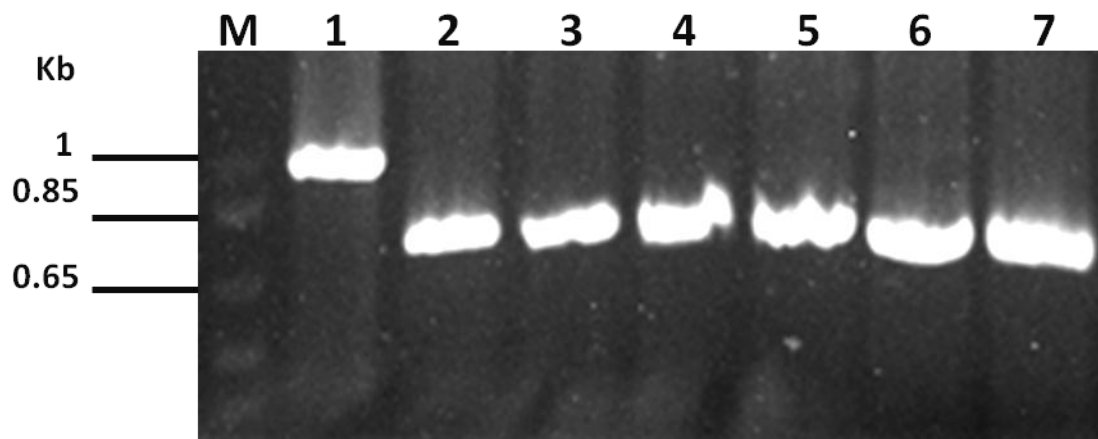


Figura 3. Amplificación de los genes que codifican para PF por PCR.

En la imagen se muestran los diferentes genes amplificados por medio de PCR, los cuales posteriormente se clonaron y subclonaron. **Carril 1 Gen RFP (1.1Kb), Carril 2 Gen EGFP (0.72 Kb), Carril 3 Gen EYFP (0.72 Kb), Carril 4 Gen StrawberryFP (0.71 Kb), Carril 5 Gen CFP (0.73 Kb), Carril 6 Gen OrangeFP (0.71 Kb), Carril 7 Gen CherryFP (0.78 Kb).**

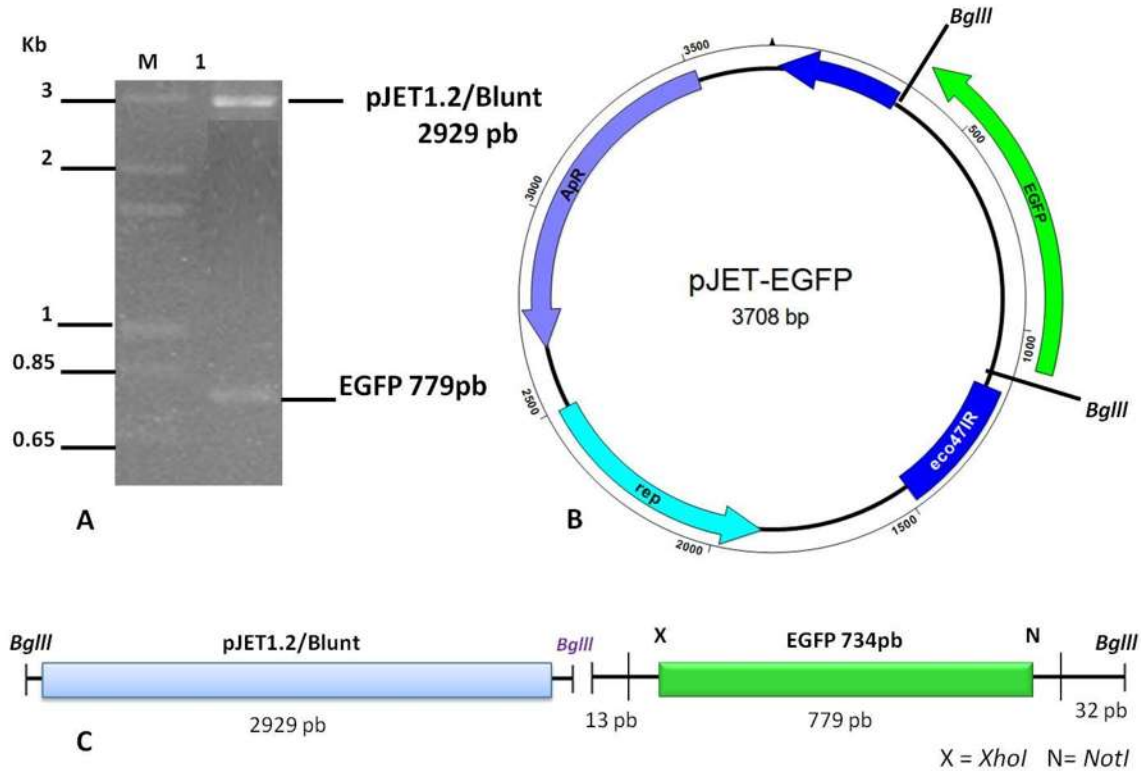


Figura 4. Clonación del gen *EGFP* (Enhanced Green Fluorescent Protein).

A. En la imagen se puede observar la restricción del gen EGFP y el vector de clonación pJET 1.2/Blunt (FERMENTAS), con las bandas señaladas de 779 pb (EGFP) y 2.9 kb aproximadamente (pJET 1.2/Blunt). **B.** En la imagen se puede apreciar el mapa circular del vector con el gen EGFP clonado. **C** Se muestra el tamaño de cada una de las bandas liberadas con los sitios de restricción para la enzima *BglII*, la cual fue utilizada para corroborar la clonación. Nota: el fragmento es más grande debido a que los sitios de restricción de la enzima *BglII* están dentro del vector.



A. En la imagen se puede observar la restricción del gen EGFP y el vector de clonación pJET 1.2/Blunt (FERMENTAS), con las bandas señaladas de 1114 pb (RFP) y 2.9 kb aproximadamente (pJET 1.2/Blunt). **B.** En la imagen se puede apreciar el mapa circular del vector con el gen RFP clonado. **C** Se muestra el tamaño de cada una de las bandas liberadas con los sitios de restricción para la enzima *BglIII*, la cual fue utilizada para corroborar la clonación. Nota: el fragmento es más grande debido a que los sitios de restricción de la enzima *BglIII* están dentro del vector

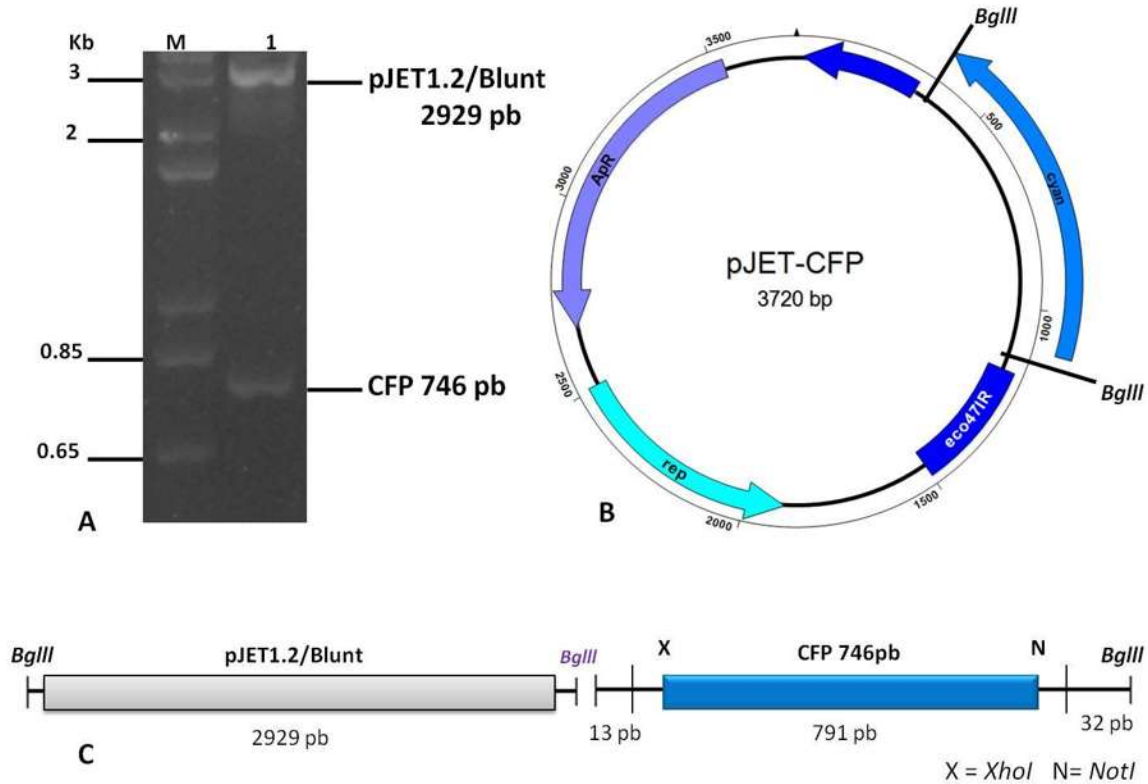


Figura 6. Clonación del gen CFP (Cyan Fluorescent Protein)

A. En la imagen se puede observar el corrimiento electroforético de la restricción del gen *CFP* y el vector de clonación pJET 1.2/Blunt (FERMENTAS), con las bandas señaladas de 746 pb (*CFP*) y 2.9 kb aproximadamente (pJET 1.2/Blunt). **B.** En la imagen se puede apreciar el mapa circular del vector con el gen *CFP* clonado. **C** Se muestra el tamaño de cada una de las bandas liberadas con los sitios de restricción para la enzima *BglII*, la cual fue utilizada para corroborar la clonación. Nota: el fragmento es más grande debido a que los sitios de restricción de la enzima *BglII* están dentro del vector.

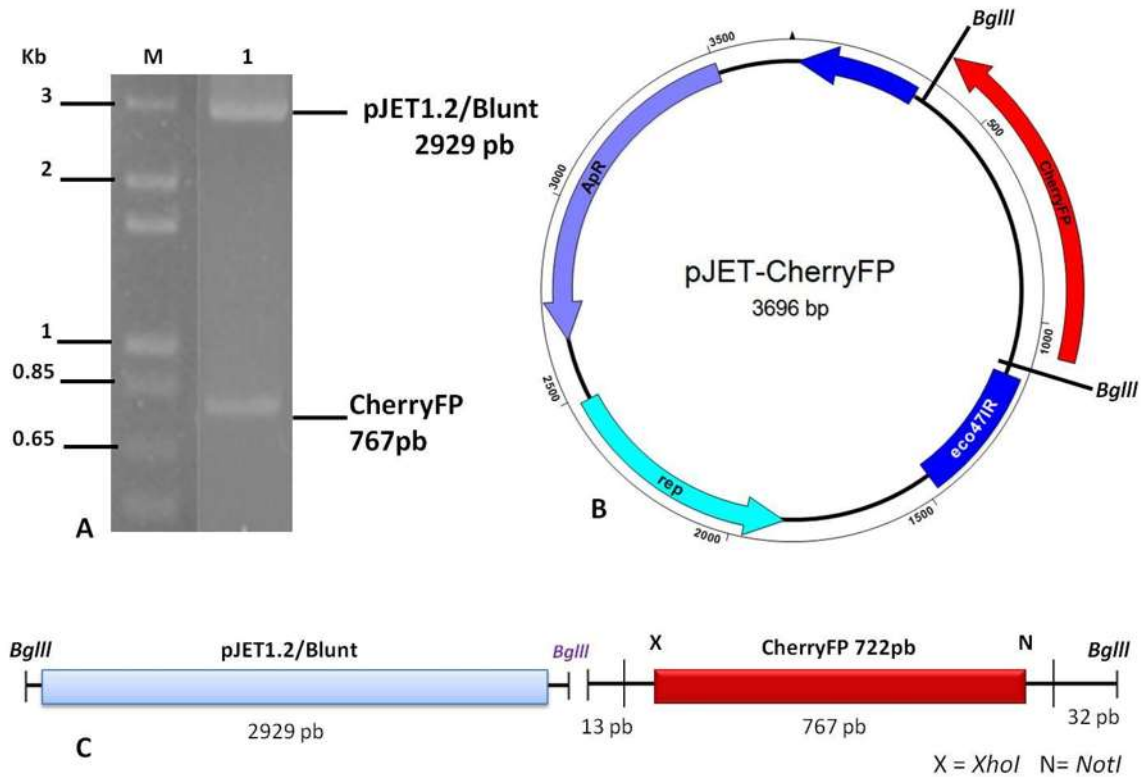


Figura 7. Clonación del gen *CherryFP*.

A. En la imagen se puede observar el corrimiento electroforético de la restricción del gen *CherryFP* y el vector de clonación pJET 1.2/Blunt (FERMENTAS), con las bandas señaladas de 767 pb (*CherryFP*) y 2.9 kb aproximadamente (pJET 1.2/Blunt). **B.** En la imagen se puede apreciar el mapa circular del vector con el gen *CherryFP* clonado. **C** Se muestra el tamaño de cada una de las bandas liberadas con los sitios de restricción para la enzima *BglII*, la cual fue utilizada para corroborar la clonación. Nota: el fragmento es más grande debido a que los sitios de restricción de la enzima *BglII* están dentro del vector.

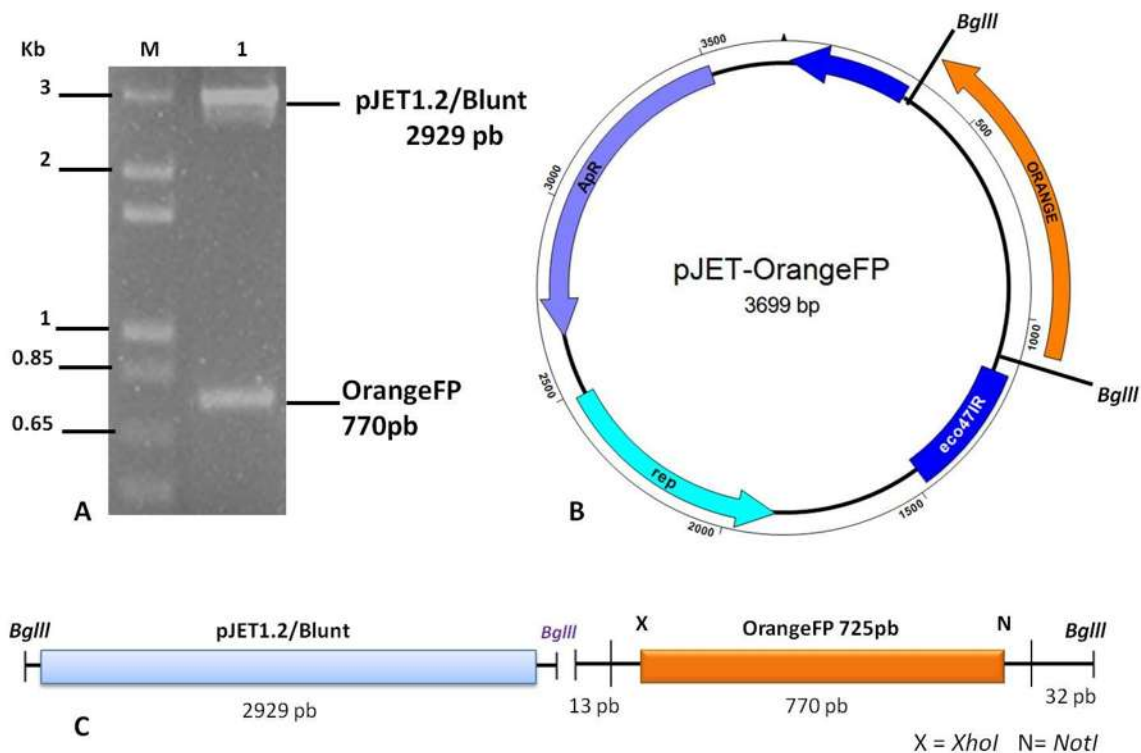


Figura 8. Clonación del gen *OrangeFP*.

A. En la imagen se puede observar el corrimiento electroforético de la restricción del gen *OrangeFP* y el vector de clonación pJET 1.2/Blunt (FERMENTAS), con las bandas señaladas de 770 pb (*OrangeFP*) y 2.9 kb aproximadamente (pJET 1.2/Blunt). **B.** En la imagen se puede apreciar el mapa circular del vector con el gen *OrangeFP* clonado. **C** Se muestra el tamaño de cada una de las bandas liberadas con los sitios de restricción para la enzima *Bgl*II, la cual fue utilizada para corroborar la clonación. Nota: el fragmento es más grande debido a que los sitios de restricción de la enzima *Bgl*II están dentro del vector.

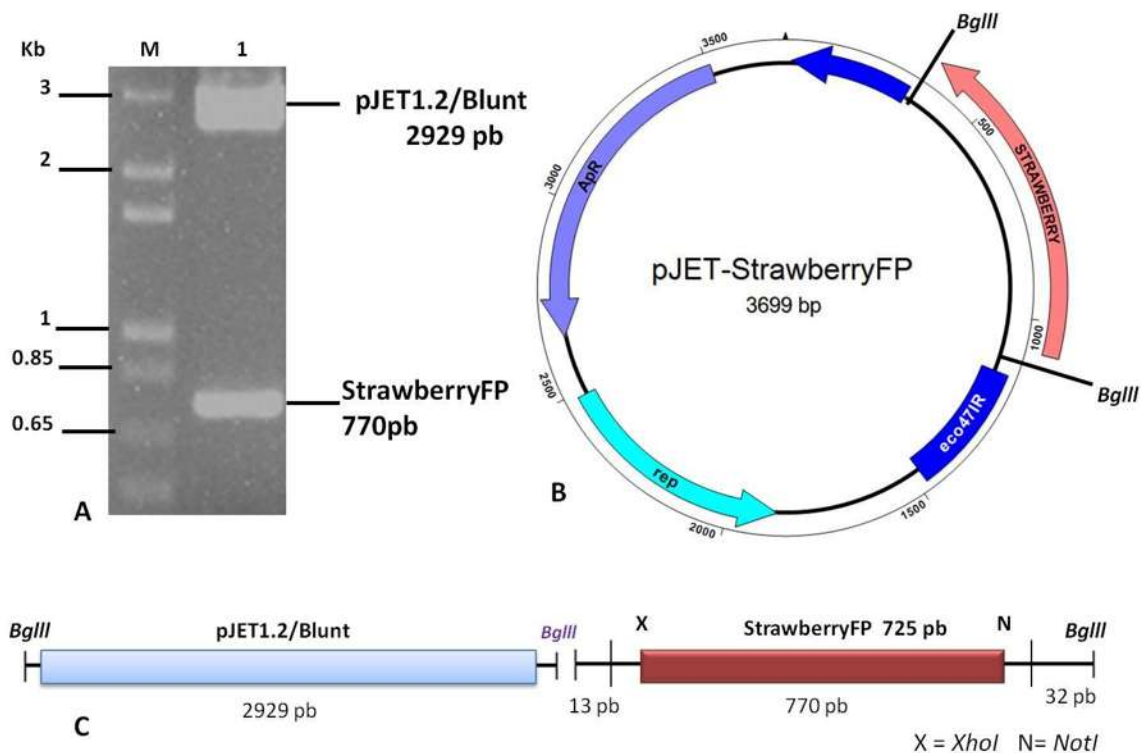


Figura 9. Clonación del gen *StrawberryFP*.

A. En la imagen se puede observar el corrimiento electroforético de la restricción del gen *StrawberryFP* y el vector de clonación pJET 1.2/Blunt (FERMENTAS), con las bandas señaladas de 770 pb (*StrawberryFP*) y 2.9 kb aproximadamente (pJET 1.2/Blunt). **B.** En la imagen se puede apreciar el mapa circular del vector con el gen *StrawberryFP* clonado. **C** Se muestra el tamaño de cada una de las bandas liberadas con los sitios de restricción para la enzima *BglII*, la cual fue utilizada para corroborar la clonación. Nota: el fragmento es más grande debido a que los sitios de restricción de la enzima *BglII* están dentro del vector.

6.3. Sub-clonación de los genes que codifican para proteínas fluorescentes

El vector requerido para la sub-clonación de los genes de interés fue pEUKA4-gox1 el cual contenía al gen *GOX 1* que codifica para la enzima glucosa oxidasa, a este vector se le retiro el gen *GOX 1* por medio de un ensayo de restricción con las enzimas *XhoI* y *NotI* las cuales permitieron separar el gen y linealizar al vector.

Se realizaron análisis de restricción para los genes clonados y poder purificarlos; posteriormente fueron ligados al vector ya purificado pEUKA4, se realizó la transformación de las células competentes, se realizaron ensayos de restricción para cada construcción.

En las siguientes imágenes se muestran los análisis de restricción de cada una de las construcciones finales, para corroborar la presencia y unión de cada uno de los genes que codifican para proteínas fluorescentes al vector pEUK4. (Figura 10 – Figura 15).

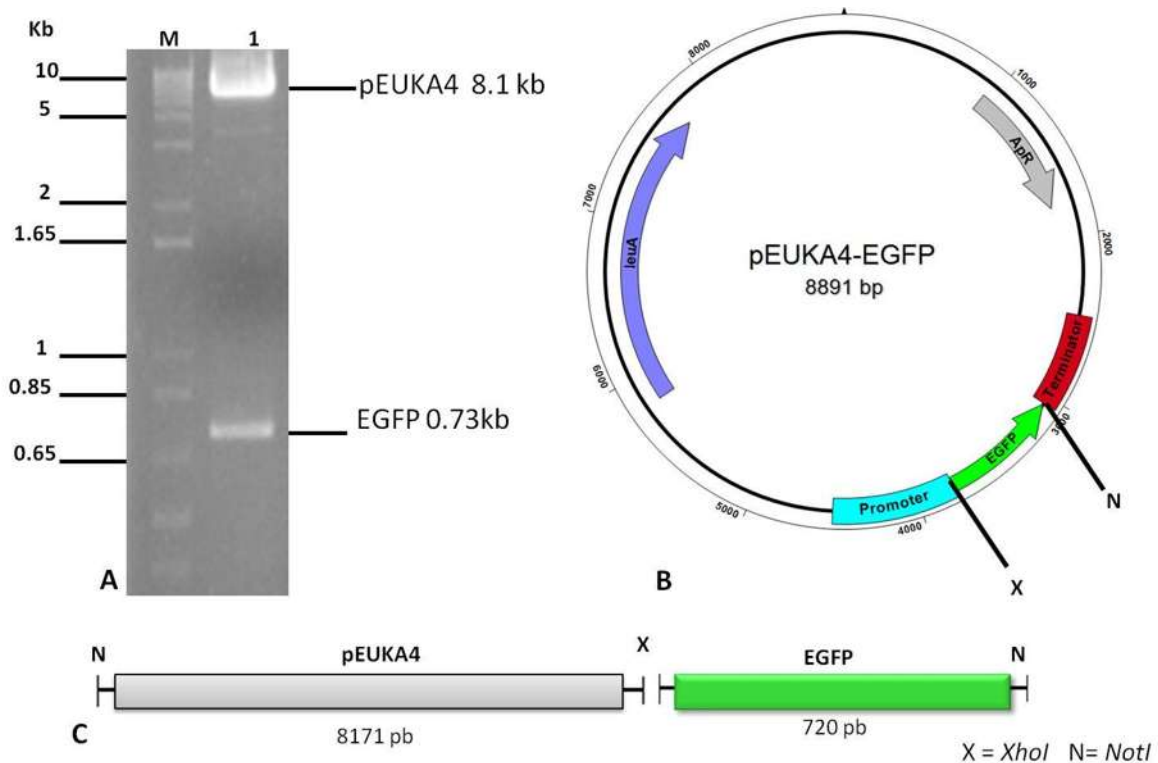


Figura 10. Sub-clonación del gen *EGFP* en el vector pEUK4.

A. Se muestra el corrimiento electroforético de la restricción de la construcción pEUK4-EGFP, en la cual se distinguen las dos bandas correspondientes al gen *EGFP* de 0.73 kb aproximadamente y de 8.1 kb aproximadamente correspondiente al vector pEUK4. **B.** Se muestra el mapa circular de la construcción en la cual se puede apreciar la presencia del promotor y el terminador antes y después del gen *EGFP*. **C.** Se muestran los tamaños por separado del gen *EGFP* y del vector pEUK4, además de los sitios de restricción de las enzimas utilizadas *XhoI* y *NotI*.

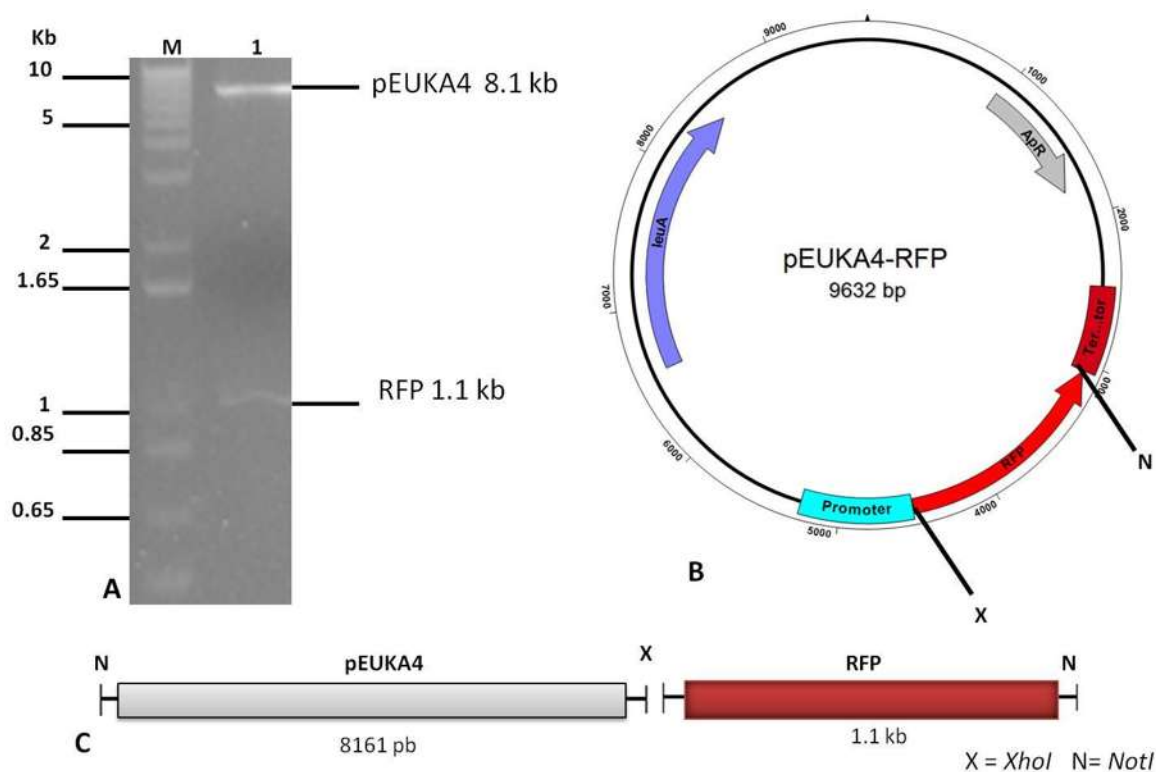


Figura 11. Sub-clonación del gen *RFP* en el vector pEUK4.

A. Se muestra el corrimiento electroforético de la restricción de la construcción pEUK4-RFP, en la cual se distinguen las dos bandas correspondientes al gen *RFP* de 1.1 kb aproximadamente y de 8.1 kb aproximadamente correspondiente al vector pEUK4. **B.** Se muestra el mapa circular de la construcción en la cual se puede apreciar la presencia del promotor y el terminador antes y después del gen *RFP*. **C.** Se muestran los tamaños por separado del gen *RFP* y del vector pEUK4, además de los sitios de restricción de las enzimas utilizadas *XhoI* y *NotI*.

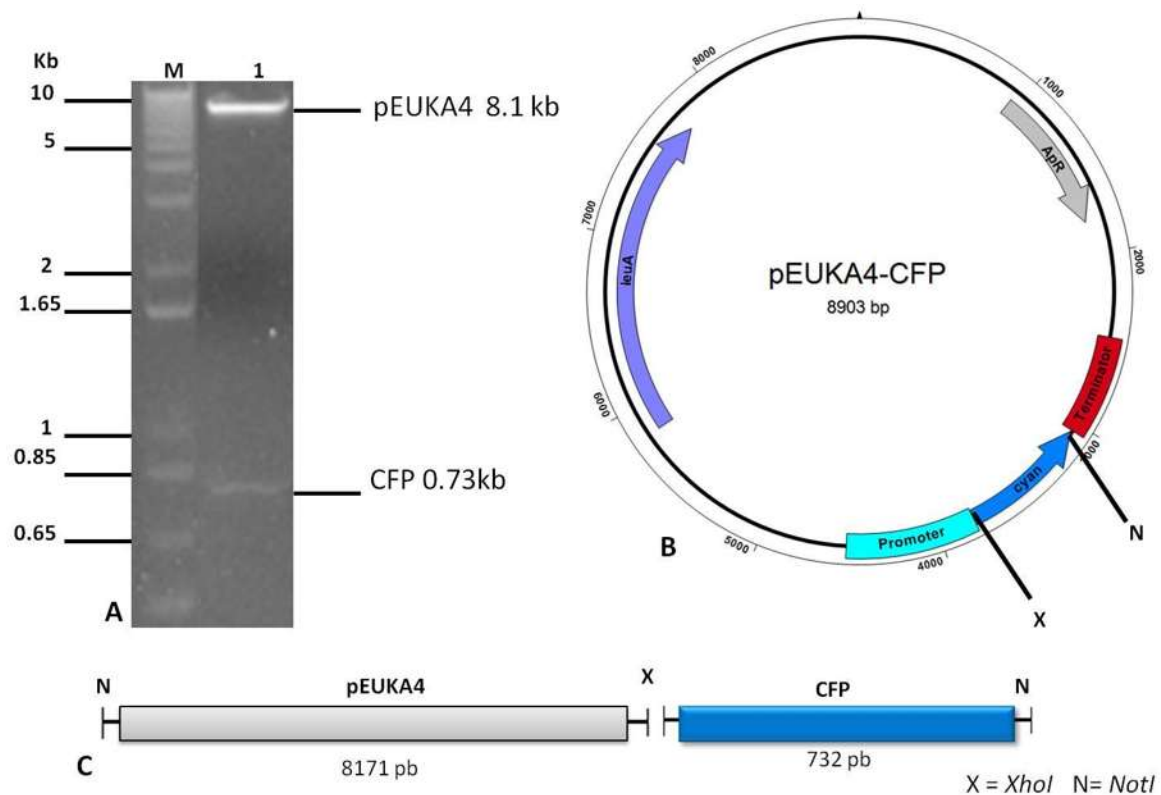


Figura 12. Sub-clonación del gen *CFP* en el vector pEUK4.

A. Se muestra el corrimiento electroforético de la restricción de la construcción pEUK4-CFP, en la cual se distinguen las dos bandas correspondientes al gen *CFP* de 0.73 kb aproximadamente y de 8.1 kb aproximadamente correspondiente al vector pEUK4. **B.** Se muestra el mapa circular de la construcción en la cual se puede apreciar la presencia del promotor y el terminador antes y después del gen *CFP*. **C.** Se muestran los tamaños por separado del gen *CFP* y del vector pEUK4, además de los sitios de restricción de las enzimas utilizadas *XhoI* y *NotI*.

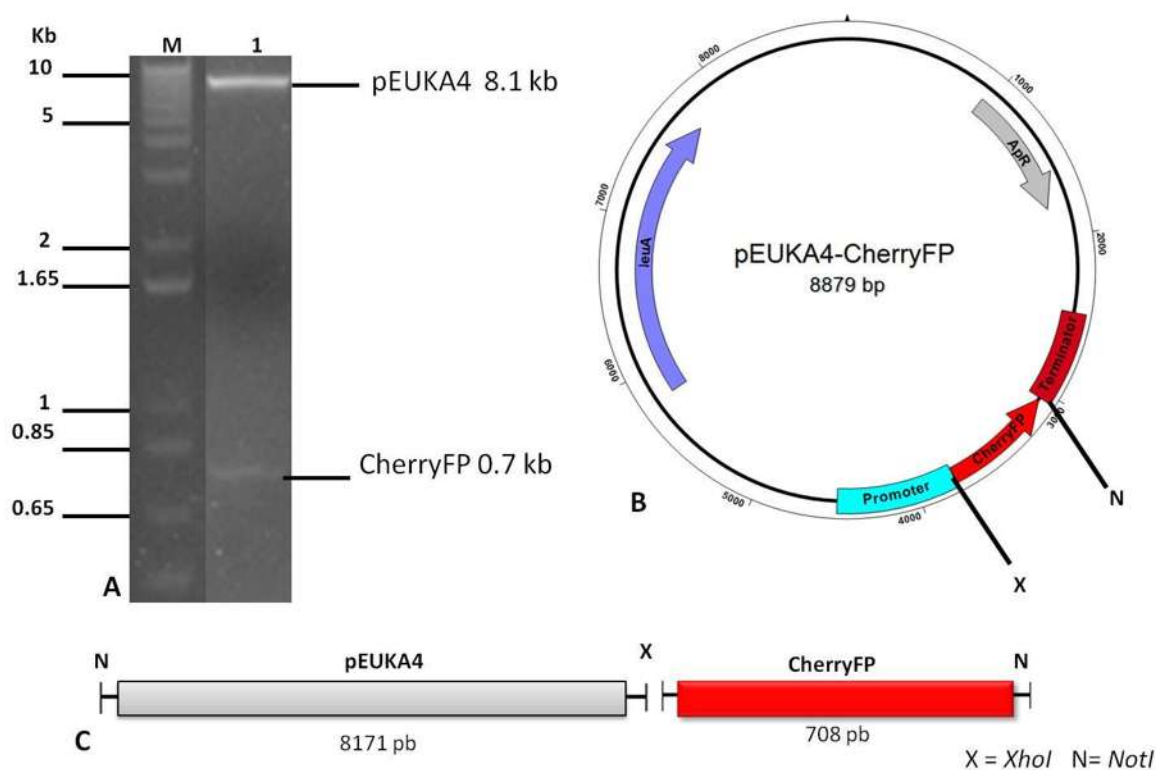


Figura 13. Sub-clonación del gen *CherryFP* en el vector pEUK4.

A. Se muestra el corrimiento electroforético de la restricción de la construcción pEUK4-CherryFP, en la cual se distinguen las dos bandas correspondientes al gen *CherryFP* de 0.7 kb aproximadamente y de 8.1 kb aproximadamente correspondiente al vector pEUK4. **B.** Se muestra el mapa circular de la construcción en la cual se puede apreciar la presencia del promotor y el terminador antes y después del gen *CherryFP*. **C.** Se muestran los tamaños por separado del gen *CherryFP* y del vector pEUK4, además de los sitios de restricción de las enzimas utilizadas *XhoI* y *NotI*.

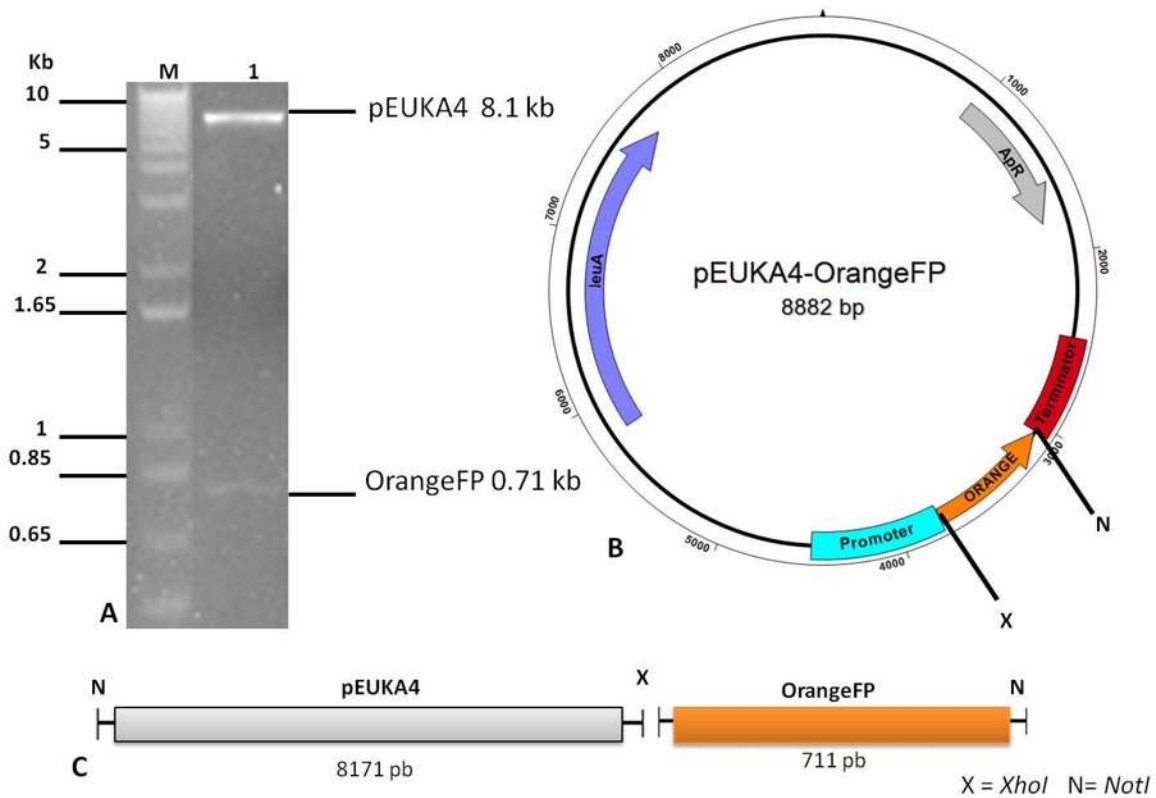


Figura 14. Sub-clonación del gen *OrangeFP* en el vector pEUK4.

A. Se muestra el corrimiento electroforético de la restricción de la construcción pEUK4-OrangeFP, en la cual se distinguen las dos bandas correspondientes al gen *OrangeFP* de 0.71 kb aproximadamente y de 8.1 kb aproximadamente correspondiente al vector pEUK4. **B.** Se muestra el mapa circular de la construcción en la cual se puede apreciar la presencia del promotor y el terminador antes y después del gen *OrangeFP*. **C.** Se muestran los tamaños por separado del gen *OrangeFP* y del vector pEUK4, además de los sitios de restricción de las enzimas utilizadas *XhoI* y *NotI*.

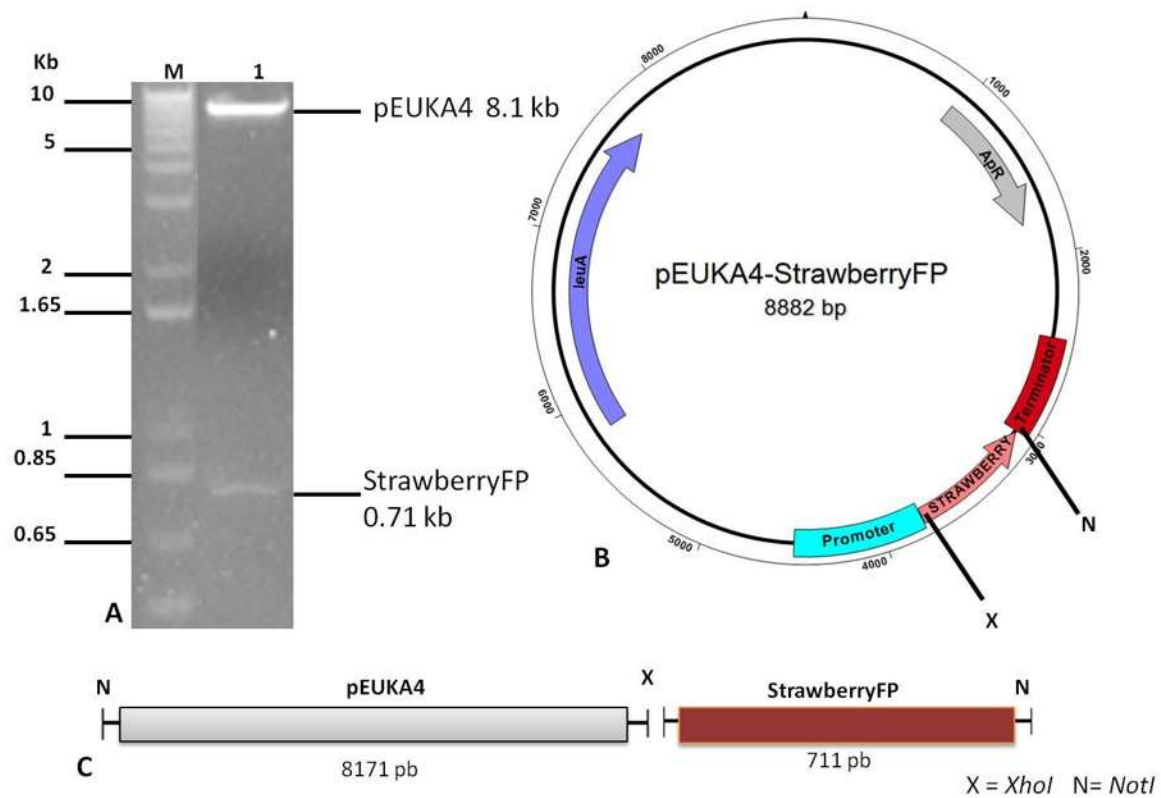


Figura 15. Sub-clonación del gen *StrawberryFP* en el vector pEUK4.

A. Se muestra el corrimiento electroforético de la restricción de la construcción pEUK4-StrawberryFP, en la cual se distinguen las dos bandas correspondientes al gen *StrawberryFP* de 0.71 kb aproximadamente y de 8.1 kb aproximadamente correspondiente al vector pEUK4. **B.** Se muestra el mapa circular de la construcción en la cual se puede apreciar la presencia del promotor y el terminador antes y después del gen *StrawberryFP*. **C.** Se muestran los tamaños por separado del gen *StrawberryFP* y del vector pEUK4, además de los sitios de restricción de las enzimas utilizadas *XhoI* y *NotI*.

6.4. Comparación del micelio de la cepa silvestre con la cepa transformada con el gen *EGFP*

Las cepas transformadas con las construcciones obtenidas en las subclonaciones de los genes que codifican para proteínas fluorescentes fueron sembradas nuevamente, para la obtención de esporas, las cuáles se crecieron en aerobiosis por 6 hrs y se observaron en el microscopio confocal adaptándolo para cada tipo de proteína fluorescente.

Cada cepa transformada fue comparada con la autofluorescencia de la cepa silvestre, de lo cual se obtuvo lo siguiente.

La autofluorescencia de la cepa *Mucor circinelloides* en el espectro verde fue muy evidente esta puede observarse en la Figura 16, en donde se muestra claramente este fenómeno.

Posteriormente se realizó la preparación en un portaobjetos del cultivo líquido de la cepa transformada con la construcción correspondiente al gen EGFP, y se observó a través del microscopio confocal con los mismos ajustes que en la silvestre, obteniéndose una fluorescencia similar a la de la cepa control, por lo que en la Figura 17 puede apreciarse la comparación entre cada una de las cepas en la fluorescencia correspondiente al espectro en verde.

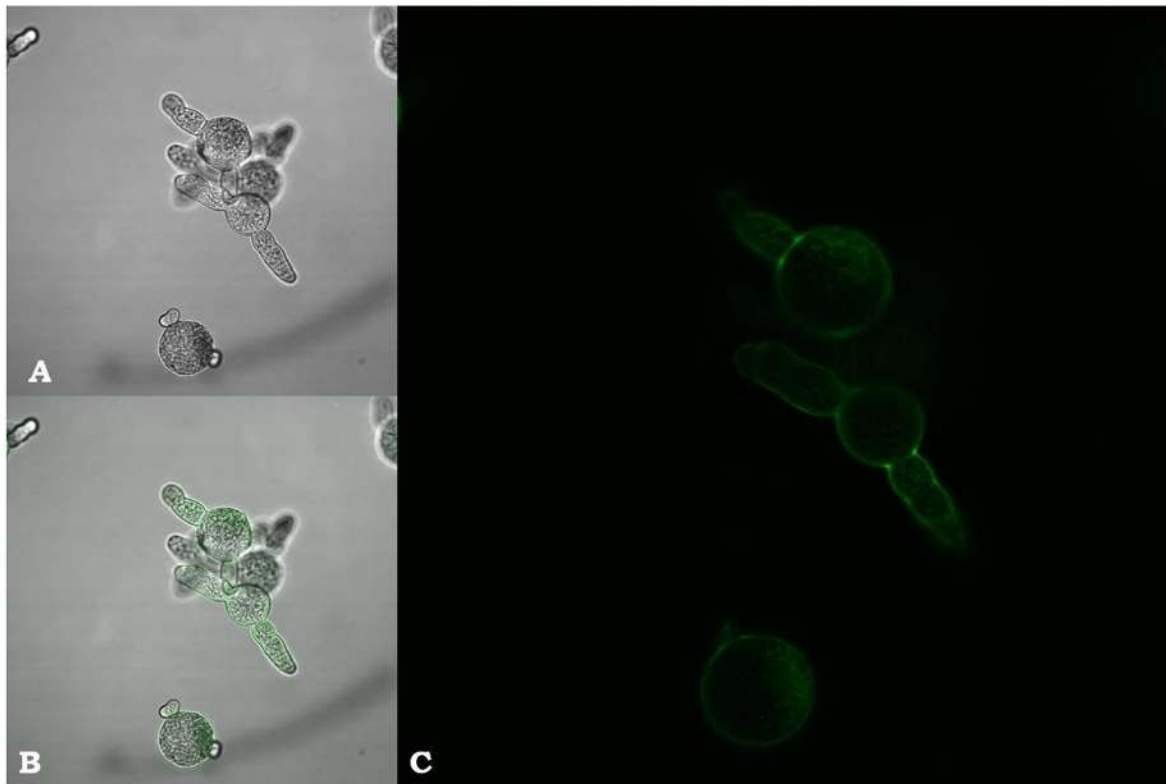


Figura 16. Autofluorescencia de la cepa *Mucor circinelloides* R7B en el espectro verde.

A. Microscopía óptica micelio de *Mucor circinelloides*. **B.** Microscopia confocal en campo claro donde puede apreciarse la autofluorescencia en verde de *Mucor circinelloides*. **C.** Campo oscuro. El micelio se dejó en crecimiento por 6 hrs a 28°C en agitación (medio YNB a una concentración de 7 g/mL).

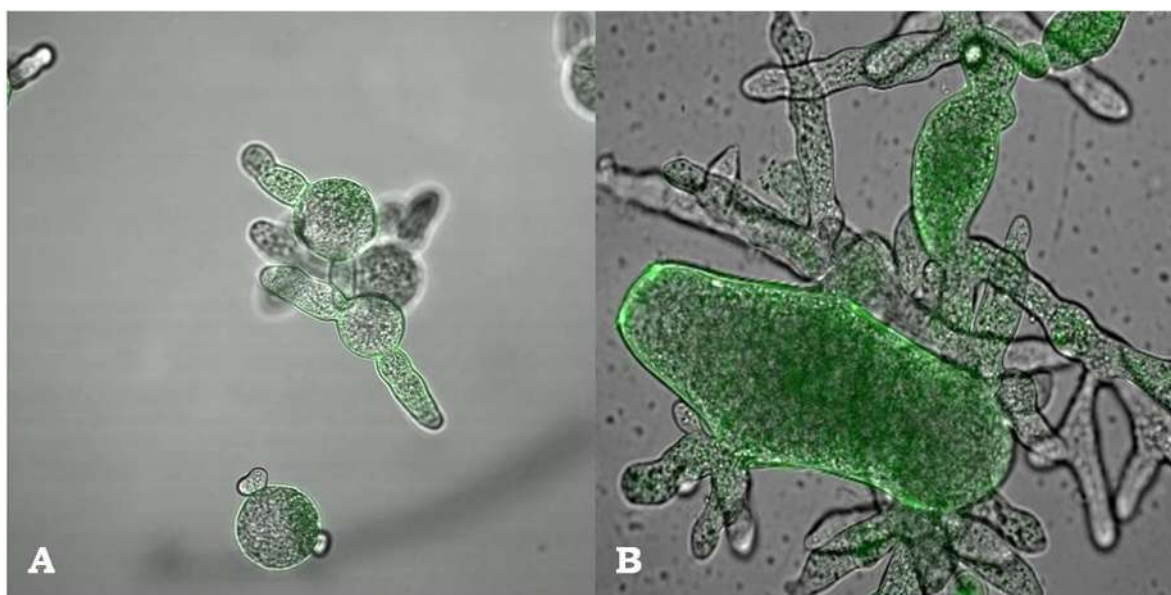


Figura 17. Comparación de la fluorescencia entre la cepa control y la transformante EGFP de *Mucor circinelloides*.

A. Autofluorescencia de la cepa control de *Mucor circinelloides*.

B. Cepa transformada con el gen *EGFP*. Comparando ambas imágenes se aprecia la misma autofluorescencia.

6.5. Comparación del micelio de la cepa silvestre con la cepa transformada con el gen *RFP*

Se realizó una preparación de la cepa control de *Mucor circinelloides* R7B para observar al microscopio confocal, para mostrar la autofluorescencia de la cepa *Mucor circinelloides* en el espectro rojo la cual fue evidente, en la Figura 18 se puede observar en diferentes campos este fenómeno.

Posteriormente se realizó el mismo procedimiento con la cepa transformada con la construcción correspondiente al gen *RFP*, y se observó a través del microscopio confocal con los mismos ajustes que en la silvestre, obteniéndose una fluorescencia similar a la de la cepa control, por lo que en la Figura 19 puede observar una comparación entre cada una de las cepas en la fluorescencia correspondiente al espectro en rojo.

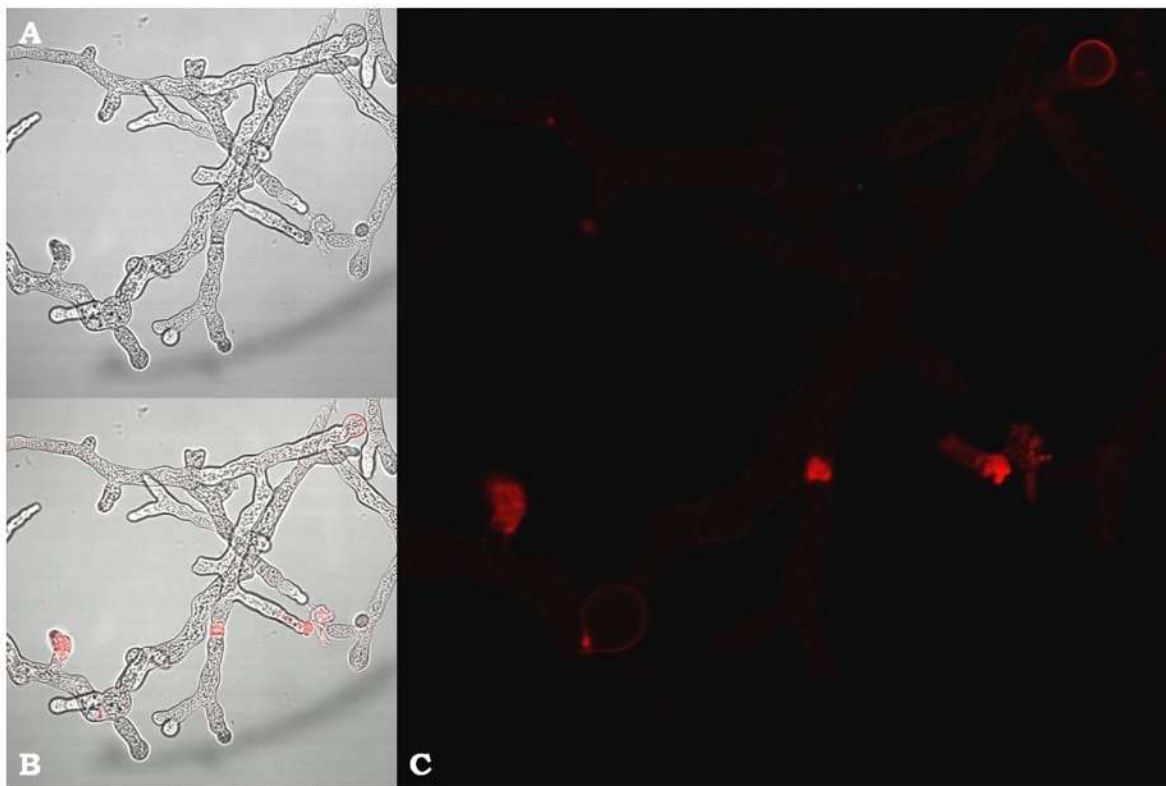


Figura 18. Autofluorescencia de la cepa *Mucor circinelloides* R7B en el espectro rojo.

A. Microscopía óptica micelio de *Mucor circinelloides*. **B.** Microscopia confocal en campo claro donde puede apreciarse la autofluorescencia en rojo de *Mucor circinelloides*. **C.** Campo oscuro. El micelio se dejó en crecimiento por 6 hrs a 28°C en agitación (medio YNB a una concentración de 7 g/mL).

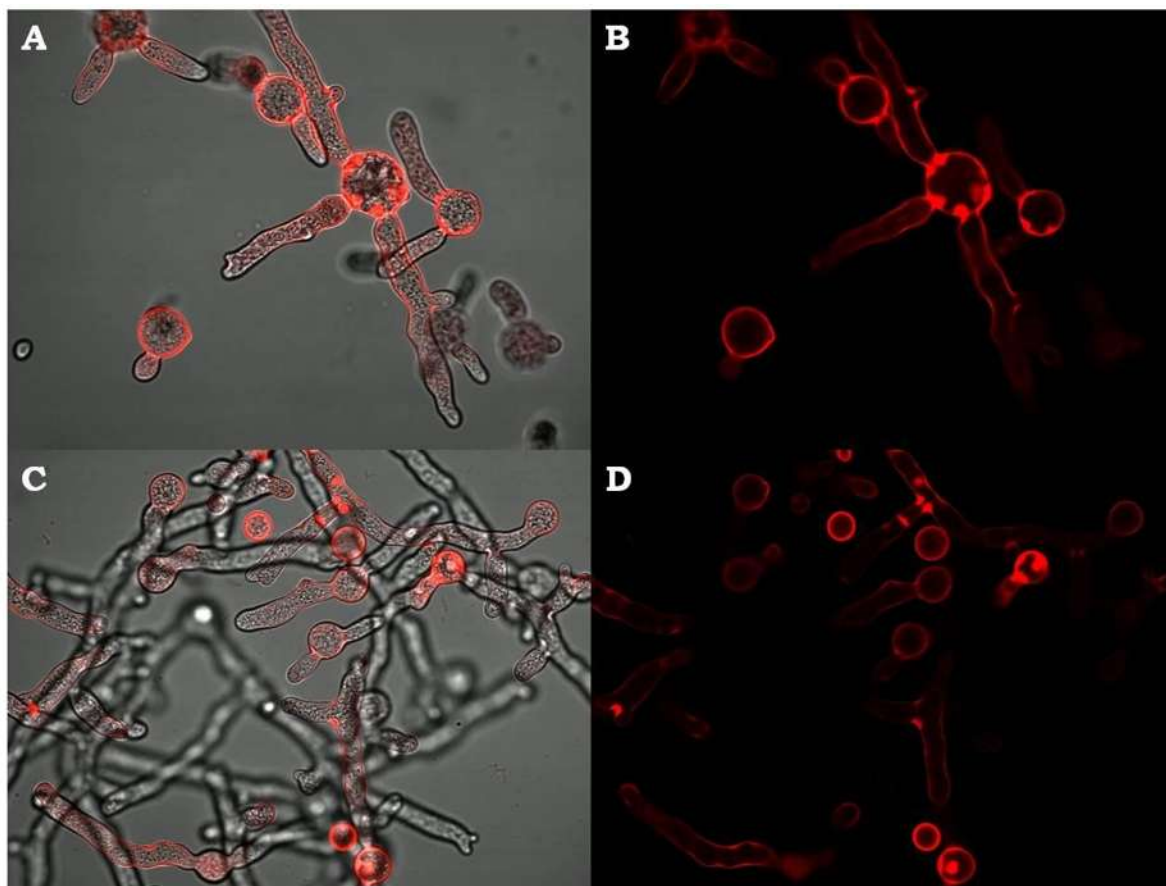


Figura 19. Comparación de la fluorescencia entre la cepa control y la transformante RFP de *Mucor circinelloides*.

A. Autofluorescencia de la cepa control de *Mucor circinelloides*. **B.** Autofluorescencia de la cepa control de *Mucor circinelloides* en campo oscuro. **C.** Cepa transformada con el gen *RFP*. **D.** Cepa transformada con el gen *RFP* en campo oscuro. Comparando ambas imágenes se aprecia la misma fluorescencia.

6.6. Comparación del micelio de la cepa silvestre con la cepa transformada con el gen *CFP*

Se realizó una preparación de la cepa control de *Mucor circinelloides* R7B para observar al microscopio confocal, para mostrar la autofluorescencia de la cepa *Mucor circinelloides* en el espectro azul la cual fue evidente, en la Figura 20 se puede observar en diferentes campos este fenómeno.

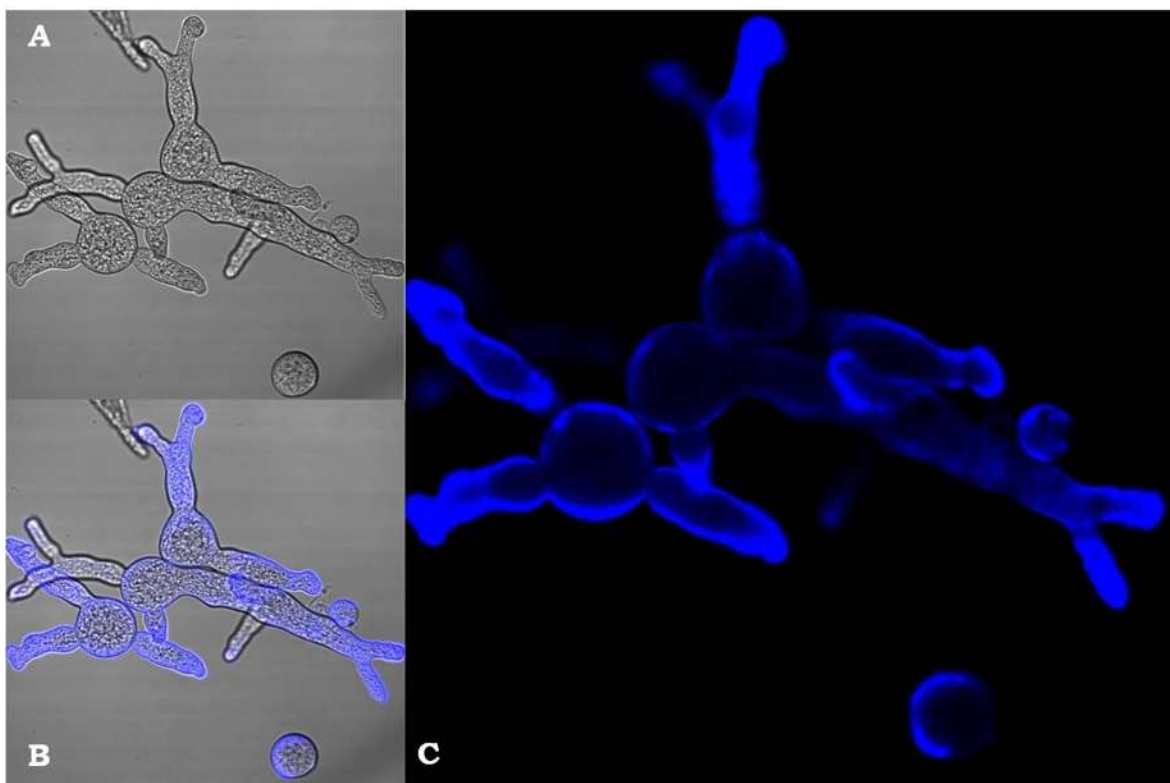


Figura 20. Autofluorescencia de la cepa *Mucor circinelloides* R7B en el espectro azul.

A. Microscopía óptica micelio de *Mucor circinelloides*. **B.** Microscopia confocal en campo claro donde puede apreciarse la autofluorescencia en azul de *Mucor circinelloides*. **C.** Campo oscuro.

Se compararon la autofluorescencia de la cepa *Mucor circinelloides* R7B en el espectro del azul con la de la cepa *Mucor circinelloides* R7B transformada con el gen *CFP* y se observó una gran semejanza como puede apreciarse en la Figura 21.

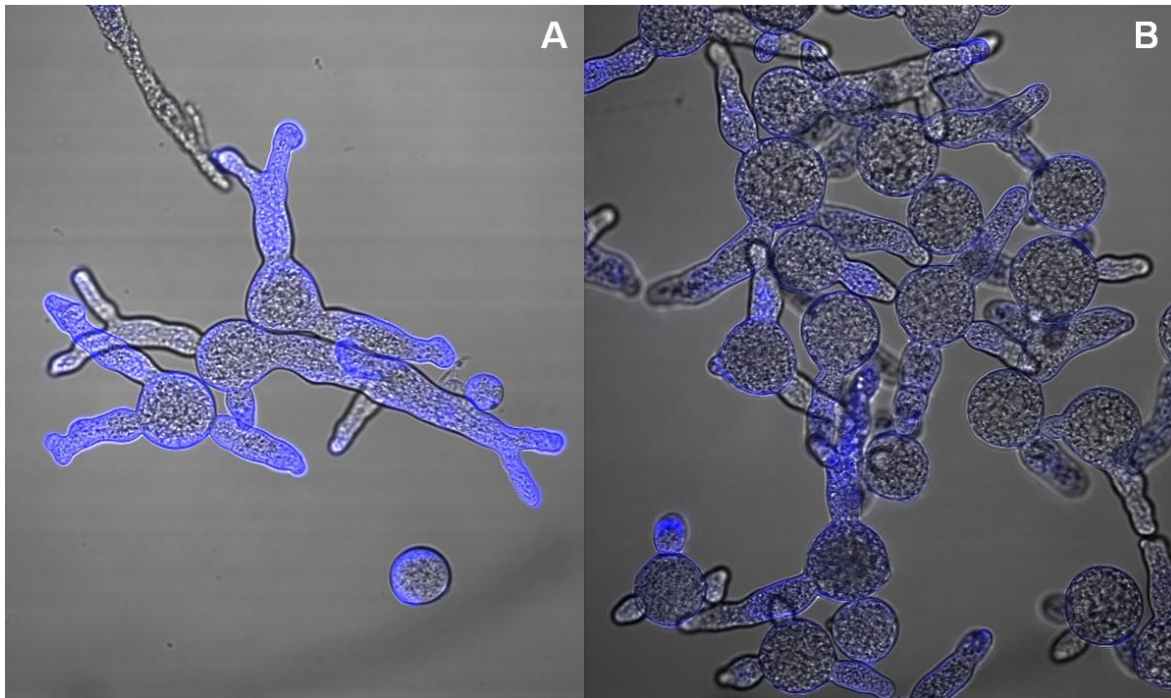


Figura 21. Comparación de la fluorescencia entre la cepa control y la transformante *CFP* de *Mucor circinelloides*.

A. Autofluorescencia de la cepa control de *Mucor circinelloides*. **B.** Cepa transformada con el gen *CFP*. Comparando ambas imágenes se aprecia la misma fluorescencia.

6.7. Comparación de la autofluorescencia en los diferentes rangos del espectro para cada una de las cepas.

En este experimento se hicieron incidir los 3 diferentes tipos de laser con los que cuenta el equipo los cuales son: **Azul (405 nm)**, **Verde (488 nm)**, **Rojo (543 nm)**, para observar cuál de ellos presentaba una mayor apreciación.

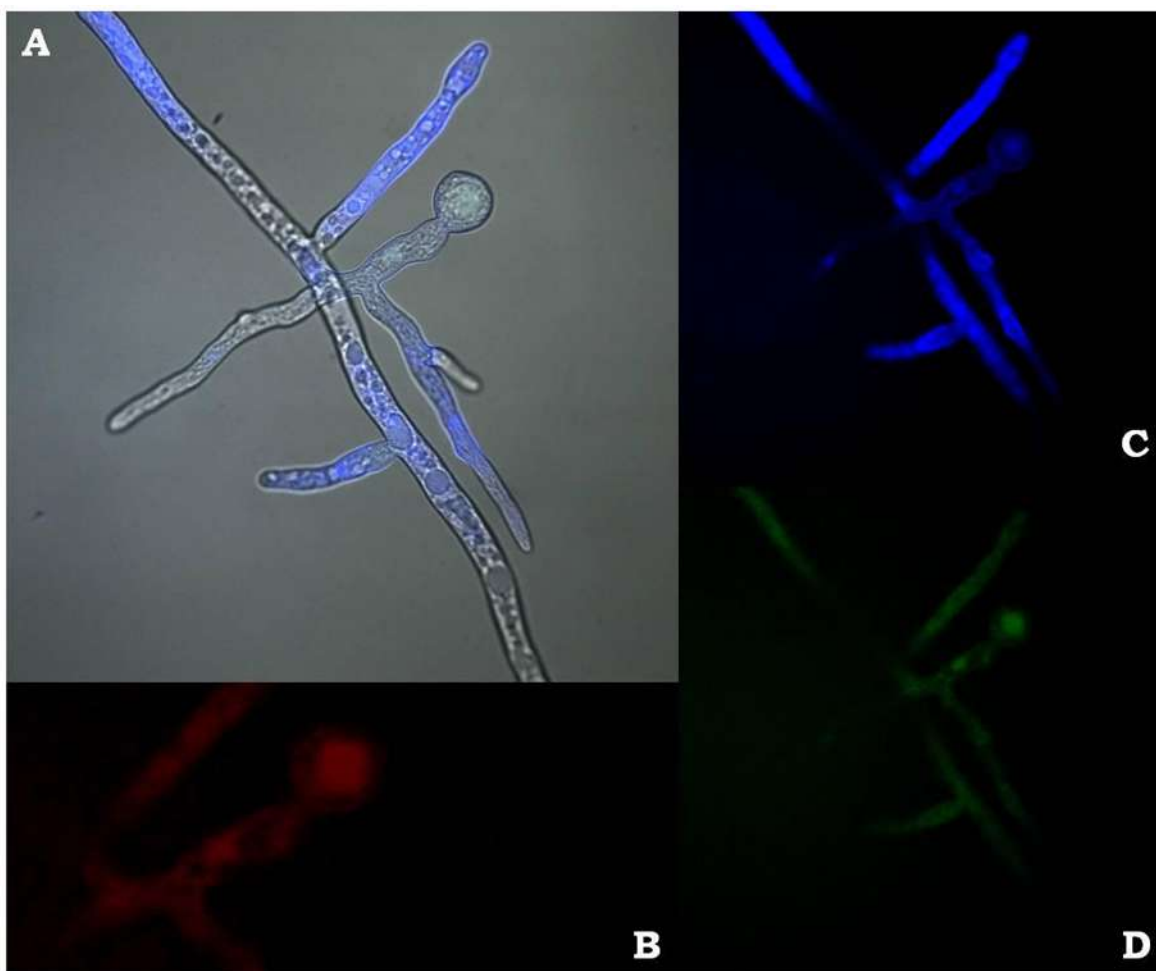


Figura 22. Incidencia las tres longitudes de onda del laser en la cepa control de *Mucor circinelloides* R7B. **A.** En la imagen se puede apreciar el micelio de la cepa control *Mucor circinelloides* R7B en la cual están incidiendo los tres laser del microscopio confocal pudiendo apreciar la autofluorescencia azul de una manera más fuerte que el verde y una pequeña del rojo. **B.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en rojo, donde podemos observar que es la más disminuida de las tres. **C.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en azul la cual es la más apreciable que las otras dos. **D.** Se observa en la imagen en campo oscuro la autofluorescencia en verde.

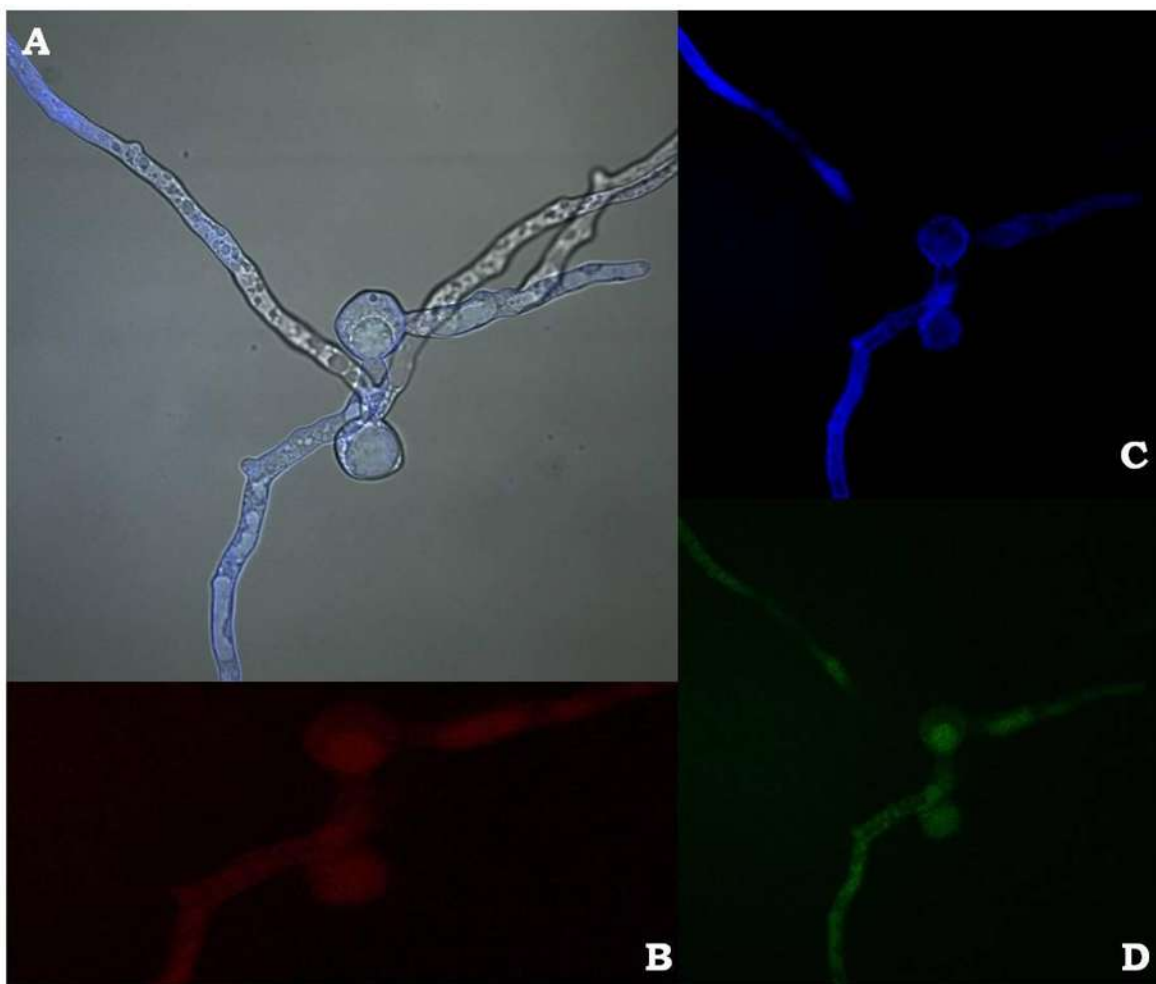


Figura 23. Incidencia de los tres longitudes de onda del laser en la cepa transformada de *Mucor circinelloides* R7B con el gen *EGFP*.

A. En la imagen se puede apreciar el micelio de la cepa control *Mucor circinelloides* R7B en la cual están incidiendo los tres laser del microscopio confocal pudiendo apreciar la autofluorescencia azul de una manera más fuerte que el verde y una pequeña del rojo. **B.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en rojo, donde podemos observar que es la más disminuida de las tres. **C.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en azul la cual es la más apreciable que las otras dos. **D.** Se observa en la imagen en campo oscuro la autofluorescencia en verde.

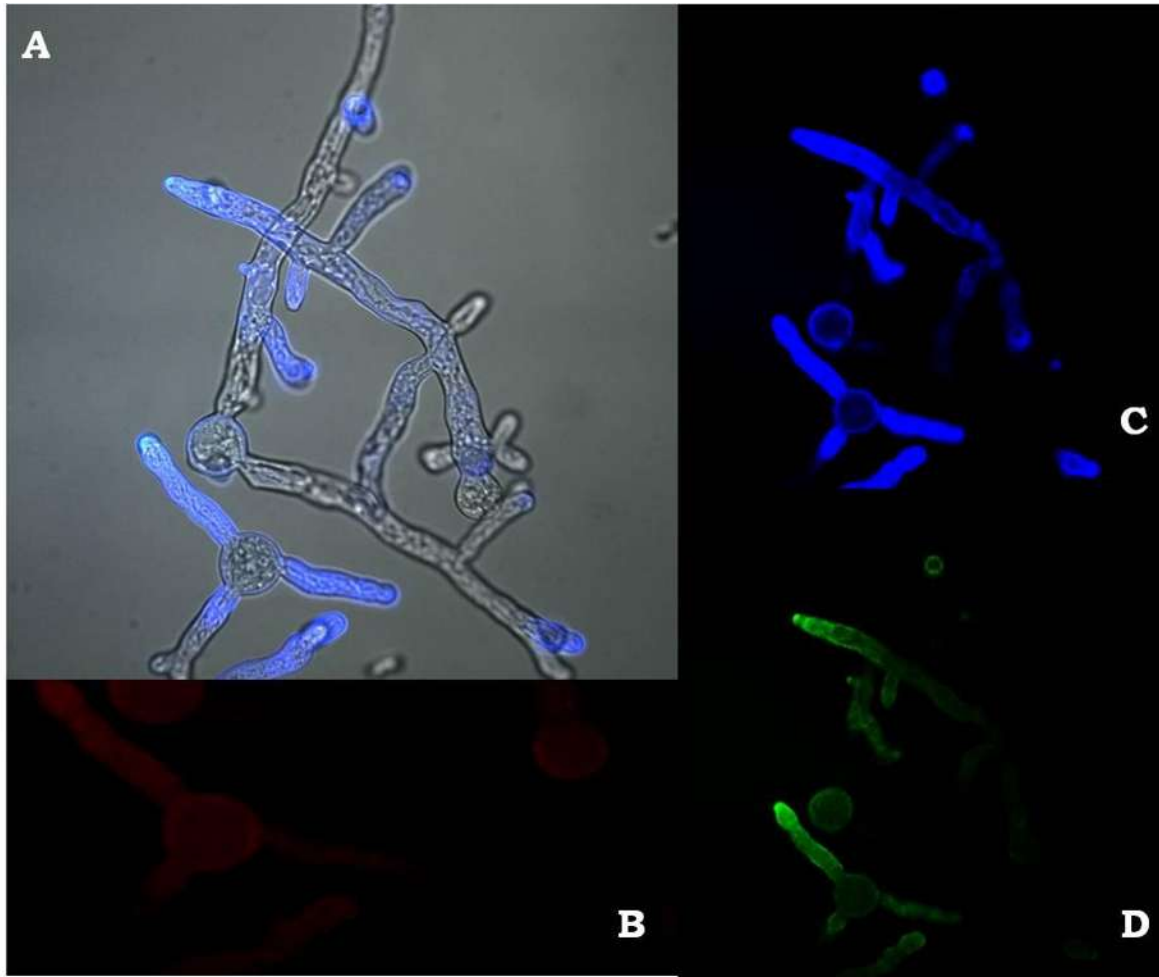


Figura 24. Incidencia las tres longitudes de onda del laser en la cepa transformada de *Mucor circinelloides* R7B con el gen *RFP*.

A. En la imagen se puede apreciar el micelio de la cepa control *Mucor circinelloides* R7B en la cual están incidiendo los tres laser del microscopio confocal pudiendo apreciar la autofluorescencia azul de una manera más fuerte que el verde y una pequeña del rojo. **B.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en rojo, donde podemos observar que es la más disminuida de las tres. **C.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en azul la cual es la más apreciable que las otras dos. **D.** Se observa en la imagen en campo oscuro la autofluorescencia en verde.

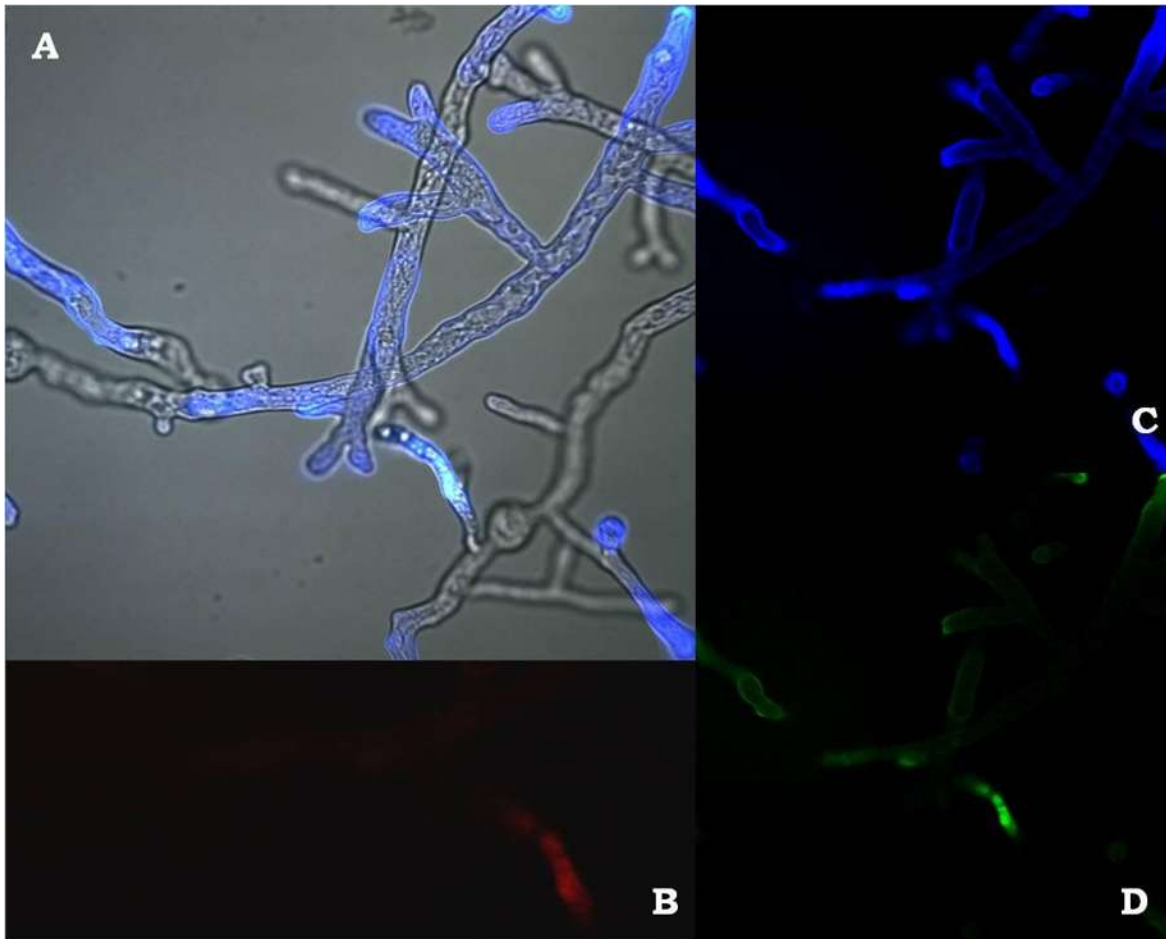


Figura 25. Incidencia de las tres longitudes de onda del laser en la cepa transformada de *Mucor circinelloides* R7B con el gen CFP.

A. En la imagen se puede apreciar el micelio de la cepa control *Mucor circinelloides* R7B en la cual están incidiendo los tres laser del microscopio confocal pudiendo apreciar la autofluorescencia azul de una manera más fuerte que el verde y una pequeña del rojo. **B.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en rojo, donde podemos observar que es la más disminuida de las tres. **C.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en azul la cual es la más apreciable que las otras dos. **D.** Se observa en la imagen en campo oscuro la autofluorescencia en verde.

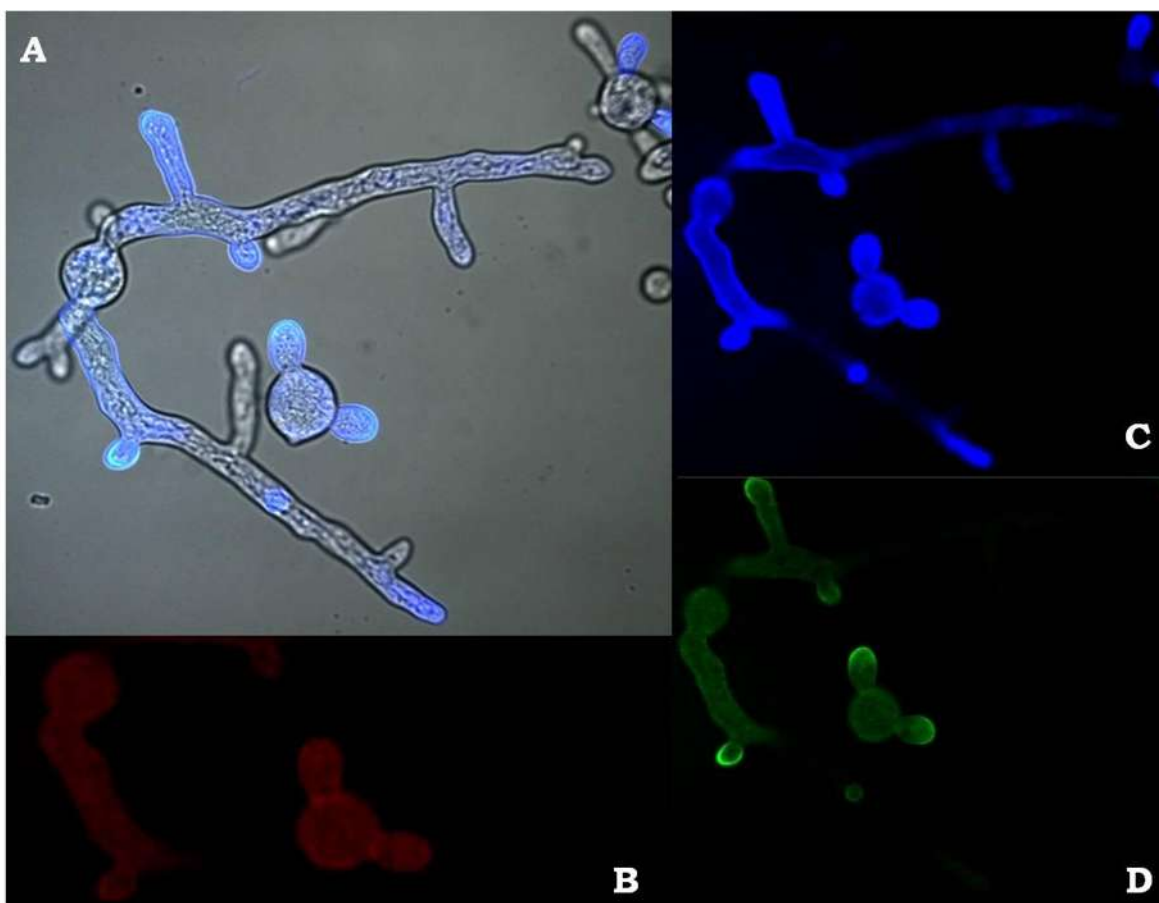


Figura 26. Incidencia las tres longitudes de onda del laser en la cepa transformada de *Mucor circinelloides* R7B con el gen *CherryFP*.

A. En la imagen se puede apreciar el micelio de la cepa control *Mucor circinelloides* R7B en la cual están incidiendo los tres laser del microscopio confocal pudiendo apreciar la autofluorescencia azul de una manera más fuerte que el verde y una pequeña del rojo. **B.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en rojo, donde podemos observar que es la más disminuida de las tres. **C.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en azul la cual es la más apreciable que las otras dos. **D.** Se observa en la imagen en campo oscuro la autofluorescencia en verde.

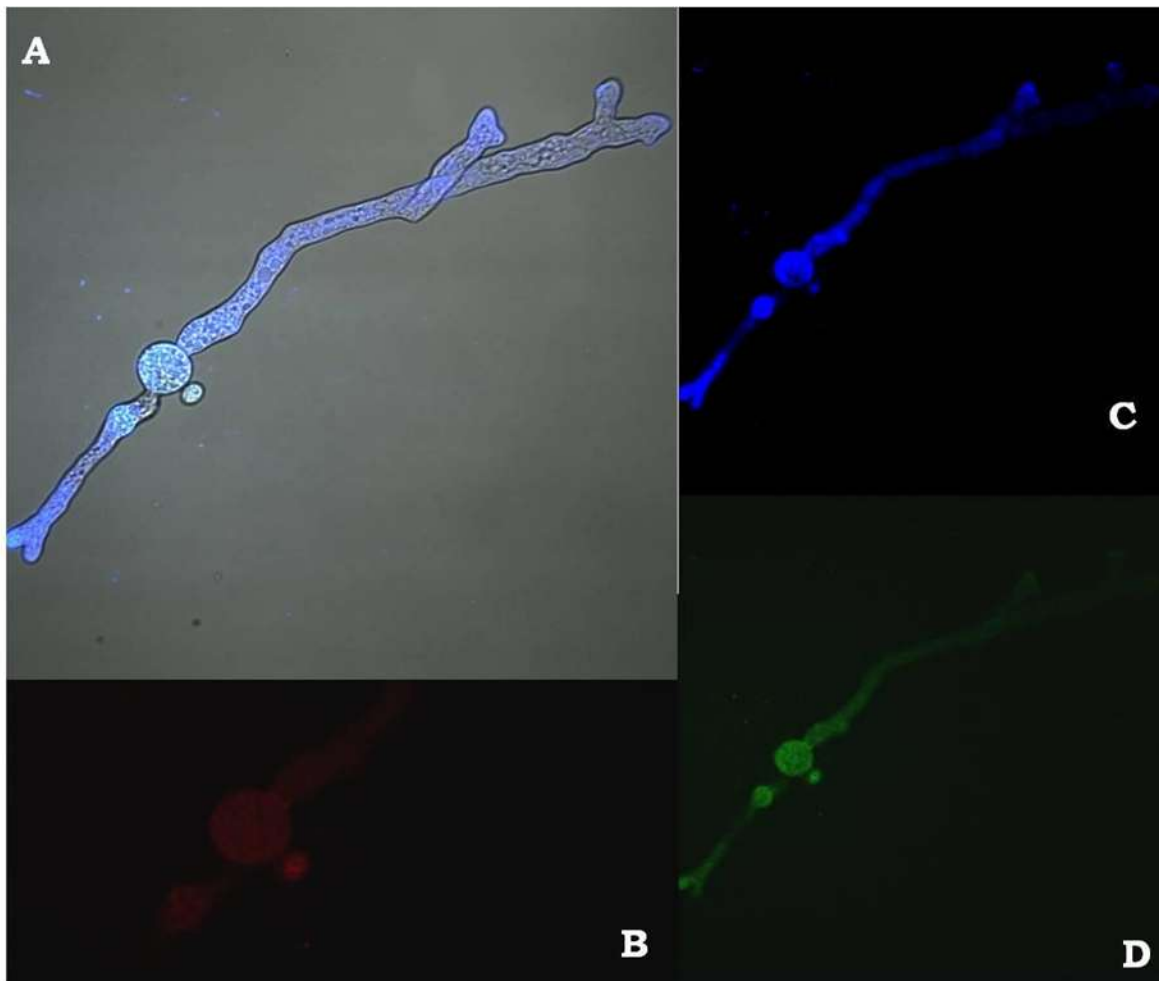


Figura 27. Incidencia de las tres longitudes de onda del laser en la cepa transformada de *Mucor circinelloides* R7B con el gen *OrangeFP*.

A. En la imagen se puede apreciar el micelio de la cepa control *Mucor circinelloides* R7B en la cual están incidiendo los tres laser del microscopio confocal pudiendo apreciar la autofluorescencia azul de una manera más fuerte que el verde y una pequeña del rojo. **B.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en rojo, donde podemos observar que es la más disminuida de las tres. **C.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en azul la cual es la más apreciable que las otras dos. **D.** Se observa en la imagen en campo oscuro la autofluorescencia en verde.



Figura 28. Incidencia de las tres longitudes de onda del laser en la cepa transformada de *Mucor circinelloides* R7B con el gen *StrawberryFP*.

A. En la imagen se puede apreciar el micelio de la cepa control *Mucor circinelloides* R7B en la cual están incidiendo los tres laser del microscopio confocal pudiendo apreciar la autofluorescencia azul de una manera más fuerte que el verde y una pequeña del rojo. **B.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en rojo, donde podemos observar que es la más disminuida de las tres. **C.** En la imagen se puede apreciar en campo oscuro la autofluorescencia en azul la cual es la más apreciable que las otras dos. **D.** Se observa en la imagen en campo oscuro la autofluorescencia en verde.

6.8. Autofluorescencia de *Mucor circinelloides* en su forma levaduriforme

Además de la forma miceliar *Mucor* presenta forma levaduriforme ya que es un hongo dimórfico como se había mencionado con anterioridad, estas levaduras también fueron observadas a través de la microscopia confocal y se observaron los siguientes resultados.

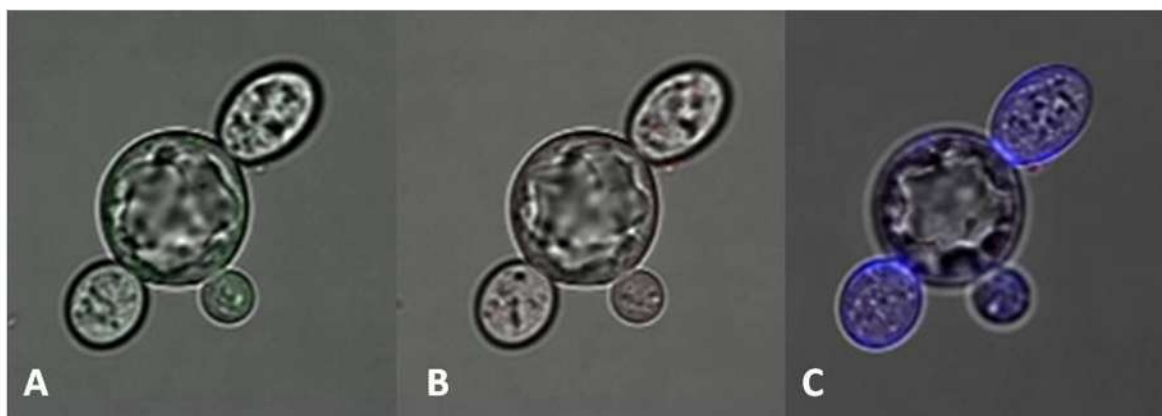


Figura 29. Autofluorescencia de la fase levaduriforme de la cepa *Mucor circinelloides* R7B.

A. En la imagen se puede observar la autofluorescencia en el espectro verde, la cual podemos ver que es muy poca comparada con la forma miceliar. **B.** Se observa la autofluorescencia de la levadura en el espectro del rojo, la cual es menos apreciable que el verde. **C.** Podemos apreciar la clara autofluorescencia en azul de la forma levaduriforme la cual es muy evidente comparada con las otras dos. **Las levaduras crecieron en medio Lee, en un matraz en anaerobiosis.**

6.9. Evaluación de la autofluorescencia de las cepas transformadas de *Mucor circinelloides* R7B

Se crecieron las cepas transformadas con los genes EGFP, RFP y CFP en forma anaerobia para la producción de levaduras en medio mínimo Lee, las cuales posteriormente fueron evaluadas en el microscopio confocal como se muestra en la Figura 30.

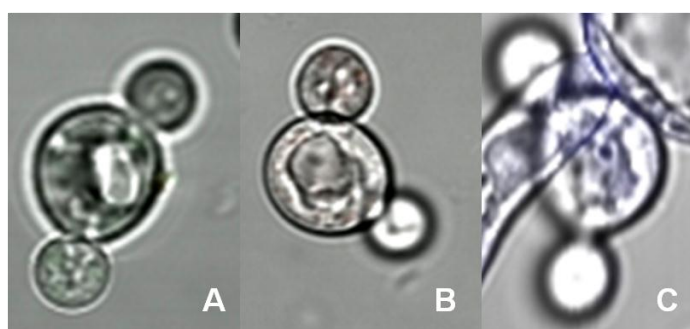


Figura 30. Levaduras de cepas transformadas de *Mucor circinelloides* R7B con los genes EGFP, RFP y CFP.

A. Se muestra a la cepa transformada con el gen EGFP, observándose una fluorescencia parecida a la cepa control en el espectro verde mostrada en la Figura 29 A. **B.** En la imagen se muestra la escasa fluorescencia de la cepa transformada con el gen RFP, la cual es parecida a la de la cepa control Figura 29 B. **C.** Podemos observar en su forma levaduriforme a la cepa transformada con el gen CFP la cual muestra una fluorescencia un poco menor que la control Figura 29 C.

7. DISCUSIÓN

Mucor circinelloides es un hongo dimórfico, el cual pertenece a la clase de los Zygomycetes. Se caracteriza por presentar una reproducción sexual por Zigosporas. Es considerado un buen modelo de estudio en procesos de diferenciación celular (Murcia-Flores y col., 2007).

Para este zygomyceto dimórfico no existe una herramienta molecular por medio de la cuál nosotros podamos observar procesos biológicos *in vivo*, siendo las proteínas fluorescentes una buena opción para tratar de resolver esta problemática. Ya que han sido utilizadas en diversos tipos de hongos dimórficos entre ellos *U. maydis* quien fue el primer hongo filamentoso en el cuál fue expresada con éxito la proteína verde fluorescente (GFP) (Spelling y col., 1996).

Realizamos las construcciones con genes que codifican para proteínas fluorescentes, insertándolas en un vector de expresión que permitiría que éstas pudieran expresarse en el hongo, este vector es pEUK4 el cual contiene el promotor del gen *gpd-1* el cual se activa a concentraciones altas de glucosa (>1% de glucosa) en el medio (Mette & Arnau, 2002).

Al evaluar las cepas de *M. circinelloides* ya transformadas con los vectores de expresión que contenían los diferentes genes de proteínas fluorescentes, se observó la misma fluorescencia que el control no transformado. La autofluorescencia de la pared de *M. circinelloides* en la forma miceliar es muy intensa y puede apreciarse en diferentes longitudes del espectro visible, rojo, verde y azul; siendo este último el más evidente.

Existe la posibilidad que diversos organismos produzcan cierta autofluorescencia, ya que es un fenómeno común, en el cual ciertos compuestos endógenos absorben luz a una determinada longitud de onda y posteriormente emiten energía a una longitud más larga. Dichas moléculas se encuentran en diversos organismos, tales como plantas, mamíferos, hongos, entre otros, entre los principales compuestos responsables del fenómeno de la autofluorescencia se encuentran las flavinas (Benson y col., 1979), el NADH⁺, NADPH, Lipofuscinas,

Elastina, Colágeno, Lignina, Clorofila (Knight & Billinton 2001). También se ha observado que la autofluorescencia se muestra principalmente en mitocondrias y cloroplastos (Monici, 2005).

Se ha visualizado la autofluorescencia celular en diferentes tipos de hongos, entre ellos se encuentran los basidiomicetos *Macrolepiota rhacodes* (Žižka y col., 2008) y *Fomes fomentarius* (Žižka y col., 2006) y ascomicetos como *Morchella conica* (Žižka y col., 2011).

De igual manera, y de acuerdo a los antecedentes ya mencionados, nosotros encontramos en este trabajo que *M. circinelloides* presenta el fenómeno biológico de la autofluorescencia.

Debido a que la autofluorescencia es un problema, se han desarrollado estrategias para poder corregirla entre ellas están, la optimización del uso de filtros ópticos (Knight & Billinton 2001), la cual nos permite distinguir de la fluorescencia de la GFP sobre la autofluorescencia natural del organismo; otro método aplicable es el de la corrección por doble longitud de onda, los cuales son incididos al mismo tiempo en la muestra y uno opaca al fondo de la autofluorescencia permitiendo visualizar la fluorescencia de GFP (Knight & Billinton 2001). Además para resolver la posible no expresión de los genes que codifican para proteínas fluorescentes, una posibilidad sería el cambio de codones para ciertos organismos.

La autofluorescencia de *M. circinelloides* es tan grande que no permite la apreciación de las proteínas fluorescentes, otra razón puede ser que las proteínas fluorescentes son utilizadas en mamíferos, por lo que sería necesario realizar la modificación de codones a este mucoral. (Kilaru y col., 2015)

Al evaluar esto podríamos llegar a usar otro tipo de herramientas que nos permitan tratar de evaluar fenómenos en *M. circinelloides* con la desventaja de que estos no pueden realizarse *in vivo* como las FP's nos permiten realizarlo, algunas de esas técnicas son el uso de anticuerpos cargados con grupos cromóforos que permitan señalar la presencia de cierta molécula.

8. CONCLUSIÓN

Las construcciones realizadas para la expresión de los genes que codifican para proteínas fluorescentes, no pudieron ser evaluadas debido a la evidente autofluorescencia que presenta *M. circinelloides*. Dicho fenómeno se presenta en otros organismos debido a la presencia de compuestos como: flavinas, NADH; sin embargo existen estrategias como, la optimización del uso de filtros ópticos, la corrección por doble longitud de onda o el cambio de codones, que han sido utilizadas para abordar este problema, las cuales sugeriríamos como una perspectiva del trabajo.

9. Referencias

- Adams, P.R. & Deploey, J.J. (1976) Amylase production by *Mucor pusillus* and *Mucor miehei* Mycologia **68**: 934 – 938.
- Ai, H.W., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., & Campbell, R.E. (2008) Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. Nat. Methods, **5**: 401-403.
- Ai, H.W., Shaner, N.C., Cheng, Z., Tsien, R.Y. & Campbell R.E. (2007) Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. Biochemistry **46**: 5904 – 5910.
- Ai, H.W., Shaner, N.C., Cheng, Z., Tsien, R.Y., & Campbell, R.E. (2007) Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. Biochemistry, **46**: 5904-5910.
- Arima, K., Jwasaki, S. & Tamura G. (1968) Milk-clotting enzyme from microorganisms. V. Purification and crystallization of *Mucor rennin* from *Mucor pusillus* var. Lindt. Appl. Microbiol. **16**: 1727 – 1733.

Balance, D.J., Buxton, F.P. & Turner, G. (1983) Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **112**: 284 – 289.

Bartnicki-Garcia, S. (1968) Control of Dimorphism in *Mucor* by Hexoses: Inhibition of Hyphal Morphogenesis. *Journ. of Bacter.* **96**: 1586-1594.

Bartnicki-Garcia, S. (1968) Control of Dimorphism in *Mucor* by Hexoses: Inhibition of Hyphal Morphogenesis. *Journ. of Bacter.* **96**: 1586-1594.

Bastidas R.J., Shertz C.A., Lee S.C., Heitman J. (2012) Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of Tor. Eukaryotic cell **11**:270-281.

Benson, R.C., Meyer, R.A., Zaruba, M.E. & McKhann, G.M. (1979) Cellular autofluorescence—is it due to flavins?. J. Histochem Cytochem **27** (1): 44 – 48.

Blasco, J.L., García-Sánchez, M.A., Ruíz-Herrera, J., Eslava, A.P. & Iturriaga, E.A. (2001) A gene coding for ornithine decarboxylase (odcA) is differentially expressed during the *Mucor circinelloides* yeast-to-hypha transition. Res. in Micro. **153**: 155 – 164.

Bokman, S.H. & Ward, W.W. (1981) Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein. Biochem Biophys Res Commun, **101**: 1372-1380.

Bredenkamp A., Velankar H., Van Zyl W.H., Gorgens J.F. (2010) Effect of dimorphic regulation on heterologous glucose oxidase production by *Mucor circinelloides*. Yeast **27**: 849-860

Case, M.E., Schweizer, M., Kushner, S.R. & Giles N.H. (1979) Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 5259 – 5263.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. **263**: 802-805.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as marker for gene expression. *Science*, **263**: 802-805.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802 – 805.

Chen, Y., MacDonald, P.J., Skinner, J.P., Patterson, G.H. & Muller, J.D. (2006) Probing nucleocytoplasmic transport by two-photon activation of PA-GFP. *Microsc Res Tech* **69**: 220 – 226.

Chen, Y., MacDonald, P.J., Skinner, J.P., Patterson, G.H., Muller, J.D. (2006) Probing nucleocytoplasmic transport by two-photon activation of PA-GFP. *Microsc. Res. Tech.*, **69**: 220-226.

Cormack, B. (1998) Green Fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Curr. Opin. in Micro.***1**: 406 – 410.

Corrochano L.M., Ruiz-Albert J. (2004) Nucleotide composition in protein-coding and non-coding DNA in the zygomycete *Phycomyces blakesleeanus*. *Myco. Res.* **108(8)**: 858-863

Cubitt, A.B., Heim, R., Adam, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. & Tsien, R.Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 448 – 455.

Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., & Tsien, R.Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **20**: 448-455.

Culter, M.W., & Ward W.W. (1997) In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Molecular Reporting with Photons*, edited by Hastings J.W., Kriska, L.J., Stanley, P.E. New York: Wiley, 403-406.

Di Pietro, A., García-Maceira, F.I., Mègelecz, E. & Roncero, M.I. (2001) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molec. Micro.y* **39**: 1140 – 1152.

Dimitry, M., Chudakov, Mikhail, V., Matz, Sergey, L., & Konstantin, A.L. (2009) Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol.*, **90**: 1103-1163.

Evdokimov, A.G., Pokross, M.E., Egorov, N.S., Zaraisky, A.G., Yampolsky I.V., Merzlyak, E.M., Shkoporov, A.N., Sander, I., Lukyanov K.A., & Chudakov, D.M. (2006) Structural basis for the fast maturation of *Arthropoda* green fluorescent protein. *EMBO*, **7**: 1006-1012

Fernández-Ábalos, J.M, Fox, H., Pitt, C., Wells, B. & Doonan, J.H. (1998) Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Molec. Micro.* **27**: 121 – 130.

Flach, J., Bossie, M., Vogel, J., Corbett, A., Jinks, T., Willins, D.A. & Silver, P.A. (1994) A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 8399 – 8407.

Goedhart, J., van Weeren, L., Hink, M.A., Vischer, N.O., Jalink, K., & Gadella, T.W. Jr. (2010) Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening. *Nat. Methods*, **7**: 137-139.

Gutiérrez, A., López-García, S., & Garre, V. (2011). High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *Journ. of Microbio.Meth.* **84** (3): 442-6.

Heim, R., & Tsien, R.Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescent resonance energy transfer. *Curr. Biol.*, **6**: 178-182.

Heim, R., Cubbit, A.B., & Tsien, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature*, **373**: 663-665.

Heim, R., Prasher, D.C., & Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**: 12501-12504.

Heim, R., Prasher, D.C., & Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Porc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**: 12501-12504.

Heim, R., Prasher, D.C. & Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci USA **91**: 12501 – 12504.

Henderson, J.N., Ai, H.W., Campbell, R.E., & Remington, S.J. (2007) Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **104**: 6672-6677.

Hoffman, R.M. (2008) A better fluorescent protein for whole-body imaging. Trends Biotech. **26**: 1 – 4.

Hoffman, R.M., (2009) Imaging cancer dynamics in vivo at the tumor and cellular level with fluorescent proteins. Clin Exp Metastasis, **26**: 345-355.

Ianushevich Iu, G., Gurskaia, N.G., Staroverov, D.B., Luk'ianov, S.A. (2003) A natural fluorescent protein that changes its fluorescence during maturation. Bioorg Khim, **29**: 356-360.

Ianushevich, Iu G., Gurskaia, N.G., Staroverov, D.B., Luk'ianov, S.A. & Luk'ianov, K.A. (2003) A natural fluorescent protein that changes its fluorescence during maturation. Bioorg Khim **29**: 356 – 360.

Jordán de Paiz A. (2014) Trabajo de fin de Grado. Búsqueda de mutantes de *Mucor circinelloides* alterados en el dimorfismo mediante el transposón Sleeping Beauty. Universidad de Salamanca España.

Kahmann, R. & Basse, C. (2001) Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. Curr. Opin.in Micro. **4**: 374 – 380.

Knight, A. & Billinton, N. (2001) Distinguishing GFP from Cellular Autofluorescence. *Biophotonics Intern.***8**: 42.

Kruglyak S., Durrett R., Schug M.D., Aquadro C.F. (2000) Distribution and Abundance of Microsatellites in the Yeast Genome Can Be Explained by a Balance Between Slippage Events and Point Mutations. *Mole. Biol. and Evol.* **17(8)**: 1210-1219.

Labas, Y.A., Gurskaya, N.G., Yanushevich, Y.G., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A., & Matz, M.V. (2002) Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, **99**: 4256-4261.

Labas, Y.A., Gurskaya, N.G., Yanushevich, Y.G., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A. & Matz, M.V. (2002) Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4256 – 4261.

Li L., Shao Y., Li Q., Yang S., Chen F. (2010) Identification of *Mga1*, a G-protein α -subunit involved in regulating citrinin and pigment production in *Monascus ruber* M7. *FEMS Microbiology Letters* **308**: 108-114.

Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N, & Patterson, G.H. (2003) Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat. Cell, Biol. Suppl*, S7-S14.

Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N., Patterson, G.H. (2003) Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat Cell Biol Suppl*: S7 – S14.

Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R., & Lichtman, J.W. (2007) Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, **450**: 56-62.

Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R. & Lichtman, J.W. (2007) Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system, *Nature* **450**: 56 – 62.

Loening, A.M., Fenn, T.D., & Gambhir, S.S. (2007) Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*. J. Mol. Biol., **374**: 1017-1028.

Lorang, J.M., Tuori, R.P., Matinez, J.P., Sawyer, T.L., Redman, R.S., Rollins, J.A., Wolpert, T.J., Johnson, K.B., Rodríguez, R.J., Dickman, M.B., & Ciuffetti, L.M. (2001) Green Fluorescent Protein is Lighting Up Fungal Biology. Applied and Env. Micro., 1987-1994.

Lorang, J.M., Tuori, R.P., Matínez, J.P., Sawyer, T.L., Redman, R.S., Rollins, J.A., Wolpert, T.J., Johnson, K.B., Rodríguez, R.J., Dickman, M.B. & Ciuffetti, L.M. (2001) Green fluorescent protein is Lighting Up Fun. Biol.. Appl. and Envi. Micro. **65**: 1987 – 1994.

Lübbenhüsen T.L., Nielsen J., McIntyre M. (2003). Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *Journ. of Appli. Micro. y* **95**: 1152–1160.

Ma L.J., Ibrahim A.S., Skory C., Grabherr M. G., Burger G., Butler M., Elias M., Idnurm A., Lang B.F., Sone T., Abe A., Calvo S.E., Corrochano L.M., Engels R., Fu J., Hansberg W., Kim J.M., Kodira C.D., Koehrsen M.J., Liu B., Miranda-Saavedra D., O'Leary S., Ortiz-Castellanos L., Poulter R., Rodriguez-Romero J., Ruiz-Herrera J., Shen Y.Q., Zeng Q., Galagan J., Birren B.W., Cuomo C.A., Wickes, B.L. (2009) Gen. Anal. of the Basal Lineage Fun. *Rhizopus*

Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A. Savitxky, A.P. Zaraisky, A.G., Markelov, M.L. & Lukyanov, S.A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. Nat. Biotechnol. **17**: 969-973.

McIntyre M., Breum J., Arnau J., Nielsen J. (2002) Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides*. *Appli. Micro. and Biotech.* **58**: 495-502.

Mena, M.A., Treynor, T.P., Mayo, S.L. & Daugherty, P.S. (2006) Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library. Nat Biotechnol **24**: 1569 – 1571.

Mena, M.A., Treynor, T.P., Mayo, S.L., & Daugherty, P.S. (2006) Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library. *Nat Biotechnol*, **24**: 1569-1571.

Mette, A. & Arnau, J. (2002) Cloning, of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase-Encoding Genes in *Mucor circinelloides* (Syn. *Racemosus*) and Use of the *gpd1* Promoter for Recombinant Protein Production. *Fungal Genetics and Biology* **35**: 21 – 29.

Monici, M. (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* **11**:227 56.

Murcia Flores L., Garre V Ruiz-Vázquez R.M., Torres-Martínez S. (2008). A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. *FEMS Microbiology Letters* **280(1)**: 81-88.

Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M. & Hegemann J.H. (1996). Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* **12**: 773 – 786.

Nishijima K.A., Wall M.M. (2011) First Report of Association of *Mucor circinelloides* on Noni (*Morinda citrifolia*) in Hawaii. *Plant Disease* **95(3)**: 360

Ocampo J., Fernández-Núñez L., Silva F., Pereyra E., Moreno S., Garre V., Rossi S. (2009) A Subunit of Protein Kinase A Regulates Growth and Differentiation in the Fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic Cell* **8**: 933-944.

Orlowski M, (1991) *Mucor* dimorphism. *Microbiological Reviews* **55**: 234-258.

Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392 – 1395.

Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., & Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea Victoria* green fluorescent protein. *Science*, **273**: 1392-1395.

Ottesen, M. & Rickert, W. (1970) The isolation and partial characterization of an acid protease produced by *Mucor miehei*. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. **37**: 301 – 325.

Pines, J., (1995) GFP in mammalian cells. Trends Genet 11: 326 – 327.

Plautz, J.D., Day, R.N. Dailey, G.M., Welsh, S.B., Hall, J.C., Halpai, S., & Kay S.A. (1996) Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. Gene **173**: 83-87.

Plautz, J.D., Day, R.N., Dailey, G.M., Welsh, S.B., Hall, J.C., Halpain, S. & Kay, S.A. (1996) Green fluorescent protein and its derivatives as versatile markers for gene expression in living *Drosophila melanogaster*, plant and mammalian cells. Gene **173**: 83 – 87.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. & Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene. **111**: 229-233.

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. & Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequora victoria* green-fluorescent protein. Gene **111**: 229 – 233.

Schipper, M.A.A (1978) On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. Studies in Mycology **17**: 1 – 52.

Shagin, D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers, A., Nunez, J.M., Widder E.A., Lukyanov, S.A., Matz, M.V. (2004) GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. Mol. Biol. Evol. **21**: 841-850.

Shagin, D.A., Barsova, E.V., Yanushevich, Y.G., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Labas Y.A., Semenova, T.N., Ugalde, J.A., Meyers, A., Nunez, J.M., Widder, E.A.,

Lukyanov, S.A., & Matz, M.V. (2004) GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol Biol Evol* **21**: 841 – 850.

Shimomura, O., Johnson, F.H. & Saiga (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**: 223-239.

Shu, X., Shaner, N.C., Yarbrough, C.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. (2006) Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry* **45**: 9639 – 9647

Shu, X., Shaner, N.C., Yarbrough, C.A., Tsien, R.Y., & Remington, S.J. (2006) Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry*, **45**: 9639-9647.

Somkutti, G.A (1974) Synthesis of cellulose by *Mucor pusillus* and *Mucor miehei*. *J. Gen. Microbiol.* **81**: 1 – 6.

Spellig, T., Bottin, A., & Kahmann, R. (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular and General Genetics MGG* **252**: 503 – 509.

Stahl, U., Tudynski, P., Kuck, U. & Esser, K. (1982) Replication and expression of a bacterial-mitochondrial hybrid plasmid in the fungus *Podospora anserine*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 3641 – 3645.

Steinberg, G., Wedlich-Soldner, R., Brill, M. & Schulz, I. (2001) Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity, *Journal of Cell Science* **114**: 609 – 622.

Suelmann, R., & Fischer, R. (2000) Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **25**: 757 – 769.

Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **67**: 509-544.

Turchin, I.V., Kamensky, V.A., Plehanov, V.I., Orlova, A.G., Kleshnin, M.S., Fiks, I.I., Shirmanova, M.V., Meerovich, I.G., Arslanbaeva, L.R., Jerdeva, V.V. & Savitsky, A.P. (2008) Fluorescence diffuse tomography for detection of red fluorescent protein expressed tumors in small animals. *J Biomed Opt* **13**: 041310.

Turchin, IV, Kamensky, V.A., Plehanov, VI, Orlova, A.G., Kleshnin, M.S., Fiks II, Shirmanova, M.V., Meerovich, I.G., Arslanbaeva, L.R., Jerdeva, V.V., Savitsky, A.P. (2008) Fluorescence duffuse tomography for detection of red fluorescent protein expressed tumors in small animals. *J Biomed Opt*, **13**: 041310.

Van, R. & Roncero, M.I. (1984) High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res. Commun* **49**: 691 – 702

Vanden Wymelenberg, A.J., Cullen, D., Spear, R.N., Schoenike, B. & Andrews, J.H. (1997) Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surfaces. *BioTechniques* **23**: 686 – 690.

Verkhusha, V.V., Chudakov, D.M., Gurskaya, N.G., Lukyanov, S. & Lukyanov, K.A. (2004) Common pathway for the red chromophore formation in fluorescent proteins and chromoproteins. *Chem Biol* **11**: 845 – 854.

Verkhusha, V.V., Chudakov, D.M., Gurskaya, N.G., Lukyanov, S., & Lukyanov, K.A. (2004) Common pathway for the red chromophore formation in fluorescent proteins and chromoproteins. *Chem. Biol.*, **11**: 845-854.

Verkhusha, V.V., Kuznetsova, I.M., Stepanenko, O.V., Zaraisky, A.G., Shalovsky, M.M., Turoverov, K.K., & Uversky, V.N. (2003) High stability of Discosoma DsRed as compared to Aequorea EGFP. *Biochemistry*, **42**: 7879-7884.

Vicente, G., Bautista, L.F., Rodríguez, R., Gutiérrez, F.J., Sábada, I., Ruíz-Vázquez, R.N., Torres-Martínez, S. & Garre, V. (2009) Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal* **48**: 22 – 27.

Wachter, R.M., & Remington, S.J. (1999) Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure*, **6**: 1267-1277.

Wall, M.A., Socolich, & M., Ranganthan, R. (2000) The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat Struct Biol.*, **7**: 1133-1138.

Wang, S. & Hazelrigg, T. (1994) Implications for bed Mrna localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila oogenesis*. *Nature* **369**: 400 – 403.

Wang, S., & Hazelrigg, T. (1994) Implications for bed Mrna localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila oogenesis*. *Nature* **369**: 400-403.

Wikandari R., Millati R., Lennartsson P.R., Harmayani E., Taherzadeh M.J. (2012) Isolation and Characterization of Zygomycetes Fungi from Tempe for Ethanol Production and Biomass Applications. *Appl Bioche. and Biotechnol.* **167(6)**:1501-1512.

Willman, P.G., Turcic, K., Battad, J.M., Wilce, M.C., Devenish, R.J., Prescott, M., & Rossjohn, J. (2006) The 1.7 Å crystal structure of Dronpa: a photoswitchable green fluorescent protein. *J. Mol. Biol.*, **364**: 213-224.

Xia, C., Zhang, J., Zhang, W. & Hu, B. (2011) A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnol. for Biofuels* **4**: 15.

Yang, T.T., Sinai, P., Green, G., Kitts, P.A., Chen, Y.T., Lybarger, L., Chervenak, R., Patterson, G.H., Piston, D.W., & Kain, S.R. (1998) Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J. Bio. Chem.*, **273**: 8212-8216.

Yarbrough, D., Watchter, R.M., Kallio, K., Matz, M.V., & Remington S.J. (2001) Refined crystal structure of DsRED, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 462-467.

Young, P. & Feng, G. (2004) Labeling neurons in vivo for morphological and functional studies. *Curr Opin Neurobiol* **14**: 642 – 646.

Young, P., & Feng, G. (2004) Labelling neurons in vivo for morphological and functional studies. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **14**: 642-646.

Yu, Y.A., Shabahang, S., Timiryasova, T.M., Zhang, Q., Beltz, R., Gentschev, I., Goebel, W., Szalay, A.A. (2004) Visualitazion of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat Biotechnol*, **22**: 313-320.

Žižka, Z. & Gabriel, J. (2011) Autofluorescence of the fungus *Morchella conica* var *rigida*. *Folia Microbiologica* **56**: 166 – 169.

Kilaru, S., Schuster, M., Studholme, D., Soanes, D., Lin, C., Talbot N. & Steinberg, G. (2015) A codon-optimized green fluorescent protein for live imaging in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genet Biol* **79**: 125 – 131.