



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-
BIOLÓGICAS**

T E S I S :

**Identificación y expresión de los genes que codifican para proteínas G
heterotriméricas en *Mucor circinelloides***

**Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Experimental**

Presenta:

Marco Iván Valle Maldonado

Asesor:

Doctor en Ciencias en Biología Experimental Víctor Meza-Carmen

Co Asesor:

Doctor en Ciencias en Biotecnología Jesús Campos García

Morelia, Mich., Diciembre 2013



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	II
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	XII
RESUMEN	XIII
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Generalidades de los hongos	2
1.1.1 Criterios de clasificación	3
1.1.2 Phylum <i>Zygomycota</i>	3
1.2 <i>Mucor circinelloides</i>	4
1.2.1 Generalidades	4
1.2.2 Transiciones morfológicas en <i>M. circinelloides</i>	5
1.2.3 Genes involucrados en la diferenciación morfológica en <i>M. circinelloides</i>	7
1.3 Transducción de señales	9
1.3.1 Receptores involucrados en transducción de señales	9
1.3.2 Proteínas G	11
1.3.2.1 Proteínas G heterotriméricas	11

1.3.2.2	Regulación de la actividad de las proteínas G	13
1.3.2.3	Mecanismos no canónicos de asociación de las proteínas G heterotriméricas	15
1.4	Proteínas G heterotriméricas en hongos	16
1.4.1	Evolución de las subunidades de proteínas G heterotriméricas fúngicas	17
1.4.2	Número de subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ en hongos	17
1.4.3	Funciones de las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ en hongos	18
2.	ANTECEDENTES	23
3.	JUSTIFICACIÓN	23
4.	HIPÓTESIS	24
5.	OBJETIVOS	24
5.1	Objetivo general	24
5.2	Objetivos particulares	24
6.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL GENERAL	25
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1	Cepas utilizadas	25
7.2	Medios de cultivo	26
7.2.1	YPG (Glucosa, Peptona de Gelatina, Extracto de Levadura)	26
7.2.2	Medios mínimos	26
7.3	Obtención y conteo de esporas de <i>M. circinelloides</i>	27

7.4	Crecimiento aeróbico y anaeróbico de <i>M. circinelloides</i>	27
7.5	Transiciones Levadura-Micelio y Micelio-Levadura de <i>M. circinelloides</i>	28
7.6	Cuantificación del crecimiento	28
7.7	Determinación de porcentajes de germinación de <i>M. circinelloides</i> en diferentes medios de cultivo	28
7.8	Análisis de imágenes	29
7.9	Extracción y cuantificación de RNA	29
7.10	Tratamiento con DNasa I de las muestras de RNA	30
7.11	Electroforesis en gel de agarosa	30
7.12	Aislamiento y purificación de DNA de geles de agarosa	30
7.13	Identificación de las subunidades G α , G β y G γ de proteínas G heterotriméricas en <i>M. circinelloides</i>	31
7.14	Modelado tridimensional de las subunidades G heterotriméricas de <i>M. circinelloides</i>	31
7.15	Análisis filogenético molecular de las subunidades G heterotriméricas de <i>M. circinelloides</i>	32
7.16	Ensayo de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR)	33
7.16.1	Determinación de las eficiencias de amplificación de RT-qPCR	34
7.17	Selección de genes normalizadores de <i>M. circinelloides</i> para realizar ensayos de RT-qPCR	35
7.18	Análisis matemático de los niveles de expresión relativa en los ensayos de RT-qPCR	36

7.19	Análisis estadístico de los resultados	36
8.	RESULTADOS	37
8.1	Identificación de subunidades de proteínas G heterotriméricas en <i>M. circinelloides</i>	37
8.1.1	Subunidades Gα en <i>M. circinelloides</i>	37
8.1.2	Subunidades Gβ en <i>M. circinelloides</i>	43
8.1.3	Subunidades Gγ en <i>M. circinelloides</i>	49
8.2	Análisis filogenético de las subunidades Gα, Gβ y Gγ fúngicas	53
8.2.1	Subunidades Gα fúngicas	53
8.2.2	Subunidades Gβ fúngicas	59
8.2.3	Subunidades Gγ fúngicas	61
8.3	Evaluación del crecimiento en <i>M. circinelloides</i>	66
8.3.1	Crecimiento aeróbico y autoanaeróbico en medio YPG de <i>M. circinelloides</i>	66
8.3.2	Transiciones morfológicas	67
8.3.3	Crecimiento aeróbico y autoanaeróbico de <i>M. circinelloides</i> en medios mínimos	69
8.4	Selección de los genes normalizadores para RT-qCPR en <i>M. circinelloides</i> durante el dimorfismo	72
8.4.1	Análisis matemático de los genes normalizadores durante el dimorfismo de <i>M. circinelloides</i>	77
8.5	Determinación de eficiencias de amplificación	78

8.6	Expresión de los genes que codifican subunidades Gα, Gβ y Gγ en <i>M. circinelloides</i> durante el dimorfismo	81
8.6.1	Expresión de las subunidades Gα en <i>M. circinelloides</i> durante el dimorfismo	82
8.6.2	Expresión de las subunidades Gβ y Gγ en <i>M. circinelloides</i> durante el dimorfismo	84
8.7	Expresión de los genes que codifican subunidades Gα, Gβ y Gγ en <i>M. circinelloides</i> durante la respuesta a nutrientes	90
8.7.1	Expresión de las subunidades Gα en <i>M. circinelloides</i> durante la respuesta a fuentes de carbono y nitrógeno	91
8.7.2	Expresión de las subunidades Gβ y Gγ en <i>M. circinelloides</i> durante la respuesta a fuentes de carbono y nitrógeno	93
9.	DISCUSIÓN	98
10.	CONCLUSIÓN	108
11.	PERSPECTIVAS	108
12.	REFERENCIAS	109

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Ciclo de vida de <i>M. circinelloides</i> en cultivo líquido	7
Figura 2	Ciclo de activación e inactivación de las proteínas G heterotriméricas	14
Figura 3	Ruta de señalización por feromonas en <i>S. cerevisiae</i>	21
Figura 4	Presencia de exones e intrones en los marcos de lectura abiertos de las subunidades G α de <i>M. circinelloides</i>	38
Figura 5	Alineamiento de las subunidades G α de <i>M. circinelloides</i>	41
Figura 6	Presencia de residuos susceptibles a ADP-ribosilación en las subunidades G α de zigomicetos	42
Figura 7	Estructuras tridimensionales predichas para las subunidades G α identificadas en <i>M. circinelloides</i>	44
Figura 8	Presencia de exones e intrones en los marcos de lectura abiertos de las subunidades G β en <i>M. circinelloides</i>	45
Figura 9	Alineamiento de las subunidades G β de <i>M. circinelloides</i>	47
Figura 10	Estructuras tridimensionales predichas para las subunidades G β identificadas en <i>M. circinelloides</i>	48
Figura 11	Presencia de exones e intrones en los marcos de lectura abiertos de las subunidades G γ de <i>M. circinelloides</i>	49
Figura 12	Alineamiento de las subunidades G γ de <i>M. circinelloides</i>	51

Figura 13	Estructuras tridimensionales predichas para las subunidades Gy identificadas en <i>M. circinelloides</i>	52
Figura 14	Análisis filogenético molecular de las subunidades Gα fúngicas	57
Figura 15	Análisis filogenético molecular de las subunidades Gβ fúngicas	62
Figura 16	Análisis filogenético molecular de las subunidades Gy fúngicas	65
Figura 17	Curvas de crecimiento aeróbico y anaeróbico de <i>M. circinelloides</i> en medio YPG	67
Figura 18	Desarrollo del crecimiento de <i>M. circinelloides</i> bajo condiciones aeróbicas o autoaneróbicas	68
Figura 19	Curvas de crecimiento aeróbico y autoanaeróbico de <i>M. circinelloides</i> en medios mínimos	69
Figura 20	Porcentaje de germinación aeróbica y autoanaeróbica para diferentes medios de cultivo en <i>M. circinelloides</i>	70
Figura 21	Fotografías de 24h de crecimiento de <i>M. circinelloides</i> en medios mínimos	71
Figura 22	Corrimiento electroforético de los productos de RT-qPCR en tiempo real para los genes constitutivos	74
Figura 23	Distribución de los niveles de expresión (Cq) de los diferentes genes constitutivos durante esporas, crecimiento micelial y levaduriforme de <i>M. circinelloides</i>	75
Figura 24	Distribución de los niveles de expresión (Cq) de los diferentes genes constitutivos durante esporas, crecimiento micelial, levaduriforme y transiciones morfológicas de <i>M. circinelloides</i>	76
Figura 25	Estabilidad individual promedio (Mj) de los genes de referencia durante el	77

dimorfismo de *M. circinelloides*

Figura 26	Distribución de Cq para diferentes concentraciones de RNA total para <i>mctfc-1</i>	79
Figura 27	Expresión de las subunidades Gα durante el dimorfismo de <i>M. circinelloides</i>	82
Figura 28	Expresión de las subunidades Gβ y Gγ durante el dimorfismo de <i>M. circinelloides</i>	84
Figura 29	Patrones similares de niveles de transcrito para genes que codifican subunidades Gα, Gβ y Gγ durante el crecimiento levaduriforme en <i>M. circinelloides</i>	89
Figura 30	Patrones similares de niveles de transcrito para genes que codifican subunidades Gβ y Gγ durante el dimorfismo de <i>M. circinelloides</i>	90
Figura 31	Expresión de las subunidades Gα durante la respuesta a nutrientes de <i>M. circinelloides</i>	92
Figura 32	Expresión de las subunidades Gβ y Gγ durante la respuesta a nutrientes de <i>M. circinelloides</i>	93
Figura 33	Patrones similares de niveles de transcrito para genes que codifican subunidades Gα, Gβ y Gγ durante el crecimiento micelial de <i>M. circinelloides</i> en medios mínimos	97

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Número de subunidades de proteínas G heterotriméricas en eucariontes	18
Tabla 2	Funciones de subunidades de proteínas G heterotriméricas en hongos	22
Tabla 3	Composición de los medios mínimos	26
Tabla 4	Oligonucleótidos y sondas empleados para los ensayos de RT-PCR en tiempo real	34
Tabla 5	Subunidades G α presentes en <i>M. circinelloides</i>	39
Tabla 6	Subunidades G β presentes en <i>M. circinelloides</i>	46
Tabla 7	Subunidades G γ presentes en <i>M. circinelloides</i>	50
Tabla 8	Subunidades G α de hongos y plantas empleadas para el análisis filogenético	54
Tabla 9	Distribución de las subunidades G α en función de los <i>Phyla</i> fúngicos	58
Tabla 10	Clasificación de las subunidades G α presentes en zigomicetos	59
Tabla 11	Subunidades G β de hongos y plantas empleadas para el análisis filogenético	60
Tabla 12	Subunidades G γ de hongos y plantas empleadas para el análisis filogenético	64
Tabla 13	Porcentajes de identidad y similitud de genes normalizadores	73

en *M. circinelloides* respecto a otros organismos

Tabla 14	Porcentajes de identidad y similitud de proteínas codificadas por genes normalizadores en <i>M. circinelloides</i> respecto a otros organismos	73
Tabla 15	Variación de la estabilidad de expresión génica en parejas de genes de referencia de <i>M. circinelloides</i> durante el dimorfismo	78
Tabla 16	Eficiencias de amplificación de los genes normalizadores y subunidades G α , G β y G γ para RT-qPCR en <i>M. circinelloides</i>	80
Tabla 17	Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en <i>M. circinelloides</i> durante crecimiento micelial respecto a esporas en medio YPG	86
Tabla 18	Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en <i>M. circinelloides</i> durante crecimiento levaduriforme respecto a esporas en medio YPG	86
Tabla 19	Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en <i>M. circinelloides</i> durante la transición micelio-levadura en medio YPG	88
Tabla 20	Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en <i>M. circinelloides</i> durante la transición levadura-micelio en medio YPG	88
Tabla 21	Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en <i>M. circinelloides</i> durante crecimiento micelial en medios mínimos	95
Tabla 22	Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en <i>M. circinelloides</i> durante crecimiento levaduriforme en medios mínimos	96

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A: Absorbencia

λ : Longitud de onda

ADP: Adenosín difosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

DNA: Ácido desoxribonucleico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GAP: Proteína activadora de GTPasa (GTPase-activating protein).

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G (G Protein Coupled Receptor)

kDa: kilo Daltons

PGH: Proteínas G Heterotriméricas

PI: Punto Isoeléctrico

PM: Peso molecular

PKA: Proteína cinasa A

RGS: Regulador de señalización de proteínas G (Regulator of G-protein signaling)

RNA: Ácido Ribonucleico

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real

TAE: Tris-Acetato- EDTA

PREFIJOS

M: Mega (1×10^6)

μ : micro (1×10^{-6})

n: nano (1×10^{-9})

RESUMEN

Las proteínas G heterotriméricas, compuestas por las subunidades G α , G β y G γ , participan en el proceso de diferenciativo y detección de nutrientes en distintos hongos, por lo tanto resultó de nuestro interés medir los niveles de transcrito de estas subunidades en estos procesos en *M. circinelloides*. Para lo cual fue necesario en primer lugar, la identificación de las distintas subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides*. La identificación de las distintas subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* demostró la presencia de un número tres veces mayor de dichas subunidades al reportado en hongos. Este número elevado de subunidades podría parecer ser un fenómeno intrínseco a los zigomicetos, debido a que en otros zigomicetos cuyos genomas han sido secuenciados como *Rhizopus oryzae* y *Phycomyces blakesleeanus*, al igual que en *M. circinelloides*, se encontraron más subunidades en relación a los demás *Phyla* en hongos. La relación evolutiva de las distintas subunidades de *M. circinelloides*, demostró que en el caso de las subunidades G α , estas no se encuentran relacionadas filogenéticamente en función de los *Phyla* de hongos, su distribución se adapta a la clasificación funcional propuesta por Bolker, 1998 y Li y col., 2007. Además, *M. circinelloides*, así como los demás zigomicetos tienen subunidades G α en tres (I, II y III) de los cuatro grupos en los que se divide la clasificación. Por otra parte, las subunidades G β y G γ muestran patrones evolutivos similares, distribuyéndose en función de los diferentes *Phyla* (ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos o chytridiomicetos) sugiriendo una posible evolución paralela, lo que concuerda con la funcionalidad en conjunto de estas subunidades.

El análisis cuantitativo de los niveles de mRNA de los genes que codifican a estas subunidades en *M. circinelloides*, requirió de la validación experimental de *mctfc-1* y *mcef-1* como genes normalizadores para llevar a cabo los experimentos de RT-PCR en tiempo real durante el dimorfismo. Los niveles de transcrito, de cada uno de los genes que codifican para las supuestas subunidades de proteínas G

heterotriméricas, fueron cuantificados mediante RT-PCR en tiempo real durante el dimorfismo y durante el crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

Los datos de expresión de las distintas subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ de *M. circinelloides* indican distintos patrones y niveles de expresión; pero en la mayoría de los casos, los niveles de transcrito de cada uno de los genes analizados durante el estadio de espora fueron distintos comparados al de los crecimientos vegetativos. Existen genes cuyos niveles de expresión son mayores en una morfología particular, sugiriendo su posible importancia de dichos genes en dicho estadio. Por ejemplo, *mcgpa11* se expresa principalmente en esporas a diferencia del crecimiento vegetativo, *mcgpb1* tuvo mayores niveles de transcrito en crecimiento miceliar respecto a esporas y levaduras, mientras que *mcgpg1* fue detectado solamente en levaduras, con niveles de expresión muy bajos. Los genes que codifican para las subunidades *mcgpa5*, *mcgpa7* ó *mcgpa11* ($G\alpha$), podrían formar un complejo heterotrimérico con *mcgpb1* ($G\beta$) y *mcgpg2* ($G\gamma$) debido a que muestran patrones y niveles de transcrito similares en crecimiento levaduriforme. De igual manera, las subunidades *mcgpb3* y *mcgpg3* presentan patrones de niveles de transcrito similares durante todas las condiciones ensayadas del proceso dimórfico, lo que sugiere que podrían formar un dímero. Para el caso del crecimiento en presencia de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, se detectaron menores niveles de expresión de los distintos genes analizados en la mayoría de los casos al usar medios mínimos con fuentes de carbono no fermentable y nitrógeno inorgánico, con respecto al medio mínimo con fuentes de carbono fermentable y nitrógeno orgánico. Los datos obtenidos sugieren que el gen *mcgpa8* podría participar en la respuesta a nitrógeno ya que sus niveles de transcrito se ven disminuidos más de diez veces en crecimiento levaduriforme en fuente de nitrógeno inorgánica respecto a fuente de nitrógeno orgánica. Por su parte, el único gen que tiene mayores niveles de transcrito en crecimiento en fuente de carbono no fermentable respecto a glucosa es *mcgpb3* durante crecimiento levaduriforme, sugiriendo esto una posible importancia en la respuesta a fuente de carbono en dicho estadio morfológico.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los hongos

Los hongos son componentes indispensables de los ecosistemas, son organismos eucariontes heterótrofos que contribuyen de manera importante a la conservación del ciclo del carbono ya que son los degradadores de materia orgánica por excelencia (Bennet y col., 2002). En algunos casos, los hongos se encuentran asociados a las raíces de las plantas formando micorrizas, representando éstas un mecanismo de captura de nutrientes muy importante para las plantas. De hecho, los hongos han sido encontrados como simbioses en todas las plantas estudiadas en ecosistemas naturales (Singh y col., 2011).

Estructuralmente presentan pared celular compuesta de polisacáridos y proteínas estructurales, de los cuales los principales polisacáridos son glucana, quitina y quitosana (Xie y Lipke, 2010). La membrana celular contiene ergosterol no encontrado en los demás eucariontes (Mille-Lindblom y col., 2004).

Los hongos pueden existir entre un estado haploide, en el cual cada célula tiene una sola copia de su material genético o en estado diploide con dos copias del material genético.

El tamaño del genoma de los hongos oscila entre 10 y 45 millones de pares de bases de DNA (Maheshwari, 2005). Comparativamente el genoma del humano tiene 3000 millones de pares de bases (Walbot y Petrov, 2001), y el de la bacteria *Escherichia coli* 4.6 millones de pares de bases (Blattner y col., 1997).

Estos organismos se desarrollan adoptando distintas morfologías celulares: levadura como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, estructura filamentosa como *Neurospora crassa*, e incluso pueden producir cuerpos fructíferos como en *Ustilago maydis* (Papagianni 2003; Cain y col., 2012).

1.1.1 Criterios de clasificación

De acuerdo a la relación que guardan con otros organismos, se clasifican como saprofitos (obtienen sus nutrientes de organismos muertos), simbiontes (viviendo en cooperativismo con otros organismos) o parásitos (viven de otros organismos sin cooperativismo) (Baron, 1996), pudiendo combinar dichas interacciones en respuesta a ciertas variaciones ambientales (Redman y col., 2001).

Los hongos se reproducen mediante la generación de esporas, las que pueden ser generadas sexual o asexualmente. Las estructuras de donde provienen estas esporas es un criterio de clasificación de los hongos, de tal forma que, si provienen de un saco llamado asco se les llama ascomicetos, si vienen de un basidio son basidiomicetos, o zigomicetos para una estructura denominada esporangio (Sharma, 2005).

Actualmente, la clasificación más aceptada para los hongos proviene del uso de técnicas moleculares tales como la comparación de la secuencia de un gen altamente conservado entre las especies, como el caso del RNA ribosomal 18S, que se encuentra en la subunidad pequeña de los ribosomas. En base a esta última clasificación, el reino *Fungi* se dividió en ocho Phyla distintos: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomales*, *Zygomycota*, *Blastocladales*, *Monoblepharidales*, *Chytridiomycota* y *Microsporidia* (Mueller y col., 2004).

1.1.2 Phylum Zygomycota

Los miembros del *Phylum Zygomycota* han sido considerados como un linaje primitivo del reino *Fungi* (Tanabe y col., 2005), esto por la carencia de estructuras fructíferas complejas y la mayoría de los representantes tienen hifas cenocíticas (sin septos) durante todo o parte de su ciclo de vida.

Por pertenecer a un linaje basal, son utilizados como modelo de estudio para estudiar la evolución fúngica (Ma y col., 2009). Los zigomicetos son una clase ecológicamente diversa de hongos, incluyendo saprófitos, patógenos de plantas, animales (incluyendo el humano) y otros hongos. El *Phylum Zygomycota* está

dividido en dos clases: *Zygomycetes* y *Trichomycetes*; y a su vez existen nueve órdenes en este *Phylum*: *Asellariales*, *Dimargariales*, *Endogonales*, *Entomophtorales*, *Harperalles*, *Kickxellales*, *Mortieralles*, *Mucorales* y *Zoopagales* (White y col., 2006). Del orden *Mucorales* se encuentran géneros como *Mucor*, *Phycomyces*, *Rhizopus* y *Rhizomucor*. Existen zigomicetos dimórficos como es el caso de *Rhizopus oryzae* (Karmakar y col., 2012) y *Mucor circinelloides* o monomórficos como es el caso de *Phycomyces blakesleeanus* (Irdum y col., 2006). Los zigomicetos tienen importancia industrial, tal es el caso de *Rhizopus oryzae* empleado en la fermentación de muchos alimentos de la comida asiática como el tempeh (Nout y Rombouts, 1990), también es productor de ácidos orgánicos, etanol (Thongchul y col., 2010) y enzimas hidrolíticas (Takahashi y col., 1978). No obstante varios zigomicetos como son *R. oryzae* y *Rhizomucor pusillus* son patógenos para humanos y causan la infección conocida como zigomicosis (Battaglia y col., 2011). La mucormicosis es una infección causada por los zigomicetos pertenecientes a los géneros: *Absidia*, *Mucor* y *Rhizomucor*. Es una infección poco frecuente que se suele desarrollar en pacientes inmunodeprimidos. Se han descrito varias formas de mucormicosis: rinocerebral, pulmonar, gastrointestinal, mucocutánea y diseminada. La forma rinocerebral es la más frecuente y suele asociarse a pacientes diabéticos descompensados o con enfermedades hematológicas (Zaballos y col., 2003).

1.2 *Mucor circinelloides*

1.2.1 Generalidades

M. circinelloides es un zigomiceto dimórfico (Lübbehüsen y col., 2003). Es un modelo de estudio en la regulación de diferenciación celular, respuestas celulares a la luz (Murcia-Flores y col., 2007). Se considera como un patógeno emergente en pacientes inmunodeprimidos (Bastidas y col., 2012), se le ha asociado también a la contaminación de frutos como el noni (Nishijima y col., 2011); además recientemente se le considera como posible fuente de ácidos grasos para la obtención de fuentes de energía renovables como el biodiesel (Xia y col., 2011). Su metabolismo fermentativo ha sido investigado a la par de la obtención de

etanol, además de que se ha evaluado el rendimiento de esta producción modificando condiciones de crecimiento (Wikandariy col., 2012).

El evento diferenciativo más estudiado en *M. circinelloides* es el dimorfismo (Lübbehüsen y col., 2003). No obstante *M. circinelloides* presenta otros eventos diferenciativos, como la síntesis de carotenos, inducida por la presencia de luz (Murcia-Flores y col., 2008), generando colonias con tonalidad amarillenta a diferencia de colonias crecidas en obscuridad que son albinas. Además el desarrollo de estructuras reproductivas y la esporulación igualmente se ven acelerados por la presencia de luz.

M. circinelloides ha sido estudiado como huésped heterólogo para la producción de enzimas importantes de carácter industrial, como el efecto del dimorfismo en el proceso de producción y actividad enzimática de glucosa oxidasa. Encontrándose una mayor producción de esta enzima durante la morfología levaduriforme (Bredenkamp y col., 2010).

El genoma de este organismo ha sido secuenciado recientemente y está disponible en la red (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>). El material genómico de este organismo está distribuido en 9 cromosomas tratándose de 11,719 genes en 36.6 millones pares de bases (Mb) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2804>). Se trata de un tamaño de genoma similar en comparación con otros hongos, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* tiene 12 Mb (Kruglyak y col., 2000), *Aspergillus nidulans* con 30 Mb (David y col., 2008), en el basidiomiceto *Ustilago maydis* 20 Mb (Kämper y col., 2006), y en los zigomicetos *R. oryzae* con 45.3 Mb (Ma y col., 2009), *P. blakesleeanus* con 30 Mb (Corrochano y Ruiz-Albert, 2004).

1.2.2 Transiciones morfológicas en *M. circinelloides*

Algunas especies del género *Mucor* son capaces de generar tres tipos esporas: 1) zigosporas productos de la recombinación genética, 2) las esporangiosporas sirven como mecanismo de dispersión y 3) las artrosporas aseguran la supervivencia bajo condiciones de crecimiento adversas (Orlowski, 1991). La

reproducción sexual sucede cuando hay fusión de hifas de origen homotálico o heterotálico y conduce finalmente a la formación de zigosporas.

La zigospora permanece en reposo durante muchas semanas o meses antes de germinar y producir una estructura alargada conocida como esporangioforo que presenta un cuerpo esférico en la punta conocida como esporangio del cual se desprenden las esporangiosporas. Las esporangiosporas son elipsoidales y aunque derivan exclusivamente del hábitat miceliar del género *Mucor* son capaces de desarrollar hacia la morfología levaduriforme o miceliar dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y la fuente de Carbono (Lübbehüsen y col., 2003). Si las esporangiosporas se crecen en anaerobiosis se favorece el crecimiento isotrópico (levadura), mientras que en aerobiosis *M. circinelloides* su crecimiento es polarizado (filamentos) (**Figura 1**). Además del ambiente gaseoso, el crecimiento levaduriforme en el caso de *M. rouxii* requiere que 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, esto modificando las condiciones de crecimiento (McIntyre y col., 2002). Las hifas del género *Mucor* son multinucleadas y cenocíticas, es decir no presentan septos (divisiones). Por otro lado, las levaduras son, esféricas y multinucleadas (Ocampo y col., 2012).

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

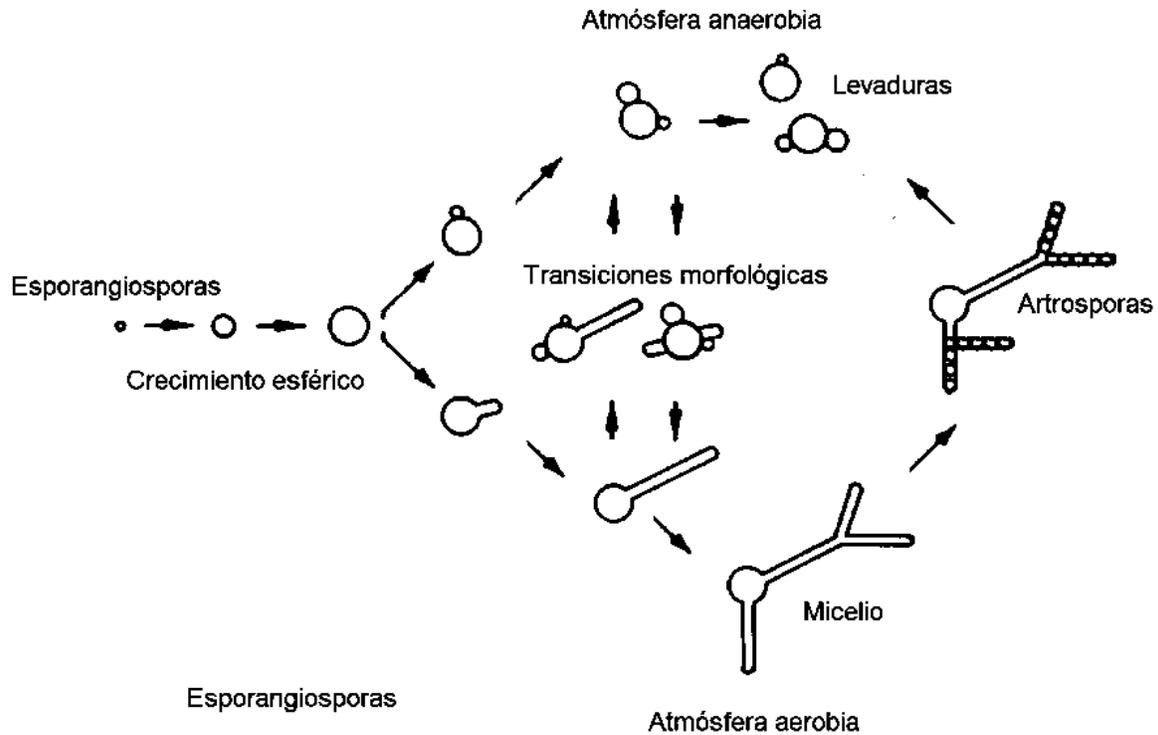


Figura 1. Ciclo de vida de *M. circinelloides* en cultivo líquido. Las esporangiosporas son capaces de desarrollar levaduras o micelio dependiendo de las condiciones ambientales. Cultivos maduros de micelio pueden conducir a la formación de artrosporas que son capaces de desarrollar levaduras o micelio dependiendo de las condiciones de crecimiento. Intercambios entre las morfologías de levadura y micelio son posibles modificando las condiciones atmosféricas. El cambio de condiciones aérobicas a anaeróbicas conduce a que el micelio produzca levaduras, el cambio de anaerobiosis a aerobiosis conduce a la formación de micelio a partir de levaduras. Modificada de Orłowski, 1991.

1.2.3 Genes involucrados en la diferenciación morfológica en *M. circinelloides*

Se ha comprobado la participación de diversos genes cuyos productos participan en el dimorfismo de *M. circinelloides*, como es el caso de la proteína cinasa A (PKA) la cual es activada por el AMPc, que fosforila sustratos proteicos específicos en residuos de serina y treonina. La PKA consiste en dos subunidades regulatorias (PKAR) que se unen e inhiben la actividad de dos subunidades

catalíticas (PKAC). La unión del AMPc a las cadenas PKAR resulta en la liberación de las subunidades PKAC y se desencadena la cascada de fosforilación que resulta en cambios en la morfogénesis y en el dimorfismo (Wolff y col., 2002). La participación de PKA en el crecimiento polarizado ha sido evidenciada usando análogos de AMPc como N⁶-monobutiril-AMPc, N⁶-benzoil-AMPc (Sorol y col., 2000). Estos análogos imitan la actividad del AMPc y resulta en crecimiento levaduriforme en condiciones aeróbicas. La regulación conferida por el AMPc es muy importante, ya que al remover los análogos hay una transición morfológica inmediata de crecimiento isotrópico a filamentoso (Wolff y col., 2002; Ocampo y col., 2009).

La enzima CrgA es una proteína con dominios tipo dedos de zinc, la cual participa en la vía de la ubiquitinación; esta proteína tiene asociada una actividad de E3 ubiquitina ligasa, la cual cataliza el último paso de la ubiquitinación y dirige al sustrato hacia el proteosoma. CrgA reprime la carotenogénesis (Navarro y col., 2000) y regula positivamente la esporulación (Lorca-Pascual y col., 2004, Nicolás y col., 2008) y el crecimiento vegetativo en *M. circinelloides* (Quiles-Rosillo y col., 2003).

Por otra parte, mutantes nulas de la O-fucosiltransferasa CigA, cuya función enzimática es la de transferir una D-fucosa proveniente de GDP-fucosa a un sustrato aceptor, muestra alteración en el crecimiento vegetativo (Quiles-Rosillo y col., 2003). Por otra parte, los niveles de transcrito del gen *mcchs1*, que codifica a un miembro de la familia de sintasas de quitina, se acumula principalmente en la morfología miceliar (López-Matas y col., 2000).

Un patrón similar fue detectado para los niveles de los transcritos de *mras1* y *mras3*, que codifican proteínas G monoméricas del tipo RAS (Roze y col., 1999); en este mismo trabajo, a diferencia de *mras1*, niveles altos del transcrito *mras3* fueron detectados durante la esporulación.

En *M. circinelloides* Se detectaron mayores niveles de las proteínas G monoméricas Rho1p y Rho3p en el crecimiento polarizado (De la Cruz y col.,

2007). Los niveles de transcrito de la subunidad *mcgpa3*, la cual codifica para una subunidad G α de proteínas G heterotriméricas, fueron evaluados en esporas y en crecimiento vegetativo, encontrándose en esporas los niveles más altos de transcrito (Meza-Carmen y col., 2006).

1.3 Transducción de señales

Todos los organismos vivos debemos ser capaces de responder efectivamente a los estímulos ambientales; esta capacidad es una característica clásica de los seres vivos, se trata de la habilidad de un organismo o de una parte del mismo para identificar un cambio negativo o positivo en el medio ambiente y poder reaccionar a éste. La transducción de señales es la transferencia de información desde un ambiente externo hacia el interior de la célula requiriendo un componente sensor o “receptor” para detectar la señal, un componente “amplificador”, que aumenta la intensidad de la señal intracelularmente regulando los niveles de segundos mensajeros y un componente “transductor” que realiza la labor de convertir la señal detectada por el receptor a una forma que pueda ser entendida y convertida a respuesta por el amplificador. Existen ciertas señales que pueden ingresar a la célula (aquellas moléculas lipofílicas, como las vitaminas A y D y la hormona tiroidea) y deben ser transferidas a través de la membrana celular hacia el interior de la célula donde su efecto biológico afecta la expresión a nivel transcripcional o traduccional (Brivanlou y Darnell, 2002). La diversidad de los estímulos externos, incluye señales acústicas, cambios de temperatura, nutrientes, luz, hormonas, entre otros factores (Krauss, 2003).

1.3.1 Receptores involucrados en transducción de señales

El primer componente participante en la transducción de señales son los receptores que reconocen señales de diversos tipos, entre los cuales destacan:

-Receptores que tienen actividad enzimática intrínseca. Receptores de este tipo incluyen aquellos que tienen actividad de tirosin-cinasa (por ejemplo receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas, de la insulina, del factor de crecimiento epidermal o el factor de crecimiento de fibroblastos), tirosin-fosfatasas (por ejemplo proteína DC45 de células T y macrófagos), guanilato ciclasas (por ejemplo receptores de natriuretico péptido) y serin-treonina cinasas (por ejemplo receptores de activina y factor de crecimiento transformante- β) (Koretzky, y col., 1990)). Un ejemplo de este tipo de receptores en hongos es el receptor de óxido nítrico (NO), receptor con actividad de guanilato ciclasa en *S. cerevisiae* (Eckstein y Schlobohm, 1997).

-Receptores intracelulares. Se hallan intracelularmente y cuando hay unión de ligando migran al núcleo donde el complejo ligando-receptor directamente afecta la transcripción génica. Dado que esta clase de receptores es intracelular y funciona en el núcleo como factores de transcripción, comúnmente se les llama receptores nucleares. Receptores de esta clase incluyen a la gran familia de receptores de esteroides y hormona tiroidea. Los receptores de esta clase tienen un motivo de unión a ligando, un dominio de unión a DNA y un dominio activador transcripcional (Steinman, 2010). En hongos se sabe que la enzima PDR1 reconoce al antifúngico cicloheximida en *S. cerevisiae*, como respuesta se activa una vía que confiere resistencia a este fármaco mediante la regulación de la expresión de genes que codifican transportadores de fármacos como PDR5 (Naar y Thakur, 2009; Balzi y col., 1994; Gao y col., 2004.).

-Receptores acoplados a proteínas G. (Se denominan GPCRs por sus siglas en inglés, G-Protein Coupled Receptors). Son receptores de siete pasos transmembranales conectados por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular. Es un grupo muy numeroso de receptores, que en humanos se trata del grupo más amplio de receptores membranales), el genoma humano codifica al menos 791 GPCRs.

Ejemplos de esta clase de receptores son: los receptores adrenérgicos, receptores olfatorios, y algunos receptores de hormonas: glucagón, angiotensina, vasopresina y bradiquinina (Huang y Tesmer, 2011). Se hallan presentes en todos los eucariontes, desde hongos hasta mamíferos. Un ejemplo de este tipo de receptores en hongos es el receptor para detectar feromonas denominado Ste2p en *S. cerevisiae* (David y col., 1997). Los receptores acoplados a proteínas G, transmiten la señal detectada a las proteínas G heterotriméricas.

1.3.2 Proteínas G

Las proteínas G reciben su nombre porque unen e hidrolizan nucleótidos de guanina (McCudden y col., 2005). Existen dos familias generales de proteínas G: monoméricas y heterotriméricas ambas involucradas en diversas funciones celulares.

Dentro de las proteínas G monoméricas existen las familias Ras, Rho, Ran, Rab y Arf (Takai y col., 2001). La familia Ras ha sido asociada a procesos de oncogénesis (Repasky y col., 2004), la familia Rho involucrada en la regulación de la organización de actina, del ciclo celular y de la expresión celular (Etienne-Manneville y Hall, 2002), la familia Ran participa en el transporte nucleocitoplásmico de RNA y proteínas (Weis, 2003), la familia Rab cumple la función de regular el transporte vesicular y el tráfico de proteínas entre diferentes organelos de las rutas endocíticas y exocíticas (Zerial y McBride, 2001), la familia Arf está involucrada en la regulación del tráfico vesicular (Nielsen y col., 2008).

La otra gran familia de las proteínas G está compuesta por las proteínas G heterotriméricas.

1.3.2.1 Proteínas G heterotriméricas

Sirven a modo de intermediario entre el receptor localizado en la membrana plasmática y los efectores intracelulares, son el componente transductor de

señales. Estructuralmente están compuestas de tres proteínas distintas: una subunidad $G\alpha$, una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$ (McCudden y col., 2005).

La subunidad $G\alpha$ une el nucleótido GDP o GTP, determinando el estado de inactivación o activación del complejo, respectivamente. La subunidad $G\alpha$ muestra homología con las subunidades G pequeñas, debido a que ambas tienen actividad de GTPasa y comparten los dominios que cumplen dichas funciones, sin embargo la diferencia con estas últimas radica en, que la subunidad $G\alpha$ es más grande, por lo regular entre (35-45 kDa) en comparación con las subunidades G pequeñas (20-25 kDa). Además, las subunidades G pequeñas carecen de los residuos necesarios para la interacción con la subunidad $G\beta$ (Takai y col., 2001). En cuanto a las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$, éstas forman un dímero muy estable que en condiciones fisiológicas no se disocia (Schwindinger y Robishaw, 2001).

El mecanismo canónico de estructuración en la célula del heterotrímero indica dos conformaciones:

-Heterotrímero asociado. Se trata de la conformación cuaternaria que adopta el heterotrímero donde la subunidad $G\alpha$ está asociada a las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$; estas últimas subunidades son adyacentes entre sí. La subunidad $G\alpha$ tiene unido GDP en esta conformación. Además, el heterotrímero está anclado en la membrana plasmática mediante las subunidades $G\alpha$, y $G\gamma$, las cuales son susceptibles de presentar modificaciones postraduccionales (miristoilación para $G\alpha$ y farnesilación o geranil-geranilación para $G\gamma$) favoreciendo la interacción con la membrana celular. La subunidad $G\alpha$ además tiene contacto con el receptor, funcionalmente se describe a este heterotrímero como inactivo (Tesmer, 2010) **(Figura 2).**

-Heterotrímero disociado. Cuando ocurre el reconocimiento de una señal extracelular por medio del receptor, se promueve el intercambio del GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$. Conduciendo a un cambio conformacional de la subunidad $G\alpha$, alterando la interacción con el dímero $G\beta$ y produciendo finalmente una disociación del trímero. Las unidades de señalización, correspondientes a la

subunidad $G\alpha$ -GTP y el dímero $G\beta\gamma$, se encuentran separadas, esta conformación se conoce como activa, ya que cada una de las unidades de señalización pueden interactuar con distintos efectores generando diversas respuestas fisiológicas (Tesmer, 2010) **(Figura 2)**.

Las complejos de señalización de las proteínas G heterotriméricas activadas pasan la señal a moléculas efectoras que tienen actividad enzimática como la adenilato ciclasa (Levitzki y Bar-Sinai, 1991), fosfolipasas (Smrcka y col., 2012), fosfodiesterasas específicas de GMPc (Artemeyev y col., 1992) o canales iónicos como: canales de K^+ , Ca^{2+} o Cl^- (Zhang, 2011).

La activación de estas proteínas efectoras conduce a cambios en la concentración de segundos mensajeros, como el AMPc, GMPc, diacilglicerol o inositol trifosfato, Ca^{2+} , entre otras, los cuales desencadenan reacciones fisiológicas específicas (Neer, 1994).

Por ejemplo, la ADP-ribosilación de una subunidad $G\alpha$ de las células del epitelio intestinal por la toxina de cólera conduce a la activación permanente de la subunidad $G\alpha$, lo que a su vez activa permanentemente a la proteína cinasa A (PKA), generando la apertura de un canal de cloro e inhibiendo la absorción de sodio por el intercambiador Na^+ - H^+ , debido a la fosforilación del canal y del intercambiador Na^+ - H^+ . El resultado neto de la fosforilación es una pérdida excesiva de NaCl y de grandes cantidades de agua en el intestino (Berg y col., 2002).

1.3.2.2 Regulación de la actividad de las proteínas G

El estado de actividad de las proteínas G es regulado por las tasas de intercambio de GDP por GTP y por la velocidad de hidrólisis del GTP a GDP. El primer proceso es catalizado por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, por sus siglas en inglés, Guanine Exchange Factors). Se ha propuesto a los receptores GPCRs como una proteína tipo GEF cuando ocurre la unión del ligando y la activación correspondiente del receptor **(Figura 2)**.

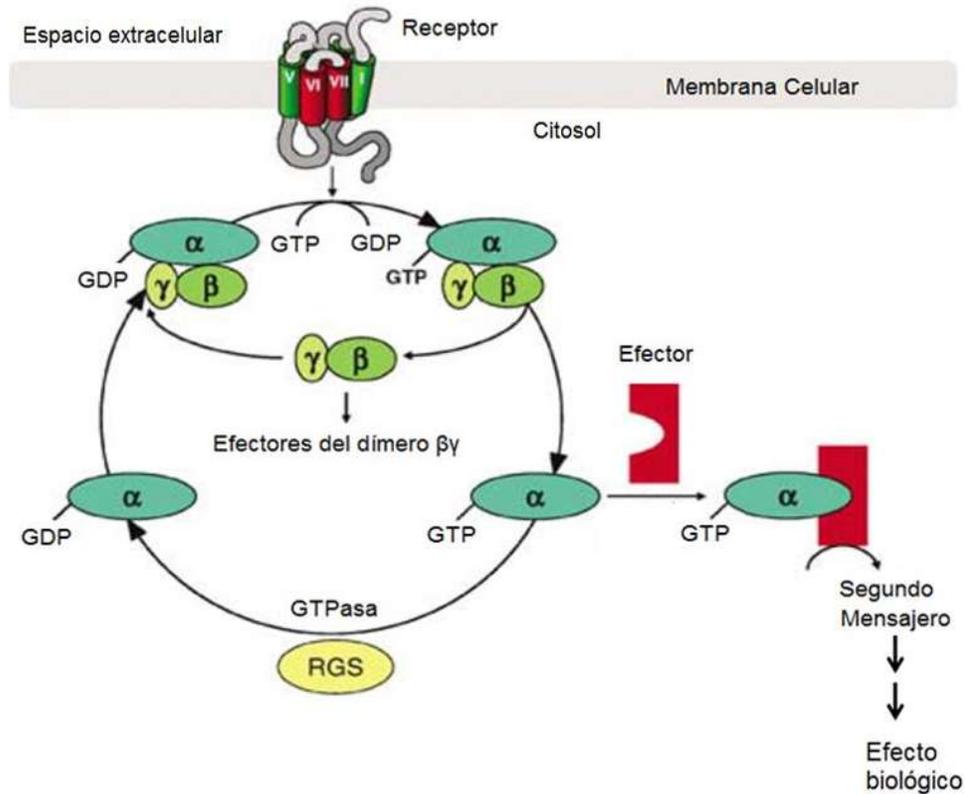


Figura 2. Ciclo de activación e inactivación de las proteínas G heterotriméricas.

Inicialmente el heterotrímero completo se halla anclado en la membrana mediante contacto directo con la membrana de las subunidades $G\alpha$ y $G\gamma$. La subunidad $G\alpha$ es la que tiene contacto con el receptor. En esta condición la subunidad $G\alpha$ tiene unido GDP ($G\alpha$ -GDP) y el heterotrímero se encuentra inactivo. Al haber un reconocimiento del ligando por parte del receptor, este sufre un cambio conformacional que provoca que la subunidad $G\alpha$ -GDP intercambie el GDP por GTP, de esta manera se separa el heterotrímero en la subunidad $G\alpha$ -GTP y el dímero $G\beta\gamma$ y se consideran activos ya que pueden interactuar con distintos efectores. El ciclo se completa cuando el GTP de la subunidad $G\alpha$ -GTP es hidrolizado a GDP y el heterotrímero se vuelve a asociar, para lo cual se requiere de la participación de una proteína reguladora de la señalización denominada (RGS, por sus siglas en inglés Regulator of G-Protein Signaling). Modificado de Milligan y Kostenis, 2006.

Sin embargo, existen ejemplos de proteínas tipo GEF que no son receptores GPCR, como es el caso de Ric8 en el hongo filamentoso en *Neurospora crassa*. Mutantes carentes de este gen, muestran afectaciones en los niveles de AMPc, dichos niveles son regulados por subunidades $G\alpha$ en este organismo, lo cual conduce finalmente a una disminución en el crecimiento vegetativo, desarrollo sexual y asexual (Wright y col., 2011).

La hidrólisis de las proteínas G es regulada por una familia de proteínas denominadas proteínas activadoras de GTPasa (GAP, por sus siglas en inglés, GTPase-Accelerating Protein) como es el caso de la enzima SSt2 de *S. cerevisiae* la cual se une a Gpa1p y es un regulador negativo directo de esta subunidad. De esta manera, las proteínas GEFs y GAPs son reguladoras de la señalización por proteínas G y se denominan por sus siglas en inglés RGSs .

1.3.2.3 Mecanismos no canónicos de asociación de las proteínas G heterotriméricas

Se ha establecido recientemente que las proteínas G heterotriméricas realizan funciones no canónicas, debido a la interacción con nuevos efectores, activación independientemente de receptores y la localización celular diferente a la membrana plasmática.

Las subunidades de proteínas G heterotriméricas pueden traslocarse reversiblemente de la membrana plasmática a endomembranas, como son aparato de Golgi, endosomas, núcleo (Marrari y col., 2007). Mediante un ensayo de coimmunoprecipitación Kino y col., 2005, mostraron que en células HeLa la subunidad $G\beta_2$ migra en conjunto con el receptor de glucocorticoides (GR, por sus siglas en inglés Glucocorticoid Receptor,) al núcleo y a su vez suprime la activación inducida por el GR de los genes de respuesta a glucocorticoides.

La detección de glucosa en *Saccharomyces cerevisiae* es un mecanismo no canónico ya que se ha demostrado la participación del receptor Gpr1 y la subunidad $G\alpha$, Gpa2p. No ha sido comprobada la participación de las subunidades Ste4p ($G\beta$) ni Ste18p ($G\gamma$) presentes en este organismo. La

información disponible hasta el momento indica que la subunidad Gpa2p ($G\alpha$) en estas condiciones funciona sin la participación de las subunidades $G\beta$ ni $G\gamma$. Además, las subunidades Gpa2p y Ste4p no interactúan entre sí lo cual refuerza la teoría de que no forman un parte de un heterotrímero (Versele y col., 2001).

Se ha comprobado de igual manera, que las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ en *S. cerevisiae* (Gpa2p, Ste4p y Ste18p, respectivamente) pueden estar en una configuración acitvada a niveles normalmente vistos solo en presencia de ligando, de manera espontánea en ausencia de receptor, esto sucede cuando el componente *sst2*, el cual codifica para un elemento RGS (Siekhaus y Dubrin, 2005) es mutado. De igual manera, se ha reportado la existencia de proteínas activadoras de señalización de proteínas G, independientes de receptor AGS (por sus siglas en inglés: receptor-independent activators of G-protein signaling), las cuales interactúan y activan a $G\alpha$ o $G\beta\gamma$ de manera específica (Blumer y col., 2005). Por ejemplo, en mamíferos, AGS1 incrementa el intercambio de GTP en la subunidades $G\alpha_i$ y $G\alpha_o$ actuando como un GEF, en la ausencia del receptor (Cismowski y col., 1999).

1.4 Proteínas G heterotriméricas en hongos

La primera subunidad de proteínas G heterotriméricas descubierta en hongos fue una subunidad $G\alpha$ (Gpa1p) de *S. cerevisiae*, la cual fue identificada mediante un ensayo de hibridación tipo Southern Blot usando como sonda cDNA de la subunidad $G\alpha_i$ de *M. musculus* (Nakafuku y col., 1987). De igual manera las primeras subunidades $G\beta$ (Ste4p) y $G\gamma$ (Ste18p) fúngicas fueron descubiertas en *S. cerevisiae* (Whiteway y col., 1989). Desde ese entonces ha habido mucho interés en el estudio de las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ de hongos debido a que se han identificado subunidades homologas a las de mamífero, la primera de ellas caracterizada funcionalmente fue Gna-1 ($G\alpha$) de *Neurospora crassa* que tiene un 55% de identidad respecto a $G\alpha_{i2}$ de *M. musculus* (Turner y Borkovich, 1993).

1.4.1 Evolución de las subunidades de proteínas G heterotriméricas fúngicas

Los análisis evolutivos de las subunidades $G\alpha$ realizados hasta el momento en hongos indican que estas subunidades tienen una distribución en cuatro grupos principales, clasificación derivada de la funcionalidad de las subunidades $G\alpha$ de mamífero (Bolker, 1998).

El grupo I se relaciona con las subunidades $G\alpha_i$ que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa, el grupo III con las subunidades $G\alpha_s$ que estimulan la actividad de la adenilato ciclasa, el grupo II y el grupo IV no han sido asociados a subunidades de mamíferos (Bolker, 1998; Li y col., 2007).

Por otra parte, hasta la fecha no se han realizado análisis de clasificación de las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ de hongos. Sin embargo, se ha propuesto la clasificación de dichas subunidades en otros eucariontes como metazoarios en donde las subunidades $G\beta$ se dividen en 5 grupos, y las subunidades $G\gamma$ en 13 grupos, obedeciendo a porcentajes de identidad entre las mismas (Prasobh y Manoj, 2009).

1.4.2 Número de subunidades $G\alpha$, $G\beta$, y $G\gamma$ en hongos.

El número de subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ reportadas hongos es de cuatro subunidades $G\alpha$, una subunidad $G\beta$ y una subunidad $G\gamma$ (Li y col., 2007) **(Tabla 1)**.

La comparación del número de subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ en organismos eucarióticos indica que las plantas presentan el repertorio más limitado, mientras que los animales presentan un número mayor de subunidades que hongos **(Tabla 1)**

Tabla 1. Número de subunidades de proteínas G heterotriméricas en eucariontes

Organismo		Phylum	Número de subunidades			Tamaño genoma (Mb)/Genes	Referencia
			G α	G β	G γ		
<i>Neurospora crassa</i>	Hongo	<i>Ascomycota</i>	3	1	1	42.9/10,620	Krystofova y Borkovich, 2005
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hongo	<i>Ascomycota</i>	2	1	1	12/ 5,885	Kübler y col., 1997.
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Hongo	<i>Ascomycota</i>	2	1	1	12.5/6,991	Ivey y col., 2010.
<i>Aspergillus nidulans</i>	Hongo	<i>Ascomycota</i>	3	1	1	31/10,982	Yu, 2006.
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Hongo	<i>Ascomycota</i>	2	1	1	10.9/5,412	Olmos-Navarro y col., 2010
<i>Trichoderma reesei</i>	Hongo	<i>Ascomycota</i>	3	1	1	33.4/9,120	Schmoll y col., 2009. Tisch y col., 2011.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Hongo	<i>Basidiomycota</i>	3	1	2	20/6,572	Li y col., 2007.
<i>Ustilago maydis</i>	Hongo	<i>Basidiomycota</i>	4	1	1	20/7,000	Regenfelder y col., 1994.
<i>Homo sapiens</i>	Mamífero	Chordata	21	6	12	3,234.8/39,972	Oldham y Hamm, 2008.
<i>Drosophila melanogaster</i>	Invertebrado	Arthropoda	11	3	2	165/13,600	Ishimoto y col., 2005.
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nemátodo	<i>Nematoda</i>	21	2	2	97/19,000	Bastiani y Mendel, 2006.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Planta	<i>Magnoliophyta</i>	1	1	3	119.6/33,583	Thung y col., 2012.
<i>Oryza sativa</i>	Planta	<i>Magnoliophyta</i>	1	1	2	382.7/30,534	Abe y col., 2012. Yadav y col., 2012

1.4.3 Funciones de las subunidades G α , G β y G γ en hongos.

La funcionalidad biológica reportada para subunidades G α , G β y G γ en hongos es bastante diversa. Entre las funciones reportadas se encuentran: morfogénesis, patogénesis, reproducción y/o detección de nutrientes.

Morfogénesis: En el 2002, Sánchez-Martínez y Pérez-Martín determinaron que el gen *gpa2* de *C. albicans*, el cual codifica para una subunidad G α del grupo III, es indispensable para la transición morfológica levadura-micelio. Cuando el gen *gpa2* fue deletado, *C. albicans* no realizó la transición morfológica aún tras someterse a estímulos ambientales que promueven dicho cambio. La expresión del alelo GPA2^{G354V}, el cual es un alelo constitutivamente inactivo, resultó incapaz de

separarse del dímero $\beta\gamma$, finalmente esta mutante no forma micelio en las condiciones ensayadas.

Además, se pudo asociar a Gpa2 a la ruta de señalización de las MAP cinasas (MAPK) ya que al sobreexpresar al gen que codifica para la MAPK denominada *hst7* en mutantes $\Delta gpa2$, se revirtió el fenotipo de crecimiento filamentoso.

Patogénesis: Mukherjee y col., en 2004, determinaron en el hongo fitopatógeno *Trichoderma virens* que la expresión del gen *tgaA* que codifica para una subunidad $G\alpha$ perteneciente al grupo I de la clasificación de subunidades $G\alpha$ fúngicas, es indispensable para parasitar a *Sclerotium rolfsii*. Esto fue determinado al verificar la incapacidad de infectar a *S. rolfsii* por la cepa mutante en el gen *tgaA* deletado.

Mutantes en el gen *gpa1* en el hongo basidiomiceto patógeno de humanos *C. neoformans*, el cual codifica para una subunidad $G\alpha$ perteneciente al grupo III, es incapaz de activar los mecanismos asociados a virulencia. Dichos mecanismos son la síntesis de melanina y la producción de la cápsula antifagocítica en respuesta a limitación de hierro.

Se comprobó que esa mutante de *C. neoformans* resultó significativamente menos patógena en un modelo de conejo para meningitis (Alspaugh y col., 1997).

Se determinó que la subunidad Gpa1 de *C. neoformans* regula la actividad de la enzima adelinato ciclasa, denominada Cac1, que regula los niveles de AMPc y por ende activando la proteína cinasa dependiente de AMPc, Pkr1. Finalmente, el factor de transcripción Ste12 α es activado por la proteína cinasa activada por mitógeno Cpk1 regulando la transcripción de genes asociados a reproducción y virulencia (D'Souza y col., 2001).

Reproducción: Donzeau y Bandlow en 1999, demostraron que Gpa2p (una subunidad $G\alpha$, perteneciente al grupo III) en *S. cerevisiae*, está involucrada en la esporulación al interactuar con el dominio regulatorio de Ime2p, una proteína esencial para la entrada a la meiosis y esporulación. Ime2p es una serina treonina cinasa encargada de fosforilar a varios complejos, entre ellos RPA (por sus siglas

en inglés Replication protein A) , el cual está encargado de la estabilización del DNA de cadena sencilla durante replicación, recombinación y reparación).

La otra subunidad $G\alpha$ de *S. cerevisiae* Gpa1p también ha sido asociada a la reproducción. *S. cerevisiae* tiene dos tipos de sexo ("a" y "α"), que secretan una feromona de naturaleza peptídica específica para el sexo opuesto, el reconocimiento de la feromona ocurre por receptores acoplados a proteínas G, el receptor para la feromona "α" es Ste2p y para la feromona "a" es Ste3p (Kurjan, 1993).

Al haber reconocimiento de la feromona por los receptores Ste2p o Ste3p. El heterotrímero compuesto por Gpa1p, Ste4p y Ste18p se disocia y la subunidad Ste4p activa a la tirosina cinasa Ste20p que es una proteína clave en la regulación de la cascada de las MAPK integrada por Ste5p, Ste11p, Ste7p que fosforila y activa la cinasa Fus3, que fosforila al factor de transcripción Ste12p.

Ste12p induce la transcripción de genes necesarios para promover el adecuado desarrollo del ciclo celular (Gustin y col., 1998). Finalmente, el reconocimiento de la feromona reprime el crecimiento y favorece la reproducción (Kallal y Kurjal, 1997; Versele, 2001) (**Figura 3**).

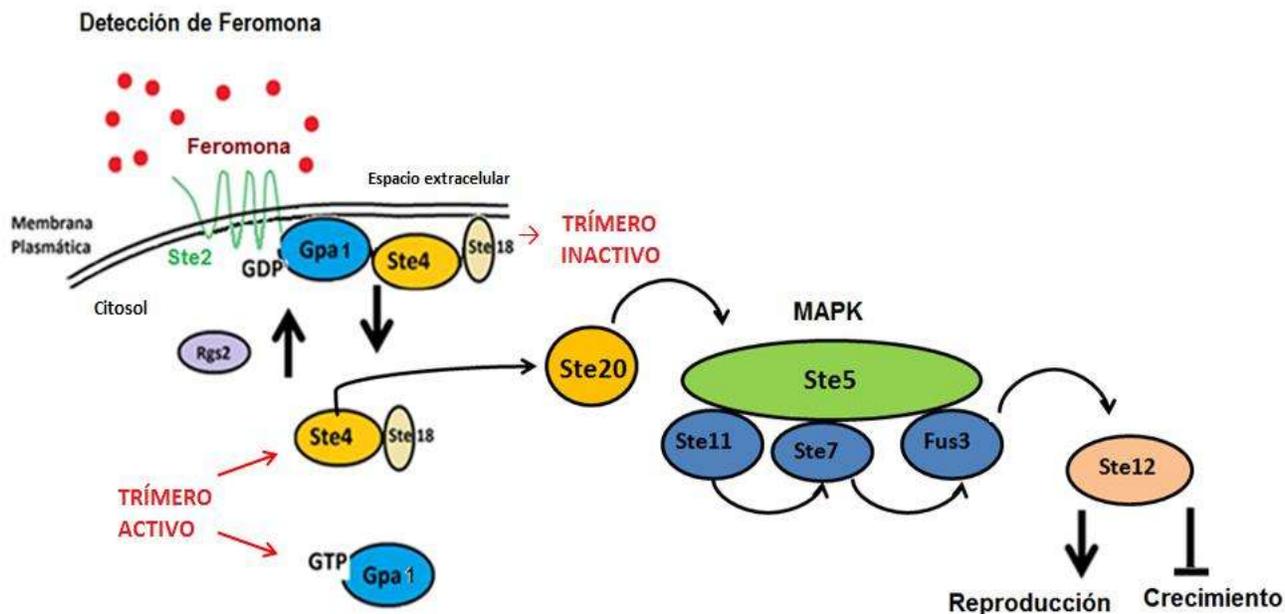


Figura 3. Ruta de señalización por feromonas en *S. cerevisiae*. El heterotrímero conformado por las subunidades G α -GDP (Gpa1p), G β (Ste4p) y G γ (Ste18p). Cuando el receptor (Ste2p) reconoce a la feromona, la subunidad G α sufre un cambio conformacional que provoca el intercambio de GDP por GTP y promoviendo la disociación del heterotrímero. La subunidad G β activa a la tirosina cinasa Ste20p que es una proteína reguladora de la cascada de las MAPK integrada por Ste5p, Ste11p, Ste7p, esta última fosforila y activa a la cinasa Fus3, que a su vez fosforila al factor de transcripción Ste12p que favorece la expresión de genes que promueven la reproducción y reprimen el crecimiento. Modificada de Versele y col., 2001.

Detección de nutrientes. Whelton y Hoffman en el 2000, determinaron que los genes *gpa2* y *git5* en *S. pombe* participan en la detección de glucosa. Estos genes codifican a las subunidades G α y G β , respectivamente. Ambos productos de estos genes son necesarios para activar a la enzima adelinato ciclasa (Git2), la cual aumenta la concentración de AMPc que a su vez activa la ruta de la PKA. Dicha ruta, entre otras cosas, inactiva procesos asociados al crecimiento en condiciones pobres de glucosa, como es la activación de la transcripción de *fbp1* que codifica a la enzima gluconeogénica fructosa-1,6 bifosfatasa. Fbp1 es activada vía la MAPK activada por estrés (SAPK) durante el crecimiento en medio de cultivo con bajas concentraciones de glucosa (Janoo y col., 2001).

Tabla 2. Funciones de subunidades de proteínas G heterotriméricas en hongos

Tipo de subunidad	Organismo	Phylum	Función en la que participa	Referencia
FadA (G α) Grupo I	<i>Aspergillus nidulans</i>	Ascomiceto	Regulador positivo del crecimiento y negativo de la esporulación	Hicks y col., 1997.
TgaA (G α) Grupo I	<i>Trichoderma virens</i>	Ascomiceto	Indispensable para parasitar a <i>S. rolfsii</i>	Mukherjee y col., 2004.
Gpa1p (G α) Grupo II	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomiceto	Reconocimiento de feromonas	Kallal y Kurjal, 1997; Versele, 2001.
Gpa2 (G α) Grupo III	<i>Candida albicans</i>	Ascomiceto	Regula transición morfológica levadura-micelio	Sánchez-Martínez y Pérez-Martín, 2002.
Gna3 (G α) Grupo III	<i>Neurospora crassa</i>	Ascomiceto	Regulación negativa de la conidiación	Kays y col., 2000.
Gpa2p (G α) Grupo III	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomiceto	Regulación negativa de la esporulación	Donzeau y Bandlow, 1999.
Gpa2 (G α) Grupo III	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ascomiceto	Detección de glucosa	Whelton y Holfman, 2000.
Fil1 (G α) Grupo III	<i>Ustilago hordei</i>	Basidiomiceto	Dimorfismo	Lichter y Mills, 1997.
Gpa1 (G α) Grupo III	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Basidiomiceto	Reproducción y virulencia ponla junto a las G alfas	Tolkacheva y col., 1994.
Git5 (G β)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ascomiceto	Detección de glucosa	Whelton y Holfman, 2000; Holfman y col., 1999.
Vgb (G β)	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomiceto	Virulencia	Tzima y col., 2012.
Klg β (G β)	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ascomiceto	Reproducción	Navarro-Olmos, 2010.
Gpb1 (G β)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Basidiomiceto	Reproducción.	Li y col., 2007.
GpgA (G γ)	<i>Aspergillus nidulans</i>	Ascomiceto	Crecimiento vegetativo	Yu, 2006.
Git11 (G γ)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ascomiceto	Detección de glucosa y reproducción	Landry y col., 2001.
Gpg1 (G γ)	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Basidiomiceto	Reproducción	Li y col, 2007.

2. ANTECEDENTES

Los niveles de transcrito de las subunidades G α , G β y G γ de proteínas G heterotriméricas han sido evaluados en diversos hongos y se han asociado a diversas funciones como son detección de nutrientes, luz, feromonas y participación en transiciones morfológicas, patogénesis.

Los participantes moleculares en el proceso dimórfico, como los involucrados en la detección de nutrientes en *M. circinelloides* se conocen parcialmente, y no se ha comprobado que sean fenómenos relacionados entre ellos mismos (Wolff y col., 2002; Ocampo y col., 2012; Quiles-Rosillo y col., 2003; López-Matas y col., 2000; Roze y col., 1999).

Se han identificado solamente cuatro subunidades G α en el zigomiceto *Mucor circinelloides*. De los cuales se tienen la secuencias genómicas completas de *mcgpa1* y *mcgpa3*, y se encontraron las secuencias genómicas parciales de *mcgpa2* y *mcgpa4*. Los niveles del transcrito *gpa3* fueron evaluados mediante ensayos de hibridación tipo Northern Blot en esporas, micelio, levaduras y las transiciones levadura-micelio y micelio-levadura en diferentes tiempos de crecimiento, encontrándose mayores niveles de expresión en esporas respecto al crecimiento vegetativo. El análisis evolutivo realizado para dos subunidades G α (McGpa1 y McGpa3) en *Mucor circinelloides* indica que pertenecen al grupo I de subunidades G α fúngicas (Meza-Carmen y col., 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Es escasa la información de los participantes moleculares en las vías de detección de señales involucradas en el dimorfismo y detección de nutrientes de *M. circinelloides*. La identificación de las subunidades G α , G β y G γ de *M. circinelloides* y el análisis de expresión de estos genes durante el dimorfismo y en la respuesta a la detección de fuentes de carbono y nitrógeno, permitirá establecer la posible relevancia biológica de dichas subunidades en estos procesos biológicos.

4. HIPÓTESIS

Las subunidades de $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ de proteínas G heterotriméricas de *M. circinelloides* se expresan diferencialmente durante el proceso dimórfico y durante el crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

5. OBJETIVOS

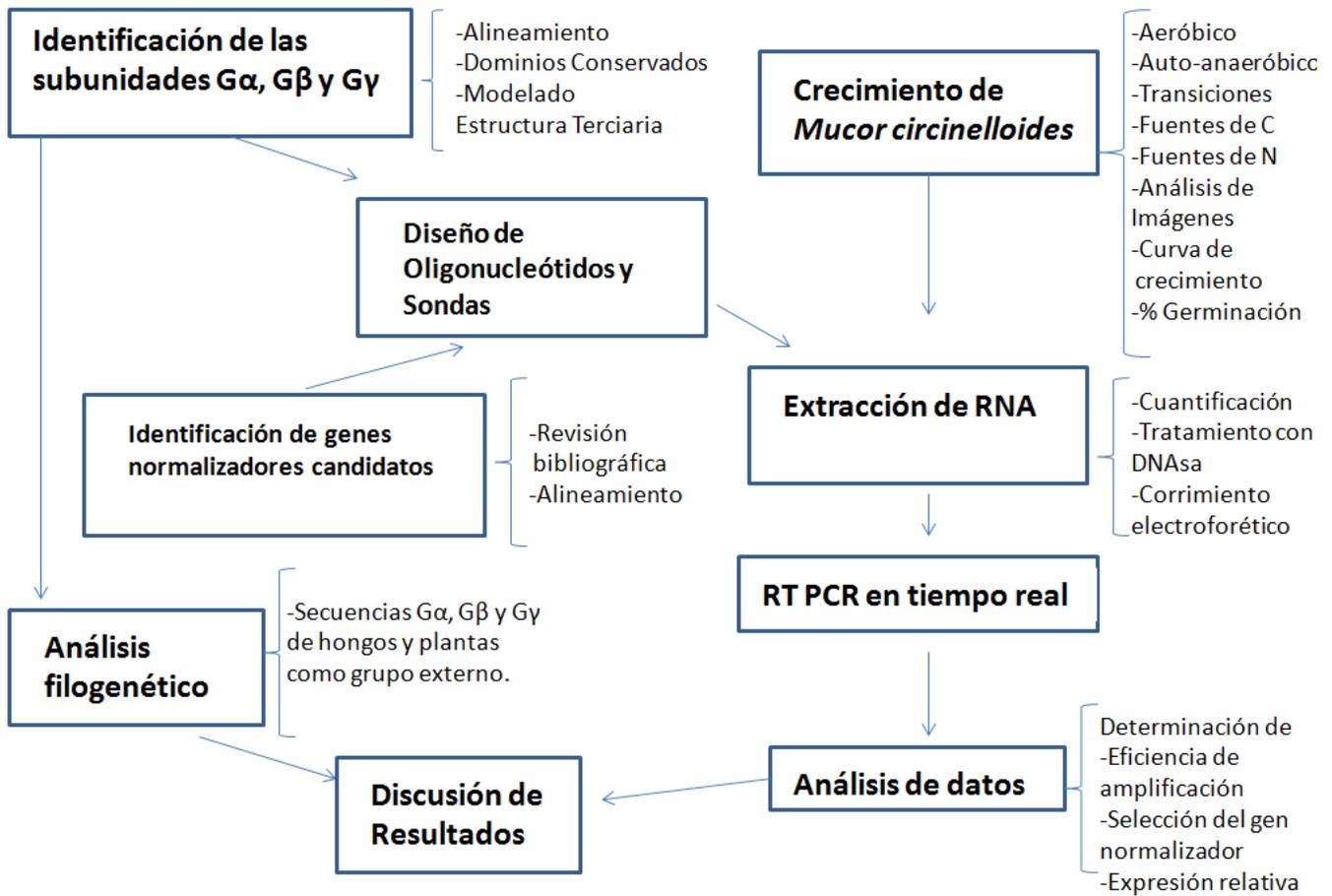
5.1 Objetivo General

Identificar y determinar la expresión de los genes que codifican proteínas G heterotriméricas en *M. circinelloides* en el dimorfismo y respuesta a nutrientes.

5.2 Objetivos Particulares

- A) Analizar *in silico* los genes que codifican las distintas subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ presentes en el genoma de *M. circinelloides*.
- B) Realizar un análisis filogenético de las subunidades $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$ de *M. circinelloides*.
- C) Validar un gen o conjunto de genes normalizadores para el análisis de expresión relativa en *M. circinelloides*.
- D) Determinar la expresión de los genes que codifican las distintas subunidades $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$ en *M. circinelloides* en el dimorfismo.
- E) Determinar la expresión de los genes que codifican las distintas subunidades $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$ en *M. circinelloides* en respuesta a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL GENERAL



7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepas utilizadas

La cepa de *M. circinelloides* R7B (ATCC 90680, cepa auxótrofa a leucina derivada de la cepa ATCC 1216b) (Roncero y col., 1989).

7.2 Medios de cultivo

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

Cada litro de medio contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de dextrosa (BD Bioxon) y 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en caso de medio sólido, se ajustó el pH 4.5 (Bartnicki-García, 1968).

7.2.2 Medios mínimos

Se emplearon tres medios de cultivo, suplementados con distintas fuentes de carbono y nitrógeno, las proporciones por cada litro de medio se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de los medios mínimos

Medio	Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno
A	20 g Glucosa (BD Bioxon) [M]=0.11	10 g Peptona de Gelatina (BD Bioxon) 1.5 g N total
B	20 g Glucosa (BD Bioxon) [M]=0.11	7.5g (NH ₄) ₂ SO ₄ (Golden-Bell) 1.5g N total
C	10.2 g Glicerol (Golden-Bell) [M]=0.11	10 g Peptona de Gelatina (BD Bioxon) 1.5 g N total

Además de lo indicado en la Tabla 3, cada litro de los medios A, B y C contaron con 3.5 g de KH₂PO₄ (Golden-Bell), 2.7 g de MgSO₄ (USB), 20 mg de L-Leucina (SIGMA), 2 ml de solución de vitaminas y 20 ml de solución de elementos traza.

Cada litro de solución de vitaminas contenía (1 mg de ácido nicotínico (SIGMA), 1 mg de tiamina (SIGMA), 200 mg ácido p-aminobenzoico (SIGMA), 50 mg de d-biotina (SIGMA), 25 mg m-inositol (SIGMA), 1 mg de piridoxina (SIGMA), y 1 mg de pantotenato de calcio (SIGMA). Una solución de elementos traza de 100 ml contiene 5 g de ZnSO₄·7H₂O (USB), 5 g de ácido cítrico·H₂O (SIGMA), 1 g de Fe(NH₄)₂(SO₄)·6H₂O (J.T. Baker), 0.25 g de CuSO₄·5H₂O (J.T. Baker) , 0.05 g de

H₃BO₃ (USB), 0.05 g de MnSO₄·H₂O (J.T. Baker) y 0.05 g de Na₂MoO₄·2H₂O (USB) (McIntyre y col., 2002).

7.3 Obtención y conteo de esporas de *M. circinelloides*

Placas de Petri con medio YPG sólido, se inocularon 50 esporas de *M. circinelloides* y se mantuvieron a 28°C en presencia de luz durante 4 a 5 días. Las esporas fueron colectadas agregando 5 ml de H₂O sobre las placas y raspando cuidadosamente con un asa de plástico, luego, las esporas fueron aspiradas y depositadas en un tubo de 50 ml. Las esporas fueron concentradas al centrifugar a 5000xg por 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente fueron lavadas con H₂O destilada estéril y centrifugadas de la misma manera. Las esporas fueron resuspendidas en 10 ml de H₂O destilada estéril. El conteo se realizó en un hematocítometro (PGC Scientific) usando el objetivo 40X de un microscopio óptico ATC 2000 (Leika), depositando 15 µl en la parte superior y 15 µl en la inferior, respectivamente. Se contaron las cuadrículas de los extremos y la del centro para ambas celdas de la cámara. Dicha cantidad fue multiplicada por el factor de 25000 y el resultado obtenido expresa esporas por mililitro de la muestra. Las esporas fueron conservadas a 4°C y empleadas en un máximo de siete días después de su obtención.

7.4 Crecimiento aeróbico y anaeróbico de *M. circinelloides*

Para llevar a cabo los crecimientos aeróbicos y anaeróbicos 500,000 esporas fueron inoculadas por cada mililitro de medio de cultivo. En el caso de crecimiento filamentoso los matraces se incubaron a 28°C, con agitación constante de 200 rpm, usando 20 ml de medio en matraces de 125 ml. Para el crecimiento levaduriforme matraces Erlenmeyer de 125ml fueron llenados con medio casi totalmente (aprox. 137ml), a los que se les colocó un tapón de corcho en la boca de cada uno de los matraces, dichos tapones estuvieron atravesados con una aguja que permitió la salida del CO₂ producido durante el metabolismo anaeróbico, dentro del matraz se colocó una barra magnética, el matraz se colocó sobre un agitador magnético permitiendo una agitación constante. Todo este sistema se le

conoce como sistema “auto-anaeróbico” (Salcedo-Hernández y Ruiz Herrera, 1993).

7.5 Transiciones Levadura-Micelio y Micelio-Levadura de *M. circinelloides*

Los experimentos de transición fueron realizados siguiendo las indicaciones de De la Cruz y col., 2007. Para la transición Levadura-Micelio, las esporas fueron germinadas en condiciones auto anaeróbicas en medio YPG y se mantuvieron por 10 horas en dichas condiciones para su posterior filtración y estas fueron depositadas en medio de cultivo fresco e incubadas en condiciones de crecimiento aeróbicas de 3 a 6 horas. Por otra parte, en la transición Micelio-Levadura las esporas fueron germinadas en condiciones aeróbicas en medio YPG por 5 horas antes de ser filtradas, cambiadas a medio fresco y posterior crecimiento en anaerobiosis por 3 a 6 horas.

7.6 Cuantificación del crecimiento

El crecimiento celular fue determinado midiendo biomasa total generada en medio líquido como peso seco. Las muestras biológicas de *M. circinelloides* (micelio o levaduras) fueron colectadas en papel filtro previamente seco y pesado. Las células fueron lavadas dos veces con agua destilada. El papel filtro conteniendo las células fueron secados por 96 horas a 80°C. Después del secado y enfriado, los filtros fueron pesados de nuevo para determinar el peso seco de las células, hasta que este se mantuvo constante.

7.7 Determinación de porcentajes de germinación de *M. circinelloides* en diferentes medios de cultivo

Con el objetivo de determinar los tiempos relevantes a ser estudiados en la medición de los niveles de transcrito se realizaron ensayos de germinación durante condiciones aeróbicas en diferentes medios; YPG (medio rico), y los tres medios usados: medio A (Glucosa + Peptona de Gelatina), medio B (Glicerol + Peptona de Gelatina), y medio C (Glucosa + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) en diferentes tiempos de crecimiento (3, 6, 12, 18 y 24 horas). Todos los ensayos fueron incubados a 28°C,

por triplicado. Se contaron al menos cien células para determinar el porcentaje de células germinadas en cada medio de cultivo evaluado.

7.8 Análisis de imágenes

Se empleó un microscopio Optihot-2 (NIKON) y una cámara Coolpix S10 (NIKON) para capturar las imágenes correspondiente a las morfologías obtenidas a los diferentes tiempo de crecimiento, fueron tomadas usando el objetivo 40X.

7.9 Extracción y cuantificación de RNA

La extracción de RNA se realizó mediante el uso de columnas de silica (RNeasy mini kit, QIAGEN). Muestras de distintos tiempos de crecimiento que incluyeron micelio, levaduras, esporas o muestras de las transiciones morfológicas de *Mucor circinelloides* fueron filtradas a través de papel filtro whatmann (para el caso de micelio) o membranas 0.45µm Millipore (para las otras morfologías) y las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su procesamiento, el cual se realizó posterior a la filtración de las células.

La lisis celular se realizó mediante rompimiento mecánico empleando perlas magnéticas (Roche) con la adición de β-mercaptoetanol como agente reductor e isotiocianato de guanidina como agente desnaturizante. Ambos compuestos se emplean para inactivar ribonucleasas y para facilitar el rompimiento celular, el rompimiento fue realizado en el lisador MagNA Lyser (Roche). Para realizar la extracción se siguieron las instrucciones del fabricante (RNeasy mini kit, QIAGEN), empleando la microcentrifuga 5417R (Eppendorf).

Todas las manipulaciones de muestras de RNA, como extracción, diluciones, tratamiento con DNAsa fueron realizadas en el ganibete de bioseguridad clase II Tipo A2 (Thermo Scientific). Las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente (SmartSpec Plus Bio-Rad) a $\lambda=260\text{nm}$ y $\lambda=280\text{nm}$, dichas absorbancias indican la presencia de ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente (Krebs y col., 2009). De manera que se evaluó la relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$, una relación $\frac{A_{260}}{A_{280}} \geq 1.90 - 2.0$ indica una calidad óptima de extracción (Yamaguchi

y col., 1992; Wilfinger y col., 1997). Las muestras de RNA total cuyo valor de relación $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ resultó menor a 1.8 fueron descartadas para análisis de RT-qPCR.

7.10 Tratamiento con DNAsa I de las muestras de RNA

A 1 µg total de RNA se le agregó 1 µl (1U) de DNAsa I (DNAsa I, Invitrogen), 1 µl de buffer de reacción de DNAsa (200mM Tris-HCl pH 8.4, 20mM MgCl₂, 500mM KCl, Invitrogen). La muestra se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La DNAsa se inactivó al agregar 1 µl de EDTA 25 mM (Invitrogen) a la muestra de RNA y posterior incubación a 65°C durante 10 minutos, para ello se empleó un incubador para microtubos de 2 ml (Eppendorf Thermomixer).

7.11 Electroforesis en gel de agarosa

Los geles de agarosa fueron preparados al 1-2% (p/v) con agarosa grado molecular (BIO RAD) y buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA (1 mM)). Se agregó bromuro de etidio (0.075 µl/ml de gel). Se montó el gel y las muestras se cargaron en una cámara de electroforesis (BIO RAD) conectada a una fuente de poder (PowerPac Basic, BIO RAD 300 V). Se empleó un buffer de carga que tiene glicerol (30% p/v), xilencianol (0.25% p/v) y azul de bromofenol (0.25% p/v) como colorantes de referencia. El marcador de tamaño molecular empleado fue el de 1 kb DNA Ladder Track-It (Invitrogen). Las condiciones de corrida fueron 90 V durante 30 minutos. El registro de la imagen del gel se obtuvo mediante el empleo de un fotodocumentador (Gel Doc XR+ Imager, Bio-Rad). Los geles para corrimientos de RNA fueron llevados a cabo con material y reactivos esterilizados dos veces. Mientras que las cámaras, moldes para geles y peines fueron lavados con solución degradadora de ribonucleasa (RNase Zap, Ambion), para posteriormente removerla con H₂O destilada estéril.

7.12 Aislamiento y purificación del DNA de geles de agarosa

Se empleó el sistema comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

7.13 Identificación de las subunidades G α , G β y G γ de proteínas G heterotriméricas en *M. circinelloides*

Las secuencias aminoácidas de las dos subunidades G α del ascomiceto *S. cerevisiae*: Gpa1p (NP_011868.1) y Gpa2p (NP_010937.3) y de las subunidades G β , Ste4p (NP_014855.3) y G γ , Ste18p (NP_012619.1) fueron obtenidas de la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Estas subunidades han sido ampliamente caracterizadas funcionalmente (Whiteway y col., 1989; Blumer y col., 1990; Whiteway y col., 1994; Lorenz y Heitman, 1997; Kubler y col., 1997; Hirshman y col., 1997). Dichas secuencias se emplearon como sondas en un alineamiento tipo BLAST en la página web de la secuencia del genoma de *Mucor circinelloides* (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>). De manera simultánea, se empleó la opción KOG (Grupos de genes ortólogos eucarióticos por sus siglas en inglés: EuKaryotic Orthologous Groups) y búsqueda por palabra clave, en dicha página. Las proteínas identificadas correspondientes a subunidades G α , G β y G γ de *M. circinelloides* fueron alineadas en MegAlign (DNASTAR) mediante ClustalW. Por otra parte, las secuencias previamente identificadas fueron además utilizadas como sondas en un análisis tipo BLAST en la página del genoma de *M. circinelloides* para localizar otras posibles secuencias correspondientes a este mismo tipo de proteínas que no hubieran sido identificadas por los criterios de búsqueda antes mencionados.

7.14 Modelado tridimensional de las subunidades G heterotrimericas de *M. circinelloides*

Se empleó el programa SWISS Model (Arnold y col., 2006), para generar los modelos tridimensionales de las supuestas subunidades G α , G β y G γ de *M. circinelloides* identificadas, se emplearon los parámetros predeterminados del programa. Las estructuras obtenidas fueron comparadas con las siguientes secuencias cuyas estructuras cristalograficas fueron previamente determinadas:

G α_0 de *Mus musculus* (NP_034438.1), G β_1 (1OMW_B) y G γ_2 (1GP2_G) de *Bos taurus* (Slep y col., 2008; Wall y col., 1995).

7.15 Análisis filogenético molecular de las subunidades G heterotrimericas de *M. circinelloides*

Las distintas secuencias G α , G β y G γ identificadas en *M. circinelloides* fueron empleadas como sondas para una búsqueda de secuencias de proteínas G heterotrimericas en hongos y plantas (*Arabidopsis lyrata*, *A. thaliana* y *Brassica napus*, que fueron empleadas como grupo externo) depositadas en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Estas secuencias de plantas fueron elegidas puesto que se trataron de las primeras subunidades G heterotrimericas identificadas en el reino *Plantae* (Ma y col., 1990; Mason y Botella, 2000; Thung y col., 2012).

Para lo cual se utilizó la herramienta Blastp (Altschul y col., 1997), con $e=10^{-5}$, empleando la base de datos de proteínas no redundantes (Non-redundant protein sequences nr) y se restringió la búsqueda al tipo de organismo deseado (hongos o las plantas), usando la matriz BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff, 1993). Una vez obtenidos los resultados, estos fueron descargados y dichas secuencias aminoacídicas fueron depuradas manualmente, es decir removiendo secuencias redundantes. Por ejemplo existe el caso de hongos con estadios telomorfo o anamorfo que se refieren a las mismas secuencias aminoacídicas. También fueron removidas las secuencias correspondientes a proteínas codificadas por un mismo gen. Las secuencias de las distintas subunidades fueron alineadas mediante ClustalW (Thompson y col., 1994) y editadas manualmente en BioEdit. Se determinaron los parámetros (*Modelo de sustitución y +G*) del análisis filogenético para las tres subunidades en MEGA5 (Tamura y col., 2008). Para el caso de las subunidades G α el modelo de sustitución empleado fue el propuesto por Whelan y Goldman, 2001. Para las subunidades G β y G γ el modelo de sustitución fue el propuesto por Jones y col., 1992. Estos métodos fueron elegidos en función a la determinación numérica del criterio bayesiano para cada conjunto

de secuencias (MEGA5). Se determinó la inferencia evolutiva usando el método de máxima verosimilitud con un número de 500 repeticiones en cada caso.

7.16 Ensayo de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR)

La amplificación y detección de los genes se realizó usando el método de sonda de hidrólisis, que emplea la actividad 5' de la DNA polimerasa. Para asegurar la especificidad de todas las detecciones, los oligonucleótidos y sondas con estructuras secundarias mínimas fueron diseñadas mediante la herramienta bioinformática disponible por Biosearch Technologies (www.biosearchtech.com). La RT-qPCR se realizó en el sistema LightCycler480 II (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA), usando el kit SuperScript III Platinum One-step RT-qPCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cada 25 µl de volumen de reacción contenía 5 µl de RNA templado (100 ng), 0.5 µl de mezcla de enzimas, 12.5 µl de mezcla de reacción 2X, 0.5 µl de oligonucleótido directo 10 µM, 0.5 µl de oligonucleótido reverso 10 µM, 0.5 µl de sonda 5 µM, y 5.5 µl de agua libre nucleasa, esta mezcla fue preparada en un gabinete para PCR (UVP). Todos los oligonucleótidos y sondas utilizadas están enlistados en la Tabla 5.

La RT-qPCR se inició por la adición de la transcripción reversa (50°C, 30 min) y la desnaturalización inicial (95°C, 5 min), seguidas por 45 ciclos de amplificación a 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Las señales de fluorescencia fueron colectadas a cada ciclo de amplificación a 60°C. Las curvas de amplificación fueron analizadas a longitudes de onda de absorción de 530 nm. En cada experimento fueron incluidos genes de expresión constitutiva como controles positivos, y agua como templado como control negativo.

Tabla 4. Oligonucleótidos y sondas empleados para los ensayos de RT-PCR en tiempo real.

Secuencia (Número ID)	Oligonucleótido directo (5'-3') Oligonucleótido reverso (5'-3') Sonda (5'-3') FAM-BHQ1	Tm (°C) / GC (%)	Secuencia (Número ID)	Oligonucleótido directo (5'-3') Oligonucleótido reverso (5'-3') Sonda (5'-3') FAM-BHQ1	Tm (°C) / GC (%)
<i>mcgpa1</i> (45435)	GGAGAACATGGCGTATCGTA GCAGCGAATCAGCTTCAATCTG TGCCTCATCGAAAACAGACTTCATTC	66.88 / 52.4 66.64 / 50 69.4 / 44.4	<i>mcgpb1</i> (112430)	TGCACATGATGCAGAAATACATTG GCGCCACCTGTAGCAAAC TAGCCGCTTCATCCACAGGCAC	65.21 / 37.5 65.6 / 61.1 69.21 / 59.1
<i>mcgpa2</i> (142505)	ACAAAGGCGGTGACAACATATGATG GGTTTCTGTTGCGCAGGTAAG CCGGGTGCCAGTATCTCTTGCA	66.7 / 45.8 66.52 / 52.4 70.3 / 59.1	<i>mcgpb2</i> (167321)	AGCCGCTGCAAGAAGAGAAG CGTTGTGTCTGCCAATGCT AGGCATTGAAAGAGCGTATCAAACAGCG	66.08 / 55 65.33 / 52.6 69.77 / 46.4
<i>mcgpa3</i> (40656)	ATGCAGCGATTCTTTCACTCA GCTGCCATGACAAACTTGAC TCGTCTGCTGAAAAGCAGGTTTACAC	66.12 / 40.9 65.58 / 50 69.9 / 46.2	<i>mcgpb3</i> (177805)	GCGAGGGCTTGATTTATTCAGCTT CCCAGTACCATGACCTTCCAAT ACGATCAAAGGTGGAAATTCATCTGGCA	66.67 / 45.8 66.85 / 47.8 69.52 / 46.4
<i>mcgpa4</i> (138841)	TGGACCACTCGGCATTCTCT AGCCGCTGCAGTCTTCTGG CTGGAGAGCAAATCCAACGCGGA	67.46 / 55 67.09 / 66.7 70.4 / 56.5	<i>mcgpg1</i> (144686)	ATCCCGCATACCCATTTCAAGAG GCTCTGCGAATGGATCAGGAT TCGATCGCTTATTGAATACTGTGACAGAAA	65.99 / 47.8 66.17 / 52.4 68.2 / 37.9
<i>mcgpa5</i> (109555)	CCTGCTGAACCTGACGTTTGAG TGGAACGAGCTGACAGGAT CGAGACGAATTGGAACACTACATTGGCC	65.8 / 50 65.5 / 52.6 69.4 / 50	<i>mcgpg2</i> (145510)	CAGTTGGACATTCAGAAATAACAG CCCACACTGAAGGCCACAA CAGAAGCATCCACAAGCTTGATATCGTA	65.83 / 44 67.12 / 57.9 68.14 / 42.9
<i>mcgpa6</i> (151649)	GGTGTGGAGACTCTGAAAAG GCAGCGTTTGGATGGTGTG TCAACAGTCTGAAAACAAATGAGGC	67 / 57.1 66.82 / 55 68.7 / 44	<i>mcgpg3</i> (146836)	TGTTTCTGAAGCAAGTCGATCATTG GATGCGCCACATCCATTGTC CGATTACTGTCAATCCACCCTGATTGTA	66.45 / 40 67.1 / 55 69.68 / 44.8
<i>mcgpa7</i> (137808)	CCAAGTGTCTGGAAGAATC GCGGCTATTGACAACGGA TCGCATGATGGAGAGTCTTGTGTTGT	66.9 / 52.4 65.1 / 55.6 68.7 / 46.2	<i>mc18S</i> (111102)	TCGAGCAGACATTGAAGCATAAC CTGTGGAGTAGGTTGAGGAGAT AGCAGAGCAAAGACAGGGCGCT	65.06 / 45.5 66.71 / 50 69.54 / 56.5
<i>mcgpa8</i> (32511)	AACAGGCAAAAGCCAAATGATG TTGAGGATCAAGCAGTTGGAGCAAA	66.3 / 47.6 65.61 / 45.5 70.5 / 46.2	<i>mc28S</i> (115810)	CCATCAGTAGGTGGGTGAACA TCGATGTGGCTCTTCTCTATC TCCAACGCTTACTGAATTCGCTTCA	66.61 / 52.4 65.56 / 52.4 68.14 / 42.3
<i>mcgpa9</i> (152023)	CCACCAGAACGGCTACTCA TGGCCTGTATAGACTCAATGATG CAAGAGGAATTGAAAAGTTGGAGGCTGA	66.18 / 57.9 65.05 / 41.7 68.4 / 42.9	<i>mcvma-1</i> (154376)	GTGCTCGTCTTGCCTCTTTC ACGGCACCACAACAGTGA ACGAACGTGCTGGTAGACTACTTG	65.14 / 55.3 67.54 / 52.6 69.65 / 52.6
<i>mcgpa10</i> (139892)	GGGCGATAGTCGAGCAATA AAGGCGCTGAATCCATCAGATAG ATCGCTGCAATTTGAAAGTGTGGGC	65.8 / 57.9 66.6 / 47.8 70.5 / 46.2	<i>mctfc-1</i> (106349)	ATGGGCGGTGACGAGGGTTT GGGCATCTGTGGCAATCTTTC TGGATGCAGAGGAACATCAACGC	67.21 / 57.9 66.32 / 52.4 68.48 / 52.6
<i>mcgpa11</i> (139870)	GGATGAGCAACGAGGTCAA GGAACCCACCGTCATGGAT TTACTATTGCTGGGCGCTGGC	65.16 / 52.6 66.48 / 57.9 68.7 / 57.1	<i>mce1</i> (26195)	TTGGCGTTGCCCTTCTTTG TGATGCCGTTGTATTGATTTGAG TTCTCTGAACCCATTGCTGCC	66.64 / 52.6 64.78 / 41.7 68.13 / 54.5
<i>mcgpa12</i> (86422)	TCAGCGCAGACATTGTTCAAG GGTTTCCGATACCGGTATGATAG GGTTTCCGATACCGGTATGATAG	66.27 / 50 66.56 / 48 66.56 / 48	<i>mctfb4</i> (155179)	GGCATTCTTGCCAGACAGATAT GGCATTCTTGCCAGACAGATAT TCGCAACTACTCAATCTGCCGA	65.54 / 45.5 65.42 / 45.5 68.65 / 52.2
			<i>mcef-1</i> (156959)	GTCCGTGATATGCGTCAAACC AGCGGCCTTGGTGACCTTAC CGTGTCGGTGTCAACAGGCT	65.68 / 52.4 67.12 / 60 69.93 / 59.1

7.16.1 Determinación de las eficiencias de amplificación de RT-qPCR

Las eficiencias de amplificación de RT-qPCR para cada gen, fueron determinadas mediante los valores de Cq (Cq es el valor donde la curva de amplificación de la reacción pierde linealidad y adopta una tendencia exponencial) correspondientes a la amplificación para cada uno de todos los genes usando las siguientes concentraciones de RNA total por reacción: 500 ng, 50 ng, 5 ng, 0.5 ng, 0.05 ng. Estos datos se utilizaron para generar una curva estándar de concentración, en donde se graficaron los log₁₀ de concentración con sus Cq correspondientes. Se trazó una recta que une estos puntos. Y se determinó la pendiente de dicha recta

La eficiencia de amplificación se calculó de la siguiente manera:

$$E = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{pendiente}} \right)} - 1 \right) \times 100.$$

7.17 Selección de genes normalizadores de *M. circinelloides* para realizar ensayos de RT-qPCR

El análisis matemático requerido para identificar los genes normalizadores se realizó siguiendo la propuesta de Vandesomepele y col., 2002.

La estabilidad individual (M_j) para cada gen candidato normalizador se determinó como se muestra a continuación:

($\forall j, k \in [1, n], j \neq k$):

$$A_{jk} = \left\{ \log_2 \left(\frac{a_{1j}}{a_{1k}} \right), \log_2 \left(\frac{a_{2j}}{a_{2k}} \right), \dots, \log_2 \left(\frac{a_{mj}}{a_{mk}} \right) \right\} = \left\{ \log_2 \left(\frac{a_{ij}}{a_{ik}} \right) \right\}_{i=1 \rightarrow m}$$

$$V_{jk} = \text{desv. est.}(A_{jk})$$

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n - 1}$$

Donde M_j es la estabilidad individual de cada gen, j y k corresponden a dos genes candidatos normalizadores diferentes, cada subíndice entre $[1 \dots m]$ de a_1 - a_m corresponde a cada uno de los estadios morfológicos evaluados (esporas, crecimiento miceliar y levaduriforme 6, 12 y 24 horas). De manera ilustrativa a_{1j} es el Cq del gen j en la condición a_1 .

La pareja de genes más estable en su expresión en las condiciones analizadas, se calculó como se muestra a continuación:

($\forall j, k \in [1, n], \forall p, q \in [1, m], j \neq k, p \neq q$):

$$R_{jkpq} = \frac{a_{qj}}{a_{qk}} \cdot \frac{a_{pk}}{a_{pj}} \quad (\text{si } R < 1, E = R^{-1}; \text{ si } R \geq 1, E = R)$$

$$R_{jk} = \text{promedio}(R_{jkpq})$$

Donde j y k corresponden a dos genes candidatos normalizadores diferentes; p y q corresponden a dos condiciones morfológicas diferentes (esporas, crecimiento miceliar y levaduriforme 6, 12 y 24 horas). De manera ilustrativa a_{qj} es el Cq del gen j en la condición a_q . E es el error asociado al uso de un solo normalizador. El valor de R_{jk} más pequeño corresponde a la mejor pareja de genes normalizadores, es decir la que tiene asociada el menor error de normalización.

7.18 Análisis matemático de los niveles de expresión relativa en los ensayos de RT-qPCR

El modelo matemático empleado para los análisis de datos fue el Delta-Ct (Livak y Schmittgen, 2001), con corrección de eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001). Mediante esta fórmula se puede saber el número de transcrito del gen de interés de manera relativa al gen (o genes) normalizador (normalizadores) en cierta condición.

La fórmula empleada es la siguiente:

$$Expresión\ Relativa = \frac{2^{(E_{gen\ interés})(Cq_{gen\ interés})}}{2^{(E_{gen\ normalizador})(Cq_{gen\ normalizador})}}$$

Donde E significa eficiencia de amplificación y los Cq del gen de interés y del gen normalizador corresponden al mismo estadio morfológico.

7.19 Análisis estadístico de los resultados

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza de un vía (ANOVA). Se usó el programa STATISTICA 7. Además, la prueba post hoc empleada fue Fisher, las diferencias estadísticamente significativas ($\alpha \leq 0.05$) se muestran con letras.

8. RESULTADOS

8.1 Identificación de subunidades de proteínas G heterotriméricas en *M. circinelloides*

En 2006, Meza y col., lograron identificar la secuencia completa de dos genes que codifican para subunidades $G\alpha$ (*mcgpa1* y *mcgpa3*) y dos fragmentos correspondientes a los marcos de lectura abiertos de *mcgpa2* y *mcgpa4*, en *M. circinelloides*. Los productos de dichos genes tienen asignados los siguientes números de acceso en el Genbank del NCBI: McGpa1 (AJ310307), McGpa2 (AJ3109009.1), McGpa3 (AAP12458), McGpa4 (DQ288161). Durante la realización de este trabajo no se identificaron subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ en este organismo.

Actualmente, se encuentra disponible la información correspondiente a la secuencia del genoma de *M. circinelloides*, lo que supone una importante ventaja metodológica, esto debido a que los análisis bioinformáticos son herramientas valiosas en identificación de secuencias, análisis filogenéticos, modelado molecular y estudio de compuestos hipotéticos (Vedani y Smiesko, 2009). Mediante el uso de herramientas bioinformáticas como alineamientos tipo BLAST, y reconocimiento de dominios conservados se identificaron distintas subunidades correspondientes a proteínas G heterotriméricas. Preliminarmente, fueron identificadas en *M. circinelloides* secuencias correspondientes a doce subunidades $G\alpha$ (McGpa1-12), cuatro subunidades $G\beta$ (McGpb1-4) y tres subunidades $G\gamma$ (McGpg1-3).

8.1.1 Subunidades $G\alpha$ en *M. circinelloides*

Fueron identificados doce genes putativos que codifican para subunidades $G\alpha$ en *M. circinelloides* (*mcgpa1-mcgpa12*). Los cuales presentan distinto número y distribución de exones e intrones lo que indica muy probablemente que se tratan de genes distintos (**Figura 4**).

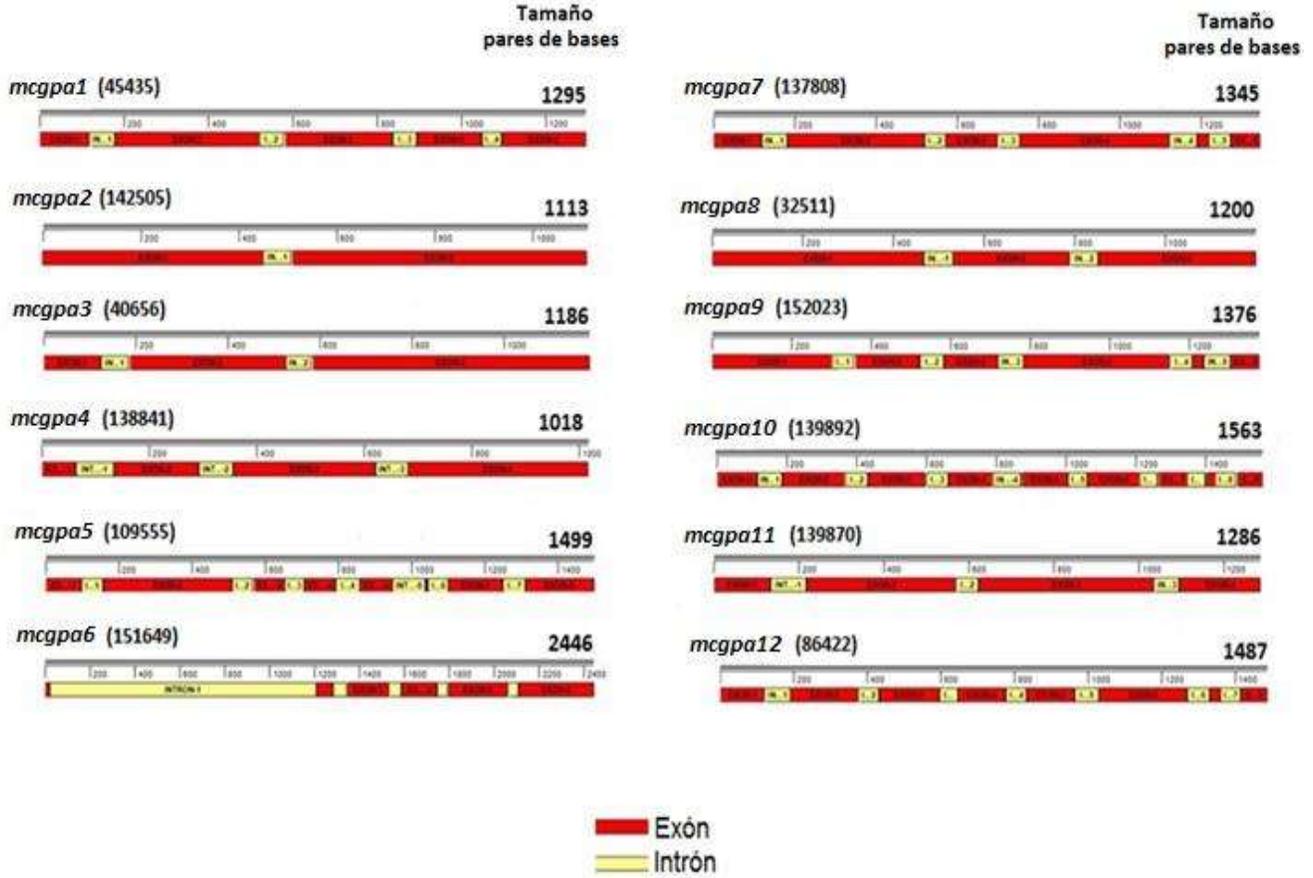


Figura 4. Presencia de exones e intrones en los marcos de lectura abierto de las subunidades $G\alpha$ de *M. circinelloides*. Se muestran los esquemas correspondientes a los doce genes (*mcgpa1*-*mcgpa12*) que codifican para subunidades $G\alpha$ putativas en *M. circinelloides*. En paréntesis se muestra el número de ID del gen, el número de pares de bases correspondientes al marco de lectura abierto se muestra a la derecha, y la distribución de los exones e intrones. Los marcos de lectura abiertos no están representados a escala.

Los números de acceso, tamaños, y porcentajes de identidad de las proteínas $G\alpha$ identificadas en *M. circinelloides* respecto a las subunidades Gpa1p y Gpa2p (*S. cerevisiae*) y $G\alpha_0$ (*M. musculus*) se muestran en la Tabla 5.

En donde se muestran número de ID de las proteínas, número de aminoácidos, Peso Molecular (P.M.), Punto Isoeléctrico (P.I.) y porcentajes de identidad respecto a las subunidades $G\alpha$ de *S. cerevisiae* (Sc Gpa1p y Sc Gpa2p) y la subunidad $G\alpha_0$ de *Mus musculus*.

Tabla 5. Subunidades $G\alpha$ presentes en *M. circinelloides*.

Nombre	Subunidades $G\alpha$				% Identidad		
	Número de ID de la Proteína	Número de aminoácidos	P. M. (kDa)	P.I.	Sc Gpa1p (NP_011868.1)	Sc Gpa2p (NP_010937.3)	Mm $G\alpha_0$ (NP_034438.1)
McGpa1	45435	357	40.9	5.12	38.9	51.7	54.9
McGpa2	142505	352	40.4	5.12	44.9	41.2	52
McGpa3	40656	356	40.6	4.64	46.3	41.7	52.6
McGpa4	138841	273	31.6	5.60	47.9	43.1	49.1
McGpa5	109555	349	40.4	7.72	45.8	37.1	42.7
McGpa6	151649	345	40.3	7.50	42.7	38.2	45.2
McGpa7	137808	350	40.7	7.89	42.6	37.8	46.2
McGpa8	32511	357	41.5	6.02	39.8	51	52.1
McGpa9	152023	356	41.1	5.37	43.3	39.8	45.4
McGpa10	139892	354	40.7	8.01	40.5	54.5	42.4
McGpa11	139870	362	41.6	5.15	38.4	47.7	49.4
McGpa12	86422	355	40.3	6.25	44.4	39.8	46.4

Los porcentajes de identidad de las doce subunidades predichas $G\alpha$ de *M. circinelloides* (McGpa1-McGpa12) respecto a las subunidades Gpa1p y Gpa2p de *S. cerevisiae*, se encuentran entre un 37.1-54.9%; respecto a la subunidad $G\alpha_0$ de *Mus musculus* oscilan entre 42.4-54.9%. Los porcentajes de identidad entre las doce subunidades $G\alpha$ oscilan entre un 35.9%-69.5% (**Tabla 5**).

Con el objetivo de verificar la presencia de los dominios característicos de estas subunidades $G\alpha$ identificadas en *M. circinelloides* y la presencia de residuos relevantes para modificaciones postraduccionales se realizó un alineamiento de

las subunidades G α de *M. circinelloides*, *S. cerevisiae* y de *M. musculus*. Las doce subunidades G α identificadas en *M. circinelloides* muestran los dominios de unión a guanina denominados cajas G1-G5, al igual de la caja consenso asociada a la unión a GTP (GXGXXGKST) y el dominio con actividad de GTPasa (DXXGQ) (Schmoll, 2008). Diez de las subunidades G α de *M. circinelloides* presentan el sitio de miristoilación en la Glicina +2, se conoce que esta modificación favorece el anclaje de la subunidad G α a la membrana (Mumby y col., 1990), McGpa4 y McGpa6 no muestran dicha sitio potencial de mirostilacion. Sin embargo, se ha demostrado que no todas las subunidades G α lo presentan como es el caso de la subunidad Gpa2 de *S. pombe* (Isshiki y col., 1992), cuya funcionalidad ha sido comprobada en la detección de nutrientes (Welton y Hoffman, 2000).

Se realizó la búsqueda de los sitios putativos de ADP ribosilación por las tóxima de cólera y pertussis en las subunidades G α identificadas en *M. circinelloides* y los zigomicetos *R. oryzae* y *P. blakesleeanus*. Este ha sido un criterio de identificación de subunidades G α .

Las doce subunidades Ga de *M. circinelloides*, muestran el residuo de arginina susceptible de ADP-ribosilación por la tóxima del cólera (CTX) (Freissmuth y Gilman, 1989; Levis y Bourne, 1992), Ninguna de ellas presenta el sitio para ADP-ribosilación por la toxina pertussis de *Bordetella pertussis*(PTX) en el residuo de cisteína del motivo (CAAX) (West y col., 1985). De igual manera, las demás proteínas G α identificadas en los zigomicetos *R. oryzae* y *P. blakesleeanus* presentan el sitio de ADP-ribosilación por la tóxima del cólera y no por la tóxima pertussis. Solamente la subunidad RoGpa8 de *R. oryzae* no presenta ningún sitio canónico susceptible a ADP- ribosilación, ni por la tóxima pertussis ni por la tóxima del cólera. **(Figura 6).**

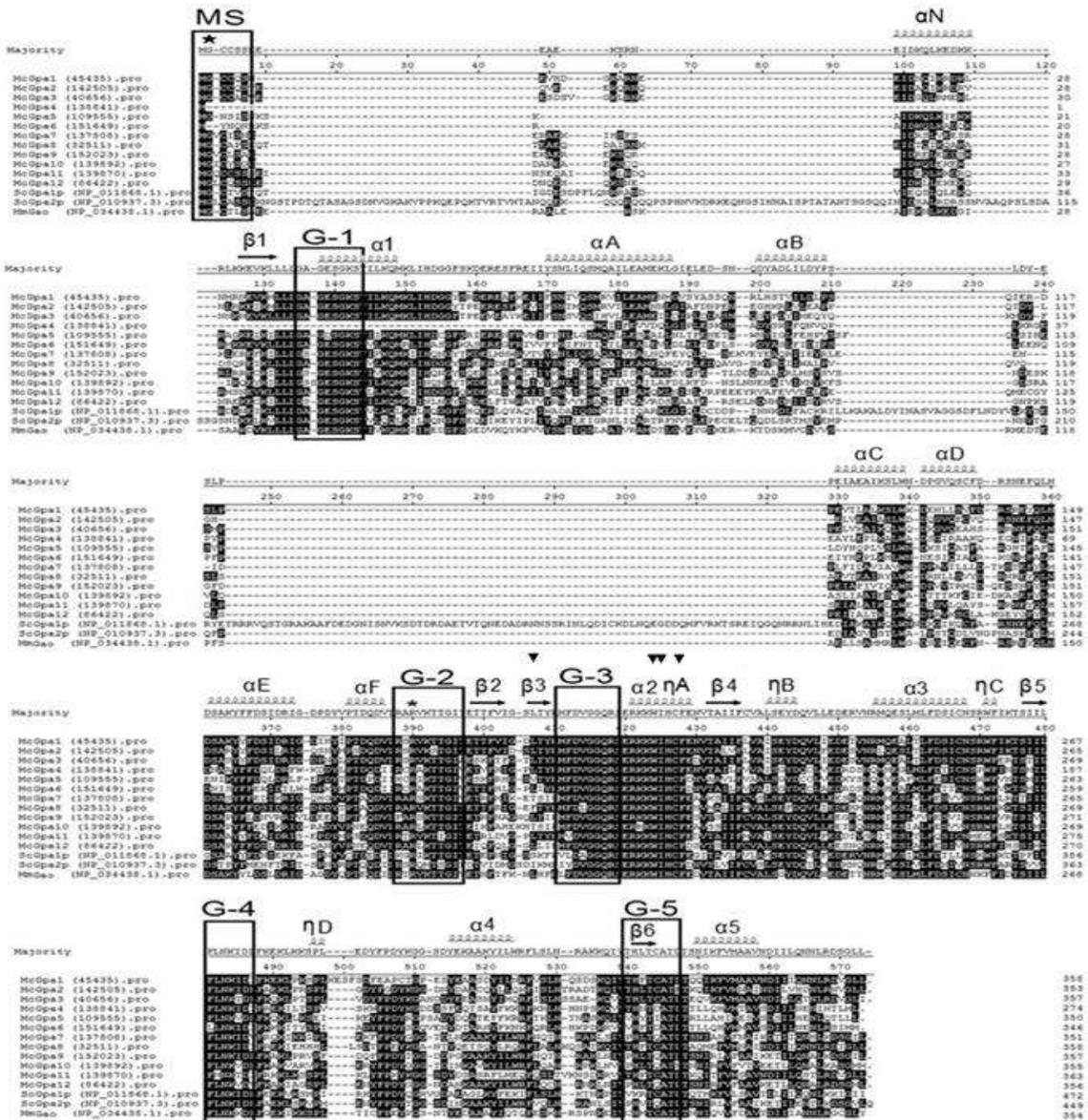


Figura 5. Alineamiento de las subunidades Gα de *M. circinelloides*. Se alinearon mediante ClustalW las doce secuencias Gα de *M. circinelloides* (McGpa1-McGpa12), las secuencias Gpa1p y Gpa2p de *S. cerevisiae* y Gα_o de *M. musculus*. Se muestran en la caja (MS) el sitio de miristoilación resaltando el residuo de Gli-2 con una estrella. Además los dominios de unión a guanina se muestran en las cajas G-1 a G-5. Los triángulos invertidos indican residuos que interactúan con la subunidad Gβ, y las estructuras secundarias indican con hélices (Prasobh y Manoj, 2009). El asterisco muestra el residuo de arginina susceptible de ADP-ribosilación por la toxina cólera (Freissmuth y Gilman, 1989).

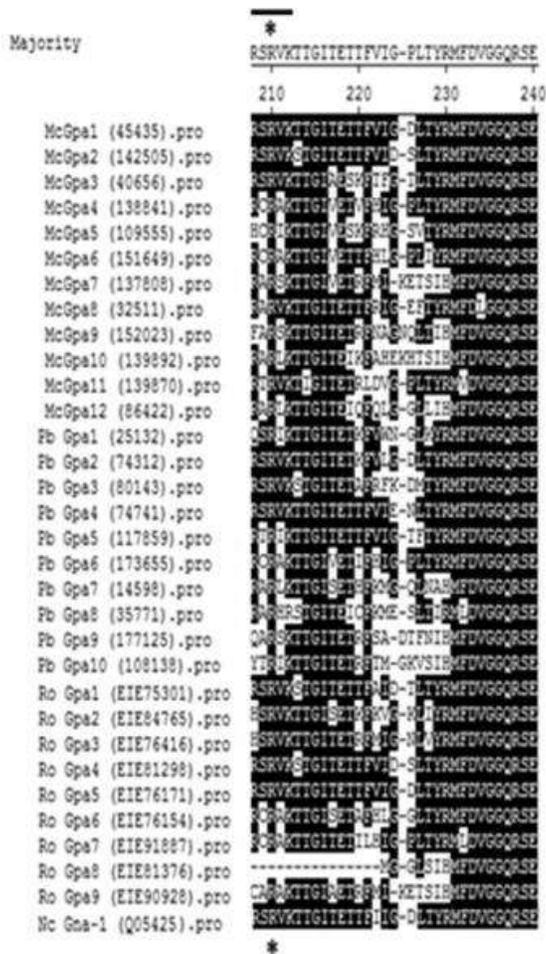
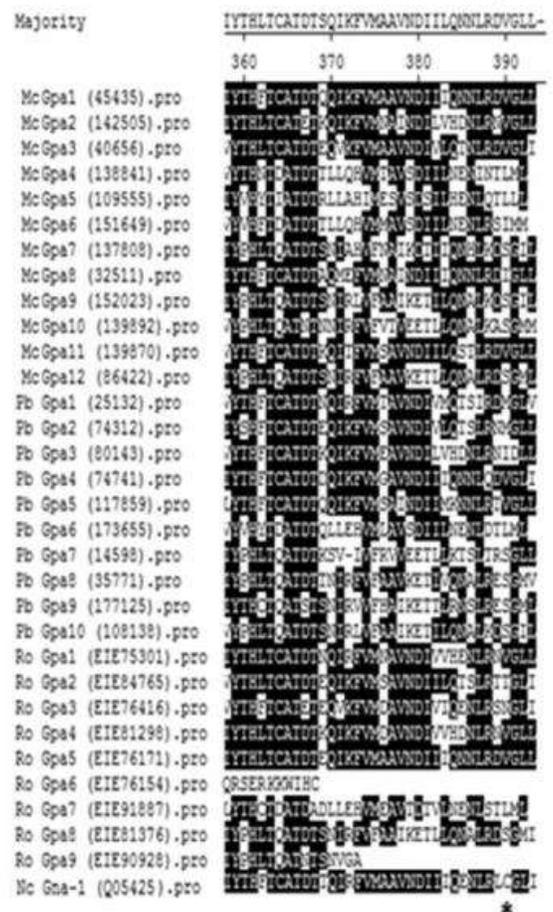
A**B**

Figura 6. Presencia de residuos susceptibles a ADP-ribosilación en las subunidades Gα de zigomicetos. Las secuencias que codifican para subunidades Gα para tres zigomicetos: *M. circinelloides* (McGpa1-12) , *P. blakesleeanus* (Pb Gpa1-10), *R. oryzae* (Ro Gpa1-9) y *N. crassa* Gna-1 (Q05425) fueron alineadas (Clustal W) para identificar sitios para ADP-ribosilación **A** Se muestra con una línea el sitio de reconocimiento por la toxina del cólera (RSRVK) y con un asterisco el residuo de arginina factible de ADP-ribosilación. **B** Extremo carboxilo terminal de las subunidades Gα, se indica con una línea el sitio de reconocimiento por la toxina del pertussis (CAAX) y con un asterisco el residuo de cisteína factible de ADP-ribosilación en Nc Gna-1.

Con la finalidad de verificar la estructura tridimensional hipotética de las subunidades $G\alpha$ identificadas en *M. circinelloides* como parte del criterio de indentificación de las subunidades, se realizó la comparación de las estructuras cristalinas predichas para la subunidades $G\alpha$ de *M. circinelloides* en relación a $G\alpha_0$ de *M. musculus*, la cual es una estructura cristalina ya determinada (Slep y col., 2008). Se empleó el programa SWISS MODEL. Observando la orientación y presencia de estructuras terciarias características, las cuales consisten en laminas β y hélices α muy similares a las de la subunidad $G\alpha_0$ de *M. musculus*, y la presencia de dominios característicos de las subunidades hipotéticas de *M. circinelloides* se sugiere que efectivamente se tratan de subunidades $G\alpha$ de proteínas G heterotriméricas.

Sin embargo, cabe hacer mención que la proteína putativa McGpa4 de *M. circinelloides* muestra la mayor diferencia a nivel de secuencia primaria debido a que es la más pequeña y la estructura tridimensional predicha sugiere la presencia de una hélice α más corta en el extremo amino terminal, dicha región está involucrada en la interacción con la membrana plasmática (Gillen y col., 1998) **(Figura 7)**.

Toda la información anterior nos indica que, las subunidades identificadas en *Mucor circinelloides* (McGpa1-McGpa12) cuentan con lo elementos que sugieren fuertemente que se tratan de subunidades $G\alpha$.

8.1.2 Subunidades $G\beta$ en *M. circinelloides*

Fueron identificados cuatro genes putativos que codifican para subunidades $G\beta$ en *M. circinelloides* (*mcgpb1-mcgpb4*). Los cuales presentan diferentes distribuciones de exones e intrones lo que indica que se tratan de genes distintos **(Figura 8)**.

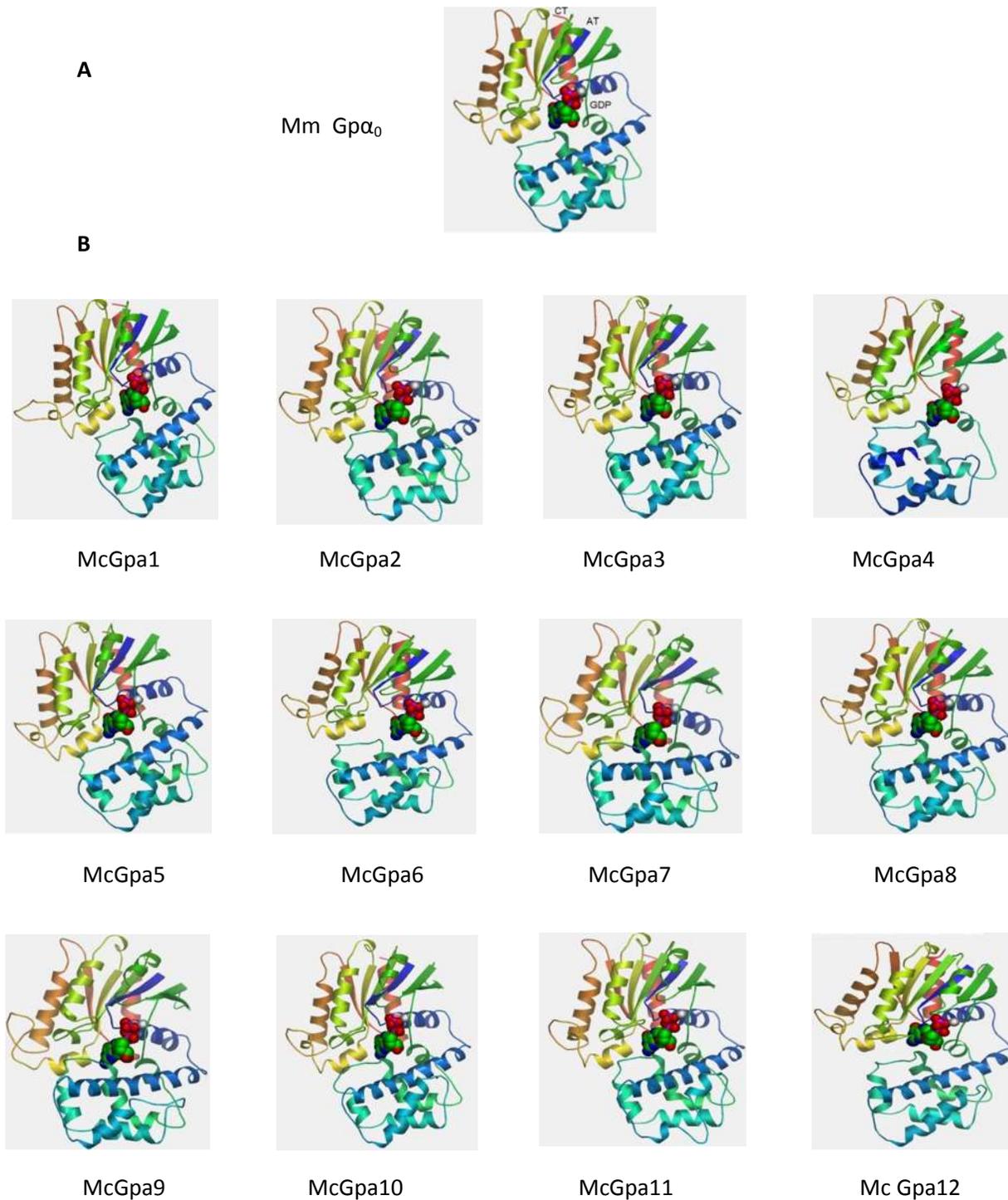


Figura 7. Estructuras tridimensionales predichas para las subunidades G α identificadas en *M. circinelloides*. **A.** Se muestra la estructura cristalográfica de G α_0 de *M. musculus* (*Mm Gp α_0*) (Slep y col., 2008). **B.** Las estructuras predichas para las doce subunidades G α identificadas en *M. circinelloides* (*Gpa1-Mc Gpa12*) determinadas en el programa SWISS Model (Arnold y col., 2006) son mostradas. En ambos casos se muestra la localización del GDP ilustrado en esferas y para la subunidad *Mm Gp α_0* los extremos amino y carboxilo terminal (NT y CT respectivamente).

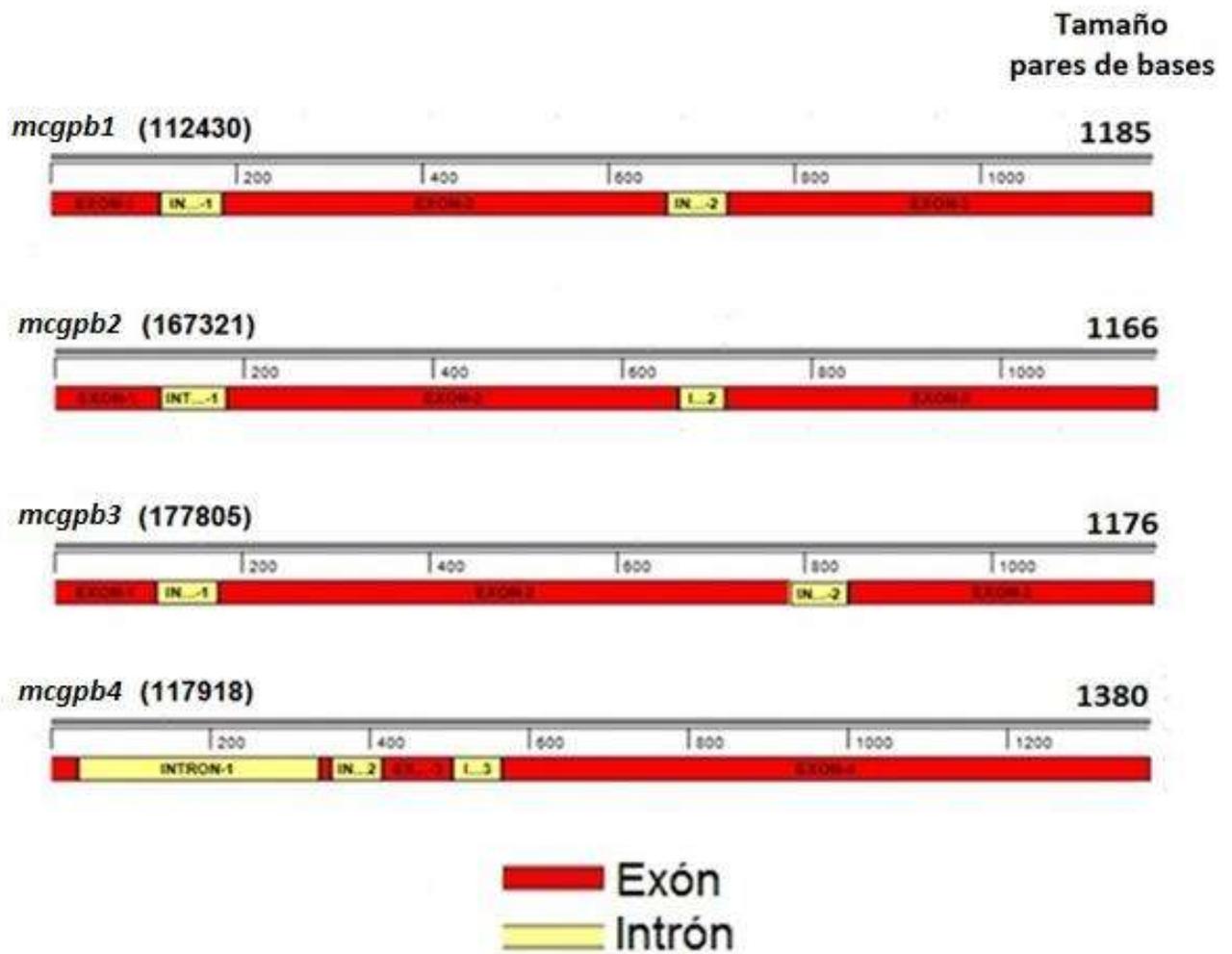


Figura 8. Presencia de exones e intrones en los marcos de lectura abierta de las subunidades G β en *M. circinelloides*. Se muestran para los cuatro genes (*mcgpb1*-*mcgpb4*) que codifican para subunidades G β putativas en *M. circinelloides* en paréntesis el número de ID del gen, el número de pares de bases correspondientes al marco de lectura abierta en la esquina superior derecha, y la distribución de los exones e intrones. Los marcos de lectura abiertos no están representados en escala.

Los números de acceso, tamaños, puntos isoelectricos y porcentajes de identidad de las proteínas G β identificadas en *M. circinelloides* respecto a las subunidades Ste4p (*S. cerevisiae*) y Gpb1 (*B. taurus*) se muestran a continuación (**Tabla 5**).

Tabla 5. Subunidades G β presentes en *M. circinelloides*.

Nombre	Subunidades G β				% Identidad	
	Número de ID de la Proteína	Número de aminoácidos	Peso Molecular (kDa)	P.I.	Sc Ste4p (DAA10984)	Bt Gpb1 (NP_786971.2)
McGpb1	112430	350	38.5	6.24	41.6	67.9
McGpb2	167321	348	38.1	7.02	43	65.3
McGpb3	177805	348	38.6	6.39	42.1	64.4
McGpb4	117918	316	35.3	8.43	21.4	23.5

Los porcentajes de identidad de las cuatro subunidades G β de *M. circinelloides* respecto a la subunidad Ste4p de *S. cerevisiae* oscilan entre 21.4 -43%, y respecto a la subunidad Gpb1 de *Bos taurus* oscilan entre 23.5-67.9%. Los porcentajes de identidad entre las tres subunidades G β de *M. circinelloides* oscilan entre 21.0-78.7% (**Tabla 5**).

Con la finalidad de apreciar los dominios característicos de las subunidades G β , se alinearon las tres secuencias McGpb1-4 de *M. circinelloides*, y las subunidades G β Ste4p de *S. cerevisiae* y Gpb1 de *B. taurus*. Los dominios característicos de estas subunidades son siete dominios repetidos WD. Además se ha reportado la presencia de un residuo de W en la posición 105 esencial para la interacción con la subunidad G α (Whiteway y col., 1994), entre otros residuos en el extremo amino terminal para la interacción con la subunidad G γ (Garritsen y col., 1993, Prasobh y Manoj, 2009). Las subunidades McGpb1-3 cuentan con estos elementos, no así McGpb4 (**Figura 9**).

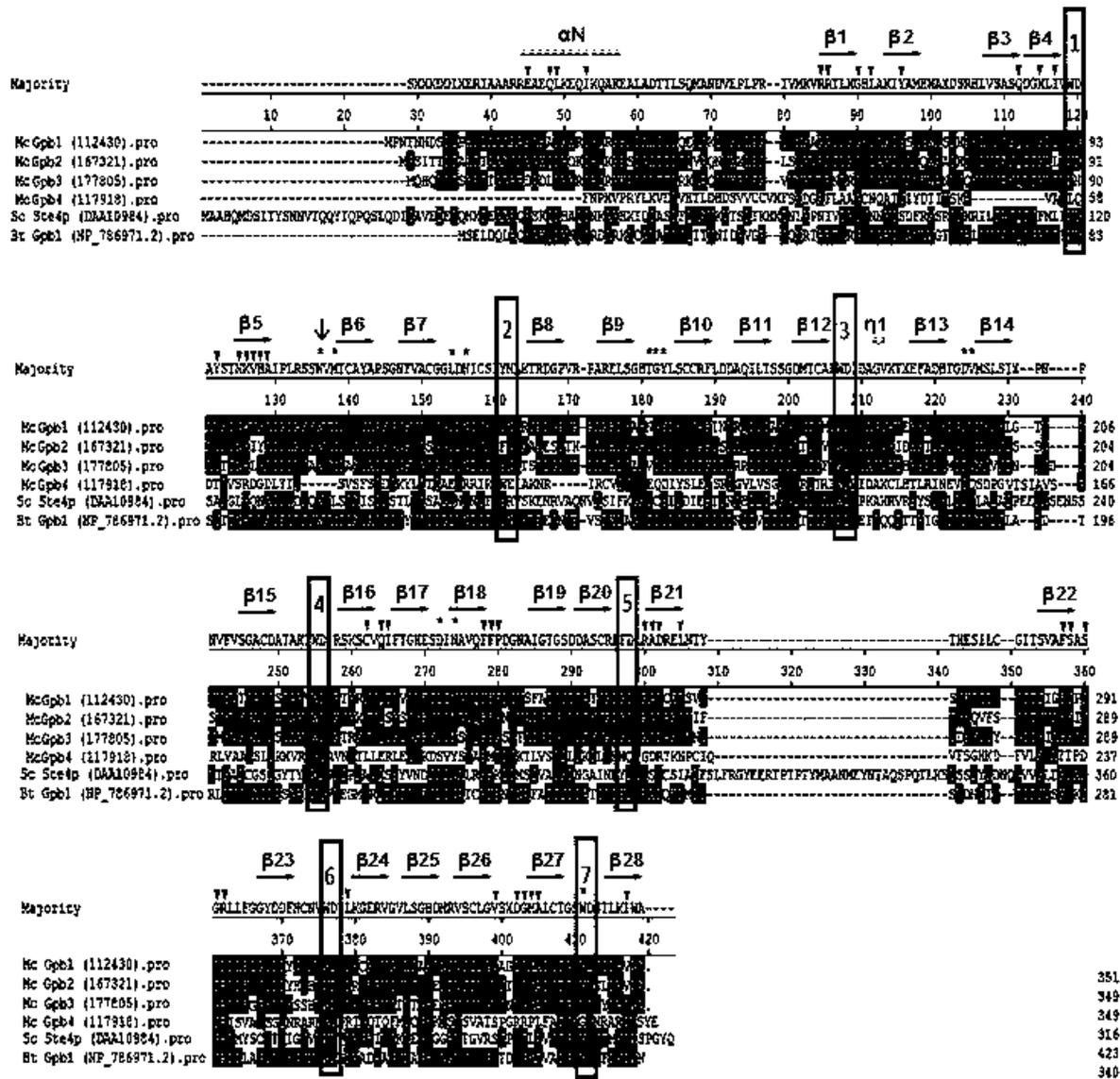
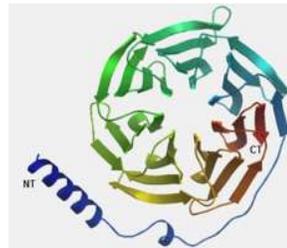


Figura 9. Alineamiento de las subunidades Gβ de *M. circinelloides*. Se muestran el alineamiento de las subunidades McGpb1-McGpb3 (*M. circinelloides*), Ste4p (*S. cerevisiae*) y Gpb1 (*B. taurus*). Se indican en cajas numeradas del 1 al 7 de los repetidos WD característicos de estas subunidades, se muestran en hélices y flechas las estructuras secundarias (Prasobh y Manoj, 200). La flecha invertida el residuo de W indispensable para la interacción con la subunidad Gα (Whiteway y col., 1994). En triángulos invertidos y en asteriscos se muestran residuos que interactúan con la subunidad Gα y Gγ, respectivamente.

Mediante el programa SWISS MODEL se realizó la comparación de las estructuras cristalinas predichas para las subunidades G β de *M. circinelloides* en relación a Gpb1 de *B. Taurus* ya cristalizada (Wall y col., 1995), La subunidad Gpb1 presentan una estructura conocida como propulsor circular compuesto de siete láminas con una hélice α en el extremo amino terminal. Se aprecia una similitud estructural para las subunidades de *M. circinelloides* respecto a la estructura cristalina, excepto McGpb4 que carece de la hélice α requerida para la interacción con la subunidad G α (Garritsen y col., 1993) (**Figura 10**) .

A



B. taurus Gpb1

B

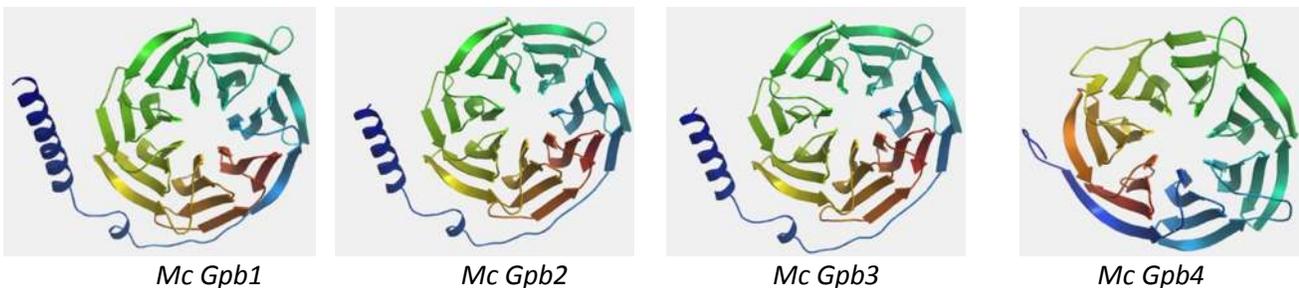


Figura 10. Estructuras tridimensionales predichas para las subunidades G β en *Mucor circinelloides*. A Se muestra la estructura Gpb1 (*B. taurus* Gpb1) que fue determinada por cristalografía por Wall y col., 1995. B. Se muestran las estructuras predichas para las subunidades G β putativas identificadas en *M. circinelloides* (McGpb1-McGpb4); la determinación fue hecha en el programa SWISS Model (Arnold y col., 2006). Se ilustran los extremos amino (NT) y carboxilo terminal (CT) en las subunidades G β .

Las subunidades G β identificadas de *M. circinelloides* (McGpb1-McGpb3) cuentan con altos porcentajes de identidad con proteínas ya caracterizadas, las cuales presentan los dominios conservados, y estructura terciaria completa característica de esta subunidades, por lo tanto lo que sugiere que es muy probable que se traten de subunidades G β , con la excepción de McGpb4, que no cumple estos criterios y de esta manera se descartó como una subunidad G β . (**Figura 9 y Figura 10**).

8.1.3 Subunidades Gy en *M. circinelloides*

Fueron identificados tres genes putativos que codifican para subunidades Gy en *M. circinelloides* (*mcgpg1-mcgpg3*). Los cuales presentan distribuciones de exones e intrones similares, pero no idénticas (**Figura 11**).

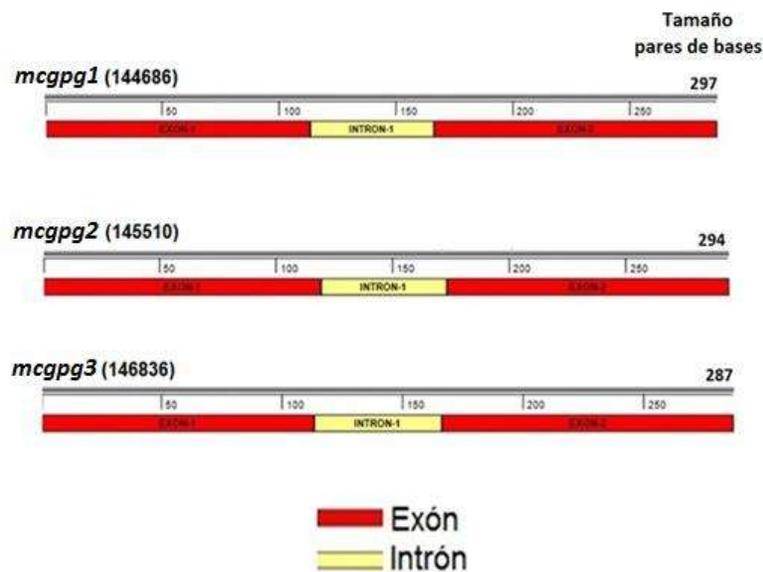


Figura 11. Distribución de exones e intrones en los marcos de lectura abierto de las subunidades Gy en *M. circinelloides*. Se muestran para los tres genes (*mcgpg1-mcgpg3*) que codifican para subunidades Gy putativas en *M. circinelloides* en paréntesis el número de ID del gen, en la esquina superior derecha indica el número de pares de bases correspondientes al marco de lectura abierto, y la distribución de los exones e intrones. Los marcos de lectura abiertos no están representados en escala.

Los números de acceso, tamaños, puntos isoelectríos, y porcentajes de identidad de las proteínas Gy identificadas en *M. circinelloides* respecto a las subunidades Ste18p (*S. cerevisiae*) y Gpg2 (*B. taurus*) se muestran a continuación (**Tabla 7**).

Tabla 7. Subunidades Gy presentes en *M. circinelloides*.

Nombre	Subunidades Gy				% Identidad	
	Número de ID de la Proteína	Número de aminoácidos	Peso Molecular (kDa)	P.I.	Sc Ste18p (NP_012619.1)	Bt Gpg2 (AAI47971.1)
McGpg1	144686	75	8.4	5.23	33.3	27.9
McGpg2	145510	79	8.3	8.31	34.2	31.9
McGpg3	146836	77	8.5	7.87	32.5	31.9

Los porcentajes de identidad de las subunidades Gy de *M. circinelloides* respecto a la subunidad Ste18p de *S. cerevisiae* oscilan entre 32.5-34.2%, respecto a la subunidad Gpg2 de *B. taurus* los porcentajes de identidad oscilan entre 27.9-31.9%. Los porcentajes de identidad entre las tres subunidades Gy de *M. circinelloides* oscilan entre 54.7-69.7%.

Además, en las tres subunidades Gy de *M. circinelloides* identificadas se hallan presentes residuos de aminoácidos requeridos para la interacción con la subunidad G β , la leucina en la posición 16 (McGpg1 y McGpg2) o isoleucina en la misma posición (McGpg3) y asparagina en la posición 20 (McGpg1, McGpg2 y McGpg3) (Navarro-Olmos y col., 2010).

Por otra parte, la subunidad Gy presenta una modificación postraduccional que consiste en la farnesilación o geranilgeranilación de la cisteína presente en la caja

CaaX del extremo carboxilo terminal. Todas las subunidades $G\gamma$ de *M. circinelloides* presentan este residuo en dicha caja sugiriendo el potencial de presentar dicha modificación (Mulligan y Farber, 2011) (**Figura 12**).

Para de verificar la presencia de los dominios característicos de las subunidades $G\gamma$ y la presencia de la leucina en la posición 15 y la asparagina en la posición 20 indispensables para la interacción con la subunidad $G\beta$ se realizó un alineamiento de las subunidades $G\gamma$ (McGpg1-McGpg3) de *M. circinelloides*, *S. cerevisiae* (Ste18p) y $G\gamma_2$ de *B. taurus*. Encontrándose que efectivamente, las subunidades $G\gamma$ identificadas en *M. circinelloides* presentan los dominios característicos de subunidades $G\gamma$.

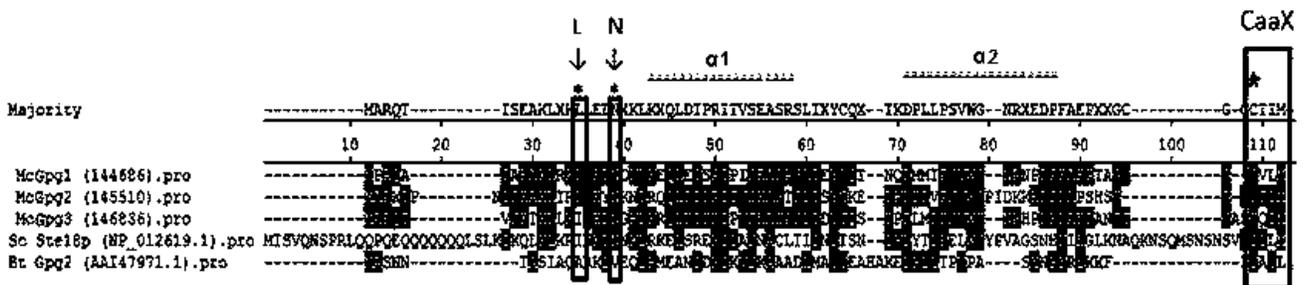
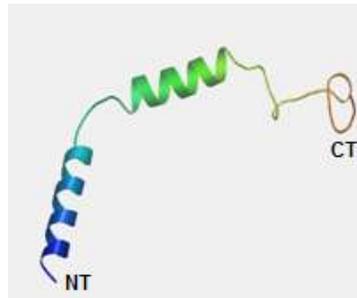


Figura 12. Alineamiento de las subunidades $G\gamma$ de *M. circinelloides*. Se muestran con asteriscos los residuos de L y N indispensables para la interacción con la subunidad $G\beta$. Se muestra la caja CaaX en el extremo carboxilo terminal y con una estrella el residuo de C susceptible a la farnesilfarnesilación o geranilgeranilación. Las hélices 1 y 2 representan las estructuras secundarias (Prasobh y Manoj, 2009).

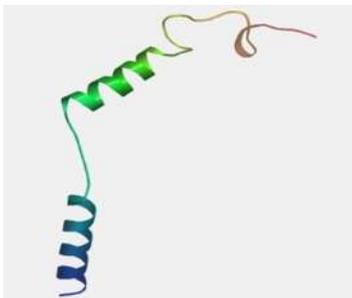
Con el objetivo realizar la comparación de las estructuras cristalinas predichas para la subunidades $G\gamma$ de *M. circinelloides* en relación a la subunidad $G\gamma_2$ de *B. taurus* que es una estructura ya cristalizada (Wall y col., 1995), que consiste en dos hélices α unidas por una asa, se empleo el programa SWISS MODEL. Se aprecia una similitud estructural entre las subunidades de *M. circinelloides* respecto a la estructura cristalizada (**Figura 13**).

A

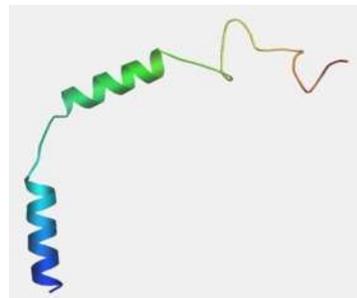


B. taurus Gpg2

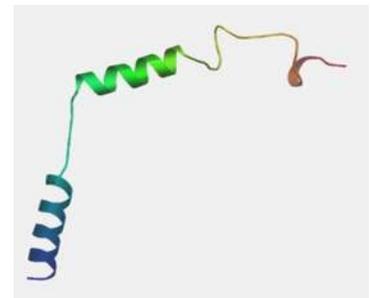
B



Gpg1



Gpg2



Gpg3

Figura 13. Estructuras tridimensionales predichas para las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ identificadas en *M. circinelloides*. **A.** $G\gamma_2$ (*B. taurus Gpg2*) de *Bos taurus* que fue determinada por cristalografía por Wall y col., 1995. **B.** Se muestran la estructuras predichas para las subunidades $G\gamma$ identificadas en *M. circinelloides* (*Gpg1-Gpg3*); la determinación fue hecha en el programa SWISS Model (Arnold y col., 2006). Se ilustran los extremos amino (NT) y carboxilo terminal (CT) en las subunidades $G\gamma$.

Las subunidades $G\gamma$ identificadas de *M. circinelloides* (McGpg1-McGgb3) cuentan con altos porcentajes de identidad con proteínas ya caracterizadas, presentan los

dominios conservados, y una estructura terciaria similar a una previamente reportada, por lo que sugiere que es muy probable que se traten de subunidades Gy.

8.2 Análisis filogenético de las subunidades G α , G β y Gy fúngicas

8.2.1. Subunidades G α fúngicas

Con la finalidad de comparar evolutivamente las subunidades G α de *M. circinelloides*, fueron descargadas todas las secuencias de hongos disponibles en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), además de las secuencias G α de las plantas *A. thaliana*, *A. lyrata* y *B. napus* como grupo externo para la comparación.

Fueron descargadas un total de 451 secuencias, de las cuales 448 pertenecen a hongos y tres a las plantas antes mencionadas. De las 498 secuencias de hongos, 293 corresponden a ascomicetos, 115 a basidiomicetos, 31 a zigomicetos y 9 a chytridiomicetos.

La Tabla 8 muestra las secuencias de aminoácidos utilizadas en el análisis filogenético, así como su número de acceso.

Las secuencias fueron alineadas mediante Clustal W y editadas manualmente (BioEdit). Posteriormente, se determinaron que el modelo de sustitución Whelan y Goldman y valor de la variable discreta G=0.9245, fueron los más adecuados numéricamente para este conjunto de datos de acuerdo al criterio de información bayesiano (MEGA5). Se realizó un análisis filogenético, mediante el método de máxima verosimilitud.

Tabla 8. Subunidades Gα de hongos y plantas empleadas para el análisis filogenético.

Ascomicetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Acremonium chrysogenum</i>	CAQ86895
<i>Ajellomyces capsulatus</i> H88	EGC49963
<i>Ajellomyces capsulatus</i> H88	EGC48989
<i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081	XP_002628022
<i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081	XP_002621657
<i>Ajellomyces dermatitidis</i> SLH14081	XP_002625730
<i>Atemaria alternata</i>	ADB12586
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	ACJ05908
<i>Arthrobotrys oligospora</i> ATCC 24927	EGX50545
<i>Arthrobotrys oligospora</i> ATCC 24927	EGX50588
<i>Arthrobotrys oligospora</i> ATCC 24927	EGX46447
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	XP_003014921
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	XP_003012013
<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371	XP_003012194
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893	XP_003174241
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893	XP_003176086
<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893	XP_003173389
<i>Arthroderma otae</i> (<i>Microsporium canis</i>)	XP_002848718
<i>Arthroderma otae</i> (<i>Microsporium canis</i>)	XP_002847497
<i>Arthroderma otae</i> (<i>Microsporium canis</i>)	XP_002845097
<i>Ashbya gossypii</i> (<i>Eremothecium gossypii</i>)	NP_984250
<i>Ashbya gossypii</i> (<i>Eremothecium gossypii</i>)	NP_983106
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	XP_001268945
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	XP_001271236
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	XP_001268965
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	XP_002375854
<i>Aspergillus fumigatus</i> A293	XP_758664
<i>Aspergillus fumigatus</i> A293	XP_754381
<i>Aspergillus fumigatus</i> A293	XP_752663
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	GAA88964
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	GAA88529
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	XP_658255
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	XP_660694
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	XP_658620
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	XP_001392728
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	XP_001399933
<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88	XP_001392699
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	XP_001272570
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	XP_001817760
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	XP_001272590
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	XP_001210595
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	XP_001213327
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	XP_001210574
<i>Beauveria bassiana</i>	AF053623
<i>Beauveria bassiana</i>	EJP64860
<i>Beauveria bassiana</i>	EJP65796
<i>Blumeria graminis</i>	CAC10177
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	CAC19871
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	CAC19872
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	BAD93277
<i>Candida albicans</i> WO-1	P28868
<i>Candida albicans</i> WO-1	EEQ44285
<i>Candida dubliniensis</i> CD36	XP_002420776
<i>Candida dubliniensis</i> CD36	XP_002419160
<i>Candida glabrata</i> CBS 138	XP_446258
<i>Candida glabrata</i> CBS 138	XP_447604
<i>Candida orthopsilosis</i>	CGG24376
<i>Candida orthopsilosis</i>	CGG25824
<i>Candida parapsilosis</i>	CCE40102
<i>Candida parapsilosis</i>	CCE44706
<i>Candida tenuis</i> ATCC 10573	EGV61402
<i>Candida tenuis</i> ATCC 10573	EGV63329
<i>Candida tropicalis</i> MYA-3404	XP_002546650
<i>Candida tropicalis</i> MYA-3404	XP_002548107
<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	XP_001229837
<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	XP_001224781
<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	XP_001223030
<i>Chaetomium thermophilum</i> var. <i>Thermophilum</i> DSM 1495	EGS20460
<i>Chaetomium thermophilum</i> var. <i>Thermophilum</i> DSM 1495	EGS18240
<i>Chaetomium thermophilum</i> var. <i>Thermophilum</i> DSM 1495	EGS22029
<i>Clavospora lusitanae</i> ATCC 42720	XP_002619485
<i>Clavospora lusitanae</i> ATCC 42720	XP_002617221
<i>Coccidioides immitis</i> RS	XP_001242922
<i>Coccidioides immitis</i> RS	XP_001239976
<i>Coccidioides immitis</i> RS	XP_001242016
<i>Coccidioides posadasii</i>	AAK49109
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	O74227
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Nara gc5	ELA27339
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Nara gc5	ELA30649
<i>Colletotrichum hanau</i>	ADC54988
<i>Colletotrichum hanau</i>	ADC54989
<i>Colletotrichum hanau</i>	ADC54987
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	CCF47307

Ascomicetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	CCF46399
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	CCF32478
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	CCF37445
<i>Colletotrichum trifolii</i>	O42784
<i>Cordyceps militaris</i> CM01	EGX90816
<i>Cordyceps militaris</i> CM01	EGX95901
<i>Cordyceps militaris</i> CM01	EGX92825
<i>Cryphonectria parasitica</i>	O00580
<i>Cryphonectria parasitica</i>	AA014395
<i>Cryphonectria parasitica</i>	AAA67707
<i>Dacryopinax</i> sp. DJM-731 SS1	EJU04442
<i>Dacryopinax</i> sp. DJM-731 SS1	EJT99100
<i>Dacryopinax</i> sp. DJM-731 SS1	EJT97041
<i>Debaromyces hansenii</i> CBS767	XP_459069
<i>Debaromyces hansenii</i> CBS767	XP_461643
<i>Dekkera bruxellensis</i> AWR1499	EIF47569
<i>Drechlerella dactyloides</i>	ACJ05909
<i>Eremothecium cymbalariae</i>	XP_003645708
<i>Eremothecium cymbalariae</i>	XP_003647852
<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT8656	EHY53619
<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT8656	EHY54329
<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT8656	EHY57810
<i>Fusarium oxysporum</i> Fo5176	EGU80548
<i>Fusarium oxysporum</i> Fo5176	BAD44729
<i>Fusarium pseudograminearum</i> CS3096	EKJ75938
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>Tritici</i> R3-111a-1	EJT69273
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>Tritici</i> R3-111a-1	EJT77547
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>Tritici</i> R3-111a-1	EJT74946
<i>Geomyces destructans</i> 20631-21	ELR10211
<i>Geomyces destructans</i> 20631-21	ELR07574
<i>Geomyces destructans</i> 20631-21	ELR04486
<i>Gibberella moniliformis</i> (<i>Fusarium verticillioides</i>)	ACJ72862
<i>Gibberella zeae</i> (<i>Fusarium graminearum</i>)	XP_385711
<i>Gibberella zeae</i> (<i>Fusarium graminearum</i>)	XP_390164.1
<i>Gibberella zeae</i> (<i>Fusarium graminearum</i>)	XP_389790
<i>Glarea lozoyensis</i> 74030	EHK99877
<i>Glomerella graminicola</i> M1.001	EFQ24949
<i>Glomerella graminicola</i> M1.001	EFQ29043
<i>Glomerella graminicola</i> M1.001	EFQ27647
<i>Grosmannia clavigera</i> kw1407	EFW98893
<i>Grosmannia clavigera</i> kw1407	EFX01247
<i>Grosmannia clavigera</i> kw1407	EFX04721
<i>Kazachstania africana</i>	XP_003954600
<i>Kazachstania africana</i>	XP_003955490
<i>Kazachstania naganishii</i> CBS 8797	CKK73103
<i>Kazachstania naganishii</i> CBS 8797	CKK71030
<i>Kluyveromyces lactis</i>	AAD33674
<i>Kluyveromyces lactis</i>	AAA75112
<i>Komagatella pastoris</i> GS115 (<i>Pichia pastoris</i> GS115)	XP_002489739
<i>Komagatella pastoris</i> GS115 (<i>Pichia pastoris</i> GS115)	CCA93955
<i>Lachancea thermotolerans</i> CBS 6340	XP_002552278
<i>Lachancea thermotolerans</i> CBS 6340	XP_002553550
<i>Leptosphaeria maculans</i> JN3	XP_003839909
<i>Leptosphaeria maculans</i> JN3	XP_003842080
<i>Leptosphaeria maculans</i> JN3	XP_003842523
<i>Lodderomyces elongisporus</i> NRRL YB-4239	XP_001524957
<i>Lodderomyces elongisporus</i> NRRL YB-4239	XP_001526193
<i>Macrophomina phaseolina</i> MS6	EKG15631
<i>Macrophomina phaseolina</i> MS6	EKG20400
<i>Macrophomina phaseolina</i> MS6	EKG14010
<i>Magnaporthe grisea</i>	AAB65426
<i>Magnaporthe grisea</i>	AAB65427
<i>Magnaporthe grisea</i>	AAB65425
<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	XP_003718715
<i>Magnaporthe oryzae</i> 70-15	XP_003719617
<i>Magnaporthe oryzae</i> Y34	ELQ36423
<i>Magnaporthe oryzae</i> Y34	ELQ36773
<i>Marssonina brunnea</i> f. sp. <i>Multigermutubi</i> MB m1	EKD14020
<i>Marssonina brunnea</i> f. sp. <i>Multigermutubi</i> MB m1	EKD17117
<i>Marssonina brunnea</i> f. sp. <i>Multigermutubi</i> MB m1	EKD18712
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102	EFY88890
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102	EFY88342
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102	EFY92893
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102	EFY85876
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 23	EFY98464
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 23	EFY99066
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	EDK36402
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	XP_001487292
<i>Milleromyces farinosa</i>	CCE84202
<i>Milleromyces farinosa</i>	CCE72850
<i>Mycelophthora thermofila</i> ATCC 42464	XP_003663323
<i>Mycelophthora thermofila</i> ATCC 42464	XP_003562190
<i>Mycelophthora thermofila</i> ATCC 42464	XP_003665801

Continuación de la Tabla 8.

Ascomycetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Naumovozyma castellii</i> CBS 4309	XP_003675869
<i>Naumovozyma castellii</i> CBS 4309	XP_003674433
<i>Naumovozyma dairenensis</i> CBS 421	XP_003980116
<i>Naumovozyma dairenensis</i> CBS 421	XP_003672184
<i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4	XP_003051115
<i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4	XP_003046681
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	XP_001263222
<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	XP_001264470
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	XP_957133
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	Q05424
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	XP_962205
<i>Neurospora tetrasperma</i> FGSC 2509	EGZ75466
<i>Neurospora tetrasperma</i> FGSC 2509	EGO59982
<i>Oculimacula yallundae</i>	CAC35694
<i>Oculimacula yallundae</i>	CAC35695
<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	EFW95958
<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	EFW95054
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	AAT40563
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb03	EEH21625
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Pb03	EEH16711
<i>Paracoccidioides</i> sp. lutzii Pb01	XP_002789418
<i>Paracoccidioides</i> sp. lutzii Pb01	XP_002793526
<i>Paracoccidioides</i> sp. lutzii Pb01	XP_002798003
<i>Penicillium chrysogenum</i>	XP_002559640
<i>Penicillium chrysogenum</i>	XP_002562005
<i>Penicillium chrysogenum</i>	XP_002559584
<i>Penicillium digitatum</i>	AFS18465
<i>Penicillium digitatum</i>	EKV07315
<i>Penicillium digitatum</i>	EKV06179
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	XP_001800368
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	AAQ94737
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	XP_001800995
<i>Pneumocystis carinii</i>	AAC49295
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	CCJ31032
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	CCJ30267
<i>Pneumocystis wakefieldiae</i>	AAC98513
<i>Podospora anserina</i> S mat+	XP_001908157
<i>Podospora anserina</i> S mat+	XP_001911837
<i>Podospora anserina</i> S mat+	XP_001906723
<i>Pyrenophora teres</i>	XP_003296138
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	XP_001940159
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	ELU42704
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	ELU43358
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	ELU42003
<i>Rosellinia necatrix</i>	BAB20820
<i>Rosellinia necatrix</i>	BAB20821
<i>Rosellinia necatrix</i>	BAB20819
<i>Saccharomyces arboricola</i> H-6	EJS43499
<i>Saccharomyces arboricola</i> H-6	EJS44038
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	NP_011868
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	NP_010937
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO 1802	EJT42965
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO 1802	EJT43575
<i>Scheffersomyces stipitis</i> (<i>Pichia stipitis</i>)	XP_001382741
<i>Scheffersomyces stipitis</i> (<i>Pichia stipitis</i>)	XP_001384268
<i>Schizophyllum commune</i> H4-8	XP_003029155
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> yFS275	XP_002173444
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> yFS275	XP_002173650
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-	NP_595960
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-	NP_593803
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	XP_001587313
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	XP_001588739.1
<i>Setosphaeria turcica</i>	ABN54455
<i>Setosphaeria turcica</i>	AEJ38171
<i>Sordaria macrospora</i>	CAI51645
<i>Sordaria macrospora</i>	CAP09210
<i>Sordaria macrospora</i>	XP_003347338
<i>Sordaria macrospora</i>	CAP09211
<i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907	EGW31147
<i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907	EGW31469
<i>Sporothrix schenckii</i>	Q74259
<i>Sporothrix schenckii</i>	AAR37394
<i>Sporothrix schenckii</i>	AAL57853
<i>Talaromyces marnettii</i>	XP_002152863
<i>Talaromyces marnettii</i>	AAO41857
<i>Talaromyces marnettii</i>	XP_002146215
<i>Talaromyces marnettii</i>	ABH09718
<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	XP_002478500
<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	XP_002486619
<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	XP_002478543
<i>Tetrapisispora blattae</i> CBS 6284	CCH59901

Ascomycetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Tetrapisispora blattae</i> CBS 6284	CCH63034
<i>Tetrapisispora phaffii</i> CBS 4417	XP_003688384
<i>Tetrapisispora phaffii</i> CBS 4417	XP_003687234
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126	XP_003655293
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126	XP_003649793
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126	XP_003650241
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126	XP_003657245
<i>Torulaspora delbrueckii</i> (<i>Candida colliculosa</i>)	XP_003680077
<i>Torulaspora delbrueckii</i> (<i>Candida colliculosa</i>)	XP_003683144
<i>Trichoderma atroviride</i>	AAK74191
<i>Trichoderma atroviride</i>	EHK40688
<i>Trichoderma atroviride</i>	AAM69919
<i>Trichoderma reesei</i>	ABJ55985
<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	EGR50830
<i>Trichoderma virens</i>	AAO18659
<i>Trichoderma virens</i> Gv29-8	AAN65182
<i>Trichoderma virens</i> Gv29-8	EHK21344
<i>Trichoderma viride</i> (<i>Hypocrea rufa</i>)	AAO38051
<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97	EGE09316
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892	XP_003231533
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892	XP_003239374
<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892	XP_003234822
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	EGD93194
<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818	EGE00697
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517	XP_003021846
<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517	XP_003024508
<i>Tuber melanosporum</i> Mel28	XP_002841733
<i>Tuber melanosporum</i> Mel28	XP_002841763
<i>Tuber melanosporum</i> Mel28	XP_002837996
<i>Uncinocarpus reesii</i> 1704	XP_002544139
<i>Uncinocarpus reesii</i> 1704	XP_002545042
<i>Uncinocarpus reesii</i> 1704	XP_002544917
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	XP_001643123
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	XP_001646247
<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102	XP_003008842
<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs.102	XP_003004792
<i>Verticillium dahliae</i>	AEI74590
<i>Verticillium dahliae</i>	AEI74591
<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	CCH44760
<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	CCH42271
<i>Yarrowia lipolytica</i>	XP_499910
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> CBS 732	XP_002498983
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> CBS 732	XP_002496520
<i>Zymoseptora tritici</i> (<i>Mycosphaerella graminicola</i>)	XP_003857423
<i>Zymoseptora tritici</i> (<i>Mycosphaerella graminicola</i>)	XP_003856727
<i>Zymoseptora tritici</i> (<i>Mycosphaerella graminicola</i>)	XP_003848934

Zigomicetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa1	45435
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa2	142505
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa3	40656
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa4	138841
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa5	109555
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa6	151649
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa7	137808
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa8	32511
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa9	152023
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa10	139892
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa11	139870
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa12	86422
<i>Phycomyces blakesleeanae</i> Gpa1	25132
<i>Phycomyces blakesleeanae</i> Gpa2	74312
<i>Phycomyces blakesleeanae</i> Gpa3	80143
<i>Phycomyces blakesleeanae</i> Gpa4	74741
<i>Phycomyces blakesleeanae</i> Gpa5	117859
<i>Phycomyces blakesleeanae</i> Gpa6	173655
<i>Phycomyces blakesleeanae</i> Gpa7	14598
<i>Phycomyces blakesleeanae</i> Gpa8	35771
<i>Phycomyces blakesleeanae</i> Gpa9	177125
<i>Phycomyces blakesleeanae</i> Gpa10	108138
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa1	EIE75301
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa2	EIE84765
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa3	EIE76416
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa4	EIE81298
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa5	EIE76171
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa6	EIE76154
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa7	EIE91887
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa8	EIE81376
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa9	EIE90928

Continuación de la Tabla 8.

Basidiomicetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnetti</i> JB137-S8	EKM75298
<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnetti</i> JB137-S8	EKM77089
<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnetti</i> JB137-S8	EKM84262
<i>Auricularia delicata</i> TFB-10046 SS5	EJD35613
<i>Auricularia delicata</i> TFB-10046 SS5	EJD42297
<i>Auricularia delicata</i> TFB-10046 SS5	EJD54322
<i>Auricularia delicata</i> TFB-10046 SS5	EJD54747
<i>Auricularia delicata</i> TFB-10046 SS5	EJD55115
<i>Coniophora puteana</i> RWD-64-598 SS2	EIW80154
<i>Coniophora puteana</i> RWD-64-598 SS2	EIW83108
<i>Coniophora puteana</i> RWD-64-598 SS2	EIW86083
<i>Coprinellus congregatus</i>	P30675
<i>Coprinopsis cinerea</i>	XP_001828295
<i>Coprinopsis cinerea</i>	XP_001830866
<i>Coprinopsis cinerea</i>	XP_001831010
<i>Coprinopsis cinerea</i>	XP_002911524
<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	XP_003191999
<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	XP_003194549
<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	XP_003195587
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>Grubii</i>	AAAS3142
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>Grubii</i>	AAQ62550
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>Grubii</i>	AAQ74379
<i>Dichomitus squalens</i> LYAD-421 SS1	EJF5942
<i>Dichomitus squalens</i> LYAD-421 SS1	EJF57339
<i>Dichomitus squalens</i> LYAD-421 SS1	EJF63795
<i>Dichomitus squalens</i> LYAD-421 SS1	EJF65201
<i>Fibroporia radiculosa</i>	CCL98926
<i>Fibroporia radiculosa</i>	CCM03889
<i>Fibroporia radiculosa</i>	CCM07192
<i>Filobasidiella depauperata</i>	ACZ80674
<i>Fomitoporia mediterranea</i> MF3/22	EJD02603
<i>Fomitoporia mediterranea</i> MF3/22	EJD04518
<i>Fomitoporia mediterranea</i> MF3/22	EJD04660
<i>Fomitoporia mediterranea</i> MF3/22	EJD08373
<i>Helicobasidium mompa</i>	BAC20192
<i>Hemileia vastatrix</i>	CCA65369
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	XP_001873527
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	XP_001886454
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	XP_001887679
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	XP_001888689
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	XP_001890326
<i>Lentinula edodes</i>	AAP13579
<i>Lyophyllum shimeji</i>	BAD86785
<i>Malassezia globosa</i> CBS 7966	XP_001732838
<i>Melampsora larici-populina</i> 98AG31	EGG03275
<i>Melampsora larici-populina</i> 98AG31	EGG07370
<i>Melampsora larici-populina</i> 98AG31	EGG09074
<i>Melampsora larici-populina</i> 98AG31	EGG09413
<i>Mixia osmundae</i> IAM 14324	GAA94912
<i>Mixia osmundae</i> IAM 14324	GAA95470
<i>Mixia osmundae</i> IAM 14324	GAA97620
<i>Monascus ruber</i>	ACY56334
<i>Moniliophthora perniciosa</i> FA533	XP_002388061
<i>Phanerochaete carmosa</i> HHB-10118-sp	EKM53848
<i>Phanerochaete carmosa</i> HHB-10118-sp	EKM54814
<i>Phanerochaete carmosa</i> HHB-10118-sp	EKM60638
<i>Piriformospora indica</i> DSM 11827	CCA66322
<i>Piriformospora indica</i> DSM 11827	CCA68952
<i>Piriformospora indica</i> DSM 11827	CCA69503
<i>Piriformospora indica</i> DSM 11827	CCA73216
<i>Piriformospora indica</i> DSM 11827	CCA76199
<i>Pisolithus</i> sp.	AAK15759
<i>Pleurotus abalonus</i>	ACQ66638
<i>Postia placenta</i> Mad-698-R	XP_002469643
<i>Postia placenta</i> Mad-698-R	XP_002470004
<i>Postia placenta</i> Mad-698-R	XP_002471439
<i>Pseudozyma antarctica</i> T-34	GAC71250
<i>Pseudozyma antarctica</i> T-34	GAC71948
<i>Pseudozyma antarctica</i> T-34	GAC74489
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>Tritici</i> CRL 75-36-700-3	XP_003307542

Basidiomicetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>Tritici</i> CRL 75-36-700-3	XP_003322367
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>Tritici</i> CRL 75-36-700-3	XP_003322715
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>Tritici</i> CRL 75-36-700-3	XP_003888857
<i>Punctularia strigozonata</i> HHB-11173 SS5	EIN03535
<i>Punctularia strigozonata</i> HHB-11173 SS5	EIN05403
<i>Punctularia strigozonata</i> HHB-11173 SS5	EIN11154
<i>Punctularia strigozonata</i> HHB-11173 SS5	EIN13172
<i>Punctularia strigozonata</i> HHB-11173 SS5	EIN14744
<i>Schizophyllum commune</i>	AAG27721
<i>Schizophyllum commune</i> H4-8	XP_003026485
<i>Schizophyllum commune</i> H4-8	XP_003032322
<i>Schizophyllum commune</i> H4-8	XP_003038400
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	CAB36912
<i>Serpula lacrymans</i> var. <i>lacrymans</i> S7.3	EGO00415
<i>Serpula lacrymans</i> var. <i>lacrymans</i> S7.3	EGO00470
<i>Serpula lacrymans</i> var. <i>lacrymans</i> S7.3	EGO00639
<i>Serpula lacrymans</i> var. <i>lacrymans</i> S7.3	EGO19618
<i>Sporisorium reilianum</i> SRZ2	CBQ69291
<i>Sporisorium reilianum</i> SRZ2	CBQ72321
<i>Sporisorium reilianum</i> SRZ2	CBQ72883
<i>Stereum hirsutum</i> FP-91666 SS1	EIM79504
<i>Stereum hirsutum</i> FP-91666 SS1	EIM81014
<i>Stereum hirsutum</i> FP-91666 SS1	EIM83217
<i>Stereum hirsutum</i> FP-91666 SS1	EIM92063
<i>Suillus bovinus</i>	AAD45319
<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1	EIW53881
<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1	EIW62954
<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1	EIW65108
<i>Tremella mesenterica</i> DSM 1558	EIW67334
<i>Tremella mesenterica</i> DSM 1558	EIW70584
<i>Tremella mesenterica</i> DSM 1558	EIW70628
<i>Trichosporon asahii</i> var. <i>Asahii</i> CBS 2479	EJT45736
<i>Trichosporon asahii</i> var. <i>Asahii</i> CBS 2479	EJT50515
<i>Trichosporon asahii</i> var. <i>Asahii</i> CBS 2479	EJT52063
<i>Ustilago hordei</i>	CCF49575
<i>Ustilago hordei</i>	CCF49861
<i>Ustilago hordei</i>	CCF52730
<i>Ustilago hordei</i>	O14438
<i>Ustilago maydis</i> 521	P87032
<i>Ustilago maydis</i> 521	XP_758664
<i>Ustilago maydis</i> 521	XP_760621
<i>Ustilago maydis</i> 521	XP_761532
<i>Wallemia sebi</i> CBS 633.66	EIM20264
<i>Wallemia sebi</i> CBS 633.66	EIM21385
<i>Wallemia sebi</i> CBS 633.66	EIM22946
<i>Ustilago maydis</i> 521	XP_758664
<i>Ustilago maydis</i> 521	XP_760621
<i>Ustilago maydis</i> 521	XP_761532
<i>Wallemia sebi</i> CBS 633.66	EIM20264
<i>Wallemia sebi</i> CBS 633.66	EIM21385

Chytridiomicetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	EGF78517
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	EGF78516
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	EGF83072
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	EGF83073
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	EGF83074
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	EGF83890
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	EGF82632
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	EGF83889
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81	EGF81213

Grupo Externo: Plantas	
Organismo	Número Acceso
<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002878953
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_180198
<i>Brassica napus</i>	ACX43273

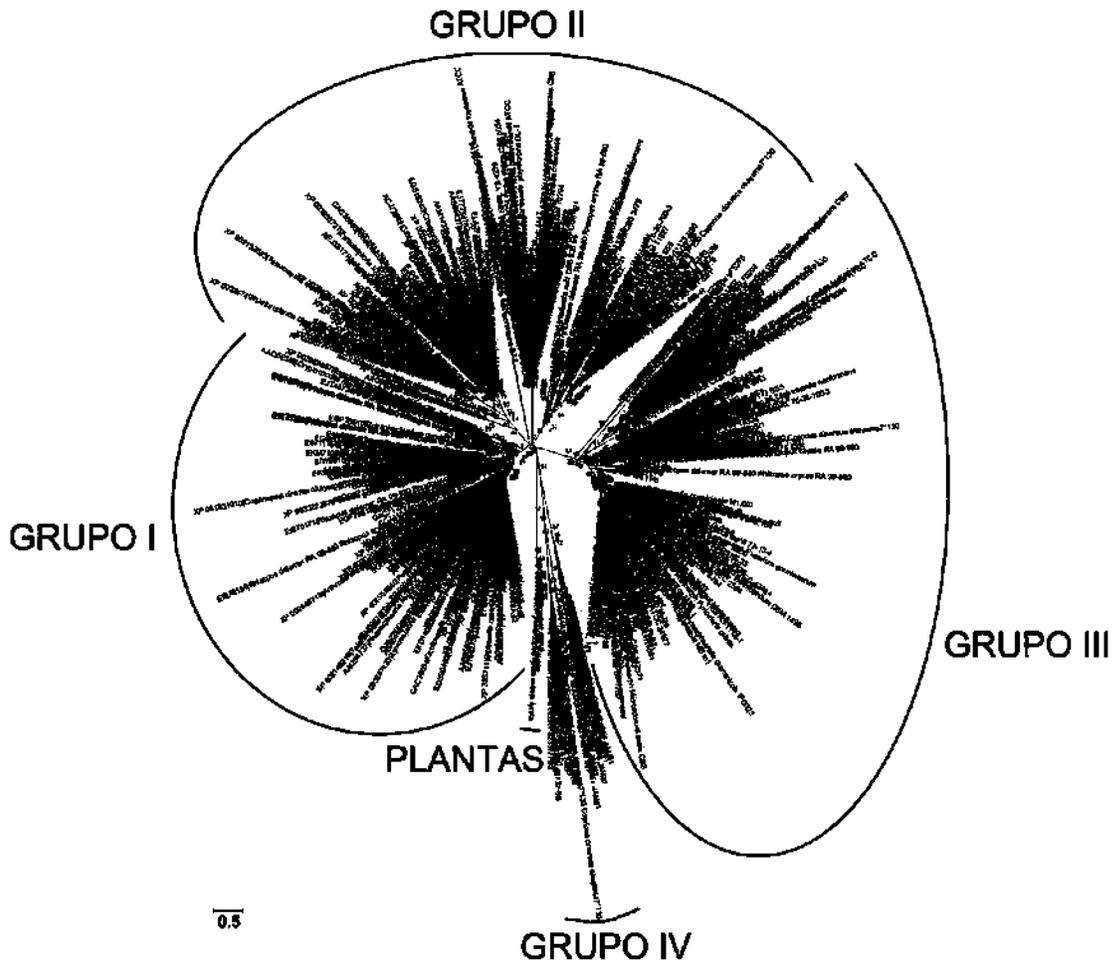


Figura 14. Análisis filogenético de las subunidades G α fúngicas. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Whelan y Goldman. El árbol con la máxima verosimilitud es mostrado. El porcentaje de árboles en los cuales los taxa asociados agruparon juntos es mostrado al lado de las ramas. El árbol está dibujado a escala, las medidas de las ramas representan el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 451 secuencias de subunidades G α . 500 fue el número de replicados. Los rotulos muestran la distribución de los *Phyla* de hongos y plantas como grupo externo.

Se encontró que las subunidades G α fúngicas se distribuyen de acuerdo a la clasificación propuesta por Bölker, 1998, la cual incluye cuatro grandes grupos en función a su similitud con las subunidades G α_i y G α_s de mamíferos. Del total de las secuencias G α empleadas en el análisis el 64.96% correspondieron a ascomicetos, 25.49% a basidiomicetos, 6.87% a zigomicetos, 1.99% a chytridiomicetos. Respecto al número de subunidades, las subunidades G α de ascomicetos se distribuyen casi homogéneamente en los grupos I,II y III. Los basidiomicetos siguieron un patrón similar al de ascomicetos, con la diferencia que en este caso se detectaron secuencias pertenecientes al grupo IV. Mientras que el grupo IV solamente está integrado por basidiomicetos y chytridiomicetos (**Tabla 9**).

Es interesante apreciar que las subunidades G α de *M. circinelloides*, al igual que los otros zigomicetos (*R. oryzae* y *P. blakesleeanus*) siguieron una distribución similar en el árbol filogenético estando presentes principalmente en los grupos I y III, en menor medida en el grupo II, y ausentes en el grupo IV (**Tabla 10**). Por su parte las secuencias de *B dendrobatidis*, el único chytridiomiceto estudiado, se distribuyeron en los grupos I y IV. El grupo externo se agrupó de manera independiente a las secuencias fúngicas.

Tabla 9. Distribución de las subunidades G α en función a los *Phyla* fúngicos.

	Número de subunidades G α				
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Total
Ascomicetos	73	115	105	0	293
Basidiomicetos	35	31	37	12	115
Zigomicetos	16	5	10	0	31
Chytridiomicetos	2	0	0	7	9
Total	126 (28.1%)	151 (33.7%)	152 (33.9%)	19 (4.2%)	448 (100%)

Tabla 10. Clasificación de las subunidades G α presentes en zigomicetos.

Subunidades Gα Zigomicetos Grupo I	
Secuencia	ID Proteína
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa1	45435
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa2	142505
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa3	40656
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa8	32511
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa11	139870
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> Gpa1	25132
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> Gpa2	74312
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> Gpa3	80143
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> Gpa4	74741
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> Gpa5	117859
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa1	EIE75301
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa2	EIE84765
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa3	EIE76416
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa4	EIE81298
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa5	EIE76171
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa6	EIE76154

Subunidades Gα Zigomicetos Grupo II	
Secuencia	ID Proteína
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa4	138841
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa5	109555
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa6	151649
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> Gpa6	173655
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa7	EIE91887

Subunidades Gα Zigomicetos Grupo III	
Secuencia	ID Proteína
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa7	137808
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa9	152023
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa10	139892
<i>Mucor circinelloides</i> Gpa12	86422
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> Gpa7	14598
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> Gpa8	35771
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> Gpa9	177125
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> Gpa10	108138
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa8	EIE81376
<i>Rhizopus oryzae</i> Gpa9	EIE90928

8.2.2. Subunidades G β fúngicas

Con la finalidad de comparar evolutivamente las subunidades G β de *M. circinelloides*, fueron descargadas todas las secuencias disponibles de hongos en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), además de las secuencias G β de las plantas *A. thaliana*, *A. lyrata* y *B. napus* como grupo externo para la comparación.

Fueron descargadas un total de 156 secuencias, de las cuales 153 pertenecen a hongos y tres a las plantas antes mencionadas. De las 156 secuencias de hongos, 107 corresponden a ascomicetos, 32 a basidiomicetos, 13 a zigomicetos y 1 a chytridiomicetos. La Tabla 11 muestra las secuencias utilizadas en el análisis filogenético, así como su número de acceso (**Tabla 11**)

Tabla 11. Subunidades Gβ de hongos y plantas empleadas para el análisis filogenético.

Ascomycetos	
Organismo	Número Acceso
Acremonium chrysogenum	CAQ86900
Ajellomyces capsulatus H88 (Histoplasma capsulatum)	EEH10050
Ajellomyces dermatitidis SLH14081	EEQ90059
Arthrobotrys oligospora ATCC 24927	EGX53779
Arthroderma benhamiae CBS 112371	XP_003017524
Arthroderma otae (Microsporium canis)	XP_002845258
Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii)	NP_983499
Aspergillus clavatus	XP_001274512
Aspergillus fumigatus Af293	EAL91392
Aspergillus kawachii IFO 4308	GAA83243
Aspergillus nidulans FGSC A4	XP_657685
Aspergillus niger CBS 513.88	XP_001398668
Aspergillus oryzae RIB40	XP_001824062
Aspergillus terreus NIH2624	XP_001211230
Baudoinia compniacensis	EMC97797
Beauveria bassiana	EJP67164
Botryotinia fuckeliana	BAD93278
Candida albicans WO-1	EEQ45840
Candida dubliniensis CD36	XP_002418364
Candida glabrata CBS 138	XP_448891
Candida orthopsilosis	XP_003868665
Candida parapsilosis	CCE43462
Candida tenuis ATCC 10573	EGV80513
Candida tropicalis MYA-3404	XP_002547267
Chaetomium globosum	XP_001229630
Chaetomium thermophilum var. Thermophilum DSM 1495	EGS20822
Clavospora lusitanae ATCC 42720	XP_002619934
Coccidioides immitis	XP_001239616
Coccidioides posadasii	XP_003067194
Cochliobolus heterostrophus (Bipolaris maydis)	AAO25585
Cochliobolus lunatus	AFK93906
Colletotrichum gloeosporioides Nara gc5	ELA30254
Colletotrichum hanauii	ADE20134
Cryphonectria parasitica	O14435
Debaromyces hansenii CBS767	XP_458399
Dekkera bruxellensis AWR11499	E1F48602
Eremothecium cymbalariae	XP_003648412
Exophiala dermatitidis	EHY52649
Fusarium oxysporum Fo5176	BAB69489
Geomyces destructans 20631-21	ELR06948
Gibberella moniliformis (Fusarium verticillioides)	ABE67098
Gibberella zeae (Fusarium graminearum)	XP_384280
Glarea lozoyensis 74030	EHL03873
Glomerella graminicola M1.001	EFQ025289
Grosmannia clavigera kw1407	EFX00034
Kazachstania africana	XP_003958366
Kazachstania naganishii CBS 8797	CK68009
Kluyveromyces lactis	XP_453363
Komagatella pastoris GS115 (Pichia pastoris GS115)	XP_002489849
Lachancea thermotolerans CBS 6340	XP_002553152
Leptosphaeria maculans JN3	XP_003840142
Lodderomyces elongisporus NRRL YB-4239	XP_001528509
Macrophomina phaseolina MS6	EKG16879
Magnaporthe grisea	BAC01165
Magnaporthe oryzae	ELQ39060
Marssonina brunnea f. sp. Multigermtubi MB m1	EKD20433
Metarhizium acridum CQMa 102	EFY92367
Metarhizium anisopliae ARSEF 23	EFZ02888
Meyerozyma guilliermondii (Pichia guilliermondii)	EDK39754
Millerozyma farinosa (Pichia farinosa)	XP_004197404
Monascus ruber	ACY56335
Myceliophthora thermofila ATCC 42464	XP_003663156
Naumovozyma castellii CBS 4309	XP_003674624
Naumovozyma dairenensis CBS 421	XP_003670209
Nectria haematococca mpVI 77-13-4	XP_003044802
Neosartorya fischeri NRRL 181	XP_001259476
Neurospora crassa OR74A	XP_956704
Ogataea parapolyomorpha DL-1	EFW94626
Paracoccidioides brasiliensis	AAT40565
Paracoccidioides sp. Iutzii Pb01	XP_002795766
Penicillium chrysogenum	XP_002567778
Penicillium digitatum	EKV10669
Pneumocystis carinii	AAG27720
Pneumocystis jirovecii	CCJ30679
Podospora anserina S mat+	XP_001908013
Pyrenophora teres f. teres 0-1	XP_003304755
Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP	XP_001936327
Saccharomyces cerevisiae S288c	NP_014855
Saccharomyces kudriavzevii IFO 1802	EJT42627
Scheffersomyces stipitidis (Pichia stipitidis)	XP_001385209
Schizosaccharomyces japonicum	XP_002174248
Schizosaccharomyces pombe	AAC37501
Sclerotinia sclerotiorum	XP_001595393
Sordaria macrospora	XP_003348853

Ascomycetos	
Organismo	Número Acceso
Spathaspora passalidarum NRRL Y-27907	EGW33395
Sporothrix schenckii	AAL90861
Stagonospora nodorum	XP_001806174
Talaromyces marneffii (Penicillium marneffii)	XP_002146687
Talaromyces stipitatus ATCC 10500	XP_002478991
Tetrapispora blattae CBS 6284	XP_004178764
Tetrapispora phaffii CBS 4417	XP_003686454
Thielavia terrestris NRRL 8126	XP_003655108
Torulopora delbrueckii (Candida colliculosa)	XP_003679120
Trichoderma atroviride	AAO37685
Trichoderma reesei	EGR50145
Trichophyton verrucosum HKI 0517	XP_003021074
Tuber melanosporum Mel28	XP_002841111
Uncinocarpus reesii 1704	XP_002584356
Vanderwaltozyma polyspora	XP_001645029
Verticillium albo-atrum VaMs.102	XP_003002364
Verticillium dahliae	AEI74592
Verticillium dahliae	AFJ79447
Villosiclava vires	ADB12512
Wickerhamomyces ciferrii	CCH4676
Yarrowia lipolytica	XP_503412
Zygosaccharomyces rouxii CBS 732	XP_002497472
Zymoseptoria tritici (Mycosphaerella graminicola)	ABE72964

Basidiomicetos	
Organismo	Número Acceso
Agaricus bisporus var. burmetii JB137-S8	EKM83994
Auricularia delicata TFB-10046 SS5	EJD45757
Ceriporiopsis subvermispora B	EMD32539
Coniophora puteana RWD-64-598 SS2	E1W87104
Coprinopsis cinerea	XP_001829309
Cryptococcus gattii WM276	XP_003193731
Cryptococcus neoformans	AAD03596
Dacryopinax sp. DJM-731 SS1	EJU00042
Dichomitus squaleus LYAD-421 SS1	EJF67111
Fibroporia radiculosa	CCM03768
Fomitopsis mediterranea MF3/22	EJDO3724
Lentinula edodes	AA174567
Melampsora larici-populina 98AG31	EGG11834
Mixia osmundae IAM 14324	GAA97540
Moniliophthora perniciosa FA533	XP_002386966
Phanerochaete carnea HHB-10118-sp	EKM61460
Piriformospora indica DSM 11827	CCA67815
Postia placenta Mad-698-R	XP_002473929
Pseudozyma antarctica T-34	GAC73956
Puccinia graminis f. sp. Tritici CRL 75-36-700-3	XP_003322190
Punctularia strigozonata HHB-11173 SS5	E1N14396
Rhizoctonia solani	AAW82439
Schizophyllum commune H4-8	XP_003037057
Serpula lacrymans var. Lacrymans S7.3	EGO05254
Sporisorium reilianum SRZ2	CBQ68126
Stereum hirsutum FP-91666 SS1	E1M92356
Trametes versicolor FP-101664 SS1	E1W64048
Tremella mesenterica DSM 1558	E1W73507
Trichosporon asahii var. Asahii CBS 2479	EJT49135
Ustilago hordei	CCF51194
Ustilago maydis 521	XP_756850
Wallemia sebi CBS 633.66	E1M22355

Zigomicetos	
Organismo	Número Acceso
Mucor circinelloides Gpb1	112430
Mucor circinelloides Gpb2	167321
Mucor circinelloides Gpb3	177085
Rhizopus oryzae Gpb1	E1E81695
Rhizopus oryzae Gpb2	E1E75342
Rhizopus oryzae Gpb3	E1E83318
Rhizopus oryzae Gpb4	E1E81357
Rhizopus stolonifer Gpb1	AAT33370
Rhizopus stolonifer Gpb2	AAT66038
Phycomyces blakesleeanus Gpb1	153895
Phycomyces blakesleeanus Gpb2	104565
Phycomyces blakesleeanus Gpb3	139838
Phycomyces blakesleeanus Gpb4	14376

Chytridiomicetos	
Organismo	Número Acceso
Batrachochytrium dendrobatidis JAM81	EGF78517

Grupo Externo: Plantas	
Organismo	Número Acceso
Arabidopsis lyrata	XP_002878953
Arabidopsis thaliana	NP_180198
Brassica napus	ACX43273

Las secuencias fueron alineadas mediante Clustal W y editadas manualmente (BioEdit). Posteriormente, se determinaron que el modelo de sustitución Jones-Taylor-Thorton y valor de la variable discreta $G=0.6729$, fueron los más adecuados en función a la determinación numérica del criterio bayesiano para este conjunto de datos (MEGA5). Se realizó un análisis filogenético, mediante el método de máxima verosimilitud.

Cabe resaltar que no existen antecedentes de un análisis filogenético para subunidades $G\beta$ fúngicas, siendo este el primer trabajo. Se encontró que las subunidades $G\beta$ fúngicas se distribuyen en función a los distintos Phyla, estando ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos y chytridiomicetos en grupos distintos. Las subunidades $G\beta$ de ascomicetos se separaron en dos grandes grupos, uno de ellos integrado por organismos filamentosos como es el caso de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*. El segundo grupo está integrado por organismos levaduriformes y dimórficos como es el caso de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Candida*. Las secuencias de *M. circinelloides* están agrupadas con las de los demás zigomicetos.

8.2.3. Subunidades $G\gamma$ fúngicas

Con la finalidad de comparar evolutivamente las subunidades $G\gamma$ de *M. circinelloides*, fueron descargadas todas las secuencias disponibles de hongos en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), además de las secuencias $G\gamma$ de las plantas *A. thaliana*, *A. lyrata* y *B. napus* como grupo externo para la comparación.

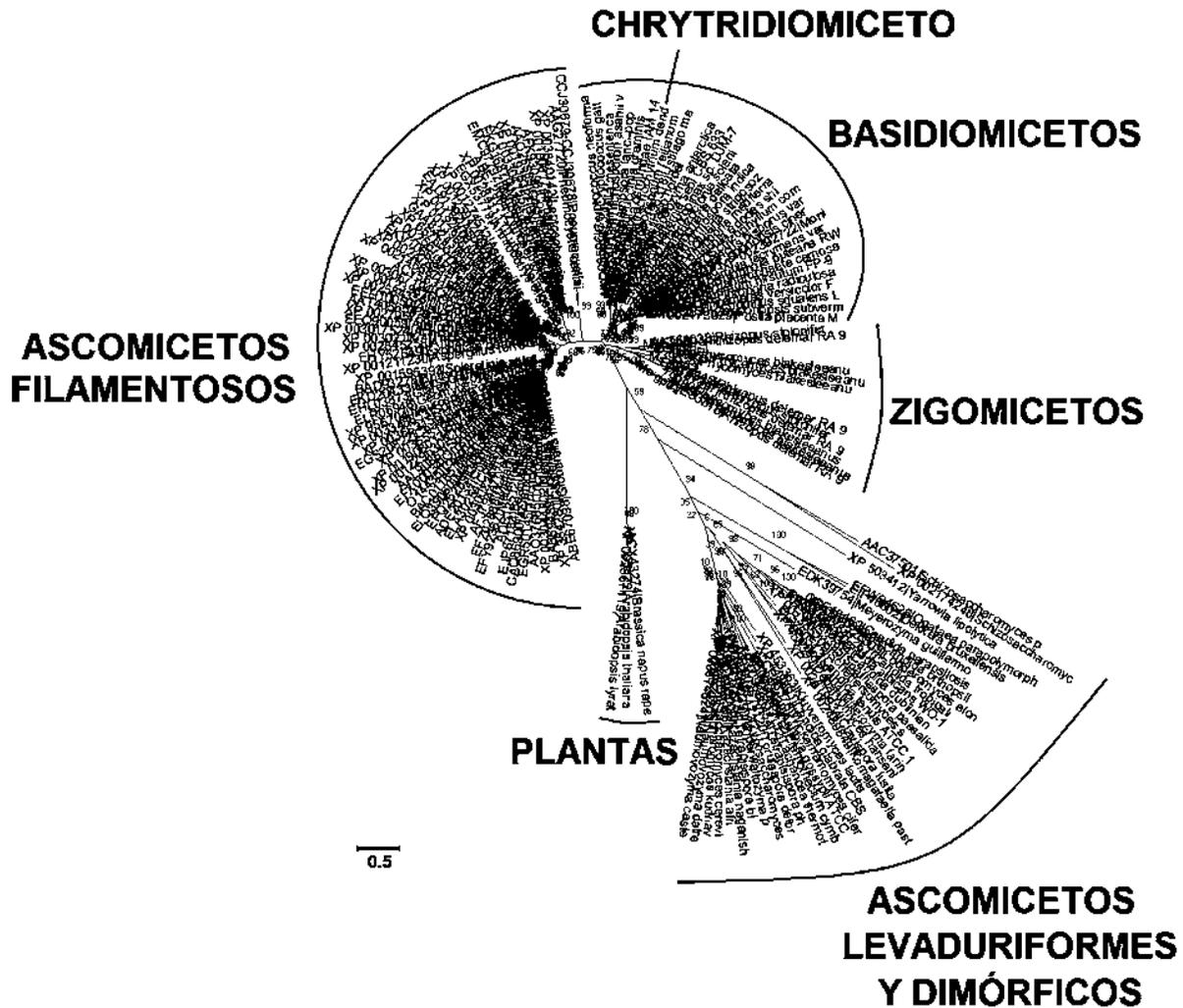


Figura 15. Análisis filogenético molecular de las subunidades G β fúngicas. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Verosimilitud basado en el matriz JTT. El árbol con la máxima verosimilitud es mostrado. El porcentaje de árboles en los cuales los taxa asociados agruparon juntos es mostrado al lado de las ramas. El árbol está dibujado a escala, las medidas de las ramas representan el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 156 secuencias de aminoácidos. El número de replicados fue 500. Con distintos rotulos se muestrala distribución de los *Phyla* de hongos y plantas como grupo externo.

En cuanto a las subunidades Gy fúngicas, fueron descargadas un total de 148 secuencias, de las cuales 143 pertenecen a hongos y cinco a las plantas antes mencionadas. De las 143 secuencias de hongos, 84 corresponden a ascomicetos, 46 a basidiomicetos, 12 a zigomicetos y 1 a chytridiomicetos.

A continuación se muestran las secuencias de aminoácidos utilizadas en el análisis filogenético, así como su número de acceso (**Tabla 12**).

Las secuencias fueron alineadas mediante ClustalW y editadas manualmente (BioEdit). Posteriormente, se determinaron que el modelo de sustitución Jones-Taylor-Thorton y valor de la variable discreta $G=1.1808$, fueron los más adecuados en función a la determinación numérica del criterio de información bayesiana para este conjunto de datos (MEGA5). Se realizó un análisis filogenético, mediante el método de máxima verosimilitud.

Al igual que para las subunidades G β fúngicas, no existen antecedentes de análisis filogenético siendo este el primer trabajo. Se encontró que las subunidades Gy fúngicas se distribuyen en función a los distintos Phyla, estando ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos y chytridiomicetos en grupos distintos.

De igual manera que el caso anterior, las subunidades Gy de ascomicetos se separaron en dos grandes grupos, uno de ellos integrado por organismos filamentosos, mientras que el segundo grupo está integrado por organismos levaduriformes y dimórficos. Las secuencias de *M. circinelloides* están dentro del grupo de los zigomicetos junto a *R. oryzae* y *P. blakesleeanus*, no habiendo una mayor cercanía de las secuencias de *M. circinelloides* con alguno de estos zigomicetos (**Figura 16**).

Tabla 12. Subunidades Gy de hongos y plantas empleadas para el análisis filogenético.

Ascomycetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Acremonium chrysogenum</i>	CAQ86906
<i>Ajellomyces capsulatus</i> H88	EGC46248
<i>Ajellomyces dermatitidis</i> ER-3	EEQ86349
<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480	XP_002846140
<i>Ashbya gossypii</i> ATCC 10895	NP_983578
<i>Aspergillus clavatus</i> NRRL 1	XP_001269641
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	XP_002374512
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	XP_750270
<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4	XP_660346
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015	EHA26396
<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	XP_001211767
<i>Beauveria bassiana</i> ARSEF 2860	EJP65162
<i>Botryotinia fuckeliana</i> B05.10	XP_001546098
<i>Candida albicans</i> WO-1	EEQ46970
<i>Candida dubliniensis</i> CD36	XP_002421375
<i>Candida glabrata</i> CBS 138	XP_449744
<i>Candida orthopsilosis</i>	CCG24953
<i>Candida parapsilosis</i>	CCE45246
<i>Candida tropicalis</i> MYA-3404	XP_002550777
<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51	XP_001221847
<i>Chaetomium thermophilum</i> var. <i>thermophilum</i> DSM 1495	EGS17599
<i>Clavospora lusitanae</i> ATCC 42720	XP_002616998
<i>Coccidioides posadasii</i> str. <i>Silveira</i>	EFW15413
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Nara gc5	ELA28639
<i>Cordyceps militaris</i> CMO1	EGX97135
<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767	XP_002777734
<i>Eremothecium cymbalariae</i> DBVPG#7215	XP_003646505
<i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT8656	EHY53970
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> R3-111a-1	EJT79592
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> R3-111a-1	EJT81703
<i>Geomyces destructans</i> 20631-21	ELR05993
<i>Gibberella zeae</i> PH-1	XP_387411
<i>Glarea lozoyensis</i> 74030	EHK98081
<i>Glomerella graminicola</i> M1.001	EFQ28560
<i>Grosmannia clavigera</i> kw1407	EFX00451
<i>Kazachstania africana</i> CBS 2517	XP_003958268
<i>Kazachstania naganishii</i> CBS 8797	CCK69900
<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL Y-1140	XP_454225
<i>Lachancea thermotolerans</i> CBS 6340	XP_002554536
<i>Leptosphaeria maculans</i> JN3	XP_003838445
<i>Macrophoma phaseolina</i> MS6	EKG16642
<i>Magnaporthe oryzae</i> Y34	ELQ44435
<i>Marssonina brunnea</i> f. sp. <i>'multigermtubi'</i> MB_m1	EKD12404
<i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102	EFY85303
<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 23	EFY98852
<i>Milleromyces farinosa</i> CBS 7064 (<i>Pichia farinosa</i> CBS 7064)	CCE82051
<i>Monascus ruber</i>	ACY56336
<i>Myceliophthora thermophila</i> ATCC 42464	XP_003662827
<i>Naumovozyma castelli</i> CBS 4309	XP_003677726
<i>Naumovozyma dairenensis</i> CBS 421	XP_003669616
<i>Neosartorya fischerii</i> NRRL 181	XP_001265146
<i>Neurospora crassa</i> OR74A	XP_956152
<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	EFW94878
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	ABS18965
<i>Paracoccidioides</i> sp. <i>'lutzi'</i> Pb01	XP_002796958
<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin	XP_002561346
<i>Penicillium digitatum</i> PH126	EKV11420
<i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15	XP_001790979
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	CCJ30991
<i>Podospora anserina</i> S mat+	XP_001908347
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP	XP_001937484
<i>Saccharomyces arboricola</i> H-6	EJS43068
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	NP_012619
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> x <i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	EHN01619
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i> IFO 1802	EJT41341
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980 UF-70	XP_001586580
<i>Sordaria macrospora</i> k-hell	XP_003351591
<i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907	EGW30024
<i>Talaromyces marneffei</i> ATCC 18224	XP_002150164
<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500	XP_002484099
<i>Tetrapisispora phaffii</i> CBS 4417	XP_003685586
<i>Thielavia terrestris</i> NRRL 8126	XP_003655757
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	XP_003680419
<i>Trichoderma atroviride</i> IMI 206040	EHK41220
<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	EGR50886
<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97	EGE05271
<i>Tuber melanosporum</i> Mel28	XP_002842388
<i>Uncinocarpus reesii</i> 1704	XP_002583712
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i> DSM 70294	XP_001645764
<i>Verticillium albo-atrum</i> VaMs. 102	XP_003000965
<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	CCH42598
<i>Yarrowia lipolytica</i> CLIB122	XP_499816

Ascomycetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> CBS 732	XP_002498734
<i>Zymoseptoria tritici</i> IPO323	XP_003857206

Basidiomycetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnettii</i> JB137-S8	EKM82425
<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnettii</i> JB137-S8	EKM82426
<i>Auricularia delicata</i> TFB-10046 SS5	EJD42247
<i>Coniophora puteana</i> RWD-64-598 SS2	EIW84923
<i>Coniophora puteana</i> RWD-64-598 SS2	EIW84925
<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130	XP_001833153
<i>Coprinopsis cinerea</i> okayama7#130	XP_001833154
<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	XP_003194915
<i>Cryptococcus gattii</i> WM276	XP_003196912
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	AAK94562
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	AAK94563
<i>Dacryopinax</i> sp. <i>DJM-731</i> SS1	EJU05664
<i>Dichomitus squalens</i> LYAD-421 SS1	EJF66306
<i>Fomitiporia mediterranea</i> MF322	EJD05687
<i>Fomitiporia mediterranea</i> MF322	EJD05689
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	XP_001874785
<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82	XP_001874786
<i>Lentinula edodes</i> (shiitake mushroom)	Q870G5
<i>Melampsora larici-populina</i> 98AG31	EGG11817
<i>Mixia osmundae</i> IAM 14324	GAA98923
<i>Moniliophthora perniciosa</i> FA553	XP_002393293
<i>Phanerochaete camosa</i> HHB-10118-sp	EKM55069
<i>Phanerochaete camosa</i> HHB-10118-sp	EKM55070
<i>Piriformospora indica</i> DSM 11827	CCA70565
<i>Piriformospora indica</i> DSM 11827	CCA74438
<i>Piriformospora indica</i> DSM 11827	CCA77979
<i>Postia placenta</i> Mad-698-R	XP_002473479
<i>Pseudozyma antarctica</i>	GAC76245
<i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> CRL 75-36-700-3	XP_003319878
<i>Punctularia strigosozonata</i> HHB-11173 SS5	EIN07203
<i>Punctularia strigosozonata</i> HHB-11173 SS5	EIN07204
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	ELU45007
<i>Schizophyllum commune</i> H4-8	XP_003036099
<i>Schizophyllum commune</i> H4-8	XP_003036100
<i>Serpula lacrymans</i> var. <i>lacrymans</i> S7.3	EGN95537
<i>Serpula lacrymans</i> var. <i>lacrymans</i> S7.3	EGN95538
<i>Sporisorium reilianum</i> SRZ2	CBQ71384
<i>Stereum hirsutum</i> FP-91666 SS1	EIM89593
<i>Stereum hirsutum</i> FP-91666 SS1	EIM89594
<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1	EIW51820
<i>Trametes versicolor</i> FP-101664 SS1	EIW51836
<i>Tremella mesenterica</i> DSM 1558	EIW65764
<i>Tremella mesenterica</i> DSM 1558	EIW67236
<i>Ustilago hordei</i>	CCF49057
<i>Ustilago maydis</i> 521	XP_762256
<i>Wallemia sebi</i> CBS 633.66	EIM24256

Zigomicetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Mucor circinelloides</i> Gpg1	144686
<i>Mucor circinelloides</i> Gpg2	167321
<i>Mucor circinelloides</i> Gpg3	177805
<i>Phycomyces blakesleeanae</i>	20455
<i>Phycomyces blakesleeanae</i>	160687
<i>Phycomyces blakesleeanae</i>	116092
<i>Phycomyces blakesleeanae</i>	144004
<i>Rhizopus oryzae</i> RA 99-880	EIE76768
<i>Rhizopus oryzae</i> RA 99-880	EIE77798
<i>Rhizopus oryzae</i> RA 99-880	EIE77902
<i>Rhizopus oryzae</i> RA 99-880	EIE80956
<i>Rhizopus oryzae</i> RA 99-880	EIE81638

Chytridiomycetos	
Organismo	Número Acceso
<i>Batrachochytrium dendrobaetidis</i> JAM81	EGF83393

Grupo Externo: Plantas	
Organismo	Número Acceso
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEE80480.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEE76694.1
<i>Arabidopsis lyrata</i>	AEE80480.1
<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002883385.1
<i>Brassica napus</i>	ACX43275.1

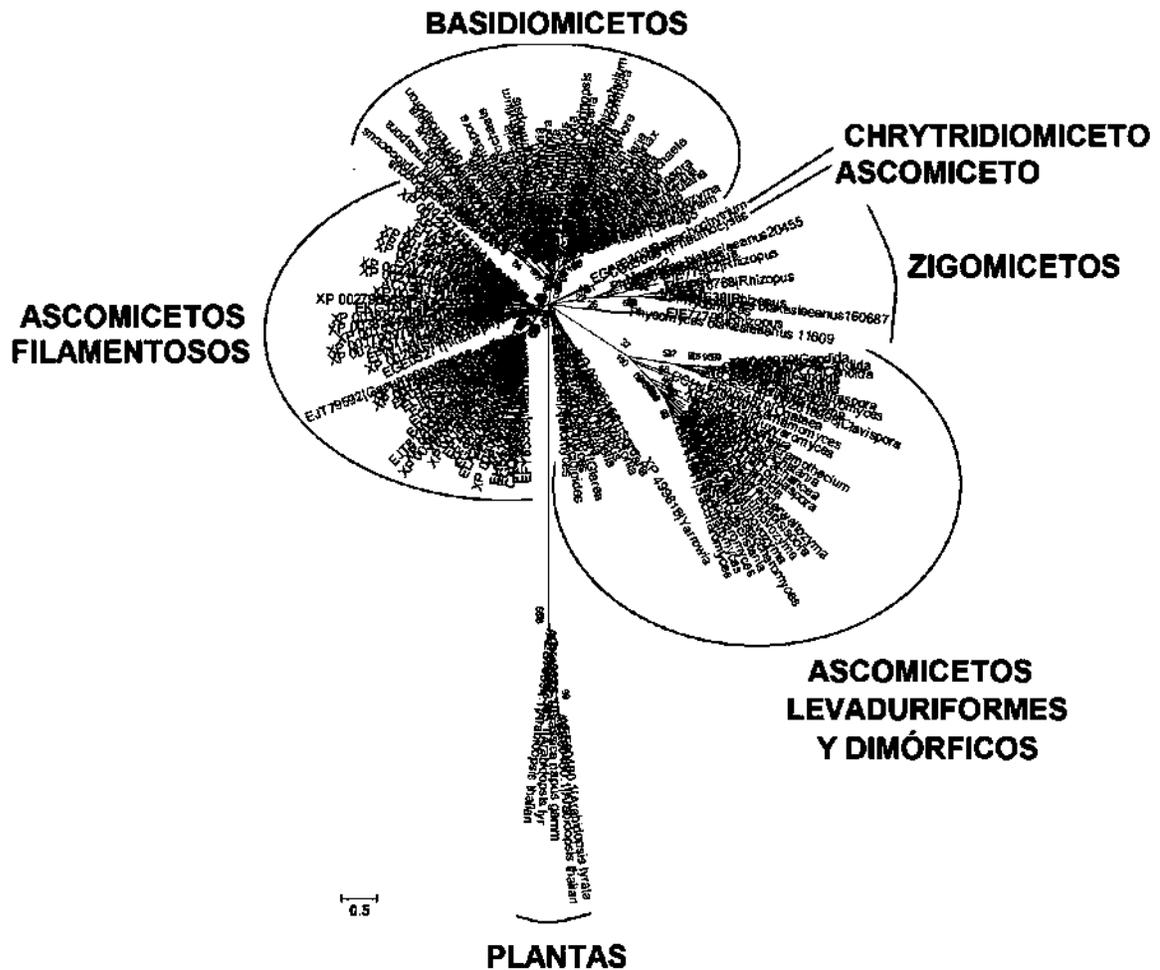


Figura 16. Análisis filogenético de las subunidades Gy fúngicas. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Máxima Verosimilitud basado en el matriz JTT. El árbol con la máxima verosimilitud es mostrado. El porcentaje de árboles en los cuales los taxa asociados agruparon juntos es mostrado al lado de las ramas. El árbol está dibujado a escala, las medidas de las ramas representan el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 148 secuencias de aminoácidos. El número de replicados fue 500. En diferentes colores se muestran la distribución de los Phyla de hongos y plantas como grupo externo.

8.3 Evaluación del crecimiento en *M. circinelloides*

8.3.1 Crecimiento aeróbico y autoanaeróbico en medio YPG de *M. circinelloides*

Con el objetivo de determinar los tiempos a considerar para llevar a cabo los análisis de expresión relativa se determinaron en primer lugar, las curvas de crecimiento para *M. circinelloides* en condiciones aeróbicas (**Figura 17A**) y autoanaeróbicas (**Figura 17B**) en medio YPG, determinando en cada caso la biomasa, representada por el peso seco (g) por cada litro de medio.

Los resultados, muestran cinéticas de crecimiento similares para ambas condiciones de crecimiento, aunque con una menor generación de biomasa en el crecimiento levaduriforme. El crecimiento aeróbico genera aproximadamente cinco veces más biomasa por litro de volumen de medio en relación al crecimiento levaduriforme.

Los tiempos seleccionados para posteriores análisis fueron 0, 6, 12 y 24 horas de crecimiento, lo cuales corresponden a distintas fases de la curva de crecimiento: 0 horas (esporas, estadio inicial), 6 horas (fase exponencial), 12 y 24 horas (fase estacionaria), cabe hacer mención que a las 24h de crecimiento al igual que ha sido reportado por McIntyre y col., 2002, también se observó la presencia de artrosporas, por lo cual este tiempo no únicamente está involucrado el dimorfismo, al mostrar la generación de otra estructura celular (artrospora) (**Figura 18**).

Los tiempos seleccionados corresponden a las mismas etapas de las curvas de crecimiento tanto para crecimiento filamentoso como para crecimiento levaduriforme.

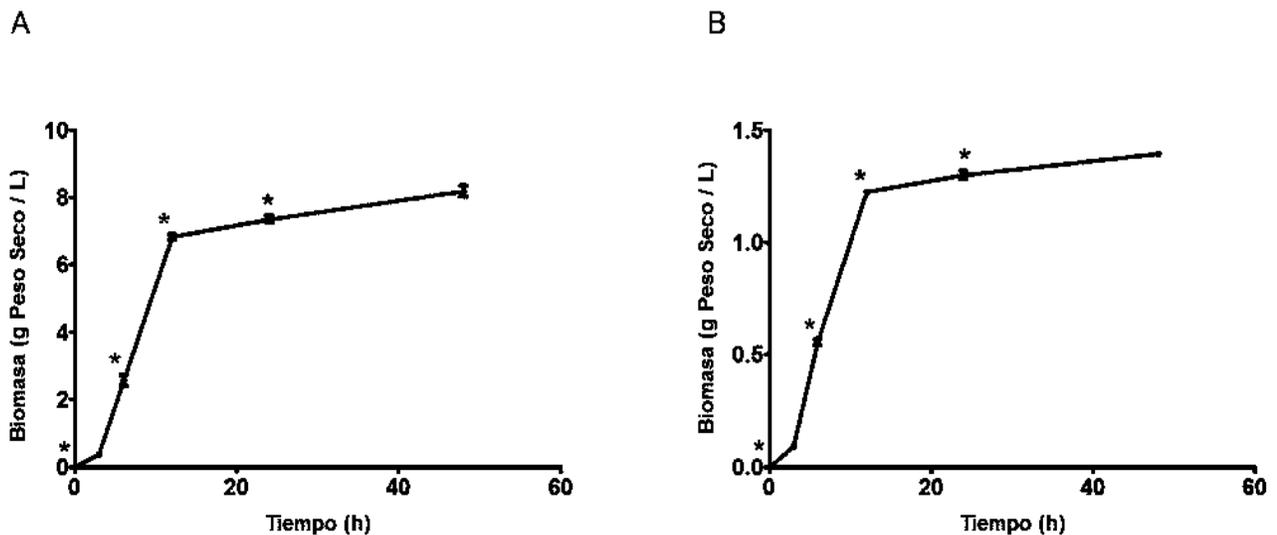


Figura 17. Curvas de crecimiento aeróbico y anaeróbico de *M. circinelloides* en medio YPG. El crecimiento celular fue determinado como gramos de peso seco por litro de medio de cultivo. *M. circinelloides* fue crecido en medio YPG a 28°C bajo condiciones aeróbicas (A) o autoanaeróbicas (B). Las muestras fueron colectadas a 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Los valores reportados son promedios \pm desviaciones estándar obtenidas mediante tres cultivos obtenidos de manera independiente. Los asteriscos muestran los tiempos seleccionados (0, 6, 12, y 24 horas) para posterior análisis de la expresión génica.

8.3.2 Transiciones morfológicas

La transición Micelio-Levadura se generó mediante la germinación de esporas en condiciones aeróbicas por 5 h, la biomasa fue filtrada y se depositó en medio de cultivo YPG fresco y fue sometida a condiciones de crecimiento de autoanerosis por 3 y 6 h. De igual forma, para la obtención de la transición Levadura-Micelio, las esporas fueron propagadas en condiciones de autoanaerobiosis por 10 h, la biomasa fue filtrada y se depositó en medio fresco y se sometió a condiciones de crecimiento aeróbicas durante 3 y 6 h. (**Figura 18**). Para ambos casos, la transición morfológica de 3 horas fue el tiempo elegido para posteriores estudios.

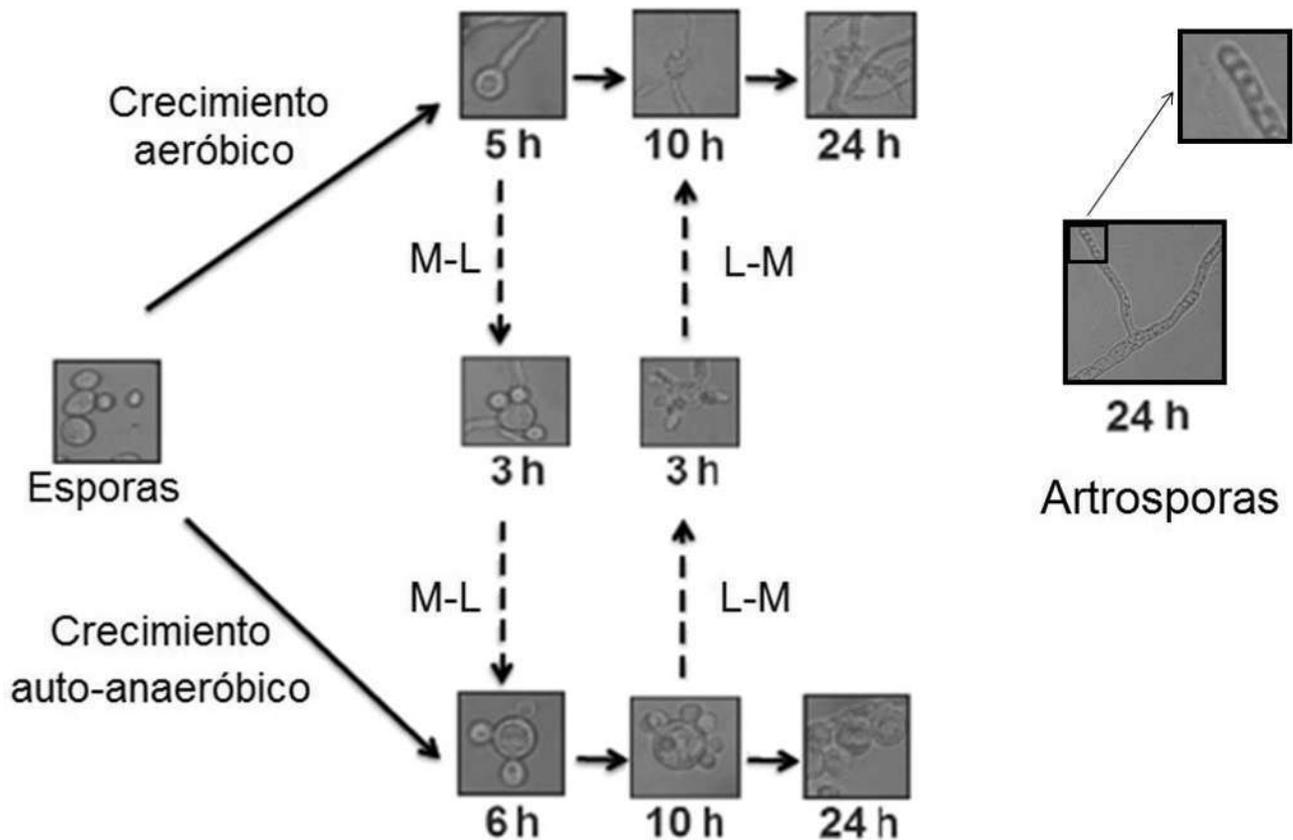


Figura 18. Desarrollo del crecimiento de *M. circinelloides* bajo condiciones aeróbicas o autoanaeróbicas. La cepa R7B de *M. circinelloides* fue crecida en medio YPG a 28°C bajo condiciones aeróbicas o autoanaeróbicas. Las transiciones Micelio-Levadura (M-L) y Levadura-Micelio (L-M) fueron llevadas a cabo como se muestra en Materiales y Métodos. Las fotografías representan células crecidas durante 6, 10, y 24 horas para crecimientos levaduriformes y miceliares conectados por líneas sólidas, mientras que las punteadas unen las transiciones morfológicas. Se muestra además el desarrollo de artrosporas a las 24h de crecimiento aeróbico.

8.3.3 Crecimiento aeróbico y autoanaeróbico de *M. circinelloides* en medios mínimos

Con la finalidad de determinar los tiempos a considerar para llevar a cabo los análisis de expresión relativa en respuesta a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno se determinaron en primer lugar, las curvas de crecimiento para *M. circinelloides* en condiciones aeróbicas (**Figura 19A**) y autoanaeróbicas (**Figura 19B**), en tres medios mínimos, medio A (glucosa y peptona de gelatina), medio B (glucosa y sulfato de amonio), medio C (glicerol y peptona de gelatina).

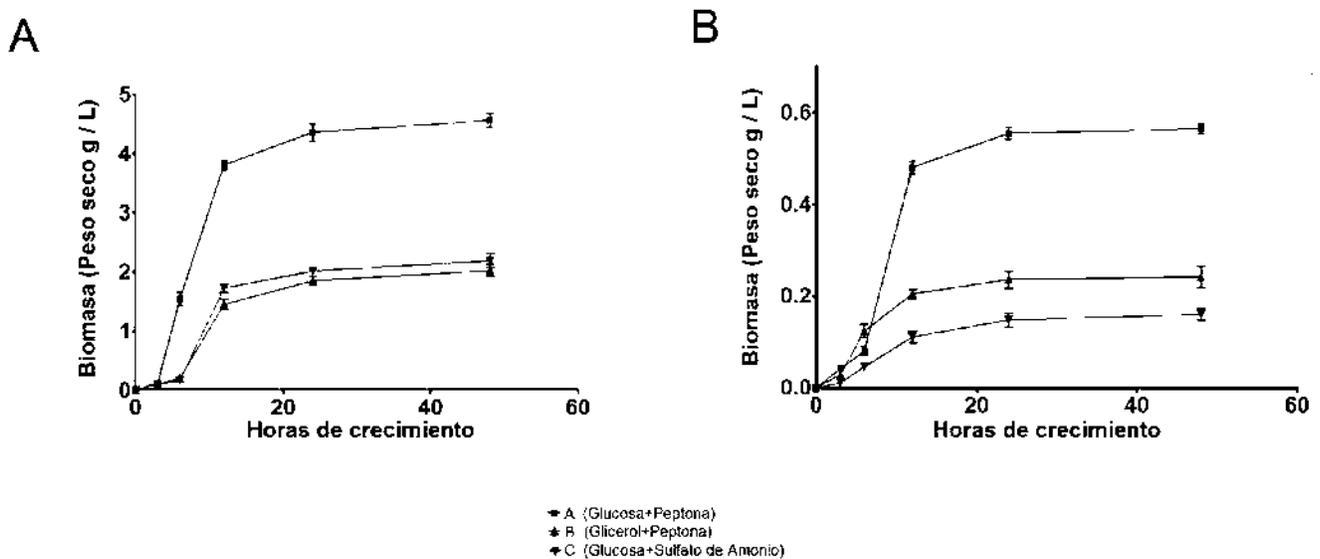


Figura 19 . Curvas de crecimiento de *M. circinelloides* en medios mínimos. *Mucor circinelloides* fue crecido aeróbicamente (**A**) o auto-anaeróbicamente (**B**) en tres tipos de medios mínimos: Glucosa + Peptona (●), Glicerol + Peptona (▲), Glucosa + Sulfato de Amonio (▼) y se determinó el crecimiento como peso seco a las 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Se muestran los promedios de tres experimentos independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.

Los resultados muestran que en medio mínimo A, la generación de biomasa es mayor respecto a los medios B y C tanto en crecimiento aeróbico como en autoanaeróbico. Sin embargo, las distintas fases de la curva de crecimiento son similares, apareciendo a los mismos tiempos en los tres medios. Se generó mayor cantidad de biomasa en micelio respecto a levaduras, independientemente del

medio empleado. Además, se determinó el porcentaje de esporas germinadas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas en los tres medios mínimos y medio YPG como referencia, encontrando que en aerobiosis como en auto-anaerobiosis en medio YPG se presenta germinación celular más rápida en relación a los medios mínimos, seguido por el medio mínimo con fuente de carbono fermentable y de nitrógeno inorgánica. Los porcentajes de germinación más tardíos se hallan en los medios mínimos B y C (**Figura 20**).

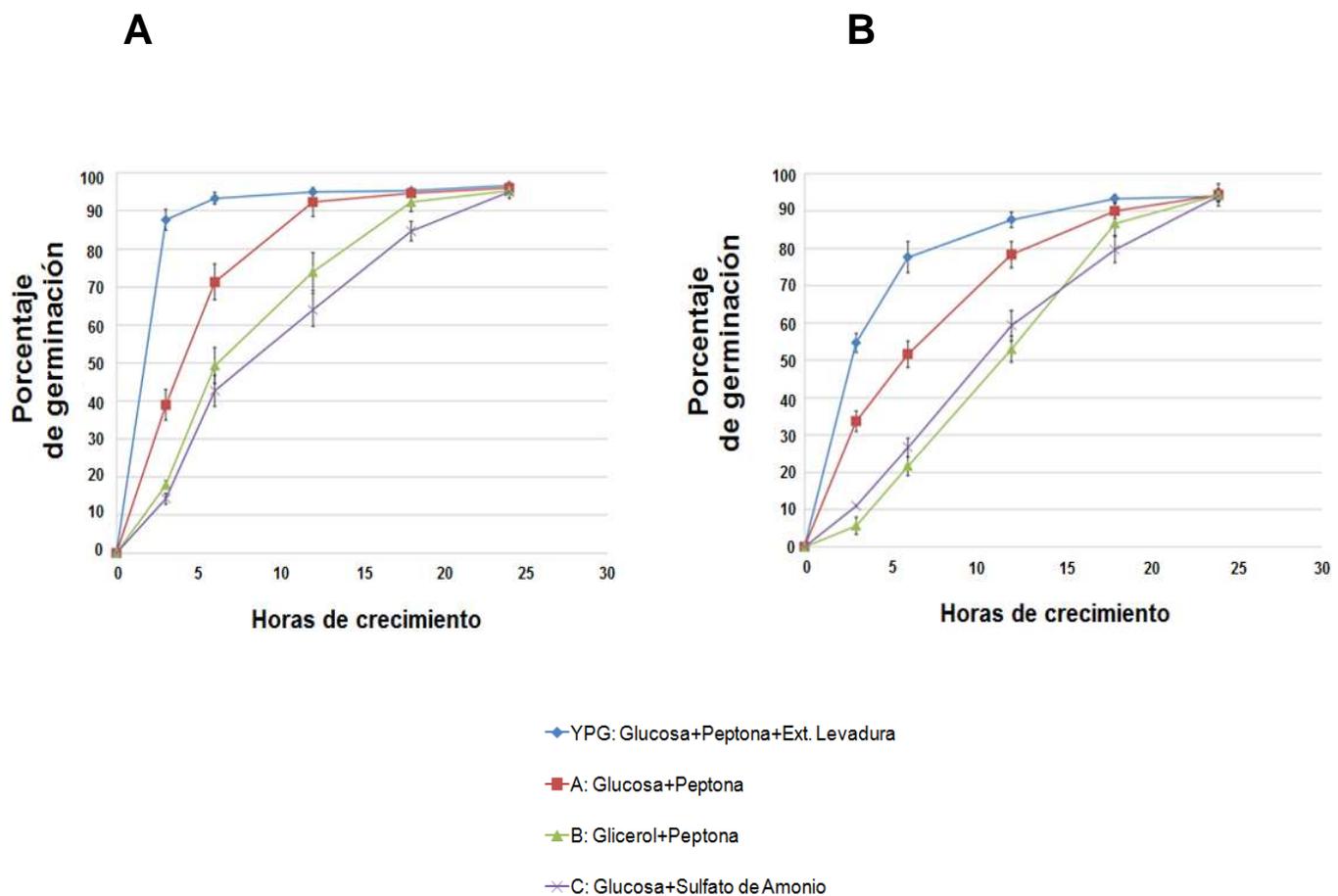


Figura 20. Porcentaje de germinación aeróbica y autoanaeróbica para diferentes medios de cultivo en *M. circinelloides*. *M. circinelloides* fue crecido aeróbicamente (**A**) y autoanaeróbicamente (**B**) durante 3, 6, 12, 18 y 24 horas en medio YPG y en tres medios mínimos (**A, B y C**). Se contaron el número de células germinadas. Los puntos representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras muestran el error estándar.

Es hasta el tiempo de 24h que en crecimientos aeróbico y autoanaeróbico para todos los medios se alcanzaron porcentajes de germinación mayores a 90%.

El tiempo de crecimiento seleccionado en los diferentes medios y condiciones de cultivo corresponde a 24 horas de crecimiento, el cual corresponde en todos los casos a la fase estacionaria de la curva de crecimiento, además de presentar porcentajes de germinación superiores al 90%.

.Se muestran a continuación fotografías que muestran la morfología de las células crecidas aeróbicamente y autoanaeróbicamente 24h en los tres medios mínimos evaluados.

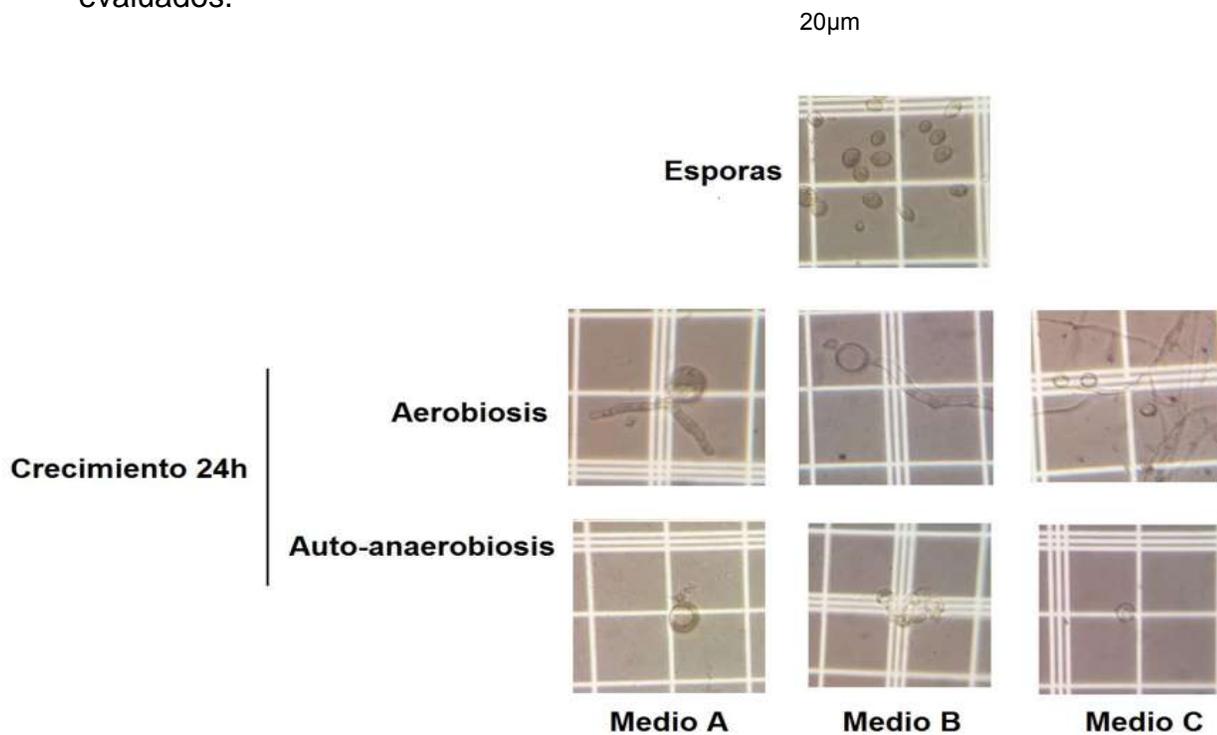


Figura 21. Fotografías de 24 h de crecimiento de *M. circinelloides* en medios mínimos. *M. circinelloides* fue crecido aeróbica y autoanaeróbicamente por 24 h en medios mínimos. Se muestran microfotografías y las celdas de un hematocítometro como referencia de tamaño, la línea mide 20μm. La composición de los medios mínimos es la siguiente, A: Glucosa + Peptona; B Glicerol + Peptona; C: Glucosa + Sulfato de Amonio.

8.4 Selección de los genes normalizadores para RT-qPCR en *M. circinelloides* durante el dimorfismo

Una vez elegido los tiempos en los cuales se llevarían a cabo las determinaciones de expresión de los genes de interés, se procedió a evaluar la estabilidad de expresión de las sondas correspondientes a los genes normalizadores en las diversas condiciones, los cuales han sido previamente reportados en otros sistemas biológicos .

Fueron analizados un conjunto de siete genes normalizadores para RT-PCR en tiempo real durante la diferenciación celular dimórfica de *M. circinelloides*: 1) *mcvma-1*, que codifica la subunidad catalítica de la ATPasa vacuolar (Wescher y Bowman, 1995); 2) *mctfc-1*, que codifica para una subunidad del factor de transcripción TFIIIC de la RNA polimerasa III (Teste y col., 2009); 3) *mcef-1*, que codifica el factor de elongación de la traducción factor (Schuchardt, 2005); 4) *mctfb-4*, que codifica para una subunidad del complejo TFIIH, involucrado en la iniciación de la transcripción (Spiering y col., 2010); 5) *mce1*, que codifica la enzima activadora de ubiquitina, que cataliza el primer paso durante la ruta de ubiquitinación (Guo y Smith., 2010); 6) *mc18S* el gen que codifica el RNA ribosomal 18S (Kuchipudi y col., 2012) 7) *mc28S* el gen que codifica el RNA ribosomal 28S (Xue y Cheng, 2012).

Se identificaron los genes homólogos en *M. circinelloides* usando la base de datos disponible en la red. A continuación se muestran los números de acceso, porcentajes de identidad de las proteínas y transcritos identificados en *M. circinelloides* respecto a otros organismos (**Tabla 13 y Tabla 14**).

Las secuencias homólogas a genes de referencia empleados en otros organismos se identificaron en *M. circinelloides*. Las secuencias fueron comparadas mediante Clustal W para proteínas (**Tabla 13**), y Clustal V para secuencias de transcritos (**Tabla 14**), y se muestran porcentajes de identidad en ambos casos, además de porcentajes de similitud para las secuencias de proteínas. Se muestran los números de acceso para todas las secuencias.

Tabla 13. Porcentajes de identidad de genes normalizadores en *M. circinelloides* respecto a otros organismos.

Secuencias de transcritos (Número de acceso)		% Identidad	Tamaño amplicón (pares de bases)
<i>mcvma-1</i> (154376)	<i>Nc vma-1</i> (XM_956480.2)	59	94
<i>mctfc-1</i> (106349)	<i>Sc tfc-1</i> (NM_001178471.3)	23.6	90
<i>mcef-1</i> (156959)	<i>Um ef-1</i> (XM_751978.1)	83.2	87
<i>mctfb-4</i> (155179)	<i>Sc tfb-4</i> (NM_001184153.1)	33.3	74
<i>mce1</i> (26195)	<i>Mm e1</i> (NM_001276316.1)	49.1	67
<i>mc28S</i> (115810)	<i>Sc 28S</i> (JQ277730.1)	93	73
<i>mc18S</i> (111012)	<i>Sc 18S</i> (JQ277730.1)	45.6	95

Abreviaturas: *M. circinelloides* (Mc), *M. musculus* (Mm), *N. crassa* (Nc), *S. cerevisiae* (Sc), *Ustilago maydis* (Um).

Tabla 14. Porcentajes de identidad y similitud de proteínas codificadas por genes normalizadores en *M. circinelloides* respecto a otros organismos.

Secuencias de proteína (Número de acceso)		% Identidad	% Similitud
McVma-1 (154376)	Nc Vma-1 (AAA33621.1)	73.3	84.4
McTfc-1 (106349)	Sc Tfc-1 (NP_009681.3)	21.4	42.8
McEf-1 (156959)	Um Ef-1 (XP_757071.1)	84.1	94.5
McTfb-4 (155179)	Sc Tfb-4 (NP_015381.1)	39.3	60.3
McE1 (26195)	Mm E1 (BAA01433.1)	59.4	74.4

Abreviaturas: *M. circinelloides* (Mc), *M. musculus* (Mm), *N. crassa* (Nc), *S. cerevisiae* (Sc), *Ustilago maydis* (Um).

Fueron diseñados oligonucleótidos y sondas específicas para cada gen normalizador, (**Tabla 4**). Se corrieron electroforéticamente los productos de RT-PCR correspondientes a los genes normalizadores propuestos que se evaluaron durante el dimorfismo *M. circinelloides*. Se aprecian productos únicos que corresponden a los tamaños esperados de los amplicones. (**Figura 22**).

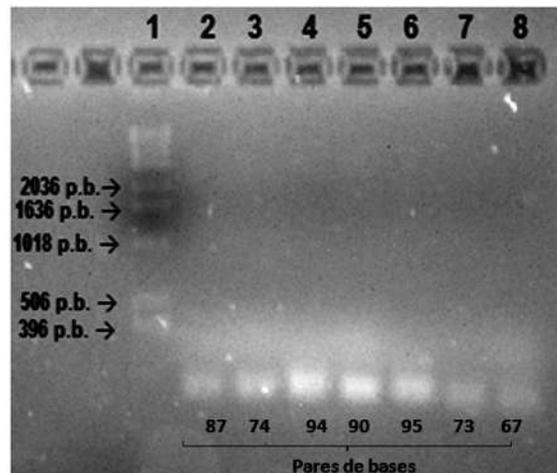
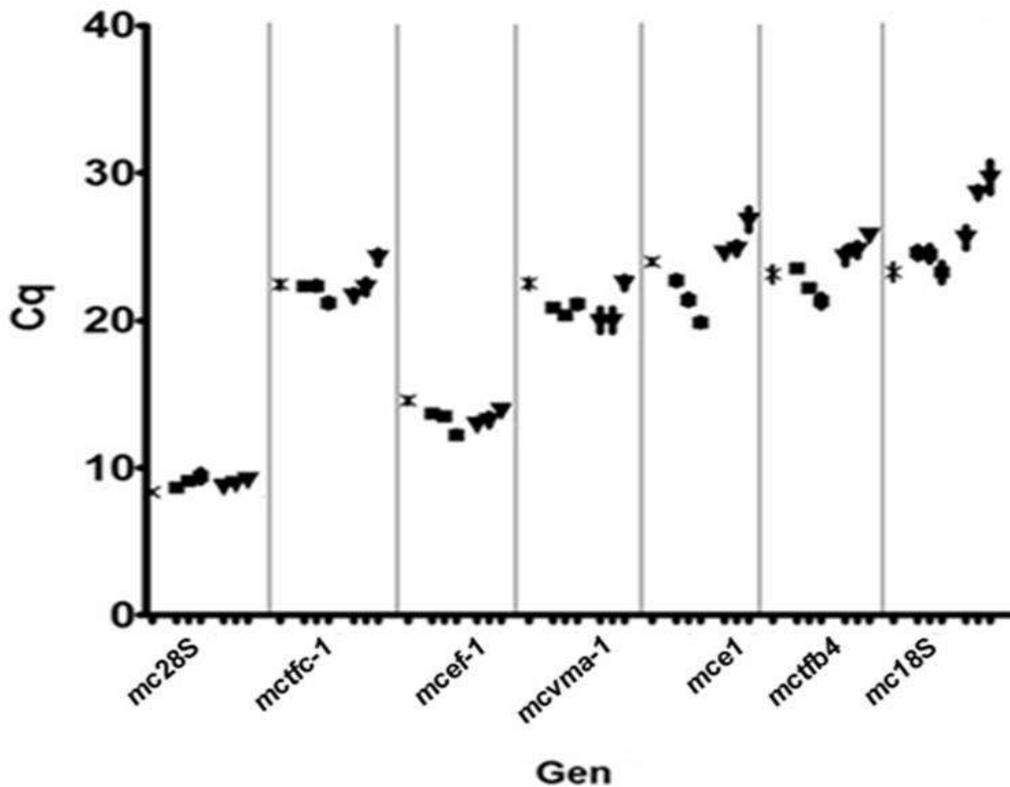


Figura 22. Corrimiento electroforético de los productos de RT-PCR en tiempo real para los genes de referencia de *M. circinelloides*. Corrimiento electroforético en gel de agarosa 2% para los genes de referencia. En el carril 1 se muestra el marcador tamaño molecular 1 kb Track it (Invitrogen), de los carriles 2 al 8 se cargaron (100 ng): *mcef-1*, *mctfb-4*, *mcvma-1*, *mctfc-1*, *mc18S*, *mc28S* y *mce1*. Se muestran los tamaños de los amplicones en pares de bases.

Un enfoque para validar los genes normalizadores durante la diferenciación morfológica consistió en verificar los valores de los Cq obtenidos por RT-qPCR durante las diferentes condiciones morfológicas. Los datos de Cq se obtuvieron usando las sondas para los siete genes candidatos durante las condiciones morfológicas de esporas, crecimientos micelial y levaduriforme de 6, 12 y 24 horas (**Figura 23**).



Gen	<i>mc18S</i>	<i>mc28S</i>	<i>mctfc-1</i>	<i>mcef-1</i>	<i>mcvma-1</i>	<i>mce1</i>	<i>mctfb4</i>
Media	25.7	8.9	22.4	13.5	21.1	23.5	23.6
Desv. Est.	2.7	0.5	1.1	0.8	1.3	2.3	1.6
Coef. Var.	0.105	0.056	0.049	0.059	0.062	0.098	0.068

Figura 23. Distribución de los niveles de expresión (Cq) de los diferentes genes constitutivos durante esporas, crecimiento micelial, levaduriforme de *M. circinelloides*. Cada punto representa valores de Cq obtenidos de curvas de amplificación de RT-PCR en tiempo real. Los genes *mc28S*, *mctfc-1*, *mcef-1*, *mcvma-1*, *mce1*, *mctfb4* y *mc18S* fueron evaluados por RT-PCR en tiempo real para esporas (x), micelio 6, 12 y 24 h (■); y levadura 6, 12 y 24 h (▼). La desviación estándar está representada para cada etapa de diferenciación con N=4. Se muestran en la tabla inferior las medias, desviaciones estándar y coeficiente de variación para cada uno de los genes probados.

Los resultados permitieron identificar las sondas correspondientes a los genes *mc28S*, *mctfc-1*, *mcef-1* y *mcvma-1* como aquellas que presentan una menor variación en las condiciones ensayadas, esto se aprecia por los valores de

desviación estándar y coeficiente de variación menores, respecto a los demás genes evaluados. Debido a la mayor variabilidad en sus valores de Cq que presentaron los genes *mc18S*, *mce1* y *mctfb-4* en las condiciones probadas, fueron descartados como genes normalizadores. Las sondas correspondientes a genes *mc28S*, *mctfc-1*, *mcef-1* y *mcvma-1* fueron posteriormente evaluadas para las transiciones levadura-micelio y micelio-levadura de 3 horas. (Figura 24).

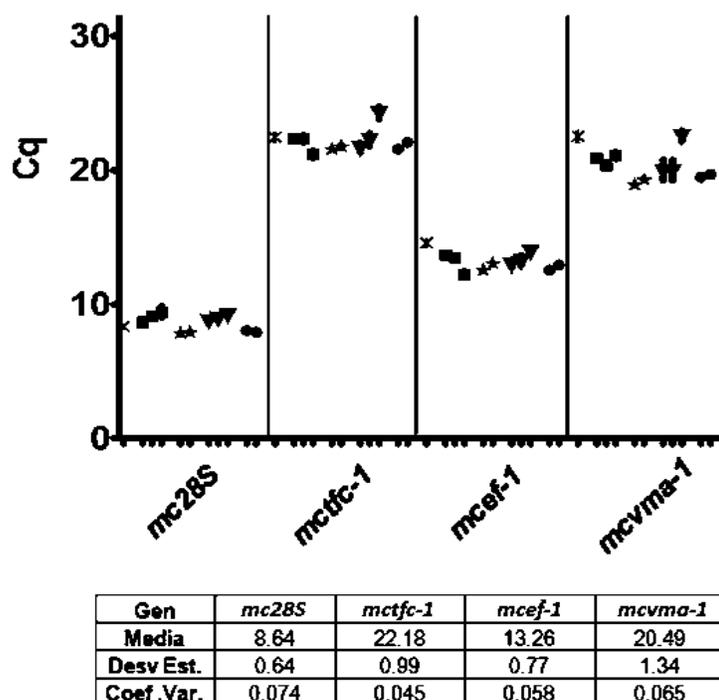


Figura 24. Distribución de los niveles de expresión (Cq) de los diferentes genes constitutivos durante esporas, crecimiento micelial, levaduriforme y transiciones morfológicas de *M. circinelloides*. Además de los datos obtenidos para esporas (x), y crecimiento micelial de 6, 12 y 24 h (■) y levaduriforme de 6, 12 y 24 h (▼) se grafican los Cqs correspondientes para los genes *mc28S*, *mctfc-1*, *mcef-1* y *mcvma-1* para las transiciones de 3 y 6 horas de levadura-micelio (★) y micelio-levadura (●). La desviación estándar está representada para cada etapa de diferenciación con una barra, el ensayo consistió en N=4 para las etapas de esporas, micelio y levadura, y N=3 para las transiciones micelio-levadura y levadura-micelio. Se muestran en la tabla inferior las medias, desviaciones estándar y coeficiente de variación para cada uno de los genes probados.

8.4.1 Análisis matemático de los genes normalizadores durante el dimorfismo de *M. circinelloides*

El análisis matemático fue realizado siguiendo el algoritmo propuesto por Vandesompele y col., 2002, el cual determina la estabilidad de los genes y de esta manera identificar el gen normalizador más estable y la mejor pareja de genes normalizadores. Se trata de una herramienta matemática que compara los C_q de los genes en las diferentes condiciones ensayadas. Los cálculos se describen en materiales y métodos. De acuerdo al algoritmo la mejor estabilidad individual se denota como el valor M_j más pequeño. De la misma forma la pareja más estable está descrita por el valor V_{jk} más pequeño.

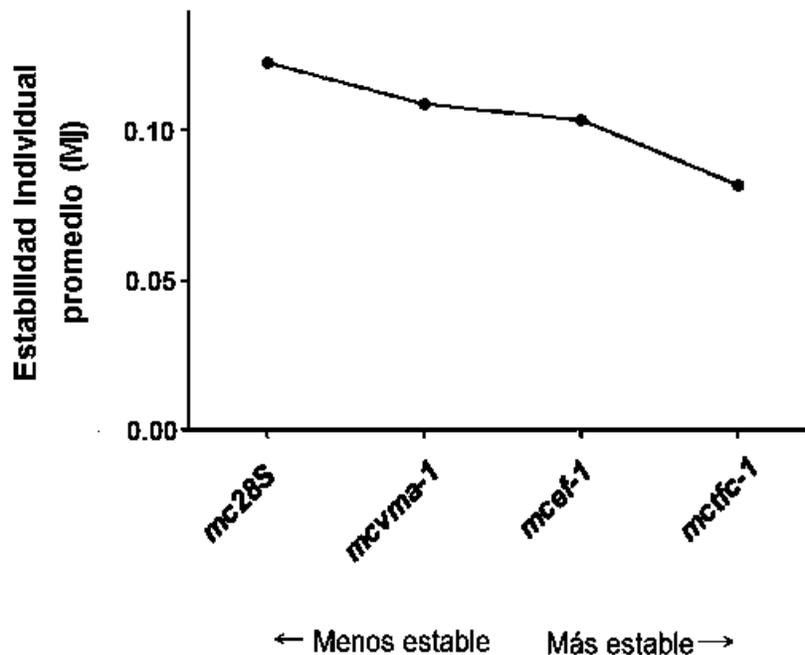


Figura 25. Estabilidad individual promedio (M_j) de los genes de referencia durante el dimorfismo de *M. circinelloides*. La medida de estabilidad individual promedio (M_j) fue determinada para los genes constitutivos *mc28S*, *mcvma-1*, *mcef-1* y *mctfc-1* en todas las condiciones probadas de acuerdo al algoritmo estadístico de geNorm.

El algoritmo de Vandesompele y col., 2002 permite también determinar la mejor pareja normalizadora entre todos los genes estudiados. Este valor se conoce

como V_{jk} , y se midió la estabilidad de parejas de genes mediante el parámetro V_{jk} para los genes *mc28S*, *mcvma-1*, *mcef-1* y *mctfc-1* para esporas, crecimiento micelial y levaduriforme y transiciones micelio-levadura y levadura-micelio en *M. circinelloides*. El valor más bajo de $V_{j/k}$ corresponde a la pareja más estable.

Tabla 15. Variación de la estabilidad de expresión génica en parejas de genes de referencia de *M. circinelloides* durante el dimorfismo.

$V(j/k)$

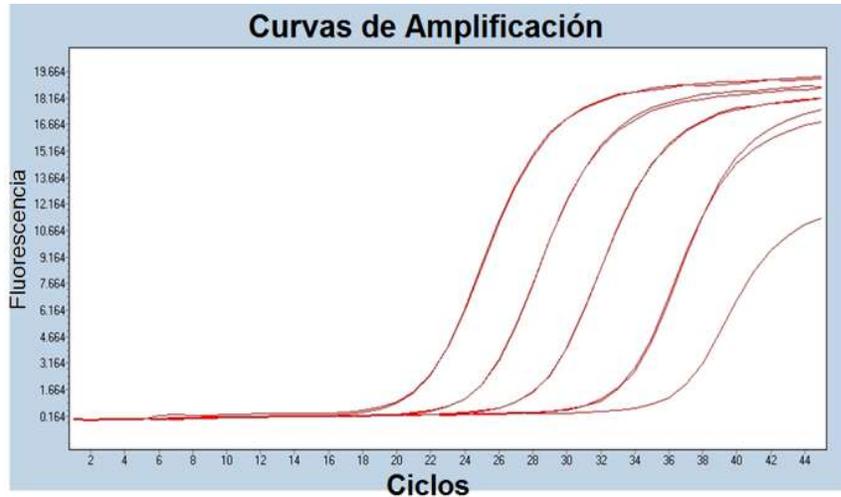
		<i>j</i>			
		Gen	<i>mc28S</i>	<i>mctfc-1</i>	<i>mcef-1</i>
<i>k</i>	<i>mc28S</i>		0.084	0.127	0.103
	<i>mctfc-1</i>	0.084		0.059	0.063
	<i>mcef-1</i>	0.127	0.059		0.071
	<i>mcvma-1</i>	0.103	0.063	0.071	

Los resultados anteriores muestran que la mejor pareja de genes normalizadores en *M. circinelloides* durante el dimorfismo es la integrada por *mctfc-1* y *mcef-1*.

8.5 Determinación de eficiencias de amplificación

Como parte del análisis de expresión relativa, fue necesario calcular las eficiencias de reacción para todos los genes estudiados, los normalizadores y los genes que codifican para subunidades de proteínas G heterotriméricas ya que el cálculo de los niveles de expresión involucra la corrección de eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001), Se ejemplifica con el gen *mctfc-1* (**Figura 26**) de la obtención de la pendiente de la curva estándar, que es un valor requerido para el cálculo de la eficiencia de amplificación, como se explica en Materiales y Métodos..

A



B

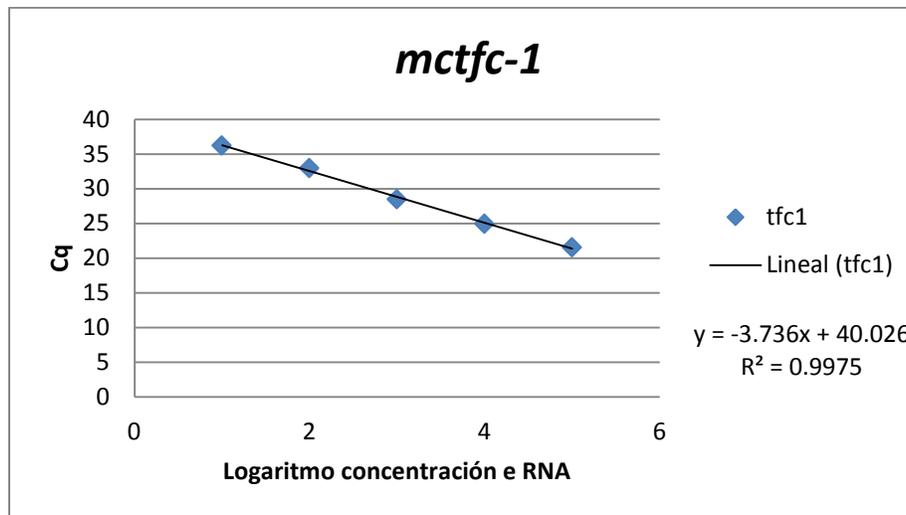


Figura 26. Distribución de Cq para diferentes concentraciones de RNA total para *mctfc-1*. **A.** Curvas de amplificación de RT-qPCR, se emplearon como templates concentraciones de RNA total de 500, 50, 5, 0.5 y 0.05 ng. **B.** Gráfica con escala logarítmica donde el punto 5 es para la concentración de 500 ng es, el punto 4 para 50 ng y así sucesivamente, mostrando línea de tendencia con su pendiente y R^2 .

El gen *mcgpg1* de *M.circinelloides* registró valores de Cq entre 33 y 35 usando una concentración de RNA total de 500 ng. El rango dinámico de la reacción de RT-qPCR no permitió la determinación de la eficiencia de amplificación usando como templado RNA total para *mcgpg1*, como si lo fue en todos los demás genes que codifican subunidades G heterotrimericas. Por lo tanto, la determinación de la eficiencia de amplificación para *mcgpg1* se realizó mediante la amplificación del cDNA de *mcgpg1* mediante una reacción de RT PCR. Este producto de cDNA de *mcgpg1* fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa y purificado. Se cuantificó el fragmento de DNA correspondiente a *mcgpg1* y se realizaron las diluciones correspondientes (1000-0.1 ng) y de esta manera fue posible calcular la eficiencia de amplificación para este gen *mcgpg1* (**Tabla 16**). Los rangos de eficiencia mayores a 80% son requeridos por que el cálculo de los niveles de expresión implica la comparación de las eficiencias de amplificación de los genes de interés normalizador y del gen normalizador. Los genes cuyas eficiencias sean menores a 80% deben ser descartados, ya que los resultados de expresión relativa no son válidos (Pestana y col., 2010).

Tabla 16. Eficiencias de amplificación de los genes normalizadores y subunidades G α , G β y G γ para RT- qPCR en *M. circinelloides*.

Gen	Eficiencia de amplificación	Gen	Eficiencia de amplificación	Gen	Eficiencia de amplificación
<i>mcgpa1</i>	94.3	<i>mcgpa10</i>	90	<i>mc18S</i>	94.4
<i>mcgpa2</i>	100	<i>mcgpa11</i>	84.5	<i>mc28S</i>	89.1
<i>mcgpa3</i>	85.6	<i>mcgpa12</i>	84.7	<i>mctfc-1</i>	84
<i>mcgpa4</i>	100	<i>mcgpb1</i>	84.7	<i>mcvma-1</i>	89.1
<i>mcgpa5</i>	94.4	<i>mcgpb2</i>	84.1	<i>mcef-1</i>	100
<i>mcgpa6</i>	85.6	<i>mcgpb3</i>	97.2	<i>mce1</i>	74.8
<i>mcgpa7</i>	87.7	<i>mcgpg1</i>	91.5	<i>mctfb-4</i>	91
<i>mcgpa8</i>	86.7	<i>mcgpg2</i>	86.7		
<i>mcgpa9</i>	100	<i>mcgpg3</i>	94.2		

8.6 Expresión de los genes que codifican subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* durante el dimorfismo

Se analizaron los niveles de transcrito de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ durante el dimorfismo en *M. circinelloides* mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real en las siguientes condiciones morfológicas: esporas, 6, 12 y 24 horas para crecimiento micelial y levaduriforme, y 3 horas en las transiciones micelio-levadura y levadura-micelio (ver Materiales y Metodos) en donde se registraron los valores de Cq correspondientes a las diferentes subunidades G α (*mcgpa1-mcgpa12*), G β (*mcgpb1-mcgpb3*), y G γ (*mcgpg1-mcgpg3*) en *M. circinelloides*. Posteriormente, se compararon los diferentes Cq mediante la fórmula del Delta-Ct (Livak y Schmittgen, 2001) con corrección de las eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001), empleando a *mctfc-1* como normalizador.

Los datos obtenidos fueron analizados desde varios enfoques.

- A) Comparación de los niveles de transcrito de los genes de manera global. Es decir, identificar cuales genes se expresan a niveles mayores o menores que los demás genes considerando todos los estadios morfológicos del dimorfismo.
- B) Identificación de genes con patrones de expresión específicos a una sola morfología. Es decir, comparando los niveles de transcrito de un mismo gen para todo el proceso dimorfico, se identificaron cuales estadios morfológicos correlacionan con un nivel de expresión elevado o disminuido.
- C) Identificación de grupos de genes con patrones de niveles de transcrito similares durante el proceso dimórfico

8.6.1 Expresión de las subunidades Gα de *M. circinelloides* durante el dimorfismo

Se realizó la comparación de niveles de transcrito entre las subunidades *mcgpa1-mcgpa12* y el gen normalizador *mctfc-1* durante el dimorfismo, mediante la fórmula Delta-Ct (Livak y Schmittgen, 2001) con corrección de eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001) (Figura 27).

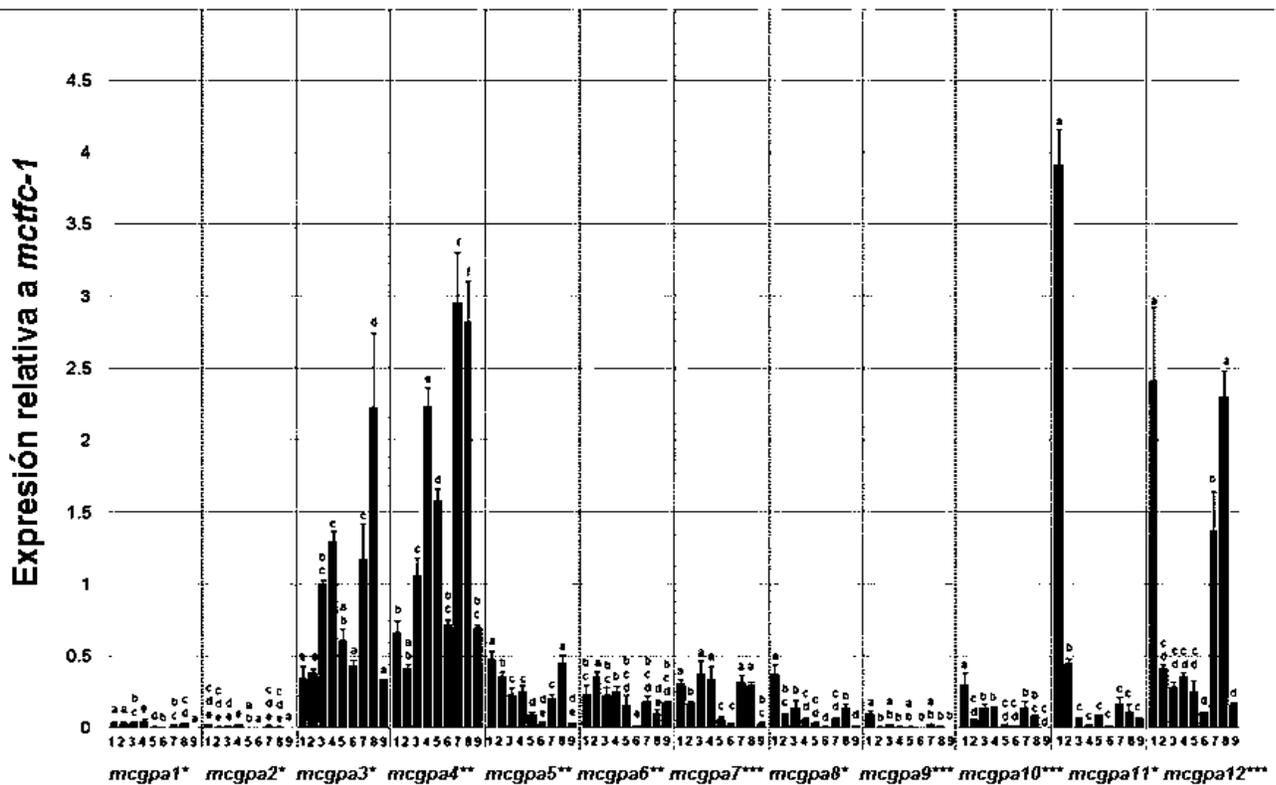


Figura 27. Expresión de los genes que codifican para subunidades Gα durante el dimorfismo en *M. circinelloides*. Se grafican los niveles de transcrito de las subunidades *mcgpa1-mcgpa12* respecto a *mctfc-1* durante el dimorfismo. Los estadios morfológicos estudiados fueron, 1: **esporas**; 2, 3, 4: crecimiento aeróbico (6, 12 y 24 horas), 5: transición micelio-levadura; 6, 7, 8: crecimiento autoanaeróbico (6, 12 y 24 horas); 9: transición levadura-micelio. Se indican en asteriscos el grupo de la clasificación filogenética de subunidades Gα al que pertenecen (*-I; **-II y ***-III). Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Fisher, $p < 0.05$) se muestran en letras.

Fueron detectados niveles de transcrito para todos los genes que codifican las subunidades $G\alpha$ (*mcgpa1-mcgpa12*) en *M. circinelloides* durante el dimorfismo. Las doce subunidades tienen niveles de transcrito acumulados diferencialmente, es decir no hay alguna subunidad que mantenga niveles de transcrito sin diferencias estadística para todos los estadios morfológicos evaluados.

Existen genes como *mcgpa1*, *mcgpa2* y *mcgpa9* que presentan bajos niveles de transcritos respecto a los demás genes durante todo la diferenciación dimórfica (aproximadamente 5 veces menores respecto a la media de los demás genes). A diferencia de *mcgpa3* y *mcgpa4* que presentan niveles relativamente altos comparado con los demás genes en todas las condiciones (aproximadamente el doble respecto a la media de los demás genes). Por su parte, los *mcgpa5*, *mcgpa6*, *mcgpa7*, *mcgpa8*, *mcgpa10*, *mcgpa11* y *mcgpa12*, por lo regular, presentan niveles de transcritos medios en relación a los demás genes. El gen *mcgpa11* presenta en esporas mayores niveles de transcrito comparado con el crecimiento vegetativo (aproximadamente 8 veces), siendo también el gen que codifica para una subunidad $G\alpha$ con el nivel de transcrito más alto para la morfología de esporas. Por su parte el gen *mcgpa4* presenta mayores niveles de transcrito en levadura respecto a micelio y esporas en *M. circinelloides* (aproximadamente el doble). Se determinó que algunas subunidades $G\alpha$ (*mcgpa5*, *mcgpa7* ó *mcgpa11*) presentan niveles y patrones de transcrito similares a subunidades $G\beta$ (*mcgpb1*) y $G\gamma$ (*mcgpg2*) (**Figura 28**) lo que podría sugerir que sean traducidas y pudieran formar probables complejos heterotriméricos durante el crecimiento levaduriforme (**Figura 29**).

Para el caso de las subunidades *mcgpb3* y *mcgpg3*, se encontraron patrones y niveles de transcrito similares durante todas las etapas del proceso dimórfico evaluadas: esporas, crecimiento micelial y levaduriforme de 6, 12 y 24 horas y las transiciones morfológicas micelio-levadura y levadura-micelio. Después de la traducción dichas secuencias podrían formar un dímero (**Figura 30**).

8.6.2. Subunidades G β y G γ de *M. circinelloides* durante el dimorfismo

Se realizó la comparación de niveles de transcrito entre las subunidades *mcgpb1-mcgpb3*, *mcgpg1-mcgpg3* y el gen normalizador *mctfc-1* durante el dimorfismo, mediante la fórmula Delta-Ct (Livak y Schmittgen, 2001) con corrección de eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001) (**Figura 28**).

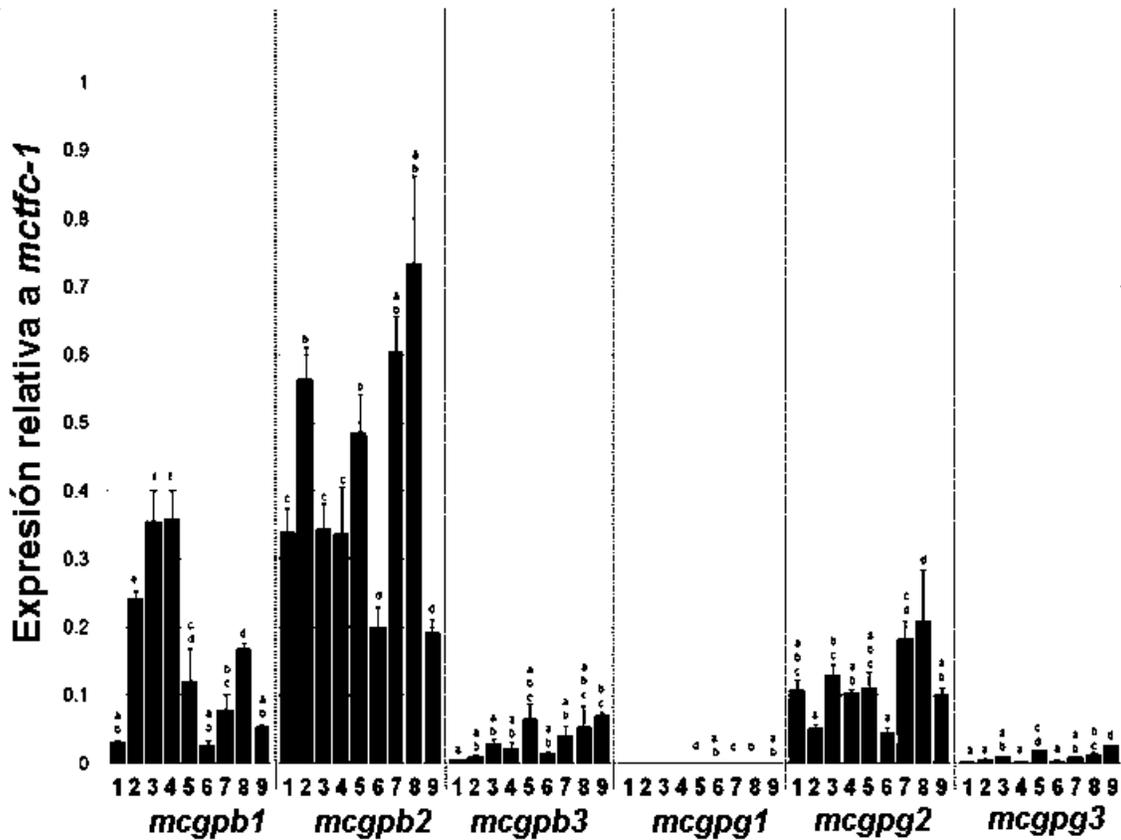


Figura 28. Expresión de los genes que codifican para subunidades G β y G γ durante el dimorfismo en *M. circinelloides*. Se grafican los niveles relativos de transcrito entre las subunidades G β (*mcgpb1-mcgpb3*) y G γ (*mcgpg1-mcgpg3*) con el gen normalizador *mctfc-1* durante el dimorfismo. Los estadios morfológicos estudiados fueron, 1: esporas; 2, 3, 4: crecimiento aeróbico (6, 12 y 24 horas), 5: transición micelio-levadura; 6, 7, 8: crecimiento autoanaeróbico (6, 12 y 24 horas); 9: transición levadura-micelio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas (Fisher, $p < 0.05$) se muestran en letras.

Se detectaron niveles de transcrito para todas las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ en *M. circinelloides* durante el dimorfismo en al menos un estadio morfológico. Para las tres subunidades $G\beta$ y las tres subunidades $G\gamma$ se determinó que tienen niveles de transcrito acumulados diferencialmente, no fue registrado algún gen que no tuviera diferencias estadísticamente significativas durante las condiciones probadas. Los genes que mostraron mayores niveles de transcrito durante el proceso dimórfico en *M. circinelloides* respecto a los demás genes que codifican para subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ fueron *mcgpb1*, *mcgpb2* y *mcgpg2*, respecto a la media de los demás genes. Por su parte *mcgpb3* y *mcgpg3* mostraron niveles intermedios de transcrito, y *mcgpg1* niveles muy bajos respecto al resto de los genes. Para el gen *mcgpg1* los niveles de transcrito fueron detectados solamente en el estadio levaduriforme y no en esporas ni en micelio, aunque dichos valores son muy bajos (5 o 6 órdenes de magnitud menores que los demás genes).

El gen *mcgpb1* presenta mayores niveles de transcrito en micelio respecto a los estadios de esporas y crecimiento levaduriforme (aproximadamente el triple). El gen que codifica para la subunidad *mcgpb2* es el que presenta los mayores niveles de transcrito durante el dimorfismo.

A continuación se muestran los patrones de niveles de transcrito de las subunidades de los genes que codifican para subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ en *M. circinelloides* durante los crecimientos micelial y levaduriforme (**Tabla 17 y Tabla 18**) y las transiciones morfológicas micelio-levadura (**Tabla 19**) y levadura-micelio (**Tabla 20**). Estos valores están basados en las Figuras 27 y 28.

Los cambios en los niveles de expresión, están basados en el criterio numérico que indica que los cambios de expresión al doble o a la mitad de los niveles de expresión respecto a un estadio en particular, indicaría inducción o represión, respectivamente (Schena y col., 1996; Ko y col., 2002).

Tabla 17. Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* durante crecimiento micelial respecto a esporas en medio YPG..

Crecimiento	Subunidades	Durante crecimiento micelial respecto a esporas				
		SE INDUCE	SE REPRIME	FLUCTUA	CONSTANTE	NO SE EXPRESA
Micelial	G α	<i>mcgpa3*</i>	<i>mcgpa2*</i> <i>mcgpa8*</i> <i>mcgpa9***</i> <i>mcgpa10***</i> <i>mcgpa11*</i> <i>mcgpa12***</i>	<i>mcgpa4**</i> <i>mcgpa5**</i>	<i>mcgpa1*</i> <i>mcgpa6**</i> <i>mcgpa7***</i>	
	G β	<i>mcgpb1</i> <i>mcgpb3</i>			<i>mcgpb2</i>	
	G γ	<i>mcgpg3</i>		<i>mcgpg2</i>		<i>mcgpg1</i>

Se indican en asteriscos el grupo de clasificación de acuerdo a Bölker (1998) de subunidades G α al que pertenecen (*-I; **-II y ***-III).

Tabla 18. Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* crecimiento levaduriforme respecto a esporas en medio YPG.

Crecimiento	Subunidades	Durante crecimiento levaduriforme respecto a esporas				
		SE INDUCEN	SE REPRIMEN	FLUCTUAN	CONSTANTES	NO SE EXPRESAN
Levaduriforme	G α	<i>mcgpa3*</i> <i>mcgpa4**</i>	<i>mcgpa2*</i> <i>mcgpa5**</i> <i>mcgpa8*</i> <i>mcgpa9***</i> <i>mcgpa10***</i> <i>mcgpa11*</i>	<i>mcgpa1*</i> <i>mcgpa6**</i> <i>mcgpa7***</i> <i>mcgpa12***</i>		
	G β	<i>mcgpb1</i> <i>mcgpb3</i>		<i>mcgpb1</i> <i>mcgpb2</i>		
	G γ	<i>mcgpg1</i> <i>mcgpg3</i>		<i>mcgpg2</i>		

Se indican en asteriscos el grupo de clasificación de acuerdo a Bölker (1998) de subunidades G α al que pertenecen (*-I; **-II y ***-III).

Comparando los niveles de transcrito de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* durante crecimiento micelial (6, 12 y 24h) respecto a sus niveles de transcrito durante el estadio de esporas, se pueden identificar 5 patrones. 1) Genes cuyos niveles de transcrito se indujeron durante este crecimiento: *mcgpa3*, *mcgpb1*, *mcgpb3* y *mcgpg3*. 2) Genes cuyos niveles de transcrito se reprimieron durante este crecimiento: *mcgpa2*, *mcgpa8*, *mcgpa9*, *mcgpa10*, *mcgpa11* y *mcgpa12*. 3) Genes cuyos niveles de transcrito fluctuaron, es decir en algunas ocasiones se reprimieron y en otras se indujeron, durante este crecimiento: *mcgpa4*, *mcgpa5*, y *mcgpg2*. 4) Genes cuyos niveles de transcrito permanecieron constantes durante este crecimiento: *mcgpa1*, *mcgpa6*, *mcgpa7* y *mcgpb2*. 5) Finalmente, *mcgpg1* fue el único gen para el que no fueron detectados niveles de transcrito durante el crecimiento micelial (**Tabla 17**). Conservando el mismo enfoque, durante crecimiento levaduriforme (6, 12 y 24h) se identificaron genes cuyos niveles de transcrito se indujeron durante este crecimiento: *mcgpa3*, *mcgpa4*, *mcgpb1*, *mcgpb3*, *mcgpg1* y *mcgpg3*. Genes cuyos niveles de transcrito se reprimieron durante este crecimiento: *mcgpa2*, *mcgpa5*, *mcgpa8*, *mcgpa9*, *mcgpa10* y *mcgpa11*. Genes cuyos niveles de transcrito fluctuaron, es decir en algunas ocasiones se reprimen y en otras se inducen, durante este crecimiento: *mcgpa1*, *mcgpa6*, *mcgpa7* y *mcgpa12*. No hubo genes cuyos niveles de transcrito permanecieran constantes ni genes que no se expresaran durante el crecimiento levaduriforme (**Tabla 18**). Para el caso de la transición morfológica miceliolevadura respecto a micelio (6h) se detectaron genes cuyos niveles de transcrito se indujeron: *mcgpa4*, *mcgpb3*, *mcgpg1*, *mcgpg2* y *mcgpg3*; genes que se reprimieron: *mcgpa1*, *mcgpa2*, *mcgpa5*, *mcgpa6*, *mcgpa7*, *mcgpa8*, *mcgpa10* y *mcgpa11*; genes cuyos niveles de transcrito permanecieron constantes: *mcgpa3*, *mcgpa9*, *mcgpa12*, *mcgpb1* y *mcgpb2* (**Tabla 19**). En la transición morfológica levadura-micelio respecto a levadura (12h) se detectaron genes cuyos niveles de transcrito se indujeron: *mcgpg3*; genes que se reprimieron: *mcgpa1*, *mcgpa2*, *mcgpa3*, *mcgpa4*, *mcgpa5*, *mcgpa7*, *mcgpa8*, *mcgpa9*, *mcgpa10*, *mcgpa11*, *mcgpa12*, *mcgpb2* y *mcgpg1*; genes cuyos niveles de transcrito permanecieron constantes: *mcgpa6*, *mcgpb1*, *mcgpb3* y *mcgpg2* (**Tabla 20**).

Tabla 19. Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* durante la transición micelio-levadura en medio YPG.

Subunidades	Transición Mic(5h)-Lev(3h) respecto a Micelio (6h)		
	SE INDUCE	SE REPRIME	CONSTANTE
G α	<i>mcgpa4</i> **	<i>mcgpa1</i> * <i>mcgpa2</i> * <i>mcgpa5</i> ** <i>mcgpa6</i> ** <i>mcgpa7</i> *** <i>mcgpa8</i> * <i>mcgpa10</i> *** <i>mcgpa11</i> *	<i>mcgpa3</i> * <i>mcgpa9</i> *** <i>mcgpa12</i> ***
G β	<i>mcgpb3</i>		<i>mcgpb1</i> <i>mcgpb2</i>
G γ	<i>mcgpg1</i> <i>mcgpg2</i> <i>mcgpg3</i>		

Se indican en asteriscos el grupo de clasificación de acuerdo a Bölker (1998) de subunidades G α al que pertenecen (*-I; **-II y ***-III).

Tabla 20. Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* durante la transición levadura - micelio en medio YPG.

Subunidades	Transición Lev(10h)-Mic(3h) respecto a Levadura (12h)		
	SE INDUCE	SE REPRIME	CONSTANTE
G α		<i>mcgpa1</i> * <i>mcgpa2</i> * <i>mcgpa3</i> * <i>mcgpa4</i> ** <i>mcgpa5</i> ** <i>mcgpa7</i> *** <i>mcgpa8</i> * <i>mcgpa9</i> *** <i>mcgpa10</i> *** <i>mcgpa11</i> * <i>mcgpa12</i> ***	<i>mcgpa6</i> **
G β		<i>mcgpb2</i>	<i>mcgpb1</i> <i>mcgpb3</i>
G γ	<i>mcgpg3</i>	<i>mcgpg1</i>	<i>mcgpg2</i>

Se indican en asteriscos el grupo de clasificación de acuerdo a Bölker (1998) de subunidades G α al que pertenecen (*-I; **-II y ***-III).

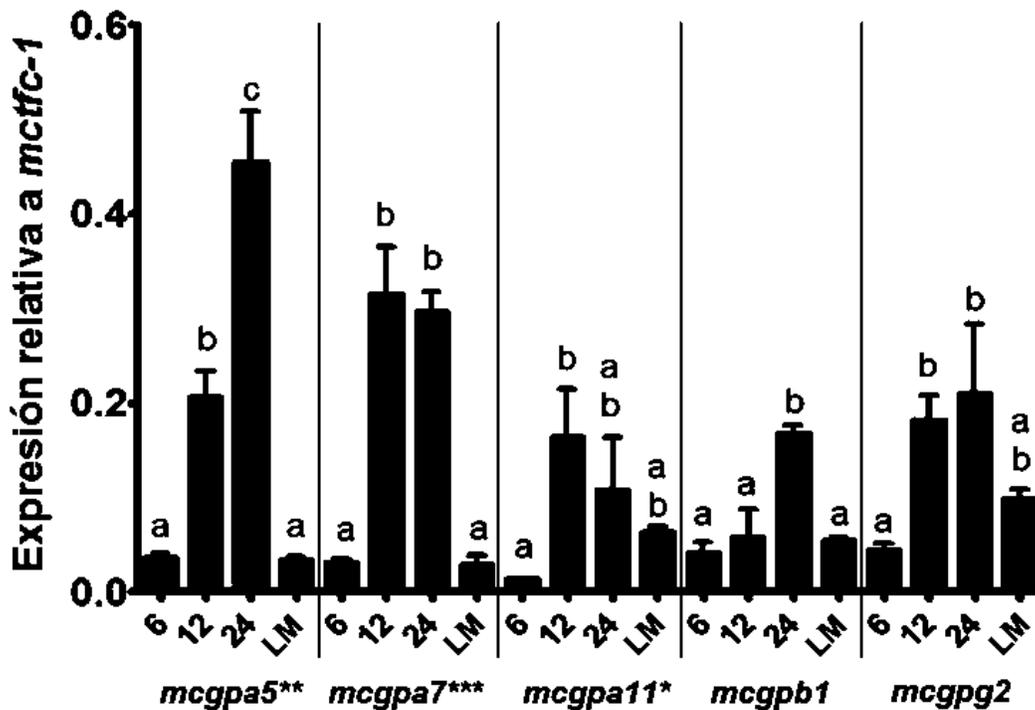


Figura 29. Patrones similares de niveles de transcritos para genes que codifican subunidades G α , G β y G γ durante el crecimiento levaduriforme en *M. circinelloides*. Se muestran los niveles de transcritos relativos a *mctfc-1* de los genes *mcpa5*, *mcpa7*, *mcpa11*, *mcpb1* y *mcpbg2* durante el crecimiento levaduriforme en *M. circinelloides*. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes para crecimientos levaduriformes de 6, 12 y 24 horas, y la transición levadura(10h)-micelio(3h), representados por 6, 12, 24 y LM respectivamente. Las barras representan el error estándar. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, Fisher $p < 0.05$).

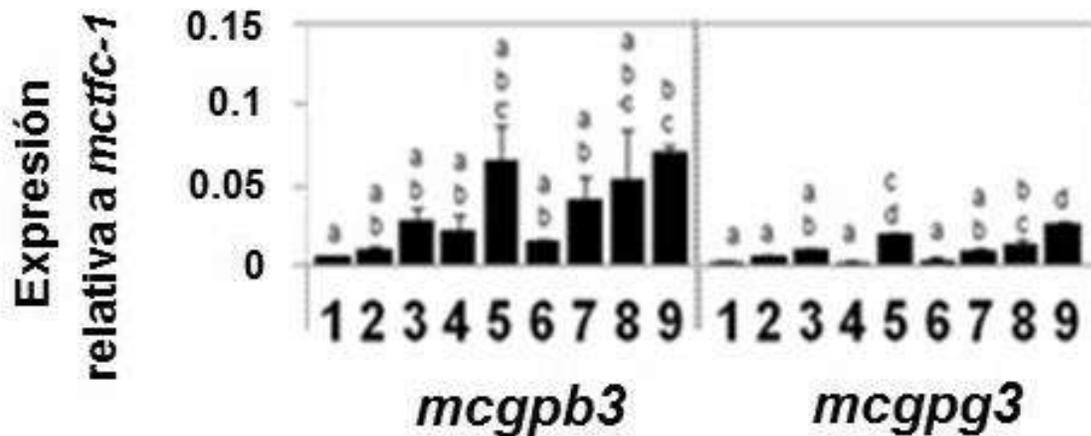


Figura 30., Patrones de niveles de transcrito similares para genes que codifican subunidades G β y G γ durante el dimorfismo en *M. circinelloides*. Se muestran los niveles de transcrito relativos a *mctfc -1* de los genes *mcgpb3* y *mcgpg3* durante el dimorfismo en *M. circinelloides*. Los estadios morfológicos estudiados fueron, 1: esporas; 2, 3, 4: crecimiento aeróbico (6, 12 y 24 horas), 5: transición micelio-levadura; 6, 7, 8: crecimiento autoanaeróbico (6, 12 y 24 horas); 9: transición levadura-micelio. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas (Fisher, $p < 0.05$) se muestran en letras.

8.7 Expresión de los genes que codifican subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* durante la respuesta a nutrientes

Se analizó la expresión de los genes que codifican subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* durante el crecimiento en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. A crecimientos aeróbico y anaeróbico de 24h se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real en donde se registraron los valores de Cq correspondientes a las diferentes subunidades G α (*mcgpa1-mcgpa12*), G β (*mcgpb1-mcgpb3*), y G γ (*mcgpg1-mcgpg3*). Las fuentes de carbono evaluadas incluyeron glucosa como fuente fermentable o glicerol como fuente no fermentable. Para el caso de la fuente de nitrógeno se evaluó peptona de gelatina como fuente orgánica o (NH₄)₂SO₄ como fuente inorgánica. Se evaluaron tres

medios mínimos: A (glucosa y peptona de gelatina), B (glucosa y sulfato de amonio), C (glicerol y peptona de gelatina).

Posteriormente se compararon los diferentes Cq mediante la fórmula del Delta-Ct (Livak y Schmittgen, 2001) con corrección de eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001), empleando *mctfc-1* como normalizador.

8.7.1 Expresión de las subunidades Gα de *M. circinelloides* durante respuesta a fuentes de carbono y nitrógeno

Siguiendo la misma estrategia matemática que se empleó en el dimorfismo, fueron detectados niveles de transcrito para todas los genes que codifican las subunidades Gα (**Figura 31**) en *M. circinelloides* durante la respuesta a los distintos nutrientes. Existen genes como *mcgpa1*, *mcgpa2*, *mcgpa5*, *mcgpa8*, *mcgpa9*, *mcgpa10* que presentan bajos niveles de transcrito durante todos los crecimientos (10 veces menores respecto a los niveles medios de expresión de los demás genes). A diferencia de *mcgpa3*, *mcgpa11* y *mcgpa12* que presentan niveles altos en prácticamente todas las condiciones (5-10 veces la expresión media de los demás genes). Presentaron niveles medios de transcritos las subunidades *mcgpa4*, *mcgpa6* y *mcgpa7*, El gen *mcgpa6* modula sus niveles de transcrito en función de la fuente de carbono, puesto que es el único gen cuyos niveles de transcrito fueron mayores en crecimiento en glicerol respecto a glucosa en crecimiento levaduriforme. Respecto a la fuente de nitrógeno, en crecimiento levaduriforme los genes *mcgpa3*, *mcgpa11* y *mcgpa12* presentan mayores niveles de transcrito con sulfato de amonio respecto a peptona de gelatina (**Figura 31**).

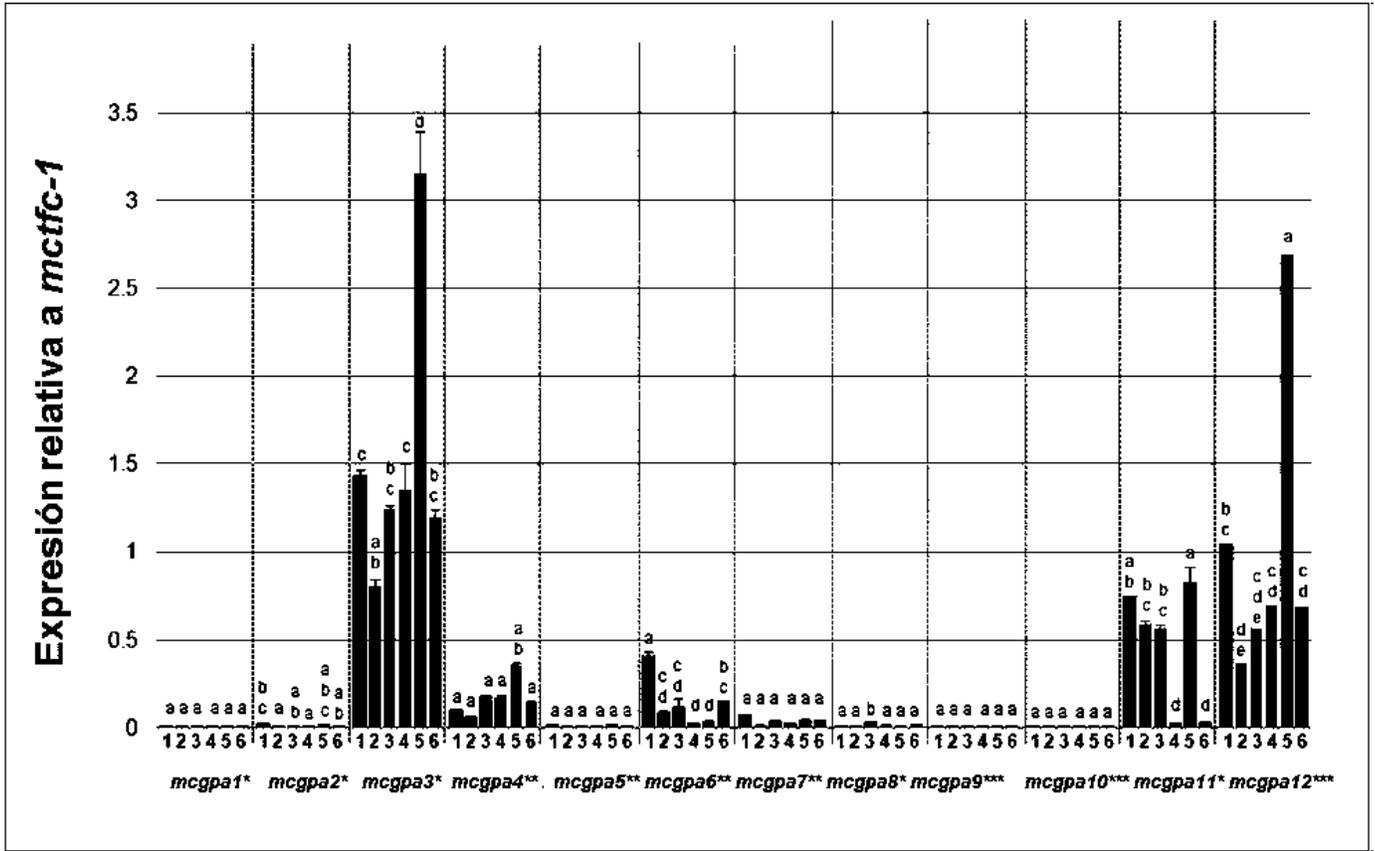


Figura 31. Niveles de transcrito de las subunidades G α durante la respuesta a nutrientes en *M. circinelloides*. Se realizó la comparación de niveles de transcrito entre las subunidades G α (*mcpa1-mcpa12*) y el gen normalizador *mctfc-1* durante la respuesta a nutrientes, mediante la fórmula Delta-Ct (Livak y Schmittgen, 2001) con corrección de eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001). Se evaluaron tres medios mínimos: A (glucosa y peptona de gelatina), B (glucosa y sulfato de amonio), C (glicerol y peptona de gelatina). Los puntos 1, 2, 3 representan crecimiento aeróbico de 24h en los medios A, B y C respectivamente. Los puntos 4, 5, 6 representan crecimiento autoaeróbico de 24h en los medios A, B y C respectivamente. Se indican en asteriscos el grupo de la clasificación de subunidades G α al que pertenecen. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Fisher, $p < 0.05$) se muestran en letras.

8.7.2 Expresión de las subunidades G β y G γ *M. circinelloides* durante la respuesta a fuentes de carbono y nitrógeno

Se realizó la comparación de niveles de transcrito entre las subunidades G β (*mcgpb1-mcgpb3*) y G γ (*mcgpg1-mcgpg3*) y el gen normalizador *mctfc-1* durante la respuesta a nutrientes, mediante la fórmula Delta-Ct (Livak y Schmittgen, 2001) con corrección de eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001) (Figura 32).

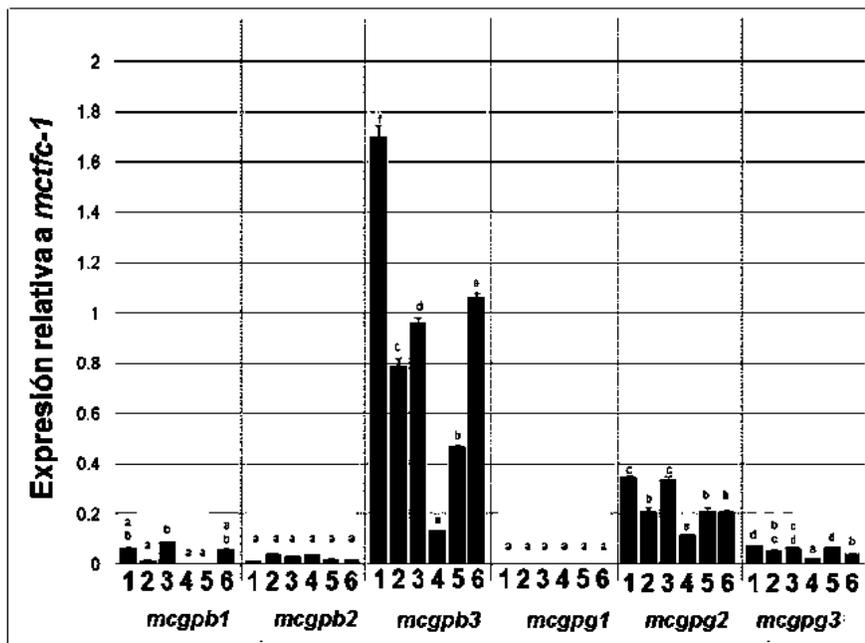


Figura 32. Niveles de transcrito de las subunidades G β y G γ durante la respuesta a nutrientes en *M. circinelloides*. Se realizó la comparación de niveles de transcrito entre las subunidades G β (*mcgpb1-mcgpb3*) y G γ (*mcgpg1-mcgpg3*) respecto al gen normalizador *mctfc-1* durante la respuesta a nutrientes, mediante la fórmula Delta-Ct (Livak y Schmittgen, 2001) con corrección de eficiencias de amplificación (Pfaffl, 2001). Se evaluaron tres medios mínimos: A (glucosa y peptona de gelatina), B (glucosa y sulfato de amonio), C (glicerol y peptona de gelatina). Los puntos 1, 2, 3 representan crecimiento aeróbico de 24h en los medios A, B y C respectivamente. Los puntos 4, 5, 6 representan crecimiento autoaeróbico de 24h en los medios A, B y C respectivamente. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. Las barras corresponden al error estándar. las diferencias estadísticamente significativas (Fisher, $p < 0.05$) se muestran en letras.

Fueron detectados niveles de transcrito para todas las subunidades G β y G γ en *M. circinelloides* durante la respuesta a nutrientes, siendo los niveles de *mcgpg1* muy bajos en todas las condiciones, respecto a los demás genes *mcgpg*. Existen genes como *mcgpb1*, *mcgpb2* y *mcgpg1* que presentan bajos niveles de transcrito durante todos los crecimientos (alrededor de 5 veces menores en relación a los demás genes). A diferencia de *mcgpb3* presenta niveles altos respecto a los demás genes en todas las condiciones evaluadas (alrededor de 4 veces mayor respecto a los demás genes). Presentaron niveles medios de transcrito los genes *mcgpg2* y *mcgpg3*.

Los niveles de transcrito de los genes *mcgpb3* y *mcgpg2* son mayores en glicerol respecto a glucosa durante el crecimiento levaduriforme. Respecto a la fuente de nitrógeno, en crecimiento levaduriforme *mcgpb3* y *mcgpg3* presentan mayores niveles de transcrito con sulfato de amonio respecto a peptona de gelatina (más del doble).

A continuación se muestran los patrones de niveles de transcrito de las subunidades de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* durante el crecimiento micelial (**Tabla 21**) y levaduriforme (**Tabla 22**) en medios mínimos. Se volvió a emplear el mismo criterio numérico que fue indicado en las Tabla 18-20 para indicar la inducción o represión de los transcritos evaluados.

Se identificaron los siguientes patrones de niveles de transcrito en crecimiento micelial de 24h: en crecimiento con fuente inorgánica de nitrógeno respecto a nitrógeno orgánico se indujeron: *mcgpa10* y *mcgpb2*; se reprimieron: *mcgpa1*, *mcgpa2*, *mcgpa5*, *mcgpa6*, *mcgpa7*, *mcgpa11*, *mcgpa12*, *mcgpb1*, *mcgpb3* y *mcgpg1*; mantuvieron niveles constantes de transcritos: *mcgpa3*, *mcgpa4*, *mcgpa8*, *mcgpa9*, *mcgpg2* y *mcgpg3*. En crecimiento con fuente no fermentable de carbono respecto a fuente de carbono fermentable se indujeron: *mcgpa8*, *mcgpa10* y *mcgpb2*; se reprimieron: *mcgpa1*, *mcgpa2*, *mcgpa6*, y *mcgpg1*;

mantuvieron niveles constantes de transcritos: *mcgpa3*, *mcgpa4*, *mcgpa5*, *mcgpa7*, *mcgpa11*, *mcgpa12*, *mcgpb1*, *mcgpb3*, *mcgpg2* y *mcgpg3* (Tabla 21)

Se identificaron los siguientes patrones en crecimiento levaduriforme de 24h: en crecimiento con fuente inorgánica de nitrógeno respecto a nitrógeno orgánico: 1) se indujeron: *mcgpa1*, *mcgpa2*, *mcgpa3*, *mcgpa4*, *mcgpa9*, *mcgpa11*, *mcgpa12*, *mcgpb3* y *mcgpb3*; 2) se reprimieron: *mcgpa8*; 3) mantuvieron niveles constantes de transcritos: *mcgpa5*, *mcgpa6*, *mcgpa7*, *mcgpa10*, *mcgpb1*, *mcgpb2*, *mcgpg1* y *mcgpg2*.

En crecimiento con fuente de carbono no fermentable respecto a fuente de carbono fermentable no se indujeron algún gen; se reprimieron: *mcgpa1*, *mcgpa2*, *mcgpb1*, y *mcgpb3*; mantuvieron niveles constantes de transcritos: *mcgpa3*, *mcgpa4*, *mcgpa5*, *mcgpa6*, *mcgpa7*, *mcgpa8*, *mcgpa9*, *mcgpb2*, *mcgpg1*, *mcgpg2* y *mcgpg3* (Tabla 22)

Tabla 21. Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* durante crecimiento micelial en medios mínimos.

Subunidades	Crecimiento en (NH ₄) ₂ SO ₄ respecto a fuente de nitrógeno orgánico			Crecimiento en glicerol respecto a glucosa		
	Se induce	Se reprime	Constante	Se induce	Se reprime	Constante
Gα	<i>mcgpa10</i> ***	<i>mcgpa1</i> * <i>mcgpa2</i> * <i>mcgpa5</i> ** <i>mcgpa6</i> ** <i>mcgpa7</i> *** <i>mcgpa11</i> * <i>mcgpa12</i> ***	<i>mcgpa3</i> * <i>mcgpa4</i> ** <i>mcgpa8</i> * <i>mcgpa9</i> ***	<i>mcgpa8</i> * <i>mcgpa10</i> ***	<i>mcgpa1</i> * <i>mcgpa2</i> * <i>mcgpa6</i> **	<i>mcgpa3</i> * <i>mcgpa4</i> ** <i>mcgpa5</i> ** <i>mcgpa7</i> *** <i>mcgpa11</i> * <i>mcgpa12</i> ***
Gβ	<i>mcgpb2</i>	<i>mcgpb1</i> <i>mcgpb3</i>		<i>mcgpb2</i>		<i>mcgpb1</i> <i>mcgpb3</i>
Gγ		<i>mcgpg1</i>	<i>mcgpg2</i> <i>mcgpg3</i>		<i>mcgpg1</i>	<i>mcgpg2</i> <i>mcgpg3</i>

Se indican en asteriscos el grupo de clasificación de acuerdo a Bölker (1998) de subunidades G α al que pertenecen (*-I; **-II y ***-III).

Tabla 22. Patrones de expresión de los genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* durante crecimiento levaduriforme en medios mínimos.

Subunidades	Crecimiento en (NH ₄) ₂ SO ₄ respecto a fuente de nitrógeno orgánico			Crecimiento en glicerol respecto a glucosa		
	Se induce	Se reprime	Constante	Se induce	Se reprime	Constante
Gα	<i>mcgpa1*</i> <i>mcgpa2*</i> <i>mcgpa3*</i> <i>mcgpa4**</i> <i>mcgpa9***</i> <i>mcgpa11*</i> <i>mcgpa12***</i>	<i>mcgpa8*</i>	<i>mcgpa5**</i> <i>mcgpa6**</i> <i>mcgpa7***</i> <i>mcgpa10***</i>		<i>mcgpa1*</i> <i>mcgpa2*</i>	<i>mcgpa3*</i> <i>mcgpa4**</i> <i>mcgpa5**</i> <i>mcgpa6**</i> <i>mcgpa7***</i> <i>mcgpa8*</i> <i>mcgpa9***</i>
Gβ	<i>mcgpb3</i>		<i>mcgpb1</i> <i>mcgpb2</i>		<i>mcgpb1</i> <i>mcgpb3</i>	<i>mcgpb2</i>
Gγ	<i>mcgpg3</i>		<i>mcgpg1</i> <i>mcgpg2</i>			<i>mcgpg1</i> <i>mcgpg2</i> <i>mcgpg3</i>

Se indican en asteriscos el grupo de clasificación de acuerdo a Bölker (1998) de subunidades G α al que pertenecen (*-I; **-II y ***-III).

En función a los patrones y niveles y de transcrito, se sugiere que las subunidades *mcgpa3*, *mcgpb3* y *mcgpg2* podrían formar un dímero durante el crecimiento micelial de 24h en el crecimiento en los medios mínimos evaluados (**Figura 33**). Para el caso del crecimiento levaduriforme en estas condiciones no se encuentra algún probable complejo heterotrimérico ni dimérico, basándose en los niveles y patrones de expresión

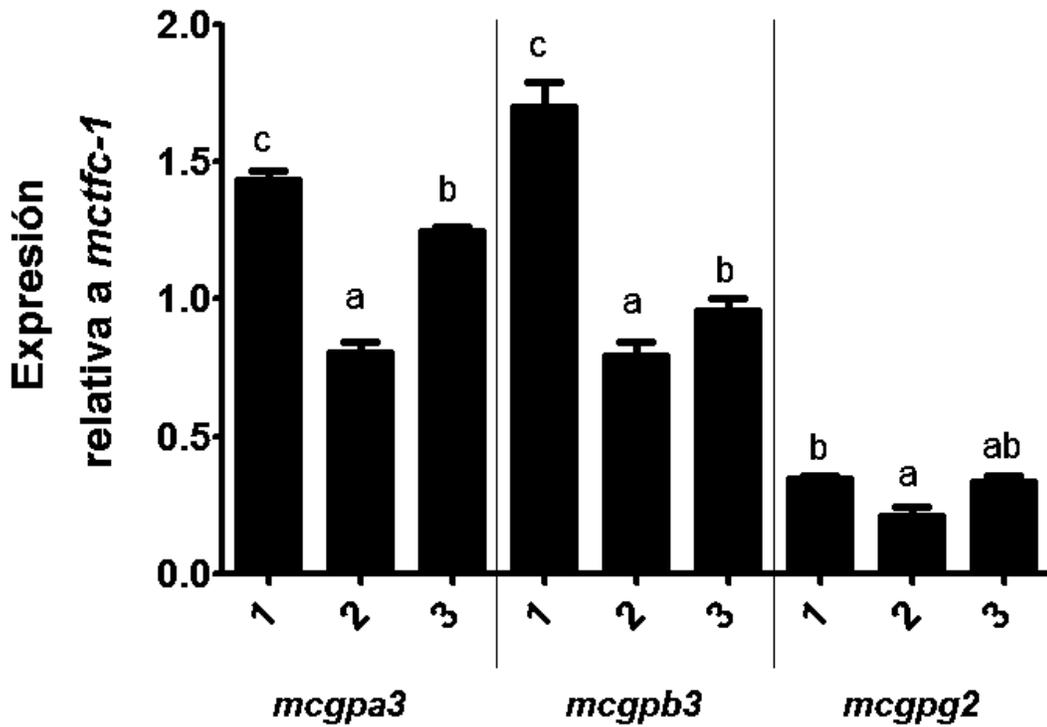


Figura 33. Patrones similares de niveles de transcrito para genes que codifican subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ durante el crecimiento micelial de *M. circinelloides* en medios mínimos. Se muestran los niveles de transcrito relativos a *mctfc-1* de los genes *mcgpa3*, *mcgpb3* y *mcgpg2*, *mcgpb1* y *mcgpg2* durante el crecimiento micelial en *M. circinelloides* en medios mínimos. Se evaluaron tres medios mínimos: A (glucosa y peptona de gelatina), B (glucosa y sulfato de amonio), C (glicerol y peptona de gelatina). Los puntos 1, 2, 3 representan crecimiento aeróbico de 24h en los medios A, B y C respectivamente. Las barras representan el error estándar. Se muestran diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, Fisher $p < 0.05$).

9. DISCUSIÓN

Se comprobó que las secuencias identificadas en *M. circinelloides* son muy probablemente subunidades G α , G β y G γ , debido a los porcentajes de identidad con subunidades ya caracterizadas. Al igual, que la presencia de los dominios conservados encontrados en cada subunidad, además de la similitud con las estructuras cristalizadas ya conocidas de estas subunidades en otros organismos (Slep y col., 2008; Wall y col., 1995).

Descartando a la subunidad McGpb4, ya que presentó bajos porcentajes de identidad y carecía de la hélice alfa del extremo amino terminal necesaria para la interacción con la subunidad G γ (Garritsen y col., 1993), y tampoco presentó el residuo W¹⁰⁵ requerido para la interacción con la subunidad G α (Whiteway y col., 1994). Este gen codifica para una proteína que presenta el dominio Kelch que estructuralmente es similar a las subunidades G β , sin embargo al no presentar los demás dominios fue descartada en el análisis posterior. Además, la subunidad McGpb4 comparte 58.4% de identidad con el factor de transcripción Tup1 de *C. albicans*, el cual está implicado en la regulación negativa del crecimiento filamentoso en respuesta a farnesol (Kebaara y col., 2008). Por lo que en realidad McGpb4 pudiera cumplir una función similar en *M. circinelloides*.

El repertorio de subunidades de proteínas G heterotriméricas que identificamos en este trabajo en el zigomiceto *M. circinelloides* es el mayor al de cualquier hongo reportado hasta la fecha. Esto no se debe al tamaño del genoma puesto que modelos de estudio como *N. crassa*, *A. nidulans* y *T. reesei* presentan tamaños de genomas y número de genes similares a *M. circinelloides*. Sin embargo, tienen un número de subunidades de proteínas G heterotriméricas más reducido. Una posible explicación de la existencia de tantas subunidades se debe a la amplia capacidad adaptativa que presenta este organismo: dimorfismo y transiciones morfológicas (Lübbenhüssen y col., 2003), síntesis de carotenos en respuesta a luz (Murcia-Flores y col., 2007), patogénesis oportunista en humanos (Bastidas y col., 2012), capacidad de colonizar frutos (Nishijima y col., 2011) y crecer en suelos contaminados con hidrocarburos (Durón-Castellanos, y col., 2005). Se ha

comprobado, en otros hongos, la participación de estas proteínas G heterotrimericas en eventos biológicos como la diferenciación morfológica (Sánchez-Martínez y Pérez-Martín, 2002), respuesta a luz (Schmoll y col., 2009), patogénesis (Mukherjee y col., 2004; Tzima y col., 2012), y respuesta a la detección de nutrientes (Whelton y Hoffman, 2000), lo cual sugiere que las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ identificadas en *M. circinelloides* pudieran participar en estos eventos.

De igual manera, otra probable explicación del número elevado de subunidades de proteínas G heterotriméricas en *M. circinelloides* es que varias de ellas tengan funciones redundantes, como ha sido demostrado en otros organismos. Por ejemplo, Gna-1 y Gna2 codifican dos subunidades $G\alpha$ de *N. crassa*, ambas están involucradas en la regulación positiva de la reproducción (Baasiri y col., 1997). Otro ejemplo, en *C. Gpg1* y *Gpg2* codifican para dos subunidades $G\gamma$ las cuales regulan positivamente la respuesta a feromonas (Li y col., 2007).

El número elevado de subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ parecería un fenómeno intrínseco de los zigomicetos, ya que los otros zigomicetos cuyos genomas ya han sido secuenciados como *Phycomyces blakesleeanus* contiene 10 $G\alpha$, 4 $G\beta$ y 4 $G\gamma$; mientras que *Rhizopus oryzae*: 9 $G\alpha$, 4 $G\beta$ y 5 $G\gamma$, lo cual representa números elevados de dichos genes, respecto a lo reportado en hongos.

Los chytridiomicetos y los zigomicetos son los linajes más antiguos de los hongos (Tanabe y col., 2005). Para el caso de los chytridiomicetos el único organismo del que se encontraron secuencias disponibles fue *Batrachochytrium dendrobatidis*, cuyo genoma ya se encuentra secuenciado y presentó nueve subunidades $G\alpha$, superior al número de subunidades en ascomicetos y basidiomicetos, siendo este número similar al de los zigomicetos. En cuanto a las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$, *B. dendrobatidis* presenta solamente una de cada una

El motivo por el cual el zigomiceto patógeno *R. oryzae* tiene numerosos genes con funciones redundantes fue abordado por Ma y col., 2009. En dicho reporte se detalla la identificación de elementos en el genoma de *R. oryzae* que sostienen

una duplicación genómica completa. Como elementos transponibles, y la presencia de elementos duplicados los cuales codifican los complejos proteínicos asociados a la cadena respiratoria de transporte de electrones, el sistema de la ATPasa vacuolar, y el complejo ubiquitina-proteasoma. Dicha duplicación también condujo a la expansión de las familias relacionadas con crecimiento celular, transducción de señales, y virulencia. Para el caso concreto de transducción de señales; el genoma de *R. oryzae* codifica para más del doble de GTPasas que *N. crassa*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *U. maydis* (Ma y col., 2009). Esto correlaciona con el número identificado de subunidades $G\alpha$ para *R. oryzae* que es mayor al de dichos hongos realizado en este trabajo. Filogenéticamente *M. circinelloides* siendo también un zigomiceto, tiene mayor cercanía a *R. oryzae* que a los demás hongos pertenecientes a otros Phyla, es posible que nuestro modelo de estudio también haya presentado dicho evento que condujo a una duplicación, aunque es necesario un extenso análisis genómico para comprobar esta hipótesis.

El análisis filogenético de las subunidades $G\alpha$ fúngicas realizado en este trabajo es el que más subunidades ha incluido hasta la fecha, y los resultados son consistentes con la clasificación que ha sido propuesta para estas subunidades. Bölker en 1998 quien propuso que las subunidades $G\alpha$ fúngicas se dividen en cuatro grandes grupos en función a su similitud con las subunidades $G\alpha$ de mamíferos (I-IV). El grupo I fúngico guarda semejanza las subunidades $G\alpha_i$ (inhibitorias de la adelinato ciclasa), el grupo III es análogo a las subunidades $G\alpha_s$ (estimuladores de la adelinato ciclasa). El grupo II y el grupo IV no guardan relación con subunidades $G\alpha$ de mamíferos (Li y col., 2007).

Dos subunidades $G\alpha$ de *M. circinelloides* (McGpa1 y McGpa3) ya habían sido clasificadas filogenéticamente en el grupo I (Meza-Carmen y col., 2006). Además, se han realizado otros análisis filogenéticos de subunidades $G\alpha$ fúngicas (Bölker, 1998; Mukherjee y col., 2004; Schmoll, 2008; Meza-Carmen y col., 2006) y los resultados obtenidos reproducen los datos ya reportados, lo que confirma la certeza de nuestro análisis filogenético.

Algunas subunidades $G\alpha$ que han sido asignadas a algún grupo. Grupo I: Mga1 de *M. ruber* (Li y col., 2010), Gna1 de *T. reesei* (Schmoll, 2008), Gna-1 de *N. crassa* (Turner y Borkovich, 1993), Gpa1 de *U. maydis* (Regenfelder y col., 1997), TgaA de *T. virens* (Mukherjee y col., 2004). Grupo II: Gpa1 de *S. pombe* (Landry y col., 2000), Gna2 de *T. reesei* (Schmoll, 2008), GanA de *A. nidulans* (Mukherjee y col., 2004). Grupo III: Gpa1 de *C. neoformans* (Li y col., 2007), Gna3 de *T. reesei* (Schmoll, 2008), Gba3 de *G. zeae* (Li y col., 2007), Gpa2 de *S. cerevisiae* (Bölker, 1998). Grupo IV: Gpa4 de *U. maydis* (Li y col., 2007)

El análisis filogenético demostró que de los cuatro grupos, los grupos I, II y III son los más abundantes (**Tabla 9**), lo que concuerda con lo reportado (Li y col., 2007). Funcionalmente al menos un miembro de cada grupo ha sido caracterizado, a excepción del grupo IV (**Tabla 2**). Había sido reportada la presencia de un solo integrante del grupo IV, Gpa4 de *U. maydis* (Regenfelder y col., 1997), sin embargo este trabajo se reporta la presencia en otros basidiomicetos y en el chytridiomiceto *B. dendrobatidis* (**Tabla 9**).

Los cuatro grupos de subunidades $G\alpha$ son diversos en cuanto a los *Phyla* de hongos que los integran, esto indica que estos grupos se separaron antes de la divergencia que dió origen a los distintos *Phyla*. En función al patrón evolutivo mostrado en el árbol filogenético, se sugiere que las subunidades del grupo IV son las más antiguas, ya que son más cercanas a las secuencias de plantas que se emplearon como grupo externo.

Los zigomicetos cuentan con secuencias representadas en los grupos I, II y III (**Tabla 10**). Las secuencias correspondientes a los grupos I y III tienen más integrantes que el grupo II, lo que concuerda con lo reportado (Kays y Borkovich, 2004).

Este es el primer trabajo en donde se reportan análisis evolutivos de las secuencias $G\beta$ y $G\gamma$ fúngicas. En otros modelos biológicos, como son mamíferos se han reportado la clasificación de las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ en cinco y trece

grupos respectivamente, esto en función a la identidad que guardan entre si estas subunidades (Prasobh y Manoj, 2009)

Los resultados filogenéticos de las subunidades G β y G γ fúngicas muestran patrones evolutivos similares, es decir una separación de las subunidades es dependiente de los *Phyla*. La semejanza de los resultados de los análisis evolutivos y la dependencia funcional que presentan ambas subunidades al ser parte de un dímero, sugieren que han coevolucionado en hongos. Un ejemplo de otros genes a los cuales se les ha propuesto un evento de coevolución son las tubulinas α y β que al igual que las subunidades G β y G γ forman un heterodímero biológicamente funcional (Nielsen y col., 2010).

Los patrones evolutivos distintos de las subunidades G α y del dímero subunidades G $\beta\gamma$ puede estar dada por varios factores, entre ellos una complejidad funcional mayor en las subunidades G α que consiste en su actividad enzimática intrínseca que presenta la subunidad G α . Mientras que para las subunidades G β ni G γ no existe ninguna función enzimática asociada. La dependencia mutúa que presentan las subunidades G β y G γ para formar un complejo funcional pudiera ser la explicación de sus patrones evolutivos similares.

Una vez identificados y agrupados los distintos genes que codifican para subunidades G α , G β y G γ en *M. circinelloides* se procedió a realizar el análisis de expresión relativa, para lo cual se debe emplear un gen o conjunto de genes normalizadores como patrón de referencia, con el cual se compararán los niveles de transcrito de nuestros genes de interés. Un gen normalizador se caracteriza por tener niveles de expresión constantes durante todas las condiciones ensayadas (Teste y col., 2009). Incluso el no contar con un gen normalizador no adecuado puede conducir a errores (Teste y col., 2009).

Se realizó la evaluación de siete genes normalizadores durante el dimorfismo de *M. circinelloides*. Los genes *mcvma-1*, *mctfc-1*, *mcef-1*, *mctfb-4*, *mce1*, *mc18S* y *mc28S*, han sido reportados en la literatura como genes normalizadores en otros organismos. Tanto la eficiencia de amplificación como la estabilidad de los niveles

de transcrito fueron determinados para cada uno de los siete genes candidatos mediante RT-qPCR estos dos criterios fueron la base de la selección del gen o genes normalizadores.

Seis de los siete genes, con excepción del gen *mce1*, tuvieron eficiencias mayores a 80%, que es el valor mínimo aceptado para análisis de expresión relativa (Pestana y col., 2010; Teste y col., 2009). Cuatro de estos genes (*mcvma-1*, *mcef-1*, *mctfc-1* y *mc28S*) presentaron la menor variación de expresión durante el dimorfismo. Sin embargo, se determinó mediante análisis matemáticos, que los genes cuyos niveles de transcrito presentaron una tendencia más constante durante todas las condiciones ensayadas fueron *mctfc-1* y *mcef-1*.

Existen reportes en otros modelos de estudio, como es el caso de *S. cerevisiae* en donde el homólogo a *mctfc-1* fue validado como gen normalizador con una estabilidad por encima de genes que codifican para actina y el RNA ribosomal 18S durante el crecimiento en glucosa y galactosa (Teste y col., 2009).

La importancia de registrar los niveles de transcrito de diferentes genes en varias condiciones consiste en proponer la probable participación de ciertos genes en la respuesta a algún estímulo en particular. Este enfoque ha sido seguido en varias investigaciones que involucran subunidades de proteínas G heterotriméricas en hongos (Landry y col., 2000; Schmoll y col., 2009).

El primer fenómeno biológico que abordamos para las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ en *M. circinelloides* fue el dimorfismo. En cada uno de los distintos estadios morfológicos fueron registrados niveles de transcrito para cada uno de los genes que codifican para las subunidades en al menos una condición.

mcgpa3 es el único de los genes que codifican para subunidades $G\alpha$ cuyos niveles de transcrito habían sido determinados durante el dimorfismo. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado con anterioridad en el hecho de los niveles de transcrito son superiores en esporas respecto al crecimiento micelial de 6 h (Meza-Carmen y col., 2006).

Sin embargo resulta interesante resaltar que la expresión del gen *mcgpa11*, que codifica para una proteína perteneciente al grupo I de la clasificación de subunidades G α fúngicas, el transcrito de este gen tiene niveles más altos en esporas, mayor a 8 veces, respecto a los crecimientos micelial, levaduriforme y las transiciones morfológicas. Esto sugiere la posible participación de este gen durante la esporulación y/o la germinación, estos fenómenos asociados a la morfología de espora. Hay subunidades G α fúngicas del grupo I asociadas a la regulación de la esporulación. Por ejemplo, el producto del gen *fadA* en *A. nidulans* regula negativamente la esporulación asexual, ya que mutantes constitutivamente activas de FadA disminuyeron la producción asexual de esporas (Hicks y col., 1997). Las subunidades McGpa11 (*M. circinelloides*) y FadA (*A. nidulans*) comparten 59.8% de identidad y un 76% de similitud.

En este trabajo se encontró que el gen *mcgpa4* de *M. circinelloides* que codifica una subunidad G α del grupo II, y presenta mayores niveles de transcrito, 2 veces mayor aproximadamente, durante el crecimiento levaduriforme respecto al micelial y esporas. Lo que sugiere una probable importancia en la morfología levaduriforme. La subunidad Gpa3 de *C. neoformans* perteneciente al grupo II, es un regulador negativo de la filamentación ya que mutantes nulas del gen *gpa3* promueven constitutivamente la filamentación (Hsueh y col., 2007). Las subunidades McGpa4 (*M. circinelloides*) y Gpa3 (*C. neoformans*) comparten 45.8% de identidad y un 64% de similitud. De las doce subunidades McGpa de *M. circinelloides*, McGpa4 es la segunda secuencia con más parecido en relación a la secuencia Gpa3 de *C. neoformans*.

Se encontró en *M. circinelloides* que los genes *mcgpb3* y *mcgpg3* que codifican para subunidades G β y G γ , respectivamente, muestran patrones de niveles de transcrito similares en crecimientos micelial y levaduriforme en medio YPG (**Figura 28**). Es posible que en estas condiciones estas subunidades formen un dímero. Se ha comprobado los niveles de transcrito de las subunidades α y β que integran al heterodímero de tubulina sufren cambios similares en los epimastigotes de *T. cruzi*, los niveles de transcrito de ambos genes se redujeron en una misma

proporción durante el cambio de la fase logarítmica a la fase estacionaria y (González-Pino y col., 1999). Se encontró que en la legumbre *Pisum sativum* los genes *psga1* y *psgβ* que codifican subunidades Gα y Gβ, respectivamente, regulan positivamente sus niveles de transcrito en la presencia de calor, peróxido de hidrógeno o cloruro de sodio (Misra y col., 2007). Respecto a hongos, en el ascomiceto *N. crassa* los niveles de transcrito de *gnb-1* y *gng-1*, que codifican para subunidades Gβ y Gγ, que funcionalmente forman un dímero, comparten patrones de expresión similares durante el ciclo de vida de este organismo. (Krystofova y Borkovich, 2005).

El gen *mcgpb1* codifica para una subunidad Gβ en *M. circinelloides* presenta mayores niveles, hasta 6 veces, de transcrito en micelio que en esporas y crecimiento levaduriforme crecido en medio YPG. Se ha comprobado en otros hongos dimórficos la importancia de las subunidades Gβ para el desarrollo de la morfología micelial (**Tabla 2**), como es el caso de la subunidad Gpb1 de *Mycosphaerella graminicola*, cuando el gen es interrumpido, reduce su capacidad de generar micelio (Mehrabi y col., 2009). Las subunidades McGpb1 (*M. circinelloides*) y Gpb1 (*M. graminicola*) comparten 70.1% de identidad y un 84% de similitud. Siendo estos datos de identidad y similitud ligeramente menores (1 ó 2%) respecto a las otras subunidades McGpb de *M. circinelloides*.

En estadio levaduriforme las subunidades *mcgpa5*, *mcgpa7* y *gpa11*, presentan patrones de los niveles de transcrito similares con las subunidades *gpb1*, *gpg2* (**Figura 29**). En otros sistemas se ha demostrado la correlación de los niveles de transcrito de genes que forman complejos heterodímeros o heterotriméricos (González-Pino y col., 1999; Misra y col., 2007; Krystofova y Borkovich, 2005), por lo tanto es posible que estas subunidades sean traducidas y se asocien en esta condición de crecimiento.

Cabe resaltar que todas las subunidades Gα del grupo III (*mcgpa7*, *mcgpa9*, *mcgpa10* y *mcgpa12*) tienen niveles de transcrito más altos en la transición Micelio(5h)-Levadura(3h) que en la transición Levadura(10h)-Micelio(3h). En *Paracoccidioides brasiliensis* se reportó que los niveles de transcrito de *gpa2* (una

subunidad G α del grupo III) se incrementaron durante la transición Micelio-Levadura (Nunes y col., 2005). Pudiendo sugerir la participación de estas subunidades en esta transición en particular.

Además se evaluó un segundo fenómeno biológico el cual fue la respuesta a la presencia de distintas fuentes de carbono y nitrógeno. Lo cual incluyó crecimiento micelial y levaduriforme de 24 horas en los siguientes medios mínimos: medio A (Glucosa + Peptona de Gelatina), medio B (Glicerol + Peptona de Gelatina), y medio C (Glucosa + (NH₄)₂SO₄). Se detectaron niveles diferenciales de transcrito para todas las subunidades G α , G β , G γ respecto al gen de referencia *mctfc-1* en estas condiciones. Para el caso particular de *mcgpg1*, los niveles de transcrito registrados fueron muy bajos (5 o 6 órdenes de magnitud menores respecto a las demás subunidades G α , G β y G γ), resultado similar al fenómeno del dimorfismo evaluado previamente. Pudiendo ser que la transcripción de este gen implique la respuesta a otro estímulo como es la luz, feromonas u otro factor no contemplado en este estudio.

Para el gen *mcgpa4* de *M. circinelloides* que codifica para una subunidad G α perteneciente al grupo II, se registró una inducción ,mayor a dos veces, en los niveles de transcrito durante el crecimiento levaduriforme en medio cuya fuente de nitrógeno fue inorgánica, respecto a la peptona. De igual manera, se determinó en *C. neoformans* que *gpa3* que también codifica para una subunidad G α perteneciente al grupo II, se induce en medio limitante de nitrógeno (Hsueh y col., 2007). Las subunidades McGpa4 (*M. circinelloides*) y Gpa3 (*C. neoformans*) comparten 45.8% de identidad y un 64% de similitud. Comparando estos datos de identidad y similitud con los del resto de las subunidades, cabe resaltar que McGpa4 es la segunda secuencia con más parecido de las doce McGpa de *M. circinelloides* en relación a la secuencia Gpa3 de *C. neoformans*.

El gen *mcgpa12* de *M. circinelloides* codifica para una proteína perteneciente al grupo III de la clasificación de subunidades G α , dicho gen presenta una represión más de la mitad del nivel de transcrito en crecimiento en fuente de carbono no fermentable respecto a glucosa en crecimiento micelial de 24 horas. La subunidad

Gpa2 en *S. pombe*, también pertenece al grupo III cuya participación en el reconocimiento de glucosa en el medio ha sido reportada (Welton y Hoffman, 2000).

El gen *mcgpa8* codifica a una subunidad $G\alpha$ perteneciente al grupo I, reprimió sus niveles de transcrito más de 10 veces en crecimiento levaduriforme en medio mínimo cuya fuente de nitrógeno fue inorgánica respecto a la fuente orgánica. SSG-1 en *S. schenckii*, codifica a una subunidad del grupo I y participa en la detección de nutrientes. McGpa8 y SSG-1 comparten 61% de identidad y 76% de similitud, tratándose de la cuarta subunidad McGpa con más parecido (Pérez-Sánchez y col., 2010). La principal aportación del presente trabajo radica en la formulación de hipótesis generadas a partir de la probable participación de subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ en la respuesta que presenta *M. circinelloides* durante el proceso dimórfico o bajo el influjo de distintos nutrientes en el medio de cultivo. Se trata evidentemente de una labor con carácter descriptivo. Sin embargo, estas hipótesis pueden ser comprobadas mediante otras herramientas experimentales.

10. CONCLUSIÓN

Las subunidades G α fúngicas muestran patrones evolutivos independientes a los Phyla. Mientras que las subunidades G β y G γ presentan un evento de coevolución. Empleando al gen normalizador validado *mctfc-1*, sugiere la posible participación los patrones de niveles de transcrito de las siguientes subunidades en los diversos estadíos analizados: *mcgpa11* en esporas; *mcgpb1* en crecimiento miceliar; *mcgpa4* en crecimiento levaduriforme y transición levadura-micelio; *mcgpa10* en transición micelio-levadura; *mcgpa8* en la respuesta a fuente de nitrógeno inorgánico; *mcgpb3* en la respuesta a fuente de carbono no fermentable. En función a los patrones y niveles de transcritos, es probable que las subunidades *mcgpa5*, *mcgpa7* ó *mcgpa11* formen un complejo durante el crecimiento levaduriforme con las subunidades *mcgpb1* y *mcgpg2*. De igual forma, es probable que las subunidades *mcgpb3* y *mcgpg3* formen un dímero durante el proceso dimórfico en medio YPG y las subunidades *mcgpa3*, *mcgpb3* y *mcgpg2* durante el crecimiento micelial en medios mínimos.

11. PERSPECTIVAS

Enfoque Bioquímico

Comprobar que las subunidades *mcgpa5*, *mcgpa7* ó *mcgpa11* forman un trímero con las subunidades *mcgpb1* y *mcgpg2* en crecimiento levaduriforme.

Enfoque Genético-Molecular

Probar la función de *mcgpa11* en esporas, *mcgpb1* en crecimiento micelial, *gpa4* en crecimiento levaduriforme en la transición micelio-levadura; para la respuesta a nutrientes ensayar a *mcgpa4* y *mcgpa12* en fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente.

12. REFERENCIAS

- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201.
- Artemeyev N.O., Rarick H.M., Mills J.S., Skiba N.P., Hamm. 1992. Sites of Interaction between Rod G-protein α -Subunit and cGMP-phosphodiesterase γ -Subunit. *The Journal of Biological Chemistry* **267(35)**: 25067-25072.
- Baasiri R.A., Lu X., Rowley P.S., Turner G.E., Borkovich K.A. 1997. Overlapping functions for two G Protein α Subunits in *Neurospora crassa*. *The Genetics Society of America* **147**: 137-145.
- Balzi E., Wang M., Leterme S., Van Dyck L., Goffeau A. 1994. PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 2206-2214.
- Baron S. 1996. Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch. United States of America. pp 1273.
- Bartnicki-Garcia, S. 1968. Control of Dimorphism in *Mucor* by Hexoses: Inhibition of Hyphal Morphogenesis. *Journal of Bacteriology*. **96**: 1586-1594.
- Bastiani C., Mendel J. 2006. Heterotrimeric G proteins in *C. elegans*, WormBook. The *C. elegans* Research Community.
- 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.
- Battaglia E., Benoit I., Van Den Brink J., Wiebenga A., Coutinho P.M., Henrissat B., De Vries R.P. 2011. Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: a highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. *BioMed Central Genomics* **12**: 38.
- Bennet J.W., Wunch K.G., Faison B.D. 2002. Use of Fungi Biodegradation. Manual of Environmental Microbiology. Second Edition. ASM Press Washington. United States of America. pp 960-971.
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. 2002. Biochemistry. Fifth Edition. W H Freeman. New York. pp 600.
- Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goeden M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277(5331)**: 1453-1462.

- Blumer J.B., Cismowski M.J., Sato M., Lanier S.M. 2005. AGS proteins: receptor-independent activators of G-protein signaling. *Trends in Pharmacological Sciences* **26(9)**: 470-476.
- Bölker M., 1998. Sex and Crime: Heterotrimeric G Proteins in Fungal Mating and Pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology* **25**: 143-156.
- 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.
- Brivanlou A.H., Darnell Jr. J.E. 2002. Signal Transduction and the Control of Gene Expression. *Science* **29(5556)**: 813-818.
- Cain C.W., Lohse M.B., Homann O.R., Sil A., Johnson A. D. 2012. A conserved Transcriptional Regulator Governs Fungal Morphology in Widely Diverged Species. *Genetics* **190**: 511-521.
- Cismowski M.J., Takesono A., Ma C., Lizano J.S., Xie X., Fuernkranz H., Lanier S.M., Duzic E. 1999. Genetic screens in yeast to identify mammalian nonreceptor modulators of G-protein signaling. *Nature Biotechnology* **17(9)**: 878-873.
- Corrochano L.M., Ruiz-Albert J. 2004. Nucleotide composition in protein-coding and non-coding DNA in the zygomycete *Phycomyces blakesleeanus*. *Mycological Research* **108(8)**: 858-863.
- David H., Ozcelik I.S., Hoffman G., Nielsen J. 2008. Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BioMed Central Genomics* **9**: 163.
- David N.E., Gee M., Andersen B. Naider F., Thorner J., Stevens R.C. 1997. Expression and Purification of the *Saccharomyces cerevisiae* α -Factor Receptor (*Ste2p*), a 7-Transmembrane-segment G Protein-coupled Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*
- De la Cruz JO, García-Soto J, Uriostegui C, Carranza L, Novoa G, Reyna G, Martínez-Cadena G, 2007. Differential expression of Rho1GTPase and Rho3GTPase during isotropic and polarized growth of *Mucor circinelloides*. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 168-176.
- Donzeau M., Bandlow W. 1999. The Yeast Trimeric Guanine Nucleotide-Binding Protein α Subunit, Gpa2p, Controls the Meiosis-Specific Kinase Ime2p Activity in Response to Nutrients *Molecular and Cellular Biology* **19(9)**: 6110-6119.
- Durón-Castellanos A., Zazueta-Novoa V., Silva-Jiménez H., Alvarado-Caudillo Y., Peña-Cabrera E., Zazueta-Sandoval R. 2005. Detection of NAD⁺ -dependent alcohol dehydrogenase activities in YR-1 strain of *Mucor circinelloides*, a potential bioremediator of petroleum contaminated soils. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **124**: 279-288.

Eckstein H., Schlobohm H. 1997. A particulate guanylate cyclase (EC 4.6.1.2) from growing yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). *Journal of Biosciences* 52(5): 373-379.

Etienne-Manneville S., Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420(6916): 629-635.

Freissmuth M., Gilman A.G. 1989. Mutations of G_{sq} Designated to Alter the Reactivity of the Protein with Bacterial Toxins. *The Journal of Biological Chemistry* 264(36): 21907-21914.

Gao C., Wang L., Milgrom E. Winston-Shen W.C. 2004. On the Mechanism of Constitutive Pdr1 Activator-mediated *PDR5* Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 279(41): 42677-42686.

Gillen K.M., Pausch M., Dohlman H.G. 1998. N-terminal domain of Gpa1 (G protein α subunit) is sufficient for plasma membrane targeting in yeast *Saccharomyces cerevisiae* 111: 3235-3244.

Henikoff S., Henikoff J.G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 10915-10919.

Hicks J.K., Yu J.H., Keller N.P., Adams T.H. 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the *FadA* G alpha protein-dependent signaling pathway. *The EMBO Journal* 16(16): 4916-4923.

Huang C., Tesmer J.J.G. 2011. Recognition in the Face of Diversity: Interactions of Heterotrimeric G proteins and G Protein-coupled Receptor (GPCR) Kinases with Activated GPCRs. *The Journal of Biological Chemistry* 286: 7715–7721.

Hsueh Y.P., Xue C., Heitman J. 2007. G protein signaling governing cell fate decisions involves opposing G α subunits in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell* 18: 3227-3249.

Ishimoto H., Takahashi K., Ueda R., Tanimura T. 2005. G-protein gamma subunit 1 is required for sugar reception in *Drosophila*. *The European Molecular Biology Organization Journal* 24: 3259-3265.

Isshiki T., Mochizuki N., Maeda T., Yamamoto M. 1992. Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a G α subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes and Development* 6: 2455-2462.

Janoo R.T., Neely L.A., Braun B.R., Whitehall S.K., Hoffman C.S. 2001. Transcriptional regulators of the *Schizosaccharomyces pombe fbp1* gene include two redundant Tup1p-like corepressors and the CCAAT binding factor activation complex. *Genetics* 157(3): 1205-1215.

Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.

Karmakar M., Ghosh B., Ray R.R. 2012. Effect of Extracellular Factors on Growth and Dimorphism of *Rhizopus oryzae* with Multiple Enzyme Synthesizing Ability. *Indian Journal of Microbiology* **52(2)**: 215-221.

Kämper J., Kahmann R., Bölker M., Ma L.J., Brefort T., Saville B.J., Banuett F., Kronstad J.W., Gold S.E., Müller O., Perlin M.H., Wösten H.A., de Vries R., Ruiz-Herrera J., Reynaga-Peña C.G., Snetselaar K., McCann M., Pérez-Martín J., Feldbrügge M., Basse C.W., Steinberg G., Ibeas J.I., Holloman W., Guzman P., Farman M., Stajich J.E., Sentandreu R., González-Prieto J.M., Kennell J.C., Molina L., Schirawski J., Mendoza-Mendoza A., Greilinger D., Münch K., Rössel N., Scherer M., Vranes M., Ladendorf O., Vincon V., Fuchs U., Sandrock B., Meng S., Ho E.C., Cahill M.J., Boyce K.J., Klose J., Klosterman S.J., Deelstra H.J., Ortiz-Castellanos L., Li W., Sanchez-Alonso P., Schreier P.H., Häuser-Hahn I., Vaupel M., Koopmann E., Friedrich G., Voss H., Schlüter T., Margolis J., Platt D., Swimmer C., Gnirke A., Chen F., Vysotskaia V., Mannhaupt G., Güldener U., Münsterkötter M., Haase D., Oesterheld M., Mewes H.W., Mauceli E.W., DeCaprio D., Wade C.M., Butler J., Young S., Jaffe D.B., Calvo S., Nusbaum C., Galagan J., Birren B.W. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444(7115)**: 97-101.

Kays A.M., Borkovich K.A. 2004. Signal transduction pathways mediated by heterotrimeric G proteins. In *The Mycota, Vol. III: Biochemistry and Molecular Biology*, ed. R Brambl, GA Marzluf, pp. 175–207.

Kays A.M., Rowley P.S., Baasiri R.A., Borkovich K.A. 2000. Regulation of Conidiation and Adenylyl Cyclase Levels by the G α Protein GNA-3 in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 7693–7705.

Kebaara B.W., Langford M.L., Navarathna D., Dumitru R., Nickerson K.W., Atkin A.L. 2008. *Candida albicans* Tup1 Is Involved in Farnesol-Mediated Inhibition of Filamentous-Growth Induction. *Eukaryotic Cell* **7(6)**: 980.

Kino T., Tiulpakov A., Ichijo T., Chheng L., Kozasa T., Chrousos G.P. 2005. G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *The Journal of Cell Biology* **169(6)**: 885-896.

Ko J., Na D.S., ee Y.H., Shin S.Y., Kim J.H., Hwang B.G., Min B.I., Park D.S. 2002. cDNA Microarray Analysis of the Differential Gene Expression in the Neuropathic Pain and Electroacupuncture Treatment Models. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **35(4)**: 420-427.

Krauss G. 2003. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. Third Edition. Wiley-WCH. Germany. pp 541.

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. *Molecular Biology and Evolution* **17(8)**: 1210-1219.

- Krystofova S., Borkovich K.A. 2005. The Heterotrimeric G-Protein Subunits GNG-1 and GNB-1 Form a G $\beta\gamma$ Dimer Required for Normal Female Fertility, Asexual Development, and G α Protein Levels in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **4(2)**: 365-378.
- Kübler E., Mösch H. U., Rupp S., Lisanti M. P. 1997. Gpa2p, a G-protein α -subunit, regulates Pseudohyphal Development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 20321-20323.
- Landry S., Pettit M. T., Apolinario E., Hoffman C.S. 2000. The Fission Yeast *git5* Gene Encodes a G β Subunit Required for Glucose-Triggered Adenylyl Cyclase Activation. *Genetics* **154**: 1463-1471.
- Levis M.J., Bourne H.R. 1992. Activation of the α Subunit of Gs in Intact Cells Alters Its Abundance, Rate of Degradation, and Membrane Avidity. *The Journal of Cell Biology* **119(5)**: 1297-1307.
- Levitzki A., Bar-Sinai A. 1991. The regulation of adenylyl cyclase by receptor-operated G proteins. *Pharmacology & Therapeutics* **50(3)**: 271-283.
- 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.
- Li L., Shen G., Zhang Z.G., Wang Y.L., Thompson J.K., Wang P. 2007. Canonical Heterotrimeric G Proteins Regulating Mating and Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell* **18**: 4201-4209.
- Li L., Wright S.J., Krystofova S., Park G., Borkovich K.A. 2007. Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi. *The Annual Review of Microbiology* **61**: 423–52.
- Lichter A., Mills D. 1997. Fil1, a G-protein α subunit that acts upstream of cAMP and is essential for dimorphic switching in haploid cells of *Ustilago hordei*. *Molecular and General Genetics* **256(4)**: 426-435.
- López-Matas M.A., Eslava A.P., Díaz-Mínguez J.M. 2000. *Mchs1*, a member of a chitin synthase gene family in *Mucor circinelloides* is differentially expressed during dimorphism. *Current microbiology* **40(3)**: 169-175.
- Lorca-Pascual J.M., Murcia-Flores L., Garre V., Torres-Martinez S., Ruiz-Vázquez R.M. 2004. The RING-finger domain of the fungal repressor *crgA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis. *Molecular Microbiology* **52(5)**: 1463-1474.
- Lorenz M.C., Heitman J. 1997. Yeast pseudohyphal growth is regulated by *GPA2*, a G protein α homolog. *The EMBO Journal* **16(23)**: 7008-7018.
- Lübbehüsen T.L., Nielsen J., McIntyre M. 2003. Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *Journal of Applied Microbiology* **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. Genomic Analysis of the Basal Lineage Fungus *Rhizopus oryzae* Reveals a Whole-Genome Duplication. *PLoS Genetics* **5(7)**: e1000549.

Maheshwari R. 2005. Fungi: Experimental Methods in Biology. Mycology Vol.24. Benett J.W. CRC Press. United States of America. pp 240.

Marrari Y., Crothamel M., Irannejad R., Wedegaertner P.B. 2007. Assembly and trafficking of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* **46(26)**: 7665-7677.

Mason M.G., Botella J.R. 2000. Completing the heterotrimer: Isolation and characterization of an Arabidopsis thaliana G protein γ -subunit cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97(26)**: 14784–14788.

McCudden C.R., Hains M.D., Kimple R.J., Siderovski D.P., Willard F.S. 2005. G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**: 551-577.

McIntyre M., Breum J., Arnau J., Nielsen J. 2002. Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**: 495-502.

Mehrabi R., M'Barek S.B., Van der Lee T., Waalwijk, de Wit P., Kema G. 2009. G α and G β Proteins Regulate the Cyclic AMP Pathway That is Required for Development and Pathogenicity of the Phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Eukaryotic Cell* **8(7)**: 1001-1013.

Meza-Carmen V., García-Soto J., Ongay-Larios L., Coria R., Pedraza-Reyes M., Arnau J., Reyna- Lopez G., Martínez-Cadena G. 2006. Molecular characterization of a G protein α -subunit-encoding gene from *Mucor circinelloides*. *The Canadian Journal of Microbiology*. **52**: 627-635.

Milligan G., Kostenis E. 2006. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology* **147 Supp 1**: 46-55.

Misra S., Wu Y., Venkataraman G., Sopory S.K., Tuteja N. 2007. Heterotrimeric G-protein complex and G-protein-coupled receptor from a legume (*Pisum sativum*): role in salinity and heat stress and cross-talk with phospholipase C. *The Plant Journal* **51**: 656-669.

Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. 2004. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press. United States of America. pp 777.

Mukherjee P.K., Latha J., Hadar R., Horwitz B.A. 2004. Role of Two G-Protein Alpha Subunits, TgaA and TgaB, in the Antagonism of Plant Pathogens by *Trichoderma virens*. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 542-549.

Mulligan T., Farber S.A. 2011. Central and C-terminus domains of heterotrimeric G protein gamma subunits differentially influence the signaling necessary for primordial germ cell migration. *Cell Signal* **23(10)**: 1617-1624.

Mumby S.M., Heukeroth R.O., Gordon J.I., Gilman A.G. 1990. G-protein α -subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**: 728-732.

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.

Murcia-Flores L., Lorca-Pascual J.M., Garre V., Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez R.M. 2007. Non-AUG Translation Initiation of a Fungal RING Finger Repressor Involved in Photocarotenogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 15394–15403.

Naar A.M., Thakur J.K. 2009. Nuclear receptor-like transcription factors in fungi. *Genes and Development* **23**: 419-432.

Navarro E., Ruiz-Pérez V.L., Torres-Martínez S. 2000. Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *European Journal of Biochemistry* **267**: 800-807.

Navarro-Olmos R., Kawasaki L., Domínguez-Ramírez L., Ongay-Larios L., Pérez-Molina R., Coria R. The β Subunit of the Heterotrimeric G Protein Triggers the *Kluyveromyces lactis* Pheromone Response Pathway in the Absence of the γ Subunit. *Molecular Biology of the Cell* **21**: 489-498.

Nakafuku M., Itoh H., Nakamura S., Kaziro Y. 1987. Occurrence in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene homologous to the cDNA coding for the α subunit of mammalian G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**: 2140-2144.

Neer E.J. 1994. G proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Protein Science* **3**: 3-14.

Nielsen E., Cheung A.Y., Ueda T. 2008. The regulatory *RAB* and *ARF* GTPases for vesicular trafficking, *Plant Physiology* **147(4)**: 1516-1526.

Nielsen M.G., Gadagkar S.R., Gutzwiller L. 2010. Tubulin evolution in insects: gene duplication and subfunctionalization provide specialized isoforms in a functionally constrained gene family. *BMC Evolutionary Biology* **10**: 113.

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.

Nout M.J., Rombouts F.M. 1990. Recent developments in tempe research. *Journal of Applied Bacteriology* **69**: 609-633.

Nunes L.R., Costa de Oliveira R., Leite D.B., Da Silva V.S., dos Reis E., da Silva M.E., Ribeiro D.C., De Souza L.A., Goldman M.H., Puccia R., Travassos L.R., Batista W.,

Nóbrega F., de Braganca C.A., Goldman G.H. 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryotic Cell* **4(12)**: 2115-2128.

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.

Ocampo J., McCormack B., Navarro E., Moreno S., Garre V., Rossi S. 2012. Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4. *Eukaryotic Cell* **11(8)**: 989-1002.

Oldham W.M., Hamm H.E. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**: 60-71.

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

Papagianni M. 2003. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. *Biotechnology advances* **22 (3)**: 189-259.

Pérez-Sánchez L., González E., Colón-Lorenza E.E., González-Velázquez W., González-Méndez R., Rodríguez-del Valle N. 2010. Interaction of the heterotrimeric G protein alpha subunit SSG-1 of *Sporothrix schenckii* with proteins related to stress response and fungal pathogenicity using a yeast two-hybrid assay. *BMC Microbiology* **10**: 317.

Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29(9)**:2000-2007.

Prasobh R., Manoj N. 2009. The Repertoire of Heterotrimeric G Proteins and RGS Proteins in *Ciona intestinalis*. *PLoS ONE* **4(10)**: e7349.

Quiles-Rosillo M.D., Torres-Martínez S., Garre V. 2003. *cig A*, a light inducible gene involved in vegetative growth in *Mucor circinelloides* is regulated by the carotenogenic repressor *crg A*. *Fungal Genetics and Biology* **38**: 122-132.

Redman R.S., Dunigan D.D., Rodriguez R.J. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* **151**: 705-716.

Regenfelder E., Spellig T., Hartmann A., Lauenstein S., Bölker M., Kahmann R. 1997. G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *The EMBO Journal* **16(8)**: 1934-1942.

Repasky G.A., Chenette E.J., Der C.J. 2004. Renewing the conspiracy theory debate: does *Raf* function alone to mediate *Ras* oncogenesis? *Trends in cell biology* **14(11)**: 639-647.

Richards T.A., Soanes D.M., Jones M.D.M., Vasieva O., Leonard G., Paszkiewicz K., Foster P.G., Hall N., Talbot N.J. 2011. Horizontal gene transfer facilitated the evolution of

plant parasitic mechanisms in the oomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108(37)**: 15258-15263.

Richards R.G., DiAugustine R.P., Petrusz P., Clark G.C., Sebastian J., 1996. Estradiol stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptorsubstrate-1 in the uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93(21)**: 12002-12007.

Roncero MI, Jepsen LP, Strøman P, van Heeswijck R, 1989. Characterization of a leuA gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene* **84**: 335-343.

Roze L.V., Mahanti N., Mehig R., McConnell D.G., Linz J.E. 1999. Evidence that *MRas1* and *MRas3* proteins are associated with distinct cellular functions during growth and morphogenesis in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal genetics and biology* **28(3)**: 171-189.

Salcedo-Hernández R., Ruiz-Herrera J., 1993. Isolation and characterization of a mycelial cytochrome *aa₃*-deficient mutant and the role of mitochondria in dimorphism of *Mucor rouxii*. *Experimental Mycology* **17**: 142–154.

Sánchez-Martínez C., Pérez-Martín, J. 2002. Gpa2, a G-Protein α Subunit Required for Hyphal Development in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **1**: 865-874.

Sharma P.D. 2005. *Fungi and Allied Organisms*. Alpha Science International. Oxford, United Kingdom. pp. 300.

Schena M., Shalon D., Heller R., Chai An., Brown P.O., Davis R. W. 1996. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 10614-10619.

Schmoll M. 2008. The information of a biotechnological workhorse-signal transduction in *Hypocrea jecorina*. *BioMed Central Genomics* **9**: 430.

Schmoll M., Schuster A., do Nascimento Silva R., Kubicek C.P. 2009. The G-Alpha Protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) Regulates Cellulase Gene Expression in the Presence of Light. *Eukaryotic Cell* **8(3)**: 410-420.

Schuchardt I., Aßmann D., Thines E., Schuberth C., Steinberg. 2005. Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 Cooperate in Hyphal Growth of the Fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell* **16**:5191-5201.

Schwindinger W.F., Robishaw J.D. 2001. Heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20(13)**: 1653-1660.

Siekhaus D.E., Drubin D.G. 2005. Spontaneous receptor-independent heterotrimeric G-protein signaling in an RGS mutant. *Nature Cell Biology* **5**: 231-235.

Singh L.P., Gill S.S., Tuteja N. 2011. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* **6(2)**: 175-191.

Singh R., Recinos R.F., Agresti M., Schaefer R.B., Bosbous M., Gosain A.K. 2006. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: an improvement in detecting mRNA levels in mouse cranial tissue. *Plastic and Reconstructive Surgery* **117(7)**:2227-34

Slep K.C., Kercher M.A., Wieland T., Chen C.K., Simon M.I., Sigler P.B., 2008. Molecular architecture of the G α_o and the structural basis for RGS16-mediated deactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105(17)**: 6243-6248.

Smrcka A.V., Brown J.H., Holz G.G. 2012. Role of phospholipase C ϵ in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell signal* **24(6)**: 1333-1343.

Sorol, M.R., Pastori R.L., Muro a., Moreno S., Rossi S. 2000. Structural and functional analysis of the cAMP binding domain from the regulatory subunit of *Mucor rouxii* protein kinase A. *Archives of biochemistry and biophysics* **382(2)**: 173-181.

Spiering M.J., Moran G., Chauvel M., MacCallum D.M., Higgins J., Hokamp K., Yeomans T., D'Enfert C., Coleman D.C., Sullivan D.J. 2010. Comparative Transcript Profiling of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Identifies SFL2, a *C. albicans* Gene Required for Virulence in a Reconstituted Epithelial Infection Model. *Eukaryotic Cell* **9(2)**:251-265.

Sun J., Sun X.X., Tang P.W., Yuan Q.P. 2012. Molecular cloning and functional expression of two key carotene synthetic genes derived from *Blakeslea trispora* into *E. coli* for increased β -carotene production. *Biotechnology Letters* **34(11)**:2077-2082.

Takahashi T., Tsuchida Y., Irie M. 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from *Rhizopus* species. *Journal of Biochemistry* **84(5)**: 1183-1194.

Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. 2001. Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews* **81(1)**: 154-188.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2008. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28(10)**: 2731-2739.

Tanabe Y., Watanabe M.M., Sugiyama J. 2005. Evolutionary relationships among basal fungi (Chytridiomycota and Zygomycota): Insights from molecular phylogenetics. *The Journal of General and Applied Microbiology* **51(5)**:267-276.

Tesmer J.J.G. 2010. The Quest to Understand Heterotrimeric G Protein Signaling. *Nature Structural & Molecular Biology* **17(6)**: 650-658.

Teste M.A., Duquenne M., François J.M., Parrou J.L. 2009. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMed Central Molecular Biology* **10**: 99-114.

Thongchul N., Navankasattusas S., Yang S.T. 2010. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **33(3)**: 407-416.

Thung L., Trusov Y., Chakravorty D., Botella J.R. 2012. $G\gamma_1 + G\gamma_2 + G\gamma_3 = G\beta$: The search for heterotrimeric G-protein γ subunits in *Arabidopsis* is over. *Journal of Plant Physiology* **169(5)**: 542-545.

Tolkacheva T., McNamara P., Piekarz E., Courchesne W. 1994. Cloning of a *Cryptococcus neoformans* Gene, *GPA1*, Encoding a G-Protein α -Subunit Homolog. *Infection and Immunity* **62(7)**: 2849-2856.

Turner G.E., Borkovich K.A. 1993. Identification of a G Protein α Subunit from *Neurospora crassa* that is a member of the G_i Family. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 14805-14811.

Tzima A.K., Paplomatas E.J., Tsitsigiannis D.I., Kang S. 2012. The G-Protein β subunit controls virulence and multiple growth- and development related traits in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology* **49(4)**: 271-283.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3(7)**: 1-12.

Versele M., Lemaire K., Thevelein J.M. 2001. Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO reports* **2(7)**: 574-579.

Voigt K., Kirk P.M. 2011. Recent developments in the taxonomic affiliation and phylogenetic positioning of fungi: impact in applied microbiology and environmental biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**: 41-57.

Wacker M.J., Godard M.P. 2005. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *Journal of Biomolecular Techniques* **16(3)**: 266-271.

Walbot V., Petrov D.A. 2001. Gene galaxies in the maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98(15)**: 8163-8164.

Wall M.A., Coleman D.E., Lee E., Iñiguez-Lluhi J.A., Posner B.A., Gilman A.G., Sprang S.R. 1995. The Structure of the G Protein Heterotrimer $G_{i\alpha 1}\beta_1\gamma_2$. *Cell* **83**: 1047-1058.

Weis K. 2003. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112(4)**: 441-451.

Welton R.M., Hoffman C.S. 2000. Glucose Monitoring in Fission Yeast via the *gpa2* $G\alpha$, the *git5* $G\beta$ and the *git3* Putative Glucose Receptor. *Genetics* **156**: 513-521.

Wescher M.A., Bowman B.J. 1995. Regulation of the expression of three housekeeping genes encoding subunits of the *Neurospora crassa* vacuolar ATPase. *Molecular Genomics and Genetics* **249**: 317-327.

- West R.E. Jr, Moss J., Vaughan M., Liu T., Liu T.Y. 1985. Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of transducin. Cysteine 347 is the ADP-ribose acceptor site. *The Journal of Biological Chemistry* **260(27)**: 14428-14430.
- Wettschureck M., Offermans S. 2005. Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions. *Physiological Reviews* **85**: 1159-1204.
- 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. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **167(6)**:1501-1512.
- Wilkie T.M., Yokoyama S. 1994. Evolution of the G protein alpha subunit multigene family. *Society of General Physiologists Series* **49**:249-270.
- White M.M., James T.Y., O'Donnell K. 2006. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* **98(6)**: 872-884.
- Whiteway M., Clark K.L., Leberer C.E., Dignard D., Thomas D.Y. 1994. Genetic Identification of Residues Involved in Association of α and β G-Protein Subunits. *Molecular and Cellular Biology* **14(5)**: 3223-3229.
- Whiteway M., Hougan L., Dignard D., Thomas D.Y., Bell L., Saari G.C., Grant F.J., MacKay V.L. 1989. The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential beta and gamma subunits of the mating factor receptor G protein. *Cell* **56(3)**: 467-477.
- Wolff A.M., Appel K.F., Petersen J.B., Poulsen U., Arnau J. 2002. Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (*syn. racemosus*). 2002. *FEMS Yeast Research* **2(2)**: 203-213.
- Wright S.K., Inchausti R., Eaton C.J., Krystofova S., Borkovich K.A. 2011. *RIC8* is a guanine-nucleotide exchange factor for Galpha subunits that regulates growth and development in *Neurospora crassa*. *Genetics* **189(1)**: 165-176.
- Xia C., Zhang J., Zhang W., Hu Bo. 2011. A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnology and Biofuels* **4**: 15-24.
- Xie X., Lipke P.N. 2010. On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast* **27(8)**: 479-488.
- Yamaguchi M., Dieffenbach C.W., Connolly R., Cruess D.F., Baur W., Sharefkin J.B. 1992. Effect of different laboratory techniques for guanidium-phenol-chloroform RNA extraction on A260/A280 and on accuracy of mRNA quantitation by reverse transcriptase-PCR. *Genome Research* **1**: 286-290.
- Yu J.H. 2006. Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Microbiology*. **44**: 145-154.

Zaballos, P. Ara M., Pozo A., Andrés R., Gil J., Ramón y Cajal S., Carapeto F.J. 2003. Mucormicosis rinocerebral fulminante. *Actas Dermosifiliogr* **94(9)**: 624-626.

Zhang W. 2011. Roles of heterotrimeric G proteins in guard cell ion channel regulation. *Plant Signaling and Behavior* **6(7)**: 986-990.

Zerial M., McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **2(2)**: 107-117.