



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Química Farmacobióloga Nancy Yadira Reyes Mares

Título de la Tesis:

**“Participación de los productos de los genes *gpa11* y *gpa12* en la
esporulación y germinación de *Mucor circinelloides*”**

Director: Doctor en Ciencias en Biología Experimental Víctor Meza Carmen

Co-director: Doctor en Biotecnología Jesús Campos García

Morelia Michoacán, Septiembre 2017

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Laura y Gerardo que siempre han sido un gran apoyo incondicional.

A mis hermanos Nelly y Gera, mis tías y no menos importante mi prima May por estar siempre apoyándome.

A mi asesor D.C. Víctor Meza por su exigencia y total apoyo en el proyecto, a mi coasesor el D.C. Jesús Campos García y a mi comité de evaluación integrado por los Doctores en Ciencias, Elda Beltrán Peña, Martha Isela Ramírez Díaz y Carlos Cervantes por sus aportaciones a este trabajo.

Un agradecimiento especial al D.C. Victoriano Garre y a sus estudiantes Carlos, Maribel y Sergio, así como a todo el grupo de trabajo de la Universidad de Murcia por su colaboración en la generación de las mutantes, por su enorme enseñanza y amistad.

A mis hermanitos de laboratorio Marco, Sharel y Albert por su apoyo y aportaciones al proyecto y por siempre generar una sonrisa en mí a pesar de las presiones.

A la beca proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Coordinación General de Estudios de Posgrado-UMSNH por la beca de extensión proporcionada para finalizar el trabajo de tesis, a los espacios del laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el Laboratorio Estatal de Salud Pública y al departamento de Biología Molecular y Celular de Hongos de la Universidad de Murcia en España.

A. Índice

	Agradecimientos	1
A.	Índice	2
B.	Índice de figuras	6
C.	Índice de tablas	8
D.	RESUMEN	9
E.	ABSTRACT	10
I.	INTRODUCCIÓN	11
1.1	Generalidades de los hongos	11
1.1.1	Características del género <i>Mucor</i>	12
1.1.2	<i>Mucor circinelloides</i>	13
1.1.3	El dimorfismo fúngico como modelo de diferenciación celular	17
1.2	Generalidades de las Proteínas G	20
1.2.1	Proteínas G heterotriméricas	21
1.2.2	Regulación de la actividad de las proteínas G	24
1.2.3	Proteínas Gα en hongos	26
1.2.4	Función de las proteínas G heterotriméricas en hongos	27
1.2.5	Genes involucrados en la esporulación en hongos	30
1.3	Proteínas Gα en <i>Mucor circinelloides</i>	35
II.	JUSTIFICACIÓN	38
III.	HIPÓTESIS	39
IV.	OBJETIVO GENERAL	39
4.1	Objetivos específicos	39
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
5.1	Cepas y plásmidos utilizados	40
5.2	Medios y condiciones de crecimiento	40

5.2.1	<i>Escherichia coli</i>	40
5.3	<i>M. circinelloides</i>	41
5.3.1	YPG (Glucosa, Peptona de Gelatina, Extracto de Levadura)	41
5.3.2	MMC (Medio Mínimo Casa-aminoácidos)	41
5.3.3	Medio Lee	41
5.3.4	YNB (Yeast Nitrogen Base)	42
5.4	Obtención y conteo de esporas vegetativas de <i>M. circinelloides</i>	42
5.5	Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de <i>M. circinelloides</i>	43
5.6	Transiciones Levadura-Micelio y Micelio-Levadura de <i>M. circinelloides</i>	43
5.7	Cuantificación del crecimiento	44
5.8	Determinación de porcentaje de germinación de <i>M. circinelloides</i>	44
5.9	Análisis de imágenes	44
5.10	Manipulación de ácidos nucleicos	45
5.10.1	Tratamiento del DNA con enzimas	45
5.10.2	Extracción y cuantificación de RNA	46
5.10.3	Análisis por electroforesis de los ácidos nucleicos	47
5.10.4	Amplificación de DNA por PCR	48
5.10.5	Ensayo de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR)	48
5.10.6	PCR en colonia	49
5.11	Construcción del fragmento recombinante <i>gpa11</i> mediante clonaciones y subclonaciones en el vector pJET1.2/blunt.	51
5.11.1	Amplificación del fragmento recombinante <i>gpa12-pyrG</i> mediante PCR en fusión.	52

5.11.2	Construcción del fragmento recombinante para generación de doble mutante en los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa1</i>	55
5.12	Transformación de protoplastos de <i>M. circinelloides</i>	55
5.13	Transformación de <i>E. coli</i>	57
5.14	Hibridación de DNA tipo Southern	57
5.15	Secuenciación de DNA	59
5.16	Análisis estadístico	59
VI.	RESULTADOS	60
6.1	Construcción y clonación de los fragmentos de recombinación de los genes que codifican a proteínas Gpa11 y Gpa12 en <i>M. circinelloides</i>	60
6.2	Construcción del fragmento de recombinación mediante PCR en fusión para la delección del gen <i>gpa12</i>	60
6.3	Transformación de <i>M. circinelloides</i> con los fragmentos recombinantes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i>	67
6.4	Confirmación molecular de mutantes en los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> en <i>M. circinelloides</i>	69
6.5	Generación de la cepa doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ de <i>M. circinelloides</i>	76
6.6	Corroboración molecular por PCR de la integración homóloga de la interrupción del gen <i>gpa11</i> en la cepa mutante $\Delta gpa12$ de <i>M. circinelloides</i> .	78
7.	Evaluación del efecto de la ausencia de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> en el crecimiento de <i>M. circinelloides</i>	80
7.1	Determinación del crecimiento radial en ausencia de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i>	80
7.2	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> en la esporulación de <i>M. circinelloides</i>	82

7.3	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> en el tamaño de las esporas	83
7.4	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> en la germinación aerobia	85
7.5	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> en el crecimiento en aerobiosis	89
7.6	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> sobre la germinación en anaerobiosis	91
7.7	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> en el crecimiento anaerobio	94
VIII.	RESUMEN DE RESULTADOS	95
IX.	PERSPECTIVAS	95
X.	DISCUSIÓN	96
XI.	CONCLUSIÓN	101
XII.	BIBLIOGRAFÍA	102

B. Índice de figuras

Figura 1.	Ciclo sexual y asexual del género <i>Mucor</i> .	14
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>M. circinelloides</i> en cultivo líquido.	16
Figura 3.	Ciclo de activación de las proteínas G heterotriméricas.	25
Figura 4.	Vías d señalización en la respuesta a feromonas, apareamiento y detección de nutrientes en hongos ascomicetos.	29
Figura 5.	Transformaciones morfológicas para la generación del conidióforo.	32
Figura 6.	Análisis filogenético molecular de subunidades G α fúngicas.	36
Figura 7.	Expresión de los genes que codifican para subunidades G α durante el dimorfismo en <i>M. circinelloides</i> .	37
Figura 8.	PCR en fusión de las regiones 5' y 3' del gen <i>gpa12</i> y del gen <i>pyrG</i> .	54
Figura 9.	Evento de recombinación homóloga para realizar la delección de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> .	57
Figura 10.	Fragmento recombinante para la delección de <i>gpa11</i> de <i>M. circinelloides</i> .	63
Figura 11.	Clonación de los fragmentos 5' y 3' del gen <i>gpa11</i> y del gen <i>pyrG</i> en el vector pJET1.2/Blunt y confirmación por PCR en colonia de los mismos.	66
Figura 12.	Subclonación del gen <i>pyrG</i> en el plásmido pGpa11-5'.	68
Figura 13.	Subclonación del fragmento 3' del gen <i>gpa11</i> en el plásmido pGpa115'- <i>pyrG</i> .	70
Figura 14.	Productos de la PCR convencional y la PCR en fusión para la construcción del fragmento de recombinación para la delección del gen <i>gpa12</i> .	68
Figura 15.	Confirmación molecular mediante PCR de la mutante Δ <i>gpa11</i> de <i>M. circinelloides</i> .	72
Figura 16.	Confirmación mediante PCR de la mutante <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> .	73

Figura 17.	Souther Blot de la mutante en el gen <i>gpa11</i> de <i>M. circinelloides</i> .	74
Figura 18.	Souther Blot de la mutante en el gen <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> .	75
Figura 19.	Construcción del plásmido pGpa115'-LeuA-3'.	77
Figura 20.	PCR de la mutación en el gen de la cepa $\Delta gpa12$ de <i>M. circinelloides</i> .	79
Figura 21.	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> en el crecimiento radial.	81
Figura 22.	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> en la esporulación.	83
Figura 23.	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> en el tamaño de las esporas.	84
Figura 24.	Efecto de la mutación en los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> sobre la expresión del gen <i>s6k</i> y <i>cnaA</i> .	86
Figura 25.	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> en la germinación aerobia.	88
Figura 26	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> en la morfología en aerobiosis.	87
Figura 27	Tamaño de la célula madre y longitud de la hifa	88
Figura 28	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> en el crecimiento aerobio.	90
Figura 29	Efecto de la mutación de los genes $\Delta gpa11$ y $\Delta gpa12$ de <i>M. circinelloides</i> sobre la germinación en anaerobiosis.	92
Figura 30	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> en la morfología en anaerobiosis.	93
Figura 31	Efecto de la mutación de los genes <i>gpa11</i> y <i>gpa12</i> de <i>M. circinelloides</i> en el crecimiento anaerobio.	94
Figura 32		100

Análisis de la expresión de los genes $G\alpha$ en el
dimorfismo de *M. circinelloides*

C. Índice de tablas

Tabla 1.	Efectores de proteínas $G\alpha$ heterotriméricas.	23
Tabla 2.	Funciones de subunidades de proteínas $G\alpha$ en hongos.	28
Tabla 3.	Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR.	50
Tabla 4.	Oligonucleótidos y sondas utilizados para qRT-PCR.	51

D. RESUMEN

Las proteínas G heterotriméricas están conformadas por las subunidades proteicas G α , G β y G γ ; En los hongos estas proteínas están involucradas en diferentes procesos biológicos tales como el crecimiento, diferenciación, patogénesis, entre otros. En el hongo *Mucor circinelloides* se han encontrado un total de 12 subunidades G α , 3 G β y 3 G γ , siendo este el mayor repertorio de subunidades G heterotriméricas en el reino fungi; sin embargo, aún se desconoce su función biológica. El análisis de los niveles de RNAm de los 12 genes G α (*gpa1-12*) durante el dimorfismo de *M. circinelloides*, reveló que los transcritos de los genes *gpa11* y *gpa12* fueron sobreexpresados en el estadio de espora respecto al resto de los genes G α , sugiriendo una posible participación en este estadio morfológico.

El objetivo de este trabajo consistió en demostrar la participación de los productos de los genes *gpa11* y *gpa12* en la esporulación y/o crecimiento de *M. circinelloides*. El análisis fenotípico en términos del crecimiento y germinación de las esporas de las mutantes simples en los genes Δ *gpa11* y Δ *gpa12* no mostró diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre Mu402; sin embargo, se observó un 30% de disminución en la producción de esporas para ambas cepas mutantes respecto a la cepa silvestre. En la cepa doble mutante Δ *gpa11*/ Δ *gpa12* la producción de esporas fue similar a las mutantes simples, éstas presentaron una diferencia significativa en el tamaño de, 15 μ m en promedio, mientras que las esporas de las mutantes simples y silvestre, tuvieron un tamaño de 10 μ m en promedio. Por otro lado analizaron los niveles de transcrito de los genes *s6k* (cinasa blanco de la protein-cinasa TOR) y *cnaA* (subunidad catalítica de la calcineurina), proteínas involucradas en procesos de diferenciación celular, entre otros., Los resultados indicaron una disminución significativa en los niveles de expresión del transcrito *cnaA* pero no de *s6k* en la cepa Δ *gpa11*/ Δ *gpa12* con respecto a la silvestre o mutantes simples, lo que sugiere que la vía de la calcineurina podría estar involucrada en el control del tamaño de la espora por lo que se sugiere que en *M. circinelloides* las proteínas Gpa11 y Gpa12 tienen funciones redundantes en el control del tamaño de las esporas, lo anterior probablemente, participa en la regulación de componentes de la vía calcineurina.

Palabras clave: *Mucor circinelloides*, adenilato ciclasa, DNA, RNA, proteína G.

E. ABSTRACT

The heterotrimeric G proteins are made up of the G α , G β and G γ protein subunits; In fungi these proteins are involved in different biological processes such as growth, differentiation, pathogenesis, among others. In the *Mucor circinelloides* fungus in a total of 12 G α , 3 G β and 3 G γ subunits, this being the largest repertoire of heterotrimeric G subunits in the fungus kingdom; however, its biological function is still unknown. The analysis of the mRNA levels of the 12 G α genes (gpa1-12) during the dimorphism of *M. circinelloides* revealed that the transcripts of the gpa11 and gpa12 genes were overexpressed in the spore stage with respect to the rest of the G α genes, Suggesting a possible participation in this morphological stage.

The objective of this work was to demonstrate the participation of the products of the genes gpa11 and gpa12 in the sporulation and / or growth of *M. circinelloides*. Phenotypic analysis in terms of the growth and germination of spores of the single mutants in the Δ gpa11 and Δ gpa12 genes did not show significant differences with respect to the wild strain Mu402; However, a 30% reduction in spore production was observed for both mutant strains relative to the wild strain. In the double mutant strain Δ gpa11 / Δ gpa12 the spore production was similar to the simple mutants, they showed a significant difference in size of, 15 μ m in average, whereas the spores of the simple and wild mutants had a size of 10 μ m on average. On the other hand there was a significant decrease in the biomass obtained in liquid cultures, compared to the other strains. In addition, the size of the hyphae of the double mutants were considerably longer, compared to the other strains. On the other hand, they analyzed the transcript levels of s6k genes (white kinase of the protein kinase TOR) and cnaA (catalytic subunit of calcineurin), proteins involved in cell differentiation processes, among others. The results indicated a significant decrease in expression levels of the cnaA transcript but not of s6k in the strain Δ gpa11 / Δ gpa12 relative to wild or single mutants, suggesting that the calcineurin pathway might be involved in size control Of the spore so it is suggested that in *M. circinelloides* the proteins Gpa11 and Gpa12 have redundant in the control of spore size, the above probably involved in the regulation of components of the calcineurin pathway.

I. Introducción

1.1 Características de los hongos

Los hongos al ser organismos eucariotes ubicuos que pueden ser unicelulares (levaduras) o pluricelulares (setas); su DNA está organizado en cromosomas que están rodeados por la membrana nuclear. El citoplasma de los hongos, contiene diversos organelos membranosos y ribosomas que están delimitados por una membrana citoplasmática rica en ergosterol, lípido no encontrado en los demás eucariontes. Estructuralmente estos organismos presentan una pared celular rígida compuesta de proteínas estructurales como lo son glucana y quitina, y polisacáridos principalmente mánanos, glucanos y quitosana que protegen de la lisis osmótica **(Xie y Lipke, 2010)**. Los hongos son un grupo muy amplio de organismos que se caracterizan por la degradación de materia orgánica, y de esta manera obtienen la energía y el carbono absorbiendo los nutrientes de dicha materia mediante la producción de exoenzimas **(Prats, 2005)**. Los hongos pueden establecer relaciones diversas con todos los organismos incluyendo al hombre; algunos de ellos causan enfermedades en plantas y animales; otros, por el contrario, interactúan en forma benéfica (simbiosis). En algunos casos, los hongos se encuentran asociados a las raíces de las plantas formando micorrizas, las cuales capturan nutrientes importantes para las plantas. De hecho, en ecosistemas naturales los hongos han sido encontrados como simbioses en todas las plantas estudiadas **(Singh y col., 2011)**. Todos los hongos se reproducen mediante la generación de esporas, que pueden ser generadas de forma sexual o asexual. Las estructuras de donde provienen dichas esporas ha sido un criterio clásico (aún vigente) de clasificación de los hongos: si provienen de un saco llamado asco se les llama ascomicetos, si se forman de un basidio son basidiomicetos, o zigomicetos si provienen de una estructura denominada esporangio **(Sharma, 2005)**.

La morfología de los hongos es variada, desarrollan células levaduriformes con formas redondas, ovoides o elongadas, pueden adoptar una morfología micelial

compuesta por hifas o filamentos, originadas por alargamiento apical, que se agrupan formando el micelio **(Martos y Salido, 2007)**. A su vez, la hifa puede presentar diversas morfologías:

1. Hifa no septada o cenocítica; son estructuras tubulares comunicantes y ramificadas, con gran cantidad de núcleos en el citoplasma rodeados por una pared única y rígida. No presenta tabiques o septos que dividen la hifa en células.
2. Hifas septadas; presentan celdillas o compartimientos que las delimita en tabiques o septos. Estas hifas pueden ser uninucleadas o poli nucleadas **(Montoya, 2008)**.

1.1.1 Características del género *Mucor*

El género *Mucor* pertenece a la familia Mucoraceae, del orden de los Mucorales, además de encontrarse en el Phylum *Zygomycota*, considerado como un linaje basal (inicial) del reino Fungí. La mayoría de los representantes del género *Mucor* tienen hifas cenocíticas durante todo su ciclo de vida, a diferencia de las hifas de los ascomicetos que presentan septos **(White y col., 2006)**. La mayoría de las especies del Phylum *Zygomycota* son saprófitos (organismos que obtienen su alimento a partir de la materia orgánica de otros organismos muertos, o en descomposición), aunque algunas especies son patógenos facultativos en plantas, animales (incluyendo los seres humanos) o incluso otros hongos **(White y col., 2006)**. El término zygomycetes fue nombrado en función de las esporas sexuales que son producidas, denominadas zigosporas; cuando hay fusión de hifas de origen heterotálico, de sexo distinto, generan hifas compatibles que al juntarse forman un cigoto **(Ni y col., 2011)**. Algunas especies del género *Mucor* son capaces de generar tres tipos de esporas: **1)** zigosporas productos meióticos de la recombinación genética, **2)** esporangiosporas producidas mediante mitosis, sirven como mecanismo de dispersión y **3)** las artrosporas aseguran la supervivencia bajo condiciones de crecimiento adversas y se derivan sólo de hifas en medio líquido **(Orlowski, 1991)**.

La zigospora puede permanecer en reposo durante varias semanas o meses antes de germinar y desarrollarse en una estructura alargada conocida como esporangióforo. Dicha estructura presenta un cuerpo esférico en la punta conocida como esporangio del cual se desprenden las esporangiosporas. Las esporangiosporas del género *Mucor* son por lo general elipsoidales y aunque derivan exclusivamente de la morfología micelial, son capaces de desarrollar estructuras levaduriformes o miceliales dependiendo principalmente de la disponibilidad de oxígeno y la fuente de carbono (**Lübbehüsen y col., 2003**). Si las esporangiosporas crecen en anaerobiosis se favorece el crecimiento isotrópico (levadura), mientras que en aerobiosis su crecimiento es polarizado (filamentos). Además del ambiente gaseoso, el crecimiento levaduriforme en el caso de *M. rouxii* requiere la presencia de una fuente de carbono fermentable en altas concentraciones (**Bartnicki-Garcia, 1968**).

Los crecimientos filamentosos y levaduriformes de *M. circinelloides* no son etapas terminales ya que al modificar las condiciones ambientales puede haber una conversión entre la forma de levadura a micelio o viceversa (**McIntyre y col., 2002**). Las hifas del género *Mucor* son multinucleadas y cenocíticas, mientras que, las levaduras son esféricas y multinucleadas (**Ocampo y col., 2012**). La artrospora del género *Mucor* es la estructura menos estudiada; se ha propuesto su funcionalidad como un mecanismo de supervivencia ya que se forma al finalizar el crecimiento exponencial o bajo condiciones nutricionales desfavorables (**Orlowski, 1991**).

1.1.2 *Mucor circinelloides*

M. circinelloides es un hongo dimórfico (**Lübbehüsen y col., 2003**), que presenta una amplia distribución encontrándose en el suelo, sobre estiércol u otros sustratos orgánicos en descomposición. Este hongo pertenece a la clase *Zigomycetes* que se caracteriza por presentar una reproducción sexual mediante la formación de zigosporas (formadas por la fusión de hifas de diferente sexo '+' y '-') o asexual mediante esporangiosporas que se desarrollan a partir de esporangios;

en condiciones aeróbicas presenta un micelio cenocítico (Fig. 1) (Lübbehüsen y col., 2003).

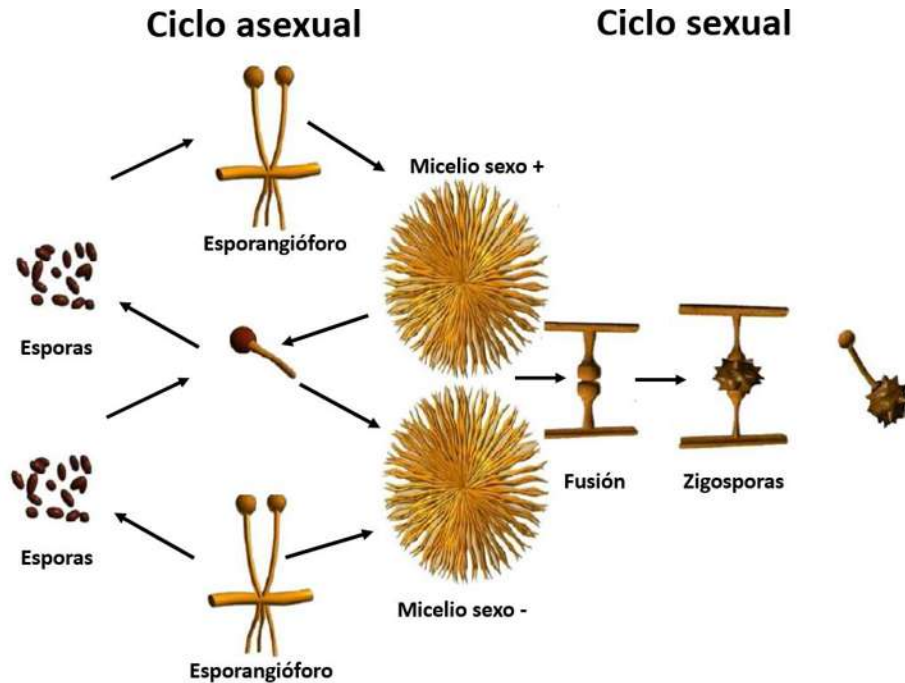


Figura 1. Ciclo sexual y asexual del género *Mucor*. El ciclo sexual se caracteriza por la formación de esporas vegetativas o esporangiosporas. Estas esporas maduran en el esporangio, situado en el extremo apical del esporangióforo. Al germinar, las esporas se hinchan y producen uno o varios tubos germinativos, dando lugar a las hifas que crecen de forma apical y se ramifican formando el micelio. El asexual se debe a la fusión de micelios de diferente tipo sexual (+ y -), y que dan origen a la zigospora (Modificada de López García, 2015).

M. circinelloides se considera un modelo de estudio en la regulación de la diferenciación celular y en las respuestas celulares a la luz (**Murcia-Flores y col., 2007**). Este organismo contiene un genoma de 36.6 millones de pares de bases (Mb) que incluyen 11,719 genes distribuidos en 9 cromosomas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2804>). El tamaño del genoma de *M. circinelloides* es similar al de otros hongos, por ejemplo *Aspergillus nidulans* tiene un genoma de 30 Mb (**David y col., 2008**), el basidiomiceto dimórfico *Ustilago maydis* de 20 Mb (**Kämper y col., 2006**), y en los zigomicetos monomórficos como *Rhizopus oryzae* el genoma es de 45.3 Mb (**Ma y col., 2009**), y *Phycomyces blakesleeanus* de 30 Mb (**Corrochano y Ruiz-Albert, 2004**).

M. circinelloides es considerado también un hongo patógeno emergente en pacientes inmunodeprimidos, debido a que genera mucormicosis, una enfermedad que afecta a la piel y al sistema respiratorio, con una alta tasa de mortalidad (**Bastidas y col., 2012**). Además se ha asociado a la contaminación de frutos como el noni (**Nishijima y col., 2011**); también se ha sugerido su papel como huésped para la producción de proteínas heterólogas (**Wolff y Arnau., 2002**) y como posible productor de ácidos grasos para la obtención de energía renovable como el biodiesel (**Xia y col., 2011**). Además su metabolismo fermentativo ha sido investigado para la obtención de etanol, evaluando el rendimiento de esta producción al modificar las condiciones de crecimiento (**Wikandariy col., 2012**).

El evento de diferenciación más estudiado en *M. circinelloides* es el dimorfismo debido a su capacidad de desarrollarse como levadura o micelio dependiendo las condiciones de crecimiento (**Fig. 2**) (**Lübbehüsen y col., 2003**). No obstante *M. circinelloides* presenta otros eventos de diferenciación, como la formación de esporangioforos, la síntesis de carotenos inducida por la presencia de luz donde genera colonias con tonalidad amarillenta a diferencia de las albinas crecidas en oscuridad. Además, por la presencia de luz el desarrollo de estructuras reproductivas y la esporulación igualmente se acelera (**Murcia-Flores y col., 2008**).

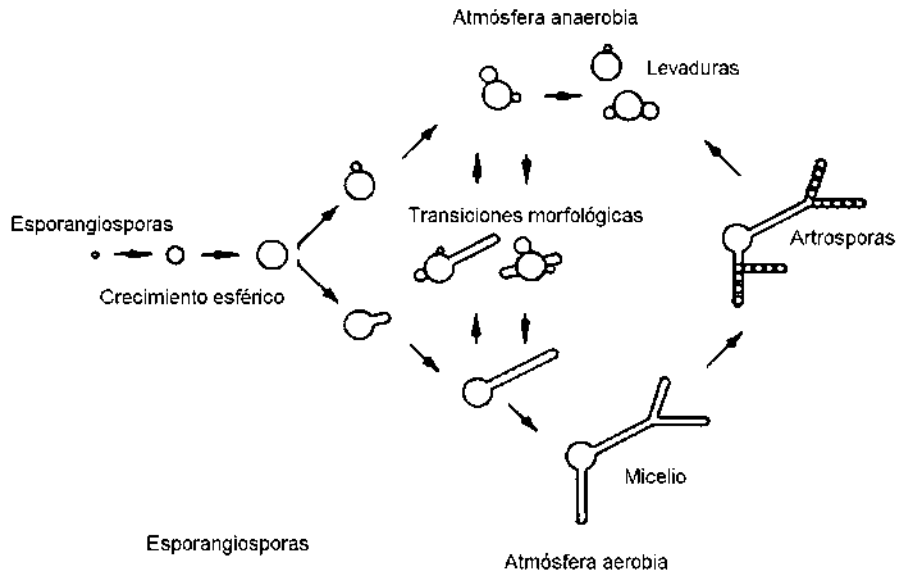


Figura 2. Ciclos de vida de *Mucor circinelloides* en cultivo líquido. Las esporangiosporas son capaces de desarrollar levaduras o micelio dependiendo de las condiciones ambientales. Cultivos maduros de micelio pueden formar artrosporas capaces de desarrollar levaduras o micelio dependiendo de las condiciones de crecimiento. Intercambio entre las morfologías de levadura y micelio, son posibles modificando las condiciones atmosféricas. El cambio de condiciones aéreas a anaeróbicas provoca que el micelio produzca levaduras, mientras que anaerobiosis a aerobiosis conduce a la formación de micelio a partir de levaduras (Modificada de Orłowski, 1991).

1.1.3 El dimorfismo fúngico como modelo de diferenciación celular

Una definición de diferenciación celular se refiere al proceso mediante el cual una célula adquiere propiedades metabólicas, estructurales y funcionales distintas a las de sus células progenitoras sin alterar el contenido de material genético (**Tazi y Zeiger, 2002**). La diferenciación celular depende de cambios en la expresión de genes que permite a las células convertirse en células con una función especializada, que provienen de una célula madre no diferenciada (células madre, esporas, semillas, entre otras) (**Segura, 1993; Kalthoff, 1996**).

El proceso de diferenciación celular es universal, desde microorganismos hasta mamíferos y plantas. Los microorganismos poseen sistemas de detección para responder a las señales externas que les permiten adaptarse a nuevas condiciones. Si las moléculas de señalización son producidas por el mismo microorganismo a este proceso se le conoce como detección de quórum (**Camilli y Bassler, 2006**). Algunos microorganismos son capaces de diferenciarse en subpoblaciones de células fenotípicamente distintas, pero genéticamente idénticos. Por ejemplo, en la esporulación de *Bacillus subtilis* puede haber dos subpoblaciones distintas en momentos determinados: células esporulantes o no esporulantes (**Veening y Smits, 2008**). Por otra parte, la diferenciación celular es un proceso básico en el desarrollo de los organismos multicelulares, a través del cual se generan los diversos tipos de células a partir de una célula embrionaria/madre para la construcción de diferentes tejidos y órganos de animales o plantas (**Jiarui, 2011**).

Las bases de los mecanismos moleculares de la diferenciación celular son a menudo comunes especialmente entre hongos y animales, aunque presentan ciertas variaciones (**Bahn y col., 2007**). Los estudios realizados en diferentes líneas celulares de mamíferos han demostrado que la diferenciación involucra una estricta regulación genética, que implica la inactivación o activación de genes en respuesta a una señal (o estímulo) específica (**Palomero y Vázquez, 2005**). Estas señales generalmente son elementos como vitaminas, hormonas, factores de crecimiento, nutrientes o incluso algunos iones, como el calcio. La detección celular de estas

señales genera la activación intracelular de vías metabólicas, denominadas vías de transducción de señales, provocando la modificación morfológica y funcional de la célula que está diferenciándose (**Cediel, 2009**).

Una forma de resumir un proceso de diferenciación celular involucra las siguientes etapas:

1. **Recepción de la señal.** Debe existir un receptor específico que perciba una señal, esto considerando que el inicio de la diferenciación celular depende de una señal específica.
2. **Decodificación de la señal.** La señal inicial debe ser transformada en un “lenguaje” que la célula comprenda, lo cual por lo general se lleva a cabo a través de una serie de reacciones bioquímicas, conocidas como vía de transducción de señales.
3. **Cambio en la programación celular.** La decodificación de la señal inicial, provoca cambios transcripcionales, traduccionales y postraduccionales para permitir que la célula se adapte a los cambios inducidos.
4. **Resultado celular final:** Finalmente en esta etapa se presentan cambios fisiológicos y/o morfológicos de manera cuantitativa. Específicamente en el dimorfismo fúngico, este resultado puede generar cambios en la forma celular.

Algunos hongos ya sean ascomicetos, basidiomicetos o zigomicetos, tienen el potencial de generar un proceso dimórfico, en donde el estadio inicial (célula madre) que por lo general es la espora asexual, tiene la capacidad de generar células especializadas con morfologías diferentes, regularmente levaduras o micelio. El dimorfismo es la capacidad de presentar una dualidad fenotípica, aunada a un proceso de diferenciación celular. El dimorfismo se presenta por los cambios ambientales como la humedad, pH, temperatura, nutrientes y disponibilidad de oxígeno, entre otros factores. En consecuencia, el hongo modifica su fisiología y

morfología de tal manera que pueda adaptarse a las nuevas condiciones ambientales **(Lozano y col., 2005)**.

En el caso de los patógenos fúngicos dimórficos, estos organismos son sometidos a un proceso de diferenciación celular que permite la transición entre una forma saprofita que habita en el medio ambiente (el suelo), la otra estructura parasitaria que habita en el huésped **(Rappleye y Goldman, 2006)**. El dimorfismo es considerado un factor de virulencia en los hongos debido a la capacidad de algunas de estas morfologías para adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento del huésped **(Klein y Tebbets, 2007)**. Por ejemplo, *Candida albicans* se desarrolla como levadura en las mucosas del humano; sin embargo, al infiltrarse en tejidos se convierte a micelio, causando una infección invasiva altamente mortal; mutantes monomórficas de *C. albicans* incapaces de formar micelio son menos virulentas **(Yamada-Okabe y col., 1999)**. Un dato interesante es que el mismo estímulo puede generar respuestas distintas en diversos hongos, por ejemplo, el choque térmico induce transiciones de micelio a levadura en diversos hongos, pero en *C. albicans* provoca la transición de levadura a micelio **(Soll, 1985)**.

Existen dos vías principales de transducción de señales que regulan la morfogénesis en hongos. La vía de las MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) y la vía de la PKA (Protein Kinase A). Ambas vías están altamente conservadas en los hongos **(Kozubowsk y col., 2009)**. Los componentes de las vías de MAPK y PKA funcionan como amplificadores de la señal inicial, la cual hace contacto primero con un receptor, que por lo general pertenece a la familia de proteínas acoplado a proteínas G heterotriméricas (GPCR, del Inglés G Protein-Coupled Receptor) **(Li y col., 2007)**.

1.2 Generalidades de las Proteínas G

Las proteínas G reciben su nombre por su capacidad de unir e hidrolizar nucleótidos de guanina (**Sánchez Paredes y col., 2007**). Dentro de estas proteínas existen dos grandes familias: proteínas G monoméricas (también llamadas pequeñas) que generalmente son polipéptidos individuales de alrededor de 200 aminoácidos y las proteínas G heterotriméricas que están constituidas por tres subunidades proteicas diferentes: una subunidad $G\alpha$ (la que une e hidroliza los nucleótidos), $G\beta$ y $G\gamma$ (**Melvin y col., 2013**). Entre las proteínas G monoméricas se incluyen a las: subfamilias Ras que regulan principalmente la expresión de genes y han sido asociadas a procesos de oncogénesis (**Repasky y col., 2004**); proteínas Rho involucradas en la reorganización del citoesqueleto, regulación de actina y del ciclo celular (**Etienne-Manneville y Hall, 2002**); las proteínas Ran que participan en el transporte nucleocitoplasmático del RNA y proteínas durante el ciclo celular (**Weis, 2003**), y las proteínas Rab y Arf están involucradas en el tráfico intracelular de vesículas de las rutas endocíticas y exocíticas entre diferentes organelos (**Takai y col., 2001**; **Zerial y McBride, 2001**).

Las proteínas G actúan como interruptores moleculares, ciclando entre un estado activo (unión a GTP) o inactivo (unión a GDP) y de esta manera favorecen o reprimen vías de transducción de señales. Por otro lado, las proteínas G heterotriméricas participan como transductores de señales extracelulares al interactuar con receptores acoplados a proteínas G (GPCR).

Todas las proteínas G tienen secuencias de aminoácidos consenso para interactuar específicamente con los nucleótidos de guanina y donde se localiza la actividad de GTPasa. La subunidad $G\alpha$ muestra homología con las proteínas G monoméricas (principalmente con las proteínas tipo Arf), debido a que ambos tienen actividad intrínseca de GTPasa y comparten los dominios (G1 al G5) para dichas funciones. Sin embargo, la diferencia entre las proteínas G monoméricas y la subunidad $G\alpha$ radica en que esta última es más grande, por lo regular entre (35 y 45 kDa), en comparación con las subunidades G pequeñas (20-25 kDa). Además,

las proteínas G monoméricas carecen de los residuos necesarios para la interacción con la subunidad G β (**Takai y col., 2001**). En cuanto a las subunidades G β y G γ , son proteínas de peso molecular entre 15 y 10 kDa respectivamente, las cuales forman un dímero muy estable que en condiciones fisiológicas no se disocia (**Schwindinger y Robishaw, 2001**).

1.2.1 Proteínas G heterotriméricas

La subunidad G α de las proteínas G heterotriméricas fue descubierta hace 40 años como un regulador de la actividad de GTPasa, acoplado a los receptores β -adrenérgico y rodopsina. Miembros de la familia G α han sido purificados y caracterizados a nivel bioquímico (**Sprang, 2016**).

Las proteínas G heterotriméricas se han descrito en todos los eucariotes, participan en diferentes procesos biológicos como el crecimiento, diferenciación celular, patogénesis, y respuesta a factores de crecimiento en hongos, plantas y mamíferos (**Valle-Maldonado y col., 2015**).

La actividad de la subunidad G α está asociada a un estado de inactivación o activación dependiendo del nucleótido GDP o GTP unido a dicha subunidad, respectivamente. El mecanismo canónico de regulación indica que en ausencia de una señal o estímulo, el heterotrímero permanece asociado e inactivo (G $\alpha\beta\gamma$) (**Sprang, 2016**). El heterotrímero inactivo está anclado en la membrana plasmática mediante las subunidades G α y G γ , las cuales son susceptibles de presentar modificaciones postraduccionales (miristoilación para G α y farnesilación o geranilgeranilación para G γ), que favorece la interacción con la membrana celular. La subunidad G α además de hacer contacto con el receptor tipo GPCR, se mantiene unida al dímero G $\beta\gamma$; este heterotrímero es descrito funcionalmente como inactivo (**Tesmer, 2010**). Mientras, que al llevarse a cabo la unión de un agonista (estímulo extracelular) a un receptor tipo GPCR, esto conduce a la activación del receptor. Dicho receptor cambia su conformación estructural y transduce la señal a la

subunidad $G\alpha$, la cual también sufre un cambio conformacional disminuyendo la afinidad por el GDP y aumentando la afinidad por el GTP, generándose el intercambio de GDP por GTP en dicha subunidad $G\alpha$. Este intercambio en la subunidad $G\alpha$ por GTP disminuye la interacción con el receptor, así como con el dímero $G\beta\gamma$ provocando a la disociación de las dos unidades de señalización: el dímero $G\beta\gamma$ y la subunidad $G\alpha$ -GTP. Las dos unidades de señalización interactúan con distintos efectores (enzimas, canales iónicos entre otros) (**Tabla 1**) lo que permite la regulación de segundos mensajeros, como AMP cíclico, diacilglicerol, inositol trisfosfato y Ca^{+2} , entre otros (**Han y col., 2004; Tesmer, 2010**).

Posteriormente, mediante la estimulación de la actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad $G\alpha$, se lleva a cabo la hidrólisis de GTP a GDP. De esta manera la subunidad $G\alpha$ -GDP se reasocia nuevamente con el receptor GPCR y el dímero $G\beta\gamma$, formando el heterotrímero inactivado $G\alpha\beta\gamma$ preparado para una nueva ronda de señalización.

En hongos se ha descrito que la señalización mediada por proteínas G heterotriméricas se transmite a través de diversas vías: **1)** adenilato ciclasa/AMPC/PKA, **2)** Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y **3)** diacilglicerol dependiente de proteínas cinasa C (**Morris y Malbond, 1999; Feldbrügge y col., 2004, McCudden y col., 2015**).

Tabla 1. Efectores de proteínas G α heterotriméricas

Efactor	Descripción de actividad	Referencia
Adenilato ciclasa	Aumenta los niveles de AMPc, activando la actividad de PKA.	Helen y col., 2015.
Proteína cinasa activada por mitógenos (MAP)	Reacciones de fosforilación consecutivas en residuos Ser/Thr.	Jae-Hyuk, 2006.
Fosfodiesterasa	Catabolizan el AMPc, transformándolo en 5'-AMP.	Artemeyev y col., 1992.
Guanilato ciclasa	Cataliza la conversión de GTP en GMPc.	Helen y col., 2015.
Fosfolipasa C (PLC)	Enzima generadora de Inositol trisfosfato (IP3) y Diacilglicerol (DAG).	Smrcka y col., 2012.
Proteína cinasa C	La subunidad catalítica fosforila proteínas específicas en residuos Ser/Thr.	Pao y col., 2009.
Canales iónicos (K ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻)	Permiten el paso de iones a favor de su gradiente de potencial.	Zhang y col., 2011.

1.2.2 Regulación de la actividad de las proteínas G heterotriméricas

El estado de actividad de las proteínas G define su función biológica y es regulado por dos procesos: la tasa de intercambio de GDP por GTP y la velocidad de hidrólisis del GTP a GDP. El primer proceso es catalizado por factores de intercambio de nucleótidos de guanina GEF (Guanine Exchange Factors). Se ha propuesto a los receptores GPCRs como proteínas tipo GEF, que cuando ocurre la unión del ligando y la activación correspondiente del receptor promueve el intercambio de nucleótidos (GDP por GTP) en la subunidad $G\alpha$ (**Fig. 3**). Sin embargo, existen ejemplos de proteínas tipo GEF que no son receptores GPCR, como Ric8 en el hongo filamentoso *Neurospora crassa*. Mutantes carentes de este gen funcional 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**). El segundo proceso que corresponde a la hidrólisis de las proteínas G es regulado por una familia de proteínas denominadas proteínas activadoras de GTPasa GAP (GTPase Activating Protein) como la enzima SST2 de *Saccharomyces cerevisiae* la cual se une a la subunidad GPA1p, actuando como un regulador negativo de esta subunidad. De esta manera, las proteínas GEFs y GAPs son reguladoras de la señalización por proteínas G y se denominan RGSs (Regulator of G-Protein Signaling) (**Johannes y col., 2007**).

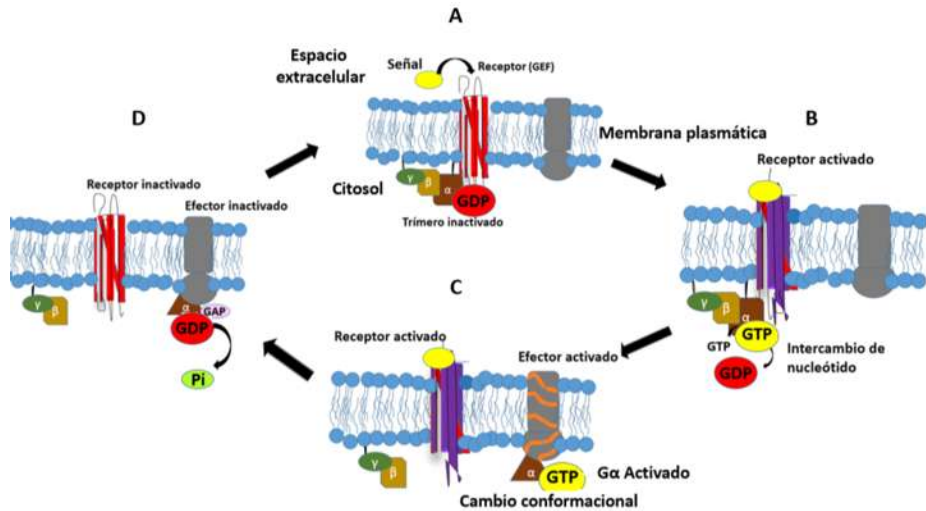


Figura 3. Ciclo de activación de las proteínas G heterotriméricas. A. Inicialmente el heterotrímico se halla anclado en la membrana mediante contacto directo de las subunidades $G\alpha$ y $G\gamma$ con la membrana. La proteína $G\alpha$, está unida a GDP en un estado inactivo. **B.** Al haber un reconocimiento de una señal extracelular por parte del receptor, la proteína G se activa modificando su conformación, liberando el GDP y aumentando su afinidad por GTP. **C.** De esta manera se separa la subunidad $G\alpha$ -GTP y el dímero $G\beta\gamma$, y la subunidad $G\alpha$ -GTP es capaz de interactuar con un efector activándolo. **D.** El ciclo se completa cuando la señal extracelular es liberada por el receptor de membrana, el GTP de la subunidad $G\alpha$ -GTP es hidrolizado a GDP y el heterotrímico se vuelve a asociar, para lo cual se requiere de la participación de una proteína reguladora de la señalización denominada RGS (Regulator of G-Protein Signaling) el dímero $G\beta\gamma$ aumentan su afinidad por la subunidad $G\alpha$, que a su vez hidroliza el GTP a GDP y se une a las otras dos subunidades, inactivándose **(Modificada de McCudden y col., 2005; Milligan y Kostenis, 2006).**

1.2.3 Proteínas G α en hongos

En *S. cerevisiae* se han identificado y caracterizado dos proteínas G α , GPA1, que fue la primera subunidad de proteínas G heterotriméricas descubierta en hongos, y participa en la vía de transducción de señales mediada por la feromona. La proteína GPA1p actúa como un regulador negativo mediante la represión del heterodímero G $\beta\gamma$, ya que G $\beta\gamma$ ejerce la represión del crecimiento asexual y promueve el proceso de apareamiento (**Nakafuku y col., 1987; Kallal y Kurjal, 1997**). La segunda subunidad de *S. cerevisiae* es GPA2p, la cual participa como un regulador negativo de la esporulación (**Donzeau y Bandlow, 1999**). La primera subunidad G α caracterizada funcionalmente fue GNA-1 (G α) de *N. crassa* que tiene un 55% de identidad respecto a G α 2 de *Mucor musculus* y se describe como un regulador positivo en el crecimiento de hifas (**Turner y Borkovich, 1993; Ivey y col., 1996**).

De igual manera, las primeras subunidades G β (Ste4p) y G γ (Ste18p) fúngicas fueron descubiertas en *S. cerevisiae* (**Whiteway y col., 1989**). Desde entonces ha habido mucho interés en el estudio de las subunidades G α , G β y G γ de hongos debido a su participación en diversos procesos, como morfogénesis (**Sánchez-Martínez y Pérez-Martín, 2002**), patogénesis (**Mukherjee y col., en 2006**) y reproducción (**Donzeau y Bandlow, 1999**), entre otros.

Las proteínas G α de hongos basándose en similitudes de sus secuencia de aminoácidos, y en relación a las subunidades G α de mamífero se clasifican dentro de cuatro grupos filogenéticos principales (**Bölker, 1998; Valle-Maldonado y col, 2015**) El I se relaciona con las subunidades G α_i (i, del inglés inhibitory) de mamíferos, las cuales inhiben la actividad de la adenilato ciclasa; en el III están relacionadas con las subunidades G α_s (s, del inglés stimulatory) de mamífero, que estimulan la actividad de la adenilato ciclasa. Mientras que los grupos II y IV de hongos no han sido asociados a subunidades de mamíferos (**Bölker, 1998; Li y col., 2007**). Las proteínas G de hongos clasificadas dentro del grupo III, tienen una participación por lo general en el crecimiento y desarrollo, incluyendo procesos de

esporulación y germinación, así como en la patogénesis (Mi-Hee y col., 2004), mientras que a las proteínas G heterotriméricas fúngicas que pertenecen al grupo IV no se les ha demostrado a la fecha una función (Valle-Maldonado y col., 2015).

En general, en los hongos las proteínas G heterotriméricas están involucradas en vías de transducción de señales involucradas en la regulación del crecimiento, la morfogénesis, el desarrollo y producción sexual y asexual de esporas y la patogenicidad, entre otros procesos (Tabla 2) (Nak-Jung y col., 2012).

1.2.4 Función de las proteínas G heterotriméricas en hongos

Se ha descrito la participación de las proteínas G heterotriméricas en diversas rutas de señalización. En el caso del apareamiento de *S. cerevisiae*, la feromona al ser reconocida por los GPCRs, STE2p o STE3p, el heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$ ($G\alpha/Gpa1p$, $G\beta/Ste4p$ y $G\gamma/Ste18p$) se disocia y la unidad de señalización $G\beta\gamma$ activa a la tirosina cinasa STE20p una proteína clave en la regulación de la cascada de las MAPK (Fig. 4A). El hongo heterotálico *Magnaporthe grisea* tiene tres subunidades $G\alpha$ (MagA, MagB y MagC) y una $G\beta$ (Mgb1); la mutación de los genes *MagB* y *Mgb1* conducen a esterilidad (Li y col., 2007).

También se han descrito la participación de las proteínas G heterotriméricas en respuesta a nutrientes en hongos; por ejemplo, en *A. nidulans* (Mi-Hee y col., 2004) y *Botrytis cinerea* (Li y col., 2007) está demostrada la necesidad de una fuente de carbono externa para inducir la esporulación. Las mutantes en el gen *ganB* de *A. nidulans* no germinan en medios libres de glucosa; sin embargo, cepas que expresan el gen *ganB* constitutivamente activo germinan en un medio libre de glucosa (Mi-Hee y col., 2004). En *C. neoformans* las mutaciones en los genes *GPA1* o *CAC1*, que codifican para una subunidad $G\alpha$ o una proteína con actividad de adenilato ciclasa, respectivamente, bloquean la síntesis de melanina, factor de virulencia en respuesta a glucosa; la suplementación con AMPc restaura la producción de melanina en estas mutantes (Fig. 4B) (Li y col., 2007; Kozubowski y col., 2009).

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

Hongo	Phylum	Número de subunidades G α	Grupo*	Función	Referencia
<i>Aspergillus nidulans</i>	Ascomycota	FadA	I	Regulación positivo del crecimiento y negativo de la esporulación asexual. Regulación negativa de la esporulación asexual. Regulación de la esporulación sexual y asexual en respuesta a glucosa	Hicks y col., 1997. Li y col., 2007; Mi-Hee y col., 2004.
		GanB	III		
<i>Neurospora crassa</i>	Ascomycota	GNA1	I	Resistencia al calor Regulación negativa de la esporulación asexual	Sona y col., 2004. Kays y col., 2000.
		GNA3	III		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	Gpa1	II	Reconocimiento de feromonas Regulación negativa de la esporulación	Kallal y Kurjal, 1997; Versele, 2001. Donzeau y Bandlow, 1999.
		Gpa2	III		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Ascomycota	Gpa2	LII	Detección de glucosa	Whelton y Holfman, 2000.
<i>Fusarium oxysporum</i>		FGA1	I	Virulencia y resistencia al calor Virulencia	Sona y col., 2004. Sona y col., 2004.
		FGA2	III		
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Ascomycota	CPG1	L	Virulencia	Sona y col., 2004.
<i>Magnaporthe grisea</i>	Ascomycota	MagA	III	Reproducción asexual	Li y col., 2007. Sona y col., 2004.
		MagB	I	Virulencia	
<i>Candida albicans</i>	Ascomycota	Gpa2	LII	Transición de Levadura a Micelio	Sánchez-Martínez y Pérez-Martín, 2002.
<i>Ustilago maydis</i>	Basidiomycota	Gpa3	LII	Virulencia	Sona y col., 2004.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Basidiomycota	Gpa1	LII	Reproducción asexual y virulencia	Sona y col., 2004; Tolkacheva y col., 1994.

*Grupos I a III corresponden a los distintos grupos filogenéticos que agrupan las proteínas G α de hongos (Bölker, 1998).

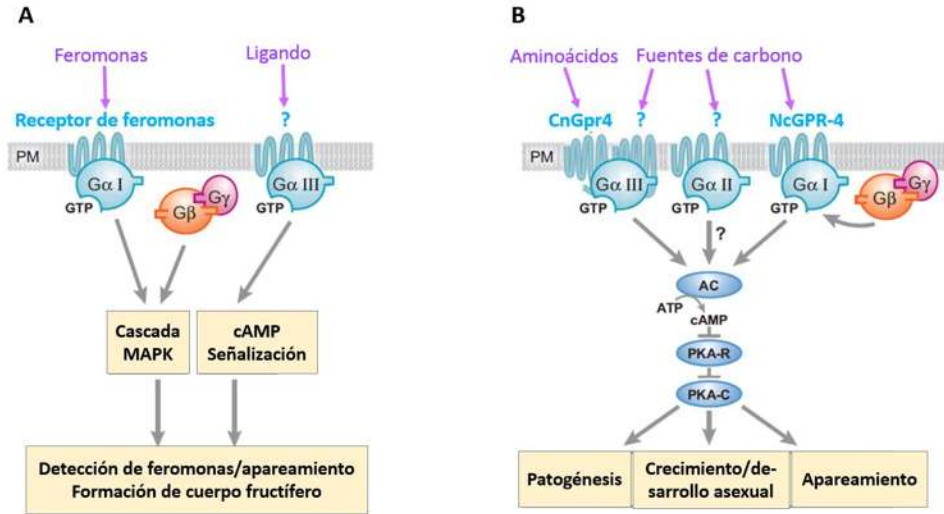


Figura 4. Vías de señalización en la respuesta a feromonas, apareamiento y detección de nutrientes en hongos ascomicetos. A. Respuesta a feromonas y apareamiento; las primeras se unen a su receptor (GPCR) que se encuentra en la membrana plasmática. En varios sistemas, las proteínas G α ó G $\beta\gamma$ activan la vía de las MAPK dando lugar a la expresión de genes implicados en el apareamiento; otros tipos de GPCR regulan la expresión de genes implicados en apareamiento vía AMPc. **B.** La adenilato ciclasa (AC) cataliza la producción de AMPc a partir de ATP. La unión de AMPc con la proteína PKA-R (subunidad reguladora) resultado en la liberación de PKA-C (subunidad catalítica), la cual fosforila a factores de transcripción implicados en la regulación de genes que controlan el crecimiento, el desarrollo asexual, el apareamiento y la patogénesis (**Modificada de Li y col., 2007**).

1.2.5 Genes involucrados en la esporulación en hongos

Las esporas son la forma quiescente de la vida microbiana, cuya función es preservar el material genético cuando las condiciones son desfavorables para el ciclo de vida vegetativo normal (**Noothalapati y col., 2016**). En bacterias como *B. subtilis* el propósito de la esporulación es producir células latentes metabólicamente inactivas (**Tan y Ramamurthi., 2014**). En el hongo *A. nidulans* en respuesta a señales internas y/o externas (deficiencia de nutrientes) las células reprimen el crecimiento vegetativo en forma de hifa y comienzan la formación del conidióforo (estructura que almacena las conidias/conidios, las cuales son llamadas las esporas asexuales en ascomicetos) (**Hee-Soo y Jae-Hyuk, 2012**).

La esporulación es un proceso biológico heterogéneo en los hongos, a diferencia de las bacterias. Dependiendo de la clase de hongos (ascomiceto, zigomiceto, etc); éstos muestran variaciones en el proceso de formar esporas; incluso dentro de la misma clase existen diferencias. Gran cantidad de ascomicetos levaduriformes como *S. cerevisiae* no producen esporas asexuales, sólo sexuales. En el caso contrario, los ascomicetos miceliales como *A. nidulans*, *crassa* y *Penicillium chrysogenum*, entre otros, producen esporas asexuales (llamadas generalmente conidias). Dichas esporas incluso son producidas en estructuras diversas entre las distintas especies, por lo que la definición molecular de los detalles que controlan el proceso de generación de esporas en hongos es poco atendida respecto a lo que se ha logrado avanzar en bacterias. A la fecha la esporulación en hongos se refiere tanto al proceso de generación de esporas como a la morfología de las esporas y del cuerpo fructífero que las genera. También funciones asociadas a la fisiología de las esporas: la germinación y viabilidad de las mismas en diferentes condiciones estresantes. *A. nidulans* y *N. crassa* son los hongos miceliales donde se conocen más detalles moleculares del proceso de esporulación asexual (**Hee-Soo y Jae-Hyuk., 2012**). En *A. nidulans* el desarrollo de conidias, al igual que en otros ascomicetos filamentosos, comienza con la germinación de una espора lo que conduce a la formación de hifas que ramifican

para formar una red de células interconectadas conocido como micelio. Aproximadamente 24 horas después de la germinación de las esporas en un sustrato sólido, algunas de estas hifas se especializan, comenzando con el crecimiento de un tallo que se alarga por extensión apical de una rama aérea al igual que las hifas de crecimiento vegetativo. La punta del tallo comienza a diferenciarse para dar lugar a células hinchadas que dan forma a una vesícula multinucleada que se somete a repetidas divisiones mitóticas para formar capas de esterigmas, una capa primaria (métula) y una capa secundaria (phialides) que generan cadenas de conidias para el posterior brote de las mismas **(Fig. 5) (Adams y col., 1998; Hee-Soo y Jae-Hyuk, 2012).**

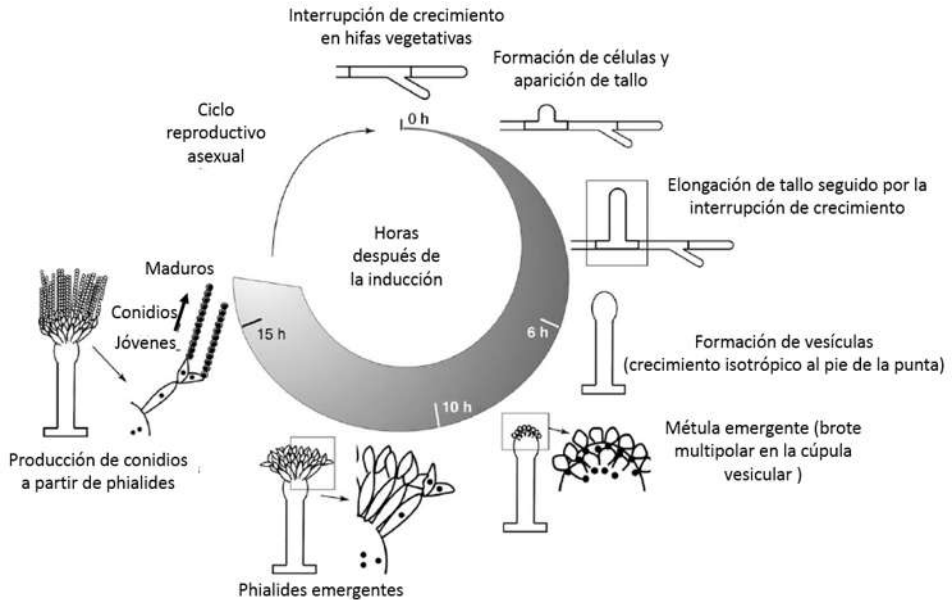


Figura 5. Transformaciones morfológicas para la generación del conidióforo en *Aspergillus nidulans*. Después de un cambio en las condiciones ambientales (tiempo cero), el crecimiento polar se inhibe en las hifas vegetativas. Entonces, una célula basal desarrolla una segunda pared interna para formar otra célula, de la cual el tallo sube y se alarga hasta alcanzar una longitud definida. El crecimiento isotrópico de la punta del tallo genera la vesícula. Después de múltiples divisiones mitóticas, los núcleos (puntos negros) se distribuyen a lo largo de la cúpula de la vesícula, de la cual se emiten aproximadamente 60 métulas mononucleadas. Después de una extensión polar limitada, las métulas emergen apicalmente en phialides, lo que da lugar a largas cadenas de conidios. Esto significa que los conidios jóvenes están cerca de la phialide mientras que los conidios viejos se localizan en el extremo opuesto de la cadena. Se forman conidióforos maduros 15 h después de la inducción del proceso (**Modificado de Etxebeste y col., 2010**).

En los Zigomicetos, como *Phycomyces*, hongo monomórfico filamentosos, heterotálico y con ciclo de vida sexual y asexual, éste inicia su ciclo vegetativo con la germinación de las esporas, donde se extienden las hifas de forma radial por encima del sustrato sólido a una velocidad de ≈ 20 mm al día (**Drinkard y col., 1982**). Los esporangióforos, que son la forma diferenciada de hifas aéreas, que se desarrollan en varias etapas: primero, el esporangióforo se elonga por su ápice y forma una esfera amarilla brillante que es el esporangio, en este se van acumulando núcleos y citoplasma hasta que se forma una tabique, denominado columnela, que separa el esporangio del resto del esporangioforo. El contenido del esporangio se divide en compartimientos, que engloban grupos de núcleos tomados al azar y se convierten en esporas (**Tu y Malhotra, 1976; Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968**); la distribución del número de núcleos por espóra varía ampliamente entre especies de hongos. El esporangio se vuelve de color negro metalizado y el esporangióforo continúa creciendo apicalmente a velocidad constante (≈ 1 $\mu\text{m/s}$) durante varios días.

Se han descrito constituyentes de distintas vías metabólicas que participan en la regulación de la esporulación en diversos hongos. En *A. nidulans*, mutantes en el gen *brlA*, el cual codifica para un factor de transcripción con dominio tipo dedos de zinc, conducen a una deformación en el desarrollo de vesículas y esterigmas; por el contrario, la sobreexpresión de este gen en el crecimiento vegetativo conduce a la formación de conidios viables directamente de la punta de las hifas, lo que sugiere que el producto del gen *brlA* está involucrado en el desarrollo del conidióforo (**Hee-Soo y Jae-Hyuk., 2012**).

En *M. circinelloides*, el gen *mcwc-1a*, que codifica para un fotorreceptor asociado a las esporangiosporas está involucrado en la respuesta a la luz al generar un fototropismo positivo. La mutación en dicho gen provocó en los esporangios la incapacidad de orientarse respecto a la dirección de la luz (**Silva y col. 2008**). El producto del gen *crgA*, que codifica para una E3 ubiquitina ligasa (enzima que participa en el último paso de la ubiquitinación de proteínas para su posterior

degradación) está involucrado en la regulación negativa de la carotenogénesis y en la esporulación de manera positiva (**Navarro y col., 2000, Lorca-Pascual y col., 2004**). También se ha demostrado que el gen *mcwc-1b* está asociado genéticamente a *crgA*, debido a que su sobreexpresión en una cepa *crgAΔ* restaura el defecto de esporulación (**Navarro y col., 2013**). La proteína PKA tiene una función importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación de *M. circinelloides*; mutantes en la isoforma de *pkaR1* muestran reducción en crecimiento, y alteración en la velocidad de germinación, longitud del tubo germinal y esporulación asexual (**Ocampo y col., 2012**). Por otra parte, la subunidad catalítica de la calcineurina CnaA de *M. circinelloides* está involucrada en la regulación negativa del tamaño de las esporas; mutantes en el gen *cnaA* generan esporas más grandes (15 μM) respecto a la cepa silvestre (10 μM), aunque no se conoce el mecanismo molecular de la regulación de este proceso (**Li y col., 2013**). Sin embargo, se sabe que el cambio en el tamaño de la espora tiene implicaciones en la patogénesis, ya que una disminución o aumento del tamaño, genera una menor o mayor germinación y virulencia (**Li y col., 2011**).

Donzeau y Bandlow demostraron que GPA2p 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. En *A. nidulans*, la subunidad $G\alpha$ denominada FadA está implicada en la regulación negativa de la esporulación asexual a través de la vía de la PKA (**Hicks y col., 1997; Nak-Jung y col., 2012**). Por otro lado, la proteína GanB, una subunidad $G\alpha$ de *A. nidulans*, regula negativamente la formación de esporas y actúa como un regulador positivo de la germinación de esporas en respuesta al estrés (**Nak-Jung y col., 2012**). Las vías de señalización en la que están involucradas las proteínas G heterotráméricas también han sido asociadas a la formación de esporas en *N. crassa* que posee tres subunidades $G\alpha$ (GNA1 a GNA3); la delección de GNA3 conduce a una inactivación de la adenilato ciclasa, reduciendo los niveles intracelulares de AMPc, GNA3 actúa como un regulador negativo de la esporulación (**Kays y col., 2000; Sona y col., 2004**).

11.3.1 Proteínas G α en *Mucor circinelloides*

En *M. circinelloides* fueron identificados 12 genes que codifican para probables subunidades G α (*gpa1-gpa12*). Dichos genes presentaron distinto número y distribución de exones e intrones, así como también codificaron para proteínas diferentes, por lo que se dedujo que son genes distintos. El análisis filogenético de las subunidades G α de *M. circinelloides* permitió que, se clasificaron en el grupo I (Gpa1-3, Gpa8, y Gpa11), en el II (Gpa5 y Gpa6) y en el III (Gpa7, Gpa9, Gpa10 y Gpa12). Por otra parte, no hubo representantes por el grupo IV en este Mucoral. El producto de los genes *gpa11* y *gpa12* mostraron un porcentaje de identidad del 60% con las subunidades FadA y GanB de *A. nidulans*, respectivamente (**Fig. 6**) (Valle-Maldonado y col., 2015).

En los hongos dependiendo de la morfología, se han descrito cambios en los niveles de los transcritos que codifican para las distintas subunidades G α . Dichos cambios pueden tener implicaciones en la función de las diferentes subunidades (Landry y col., 2000; Schmoll y col 2009). En *M. circinelloides* se cuantificaron los niveles de transcrito de todas las subunidades G heterotriméricas en el dimorfismo. Se demostró que los genes *gpa1*, *gpa2* y *gpa9* presentaron bajos niveles de expresión en todas las condiciones morfológicas analizadas, mientras que *gpa3* y *gpa4* presentaron niveles de RNAm relativamente altos comparado con los demás en todas las condiciones ensayadas (Fig. 7). Por otra parte, los genes *gpa11* y *gpa12* mostraron alta expresión en la condición de esporas respecto a todos los demás genes G alfa (incluso el de los niveles de RNAm de los G β y G γ). Los niveles de RNAm de *gpa11* presentes en la morfología de esporas, disminuyeron significativamente en el desarrollo vegetativo. En cambio, el gen *gpa12* mostró una alta expresión en el estadio morfológico de espора y aunque también disminuyó en el crecimiento micelial, estos niveles permanecieron relativamente altos en el crecimiento de la levadura respecto a los RNAm de los demás genes *gpa* de *M. circinelloides* en la misma morfología (Valle-Maldonado y col., 2015).

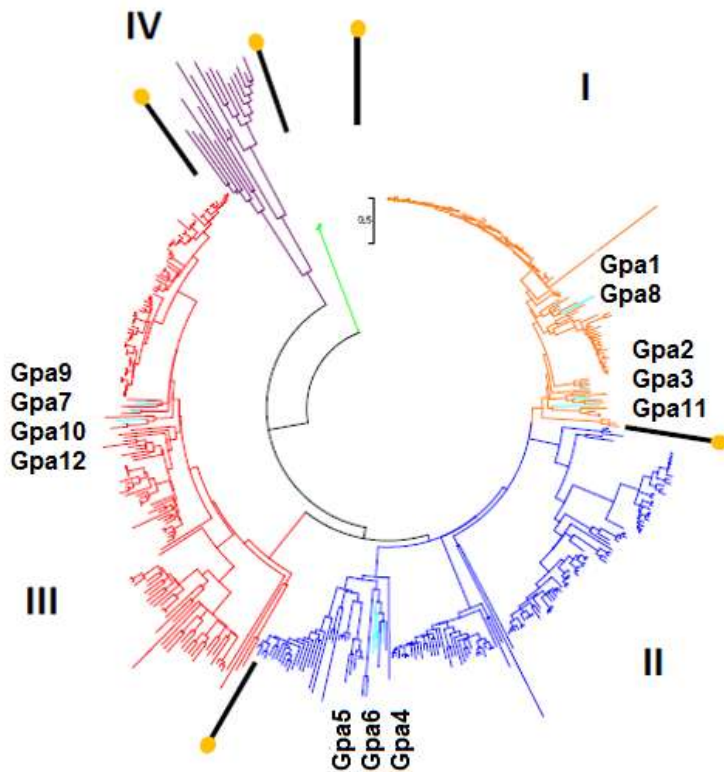


Figura 6. Análisis filogenético de subunidades G α fúngicas. La familia de la subunidad G α de hongos forma cuatro grupos principales (I-IV). Las subunidades (Gpa1 a Gpa12) G α de *M. circinelloides* se encuentran distribuidas en los Grupos I (Gpa1, Gpa2, Gpa3, Gpa8 y Gpa11); en el grupo II (Gpa4, Gpa5 y Gpa6) y en el grupo III (Gpa7, Gpa9, Gpa10 y Gpa12) (Tomada de **Valle-Maldonado y col., 2015**).

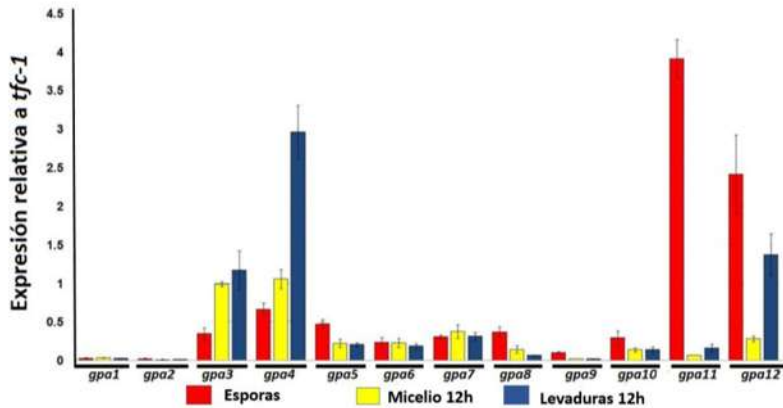


Figura 7. Expresión de los genes que codifican para subunidades $G\alpha$ durante el dimorfismo en *M. circinelloides*. Se cuantificaron los niveles de los transcritos de las subunidades *gpa1-gpa12* respecto al gen constitutivo *tfc-1* durante el dimorfismo. Los estadios morfológicos estudiados fueron: espora en rojo, crecimiento aerobio (micelio) en amarillo y crecimiento anaerobio (levaduras) en azul, ambos de 12 horas de crecimiento (Tomada y modificada de Valle-Maldonado y col., 2015).

II. JUSTIFICACION

Mucor circinelloides es el hongo que cuenta con doce Gpa1-12, el mayor repertorio de subunidades G α reportado hasta la fecha en el reino fúngico. Antecedentes directos de nuestro grupo de trabajo indican que los niveles de transcrito de los genes *gpa11* y *gpa12*, son los más altos en esporas asexuales respecto al resto de los genes *gpa* en este Mucoral. Además, dichos niveles disminuyeron significativamente durante el desarrollo vegetativo. Como la esporangiospora en *M. circinelloides* es el medio de reproducción asexual que precede al crecimiento vegetativo y además, esta estructura tiene implicaciones en latencia y virulencia, es importante definir la participación de los productos de los genes *gpa11* y *gpa12* en la esporulación asexual y germinación de este Mucoral.

III. HIPOTESIS

Las proteínas Gpa11 y Gpa12 *gpa11* y/o *gpa12* participan en la esporulación y germinación de *M. circinelloides*.

IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la participación de las proteínas Gpa11 y Gpa12 en el desarrollo de *M. circinelloides*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar la función de los productos de los genes *gpa11* y *gpa12* en la esporulación de *M. circinelloides*.
2. Demostrar la función de los productos de los genes *gpa11* y *gpa12* en la germinación aeróbica y anaeróbica de *M. circinelloides*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas y plásmidos utilizados

Fueron utilizadas las cepas de *M. circinelloides* R7B ATCC 90680 (LeuA⁻; Ura⁺), auxótrofa a leucina (**Roncero y col., 1984**), obtenida mediante mutagénesis química a partir de la cepa silvestre de sexo (-) CBS 277.49 de *Mucor racemosus* (ATCC 1216b; Schipper, 1976). Además se utilizó la cepa Mu402 (LeuA⁻; Ura⁻) que fue obtenida por mutagénesis química a partir de la R7B (LeuA⁻) (Nicolás y col., 2007) y finalmente fue usada la Mu402-P, generada a partir de Mu402 mediante la inserción genómica del gen *pyrG* (LeuA⁻; Ura⁺), donada por el Dr. Victoriano Garre, Universidad de Murcia, España.

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α (**Hanahan, 1983**) y JM101 fueron utilizadas en los experimentos de clonación y propagación de plásmidos bacterianos. Entre sus características más significativas destacan: que no permite la recombinación debido a la mutación *recA*⁻, lo que favorece la estabilidad de los plásmidos; ii) que porta una mutación *lacZ* que puede ser complementada por una amplia variedad de plásmidos utilizados habitualmente y iii) que puede mantenerse congelada en estado competente durante largos periodos de tiempo.

5.2 Medios y condiciones de crecimiento

5.2.1 *Escherichia coli*.

E. coli se cultivó a 37°C con agitación en medio nutritivo Luria Bertani (LB) (**Miller, 1972**). Cada litro contenía 10 g de peptona de caseína (BD Bioxon), 5 g de extracto de levadura (BD Bioxon) y 5 g de cloruro de sodio (J.T. Baker); para la preparación de medio sólido se añadió agar (BD Bioxon) (15 g/L) previamente a su esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de esterilizar, cuando fue necesario se adiciono 100 μ g/mL del antibiótico ampicilina (Sigma) para el crecimiento de las cepas de *E. coli* portadoras de plásmidos con el correspondiente marcador de selección dominante.

5.3 *M. circinelloides*

M. circinelloides se cultivó a 28°C en los diferentes medios:

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

Cada litro contenía 3 g de extracto de levadura (BD Bioxon), 10 g de peptona de gelatina (BD Bioxon), 20 g de dextrosa (BD Bioxon); en caso de medio sólido se adicionó 20 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) y se ajustó el pH 4.5. De ser necesario se suplementó con 0.2 mg/mL de uracilo (Sigma) (**Bartnicki-García y Nickerson, 1962**).

5.3.2 MMC (Medio Mínimo Casa-aminoácidos)

Cada litro contenía 10 g de Medio Bacto Casa-aminoácidos (BD Difco), 0,5 g de Bacto Yeast Nitrogen w/o aminoacids (BD Difco), 20 g de Dextrosa (BD Bioxon); para la preparación de medio sólido se añadió agar (BD Bioxon) (15 g/L) previamente a su esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Tras esterilizar en autoclave, se adicionó tiamina (Sigma) y niacina (Sigma) 1 µg/mL respectivamente, de ser necesario se suplementó con 0.2 mg/mL de uracilo (Sigma) (**Nicolás y col., 2007**).

5.3.3 Medio Lee

Medio mínimo, el cual se preparó con 0.25% de fosfato de potasio monobásico (Golden Bell), 0.20% de sulfato de magnesio (USB), 0.5% de sulfato de amonio (Meyer), 0.5% de cloruro de sodio (J.T. Baker), 2% de dextrosa (BD Bioxon) y 2% de agar (BD Bioxon). Así mismo, este medio líquido se utilizó para realizar curvas de germinación y crecimiento. Se ajustó el pH del medio a 5.3. Se esterilizó a 15 lb de presión a 121°C por 20 minutos. Para las cepas auxótrofas se adicionó leucina 20 µg/mL de este aminoácido (Sigma).

5.3.4 YNB (Yeast Nitrogen Base)

Cada litro contenía 1.5 g de sulfato de amonio, 1.5 g de ácido glutámico, 0.5 g de Yeast Nitrogen w/o aminoacids and amonium sulfate (BD Difco), 10 g de Dextrosa (BD Bioxon) y cuando fue necesario el medio sólido 20 g de agar (BD Bioxon). Tras esterilizar en autoclave, se adicionó tiamina y niacina 1 µg/mL respectivamente, cuando fue necesario se suplementó con leucina 20 µg/mL y/o 0.2 mg/mL de uracilo **(Lasker y Borgia., 1980)**.

En experimentos de transformación se añadió sorbitol (Sigma) a los medios de cultivo a una concentración de 0.5 M como soporte osmótico para preservar los protoplastos. En la preparación de medios sólidos, el agar se esterilizó por separado para evitar que el pH ácido de los medios impidiera la correcta polimerización. El pH fue 4.5 cuando se requirió un crecimiento normal y 2.9-3.2 cuando se necesitó obtener colonias aisladas, que permitieran analizar cultivos monospóricos en las cajas de cultivo.

5.4 Obtención y conteo de esporas vegetativas de *M. circinelloides*

Para la obtención de esporas, se creció el hongo en placas de Petri con el medio de cultivo sólido adecuado. Se inocularon 50 esporas de *M. circinelloides* y se mantuvieron a 28°C en presencia de luz durante 5 días. Las esporas se colectaron agregando 10 mL de agua destilada estéril sobre las placas y raspando cuidadosamente con un asa de plástico; posteriormente las esporas se aspiraron y depositaron en un tubo de 50 ml donde se concentraron mediante centrifugación a 5,000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada estéril. Las esporas se resuspendieron en 20 mL de H₂O destilada estéril y se conservaron a 4°C.

El conteo se realizó en un hematocitómetro (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 se multiplico por el

factor de 5×10^3 y el resultado obtenido expresa las esporas por mililitro de la muestra. Las esporas se conservaron a 4°C y emplearon en un máximo de 15 días después de su obtención.

5.5 Crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis de *M. circinelloides*

Se inocularon 5×10^5 esporas por cada mililitro de medio de cultivo. En el caso de crecimiento filamentosos, se adicionaron 20 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 125 mL y se incubaron a 28°C con agitación constante a 200 rpm. Para el crecimiento levaduriforme, los matraces Erlenmeyer de 125 mL de graduación, los cuales se llenaron en su totalidad, sobrepasando aún más la última marca de graduación (aproximadamente con 135 mL) con el medio de cultivo, con un tapón de hule del No. 5, dichos tapones se atravesaron con una aguja para la salida del CO_2 ; dentro del matraz se colocó una barra magnética, el matraz se colocó sobre un agitador magnético permitiendo una agitación constante. A este sistema se le conoce como sistema “auto-anaeróbico” (Salcedo-Hernández y Ruiz Herrera., 1993).

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

Los experimentos de transición se realizaron siguiendo las indicaciones de De la Cruz y col. (2007). Para la transición Levadura-Micelio, las esporas se germinaron en condiciones auto anaeróbicas en medio YPG, se mantuvieron por 10 horas en dichas condiciones para su posterior filtración y se depositaron en medio de cultivo fresco e incubaron en condiciones de crecimiento aeróbicas de 3 a 6 horas. Por otra parte, en la transición Micelio-Levadura las esporas se germinaron en condiciones aeróbicas en medio YPG por 5 horas antes de filtrarlas, cambiarlas a medio fresco y posterior crecimiento en anaerobiosis por 3 a 6 horas.

5.7 Cuantificación del crecimiento

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

5.8 Determinación de porcentajes de germinación de *M. circinelloides*

Se inocularon 5×10^5 esporas por cada mililitro de medio de cultivo, se tomaron alícuotas de cada matraz a las 3 y 6 horas de incubación de aproximadamente 100 μL en tubos Eppendorff de 2 mL. Inmediatamente se realizó el conteo de 100 células por muestra, identificando las células que están germinando, el resultado determina el porcentaje de esporas germinando al tiempo evaluado. También se tomaron fotografías con ayuda de la cámara del microscopio para observar diferencias en la morfología de las células en cada uno de los diferentes tiempos.

Todos los ensayos se incubaron a 28°C, por triplicado.

5.9 Análisis de imágenes

Se empleó un microscopio Optihot-2 (NIKON) y una cámara Coolpix S10 (NIKON) para capturar las imágenes correspondientes a las morfologías obtenidas a los diferentes tiempos de crecimiento; estas fueron tomadas usando los objetivos 40X y 100X.

5.10 Manipulación de ácidos nucleicos

a) **Manipulación del DNA**

El DNA de *M. circinelloides* se aisló siguiendo básicamente el protocolo descrito por van Heeswijck y Roncero (1984), con ligeras modificaciones. La extracción de DNA se realizó del micelio de *M. circinelloides* filtrado a través de papel filtro Whatmann; las muestras fueron mantenidas a 4°C hasta su procesamiento. La lisis celular se realizó mediante congelación y trituración. Se agregaron 0.4 mL de regulador de extracción (NaCl 0.4 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 8) a 0.5 mL de muestra. Posteriormente se adicionaron 80 µL de SDS al 10%, seguido de 8 µL de proteínaasa K (20 mg/mL) y se incubó por 1 hora a 60°C. Enseguida se adicionó 320 µL de NaCl 5M. Posteriormente se centrifugó la muestra por 30 min a 12,000 rpm. Se colectó el sobrenadante en tubo nuevo, se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó a -20°C por 10 min. Posteriormente se centrifugó por 20 min a 12,000 rpm, se realizaron 2 lavados con etanol al 70% y se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm, se retiró el exceso de etanol y se procedió a secar la muestra de DNA a 37°C; finalmente se resuspendió en 50 µL de agua estéril y se añadieron 3 µL de RNAasa, dejando incubar por 10 minutos a 37°C, las muestras de DNA fueron conservadas a -70°C.

5.10.1 Tratamiento del DNA con enzimas

Los tratamientos enzimáticos más usuales fueron:

Digestión con enzimas de restricción (Promega o Fermentas), que se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor.

Desfosforilación del extremo 5' con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (Roche) para evitar la autoligación de vectores. Los tratamientos se realizaron de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Ligación de fragmentos de DNA. Se realizó en volúmenes de 20µL, buffer de ligación 1X (Roche o Fermentas) y una unidad de la enzima ligada de T4 (Roche o Fermentas). En general la relación molar de vector: inserto usada fue de 1:3 las mezclas de ligación se incubaron a 16°C durante un mínimo de 2 horas.

Siempre que fue necesario las enzimas se inactivaron por medio de calor, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Tratamiento del RNA con **DNAsa I**, 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 (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl, Invitrogen). La muestra se incubó durante 30 min 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 min, para ello se empleó un incubador para microtubos de 2 mL (Eppendorf Thermomixer).

5.10.2 Extracción y cuantificación de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo con columnas de sílica (RNeasy mini kit, QIAGEN). Muestras de esporas de *Mucor circinelloides* fueron mantenidas a 4°C hasta su procesamiento. 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 desnaturante. Ambos compuestos se emplearon para inactivar ribonucleasas y para facilitar el rompimiento celular; éste fue realizado en el lisador MagNA Lyser (Roche). Para 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 gabinete de bioseguridad clase II Tipo A2 (Thermo Scientific). Las muestras fueron cuantificadas espectrofotométricamente (SmartSpec Plus Bio-Rad) a λ=260nm y λ=280nm, 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.

5.10.3 Análisis por electroforesis de los ácidos nucleicos

Para observar la integridad de la extracción de RNA y las amplificaciones generadas por los ensayos de PCR, los geles de agarosa fueron preparados al 1 % (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 el buffer de carga preparado con 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 Mix (Invitrogen) y GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas). Las condiciones de corrida fueron 120 V durante 30 min. El registro de la imagen del gel se obtuvo mediante el empleo de un foto documentador (Gel Doc XR+ Imager, Bio-Rad).

Para caracterizar plásmidos, separar fragmentos de distinto tamaño generados en las digestiones con enzimas de restricción o verificar los productos obtenidos mediante PCR, el DNA se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa). Se utilizó buffer TAE 1X y las concentraciones de agarosa variaron entre 0.7-1.5%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Para visualizar los fragmentos de DNA mediante luz ultravioleta se añadió bromuro de etidio a la agarosa a una concentración final de 0.5 µg/ mL.

La purificación de fragmentos de restricción se realizó tras su separación en geles de agarosa. Las porciones del gel que contenían los fragmentos de interés se recortaron con un bisturí y el DNA se purificó con columnas High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science) o GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y el tamaño de los plásmidos y fragmentos lineales purificados se calculó usando como referencia los marcadores λ DNA/*Hind*III (Fermentas) y GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas), respectivamente.

5.10.4 Amplificación de DNA por PCR.

El proceso de amplificación de DNA se llevó a cabo utilizando 20 pmoles de cada oligonucleótido y la enzima Herculase II Fusión Enzyme (Agilent Technologies), siguiendo en cada caso las indicaciones del fabricante. Las muestras se incubaron durante 5 min a 95°C para la desnaturalización del DNA y posteriormente se sometieron a 30 ciclos de desnaturalización (30 segundos a 95°C), alineamiento (1 minuto a la T_m de los oligonucleótidos (**Tabla 3**), utilizando la fórmula $T_m = 69,3 + 0,4 (G+C\%) - 650/\text{pb oligonucleótido}$) y polimerización (1 minuto por kb de producto a amplificar a 72°C). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de polimerización durante 10 minutos. Dada la riqueza en pares G+C de *M. circinelloides*, en todos los casos se añadió dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final del 5%. El termociclador utilizado fue Mastercycler® personal de Eppendorf.

5.10.5 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 µ 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). Los oligonucleótidos y sondas utilizadas están enlistados en la Tabla 4.

La RT-qPCR se inició por 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, 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 templada como control negativo.

5.10.6 PCR en colonia

Dicho ensayo consiste en la selección al azar de colonias de *E. coli* que crecieron en placas LB suplementadas con ampicilina posterior a los eventos independientes de transformación con los vectores pJET1.2/blunt donde estaban contenidas las diferentes construcciones utilizadas en este trabajo. Dichas colonias se sometieron a un ensayo de PCR con oligonucleótidos que flanquean el sitio múltiple de clonación del plásmido obteniendo fragmentos de tamaño variable dependiendo del fragmento analizado.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm(°C)/GC%
Gpa11-P-Fwd	CATCGCGTAAACCAAGCTCACATCTCTCTATTG	68.3/45.5
Gpa11-P-Sac-Rev	TGCAAACAACAACAAgagctcTCACAATAAAAAAGA	64.6/33.3
Gpa11-T-Sac-Fwd	GgagctcCGTACAGTCAAGAGAGCTTGACATTTGACA	71.3/48.6
Gpa11-T-Xba-Rev	CtctagaTCCACATCGACAATGATACGATTCTTGAA	68.0/40.5
PyrG-Sac-Fwd	GCACCGgagctcTGCTCAGCATTGGTACTTG	67.7/53.8
PyrG-Sac1-Rev	gagctcGTACACTGGCCATGCTATCG	69.3/57.6
12pUFow-PstI	ATACGctgcagTCTCTCTGCGTAACGAAATGG	76.9/50
12pURev-pyrG	CAAGTACCAATGCTGAGGCATGGTTGCTATGGTGATG ATGAT	82.4/45.2
12pDFow-pyrG	CGATAGCATGGCCAGTGTACCCAACAACGCAATCAAA CAACC	85.0/50
12pDRev-NotI	ATCGcggccgcAATGATGGAGATGCAGGAGAC	86.9/60.6
PyrGFow2kb	TGCCTCAGCATTGGTACTTG	62.8/50
PyrGRev2kb	GTACACTGGCCATGCTATCG	63.1/55
pyrG-R2	ATCCCACCAGAAGGAGTACATGG	66.5/52.1
11-C-Fwd	CCATCTAGTCTCCTTATTAGGGA	62.3/45.8
12-C-Fwd	GGAGAGCGTGCCTAAATCAT	63.1/50
LeuA-P-Sac-Fwd	GgagctcCTTCTATTATGCAACTCAAGTGCATGAG	70.3/47.2
LeuA-T-Sac-Rev	CgagctcCTGCAGTAGCTGTTGATGTTGTTGTTGTATCG	72.0/48.7
11Orf-Fwd-XhoI	GGCTActcgagATGGGACAATGTTGCTCTTCCA	79.1/51.5
11Orf-Rev-NotI	TACAgcggccgcAAGATGGCACAATTACAGCAAGCC	78.5/55.5
12Orf-Fwd-SalI	CACTgtcgacCAACCAGCAACGATCTTGTCAG	79.7/53.1
12Orf-Rev-NotI	CACTgcggccgcGTTGTTGGGTAAGAGAAGAAGATT	77.3/52.7
Leu4-Rev	CCGCGCTGCACAATCATTGGTCAATCTTACCG	74.5/53.1
pEUKA4-Fwd	GAGACATTGCGAAATGTTATATAAACCCAA	65.2/63.3

- Las letras en minúsculas ilustran la secuencia diana de los sitios de restricción introducidos en los oligonucleótidos.

Tabla 4. Oligonucleótidos y sondas utilizados para RT-qPCR

Secuencia (Número ID)	Oligonucleótido directo (5´-3´) Oligonucleótido reverso (5´-3´) Sonda (5´-3´) FAM-BHQ1	Tm(°C)
<i>ffc-1</i> (106349)	ATGGCGGTGACGAGGGTTT GGGCATCTGTGGCAATCTTTC TGGATGCAGAGGAAGACATCAACGC GCCAAGCGATCAGATTTGGA	68 65 69
<i>s6k</i> (171231)	GCACCTCCTATTGTTCCCATTG TGATCCGACGATTGCTTCTGT TGATCCTGAAGCTGCAGAGAACTTTGA	64 64 68
<i>cnaA</i> (128177)	GCCAAGCGATCAGATTTGGA GCTGTCAGTCTCCTCTTTTCAGTA AACGAGCGTCTGCCACCTACGC	64 64 67

Los números entre paréntesis muestran los números de id en la base de datos de *M. circinelloides*. <http://genome.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.info.html>

5.11 Construcción del fragmento recombinante *gpa11* mediante clonaciones y subclonaciones en el vector pJET1.2/blunt

La generación del fragmento recombinante de la mutante en el gen *gpa11* se realizó amplificando por PCR a partir de DNA genómico de la cepa R7B. Un fragmento de 1.1 kb que corresponde a la región 5´ rio arriba del codón de inicio del gen *gpa11*, y un fragmento de 1.1 kb a la región 3´ rio abajo del codón de paro del gen *gpa11*. Para ello se diseñaron los oligonucleótidos Gpa11-P-Fwd y Gpa11-P-Sac-Rev que amplifican la región 5´; al oligonucleótido Gpa11-P-Sac-Rev, se adicionó un sitio de corte *SacI* en su extremo 3´. El fragmento de 1.1 kb rio abajo del codón de paro de la traducción del gen *gpa11*, fue amplificado con los oligonucleótidos Gpa11-T-Sac-Fwd y Gpa11-T-Xba-Rev, el primero contiene un

sitio de restricción en su extremo 5' para la enzima *SacI* y el oligonucleótido Gpa11-T-Xba-Rev cuenta con un sitio de restricción para la enzima *XbaI* en su extremo 3'. De forma independiente a partir de DNA genómico de la cepa R7B se llevó a cabo la amplificación del gen *pyrG* de 2 kb, con los oligonucleótidos PyrG-Sac-Fwd y PyrG-Sac-Rev donde ambos oligonucleótidos contienen sitios de restricción para la enzima *SacI*.

Las regiones 5' y 3' del gen *gpa11* de 1.1 kb y el gen *pyrG*, fueron clonados de forma independiente en el vector de clonación pJET1.2/blunt que presenta un gen de resistencia a ampicilina y se identificaron como pGpa11-5' (para la región 5'), pGpa11-3' (para la región 3') y pPyrG (para el gen *pyrG*). La presencia de los sitios de corte *SacI* permitió realizar la subclonación del gen *pyrG* en el plásmido pGpa11-5'. El plásmido resultante que contenía la región 5' y el gen *pyrG* se denominó pGpa115'-*pyrG*. Por último, se realizó la subclonación del fragmento de 1.1 kb de la región 3' del gen *gpa11* en el vector pGpa115'-*pyrG* utilizando los sitios de corte *SacI* y *XbaI*, el cual fue identificado como pGpa115'-*pyrG*-3' para su posterior transformación en *E. coli*. Se corroboró la inserción de dichos fragmentos en el vector pJET1.2/blunt mediante ensayos de PCR en colonia y restricción enzimática.

5.11.1 Amplificación del fragmento recombinante *gpa12-pyrG* mediante PCR en fusión

La técnica de PCR en fusión se basa en la generación de DNA recombinante fusionado a partir de dos o más fragmentos de DNA en donde no se requieren vectores plasmídicos ni digestiones de enzimas de restricción. Para la construcción del fragmento recombinante por PCR en fusión del gen *gpa12* con el gen de selección *pyrG*, se amplificaron tres fragmentos que contenían secuencias solapantes entre ellos. Para esto se diseñaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 1 kb de la región 5' rio arriba del codón de inicio del gen *gpa12*, y 1 kb de la región 3' rio abajo del codón de paro del gen *gpa12*, estos oligonucleótidos contaban con una secuencia de aproximadamente 20 nucleótidos que hibridan con

los extremos 5´ y 3´ del gen *pyrG*, el cual fue amplificado por separado (**Fig. 8**). Esto permite la hibridación por complementariedad de bases durante la PCR en fusión. Se diseñaron 4 oligonucleótidos:

12pUFow-PstI; oligonucleótido directo y el 12pURev-pyrG, oligonucleótido reverso usados para amplificar una región de 1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *gpa12*. En el oligonucleótido 12pURev-pyrG se adicionó una secuencia de nucleótidos en su extremo 3´, dicha secuencia hibrida con el extremo 5´ del gen *pyrG*.

Mediante el uso de los oligonucleótidos 12pDRev-NotI (oligonucleótido directo) y el 12pDFow-pyrG (oligonucleótido reverso), se amplificó una región de 1 kb río abajo del codón de paro del gen *gpa12*. En el oligonucleótido 12pDFow-pyrG se adicionó una secuencia de nucleótidos en su extremo 5´ que hibrida con el extremo 3´ del gen *pyrG*.

De forma independiente se utilizaron los oligonucleótidos *pyrGFow2kb* y *pyrGRev2kb* para amplificar el gen *pyrG* por PCR convencional a partir del plásmido *ppata5* que contiene el gen *pyrG*.

Se realizaron 3 PCR individuales para obtener los tres fragmentos de DNA que componen la región 5´ de 1 kb río arriba del codón de inicio, la región 3´ de 1 kb río abajo del codón de paro, ambos del gen *gpa12*; por otra parte, el fragmento al gen *pyrG* que mide 2 kb. Las condiciones de amplificación de DNA se llevaron a cabo utilizando 100ng/µL de templado; 10µM de cada oligonucleótido y 1µL de la enzima Herculase II Fusion Enzyme (Agilent Technologies), siguiendo en cada caso las indicaciones del fabricante. Las muestras se incubaron durante 5 min a 95°C para la desnaturalización del DNA y posteriormente se sometieron a 30 ciclos de desnaturalización (30 s a 95°C), alineamiento (45segundos a 60°C) y la elongación (30s por kb de producto a amplificar a 72°C). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de elongación durante 5 min y un último paso de 4°C. El termociclador utilizado fue Mastercycler® personal de Eppendorf. Una vez finalizadas las PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.7% y se purificaron. Una vez purificados los tres fragmentos se cuantificó su concentración. Para la PCR en

fusión se utilizaron como templado los productos ya purificados de los tres fragmentos: 5'-*gpa12*; *pyrG* y 3'-*gpa12* en proporción 1:2:1. Para dicha reacción se utilizó un programa de PCR especial con un paso inicial de 95°C por 3 min, seguido por 10 ciclos: temperatura de desnaturalización (30 s a 95°C), temperatura de descenso (1 min a 70°C), temperatura de alineamiento (30 s a 60°C), temperatura de elongación (2 min a 68°C). Seguido de 25 ciclos: temperatura de desnaturalización (30 seg a 95°C), temperatura de descenso (1 min a 70°C), temperatura de alineamiento (30 seg a 60°C), elongación (2 min a 68°C) y un paso final de 5 min a 68°C para finalmente quedarse a 4°C ∞, hasta el procesamiento de las muestras amplificadas.

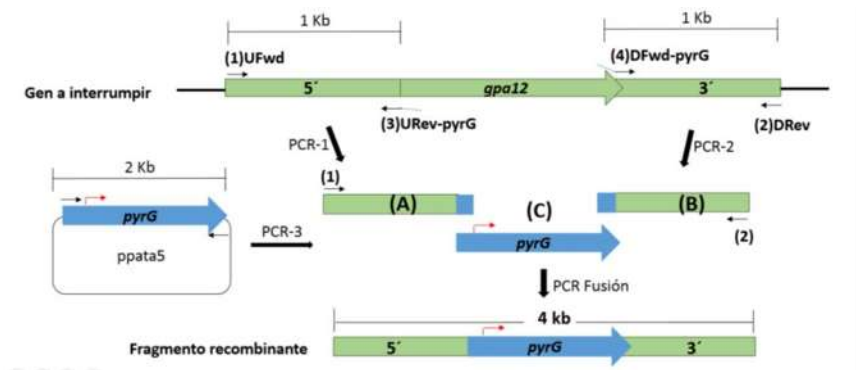


Figura 8. PCR en fusión de las regiones 5' y 3' del gen *gpa12* y *pyrG*. El esquema muestra la amplificación de las regiones 5' y 3' (PCR1 y PCR2) del gen *gpa12* exceptuando el marco de lectura del gen *gpa12* con los oligonucleótidos señalados por las flechas en color negro con la adición de nucleótidos correspondientes a la secuencia de *pyrG* en azul.

5.11.2 Construcción del fragmento recombinante para generación de doble mutante en los genes *gpa11* y *gpa12*

Para la generación de la doble mutante en los genes *gpa11* y *gpa12*, se utilizó el plásmido pGpa115'-pyrG-3' previamente obtenido para la interrupción del gen *gpa11*. Primero se obtuvo mediante PCR el gen de selección *leuA* (gen que codifica para la enzima α -isopropil malato isomerasa) necesario para la síntesis de leucina (**Van Heeswijck y Roncero, 1984**) con los oligonucleótidos LeuA-P-Sac-Fwd y LeuA-T-Sac-Rev al gen *leuA*, usando como templado el plásmido pLeuA (**Arnau y Strøman, 1993**). A ambos oligonucleótidos se adicionaron sitios de restricción para la enzima *SacI*. Una vez obtenido *leuA* se clonó entre las secuencias río arriba y río abajo del plásmido que contenía el fragmento recombinante del gen *gpa11* (pGpa115'-pyrG-3') el cual previamente se trató con la enzima *SacI* para la liberación del gen *pyrG* que mide 2 kb dejando extremos *SacI* en el vector, compatibles con el gen *leuA* previamente digerido con *SacI*. Ambos productos fueron ligados con la enzima T4 DNA ligasa, el plásmido resultante fue nombrado pGpa115'-LeuA-3', el cual fue transferido a *E. coli*.

5.12 Transformación de protoplastos de *M. circinelloides*

La transformación se realizó mediante electroporación de protoplastos (**Gutiérrez y col. 2011**) los cuales fueron generados según el protocolo descrito por van Heeswijck y Roncero (1984). Para obtener los protoplastos transformables se inocularon 1×10^7 esporas/mL en 25 mL de medio líquido YPG, pH 4.5. Los cultivos se mantuvieron durante 1 o 2 h a temperatura ambiente antes de incubarse toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se incubaron a 26°C con agitación fuerte (250 rpm) durante un período de 3 a 4 h, suficiente para que la mayoría de las esporas germinaran. A continuación, las germínulas se colectaron mediante centrifugación durante 5 min a 2,000 rpm en centrífuga Sigma 4-10 y se lavaron dos veces en buffer fosfato-sorbitol (Sorbitol 0.5 M, fosfato sódico 10 mM a pH 6.5), para resuspenderse finalmente en este mismo buffer a razón de 5 mL por cada 1×10^7 esporas. Para la digestión de las paredes celulares se añadió 1 mg/mL de un

preparado comercial de enzimas líticas rico en quitinasa (Lysing Enzymes de *Trichoderma harzianum*, Sigma) y 0.15 mg/mL de quitosanasa comercial (Chitosanase-RD; US Biologicals). Las germinulas se incubaron a 30°C con agitación suave (60 rpm) durante 90 min, hasta que se observó al microscopio la pérdida de la envoltura refringente. Para parar la digestión se añadieron 5 mL de sorbitol 0.5 M, los protoplastos se colectaron mediante centrifugación durante 5 min a 900 rpm, resuspendiendo nuevamente en 5 mL de sorbitol 0.5 M y centrifugando en las mismas condiciones. Finalmente, los protoplastos se resuspendieron en un volumen final de 800 µL de sorbitol 0.5 M.

Para la transformación se añadieron 10 µL de DNA (1 µg de DNA circular o 3 µg de DNA lineal) a 100 µL de protoplastos y la mezcla se transfirió a una celda de electroporación de 2 mm previamente enfriada en hielo. Los pulsos eléctricos se realizaron en el electroporador Bio-Rad Gene Pulser XCell con los siguientes parámetros de electroporación: 0.8 KV, 25 µF de capacitancia y una resistencia constante de 400 Ω. Inmediatamente después de aplicar el pulso eléctrico se añadió 1 mL de YPG pH 4.5 con 0.5 M de sorbitol frío y se transfirió a un tubo eppendorf limpio. Las mezclas de transformación se incubaron durante 1 hora a 26°C con una agitación de 150 rpm para permitir la recuperación de los protoplastos. En seguida, los protoplastos se centrifugaron durante 5 min a 1100 rpm, resuspendiéndose el sedimento en 600 µL de MMC pH 4.5 con 0.5 M de sorbitol. Esta suspensión se sembró cuidadosamente en cajas del medio adecuado para la selección de los transformantes.

Los fragmentos recombinantes de los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* fueron amplificados mediante PCR, y estos fueron utilizados para la transformación de protoplastos de *M. circinelloides* MU402, posteriormente se hizo la elección de transformantes bajo la condición selectiva correspondiente al marcador de (ausencia de uracilo en el medio), seguido de la identificación mediante PCR para determinar el evento de integración homóloga (**Fig. 9**).

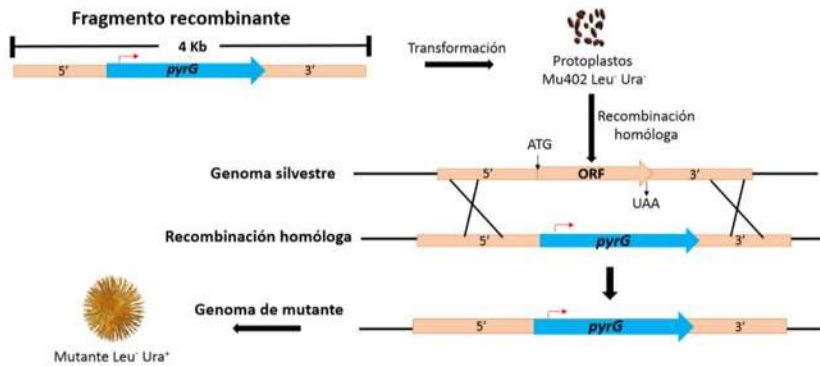


Figura 9. Evento de doble recombinación homóloga para la delección de los genes *gpa11* y *gpa12*. Se muestran las regiones 5' y 3' del gen a interrumpir que flanquean al marcador de selección el gen *pyrG* de 2 kb aproximadamente, se usó la cepa MU402 (*pyrG* y *leuA*⁻) de *M. circinelloides*, la cual permite la selección de las transformantes mediante la restauración de la prototrofia a uracilo.

5.13 Transformación de *E. coli*

Para introducir DNA plasmídico en *E. coli* se emplearon células químicamente competentes, mediante el procedimiento del cloruro de calcio; además se prepararon células electrocompetentes. Para la transformación se utilizó el procedimiento de choque térmico o electroporación (Sambrook y Russell, 2001).

5.14 Hibridación de DNA tipo Southern blot

Se realizó una digestión del DNA genómico de cada una de las cepas a analizar *M. circinelloides* durante toda la noche con enzimas de restricción específicas. Posteriormente se sometieron los productos digeridos a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, el gel se incubó durante 10 minutos en una solución de HCl 0.25 M, se lavó con agua bidestilada y se incubó durante 20-25 minutos en una solución de NaOH 0.4 N. Finalmente, el DNA se transfirió a una membrana de nylon (HybondTM-N+, Amersham Biosciences) mediante transferencia capilar con una solución de NaOH 0.4 N durante un mínimo de 2 horas **(Sambrook y Russell. 2001)**. Una vez transferido, se secó la membrana a temperatura ambiente. La hibridación se realizó en todos los casos con sondas marcadas radiactivamente las cuales fueron preparadas en un tubo eppendorf con 1 µL de marcador Gene Ruler DNA Ladder Mix, 50 ng de DNA de la sonda a utilizar ya sea del extremo 5´ ó 3´ de la construcción, 2 µL de hexanucleótidos al azar y se completó con agua bidestilada hasta 6 µL. En otro tubo se preparó 2 µL de Buffer Klenow más 2 µL de dNTPs sin citosina y 7 µL de agua bidestilada. Se calentaron en termoblock por 5-10 minutos a 95-100°C, y posteriormente se juntó el contenido de ambos tubos, se adicionó 1 µL de la enzima Klenow y 2 µL de ddCTP radioactivo con las debidas precauciones, se dejó en termoblock 1 hora a 37°C. La prehibridación se llevó a cabo a 65°C un mínimo de 2 h con 20 mL de solución de prehibridación NaCl y se hibridó a esa misma temperatura toda la noche con 10 mL de solución de hibridación (NaCl 0.9 M, SDS 1%, 50 µg/mL de DNA de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado), a la que se añadió la sonda desnaturalizada por calor (10 minutos a 100°C) y enfriada rápidamente en hielo. Las condiciones de lavado fueron: un primer lavado con una solución 2X SSC con 0.1% de SDS a temperatura ambiente durante 1-2 min para eliminar el exceso de radiactividad; un segundo lavado de 20 min a 65°C con esa misma solución; un tercer lavado de 20 min a 65°C con una solución 1X SSC con 0.1% de SDS y un cuarto lavado de 20 min a 65°C con una solución 0.5X SSC con 0.1 % de SDS. Tras este lavado se checaron las membranas con un contador Geiger para valorar la conveniencia de aplicar un último lavado de 20 minutos a 65°C con una solución 0.1X SSC con 0.1%

de SDS. Seguidamente, las membranas se pusieron en contacto con películas Kodak® BioMax™ MS Film (alta sensibilidad) y se dejaron exponiendo a -70°C . En algunos casos las membranas se expusieron a pantallas Phosphorimager BAS-MP2040 (Fujifilm) que fueron escaneadas en el lector Molecular Imager FX (BioRad).

5.15 Secuenciación de DNA

Se secuenciaron los fragmentos clonados en el plásmido pEUKA4 (11-GTP y 12-GTP) correspondientes a los genes que codifican a las proteínas Gpa11 y Gpa12 constitutivamente activas mediante el analizador de 4 capilares, modelo *ABY Prism 3130* de Applied Biosystems en el servicio de apoyo a la investigación de la Universidad de Murcia, España.

5.16 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza de una 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.

VI. RESULTADOS

6.1 Construcción y clonación de los fragmentos de recombinación de los genes que codifican a proteínas Gpa11 y Gpa12 en *M. circinelloides*.

Con la finalidad de determinar la participación de los genes *gpa11* y *gpa12* en la esporulación y germinación de *M. circinelloides* se llevó a cabo la delección de dichos genes mediante eventos de recombinación homóloga. Para ello se usó la inserción del gen de selección *pyrG* (que codifica para la enzima orotidina-5-fosfato descarboxilasa, necesaria para la síntesis de uracilo) para complementar la auxotrofia a uracilo de la cepa MU402; El marcador de selección se clonó entre las secuencias río arriba y río abajo que delimitan el marco de lectura abierto del gen a interrumpir. Para llevar a cabo dicho proceso, se amplificaron mediante PCR aproximadamente 1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción (región 5´) y un 1 kb río abajo del codón de paro de la traducción (región 3´) del gen que se mutó. Dichas regiones se usaron para flanquear al marcador de selección *pyrG*. Con este proceso, se eliminó todo el ORF (Marco de Lectura Abierto) del gen de interés mediante las diferentes estrategias descritas en materiales y métodos, generando finalmente los fragmentos de recombinación para las mutaciones en los genes *gpa11* y *gpa12*.

Para la interrupción de los genes se utilizó la cepa de *M. circinelloides* auxótrofa a uracilo y leucina Mu402, para seleccionar transformantes protótrofos a uracilo que hayan incorporado el fragmento de recombinación con el marcador de selección *pyrG*. La mutación del gen *gpa11* de *M. circinelloides*, se llevó a cabo con la construcción del fragmento de recombinación *gpa11-pyrG*. Se amplificó mediante PCR un fragmento de DNA que comprende a 1.1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción (región 5´) del gen *gpa11* y 1.1 kb río abajo del codón de paro de la traducción del gen *gpa11* con los oligonucleótidos correspondientes descritos previamente en materiales y métodos (**Fig. 10-A**).

De forma independiente a partir del DNA genómico de la cepa R7B de *M. circinelloides* se amplificó el gen *pyrG* que mide 2 kb (**Fig. 10-B**).

Las regiones 5' y 3' de interés, y el gen *pyrG*, fueron clonados de forma independiente en el vector de clonación pJET1.2/blunt que presenta un gen de resistencia a ampicilina. Los plásmidos recombinantes fueron identificados como pGpa11-5' (porta la región 5') (**Fig. 11-A**), pGpa11-3' (lleva la región 3') (**Fig. 11-B**), y el plásmido pPyrG (que tiene clonado el gen *pyrG*) (**Fig. 11-C**).

La inserción de dichos fragmentos en el vector pJET1.2/blunt se comprobó (mediante ensayos de PCR en colonia). Dicho ensayo consiste en la selección al azar de colonias de *E. coli* que crecieron en placas LB suplementadas con ampicilina posterior a los eventos independientes de transformación con los vectores pGpa11-5'; pGpa11-3' y pPyrG. Las colonias seleccionadas se sometieron a un ensayo de PCR con oligonucleótidos que flanquean el sitio múltiple de clonación del plásmido obteniendo fragmentos de 1.1 kb tanto para la región 5' (**Fig. 11-A**) como para la región 3' del gen *gpa11* (**Fig. 11-B**) y una amplificación de 2 kb para el gen *pyrG* (**Fig. 11-C**).

Una vez que fueron clonados los fragmentos, se realizó la subclonación del gen *pyrG* en el plásmido pGpa11-5'. Primero se efectuó una digestión del plásmido pPyrG con la enzima *SacI* que liberó el gen *pyrG*. Posteriormente, dicho gen fue purificado para su posterior ligación al plásmido pGpa11-5' que (digerido previamente con la enzima *SacI* para su linearización. Con el plásmido resultante pGpa115'-*pyrG*, se transformó *E. coli* y finalmente la construcción fue comprobado mediante PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos PyrG-Sac-Fwd y PyrG-Sac-Rev que amplifican un fragmento de 2 kb correspondiente al gen *pyrG* (**Fig. 12**).

Se realizó la subclonación del fragmento de 1 kb de la región 3' del gen *gpa11* en el vector pGpa115'-*pyrG*. Primero, el vector pGpa113' se sometió a una doble digestión con las enzimas *SacI* y *XbaI*. Por otro lado el plásmido pGpa115'-*pyrG* se digirió con la enzima *XbaI* y un *SacI*, esto con la finalidad de que los extremos tanto del plásmido como del inserto fueran compatibles y posteriormente fueron ligados con la enzima T4 DNA ligasa para su transformación en *E. coli*. La construcción final fue nombrada pGpa115'-*pyrG*-3' y comprobada mediante PCR en colonia utilizando los oligonucleótidos Gpa11-P-Fwd y Gpa11-T-Xba-Rev generando una banda de

amplificación de 4 kb correspondiente al fragmento de recombinación del gen *gpa11*. Como control positivo se usaron dichos oligonucleótidos en un ensayo de PCR del DNA genómico de la cepa silvestre MU402, que generó un fragmento de 3.5 kb (**Fig. 13**).

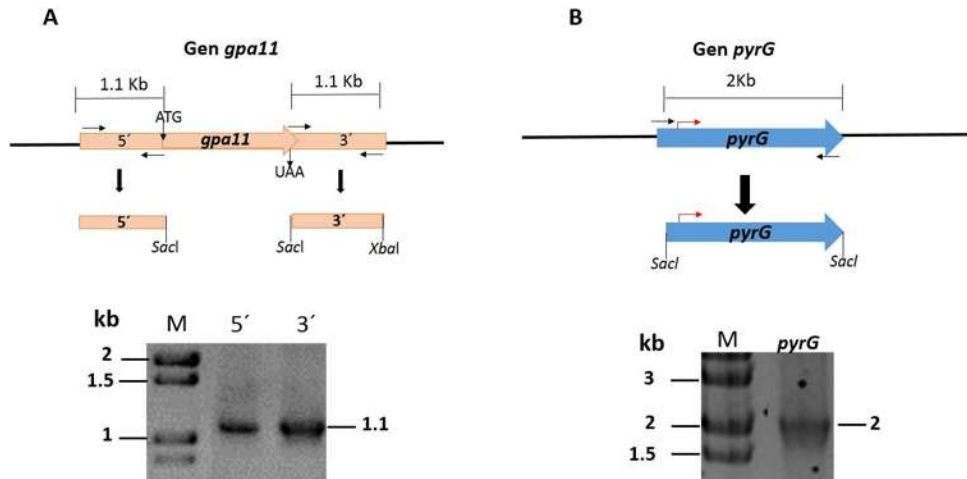


Figura 10. Fragmento recombinante para la delección de *gpa11* de *M. circinelloides*. (A) En la parte superior se muestra el esquema del gen *gpa11* con las regiones río arriba (5') y río abajo del ORF (3') de 1.1 kb cada una de ellas, las cuales fueron amplificadas mediante PCR. En la parte inferior se muestran las bandas de amplificación de 1.1 kb en un gel de agarosa, en donde se muestra el tamaño de la banda. (B) Esquema del gen *pyrG* el cual se amplificó mediante PCR y en la parte inferior se muestra la banda de 2 kb aproximadamente en gel de agarosa. Se utilizó el marcador de DNA 1 kb Plus DNA Ladder.

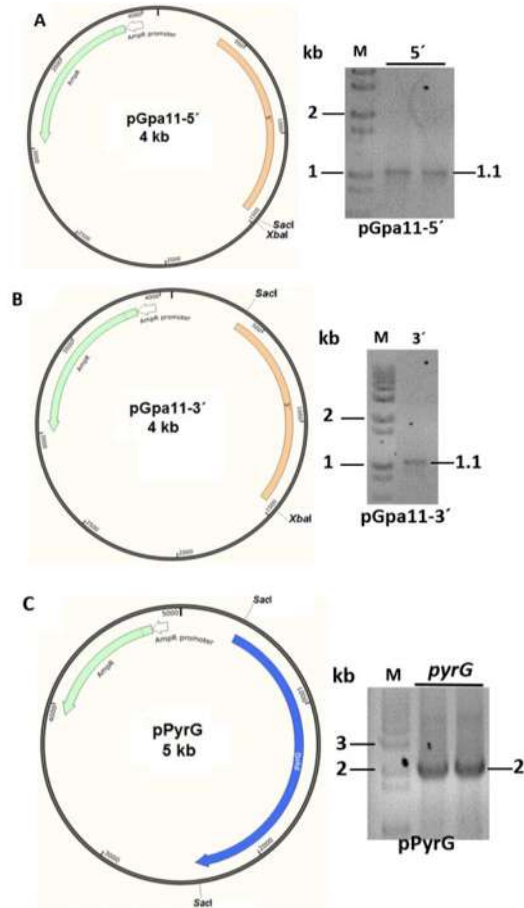


Figura 11. Clonación de los fragmentos 5' y 3' del gen *gpa11* y del gen *pyrG* en el vector pJET 1.2/blunt. (A) Plásmido pGpa11-5' que contiene la región 5' (izquierda) del gen *gpa11*, así como un gel de agarosa (derecha) del fragmento 5' del gen *gpa11* (pGpa11-5') de 1.1 kb. **(B)** Plásmido pGpa11-3' (izquierda) que contiene la región 3' del gen *gpa11*, comprobación en gel (derecha) del fragmento 3' del gen *gpa11* (pGpa11-3') de 1.1 kb. **(C)** Plásmido pPyrG (izquierda) que contiene el gen *pyrG* de *M. circinelloides*, corroboración en gel de agarosa (derecha) muestra el fragmento correspondiente al gen *pyrG* (pPyrG) de 2 kb, los tamaños de las distintas bandas amplificadas se muestran al lado derecho de cada gel. Se utilizó el marcador de DNA 1 Kb Plus DNA Ladder. Todas las bandas amplificadas fueron obtenidas mediante PCR con el uso de oligonucleótidos que flanquean el sitio múltiple de clonación de pJET1.2/blunt, usando como templates las colonias bacterianas de presuntas transformantes con los plásmidos recombinantes.

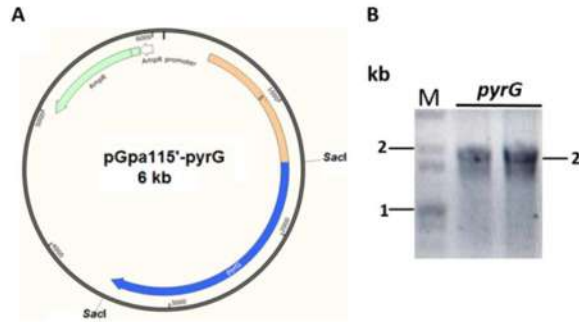


Figura 12. Subclonación del gen *pyrG* en el plásmido pGpa11-5'. (A) Plásmido pGpa115'-pyrG con la región 5' del gen *gpa11* y el gen *pyrG*. (B) Comprobación de la construcción mediante la amplificación por PCR en colonia de *pyrG* de presuntas transformantes y la visualización de la banda de 2 kb en gel de agarosa. Se utilizó el marcador de DNA 1 Kb Plus DNA Ladder. .

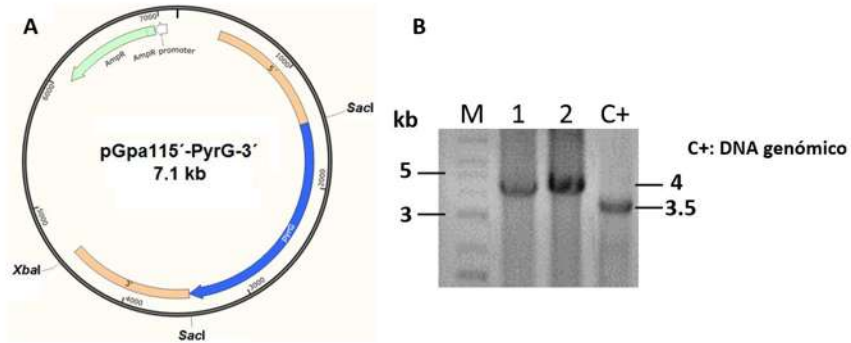


Figura 13. Subclonación del fragmento 3' del gen *gpa11* en el plásmido pGpa115'-pyrG. (A) Plásmido pGpa115'-pyrG-3' ilustrando las regiones 5' y 3' del gen *gpa11*, las cuales flanquean al gen *pyrG*. **(B)** Gel de agarosa de la construcción correspondiente al plásmido pGpa115'-pyrG-3'; Carril 1 y 2 corresponden a la amplificación mediante PCR en colonia de presuntas colonias transformantes de *E. coli* con los oligonucleótidos Gpa11-P-Fwd y Gpa11-T-Xba-Rev que flanquean en su totalidad al fragmento recombinante del gen *gpa11* que mide aproximadamente 4 kb; Carril C+ pertenece a la amplificación del gen silvestre *gpa11* con los mismos oligonucleótidos, usando como templado DNA de la cepa R7B, el cual tiene un tamaño de 3.5 kb. Se utilizó el marcador de DNA 1 Kb Plus DNA Ladder.

6.3 Construcción del fragmento de recombinación del gen *gpa12* mediante PCR en fusión.

Para llevar a cabo la interrupción del gen *gpa12* de *M. circinelloides*, se construyó fragmento recombinante para la sustitución del ORF del gen silvestre *gpa12* por *pyrG*. Para ello, se usó la estrategia de PCR en fusión como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Se amplificaron aproximadamente 1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción y una región de 1 kb río abajo del codón de paro del gen *gpa12*, fragmentos que por PCR de fusión quedaron flanqueando al gen *pyrG*, generando el fragmento recombinante sin necesidad de enzimas de restricción ni vectores de clonación.

Una vez finalizadas las reacciones de PCR, estas fueron comprobadas en un gel de agarosa al 0.7%, y cada uno de los fragmentos de DNA fue purificado y cuantificado. Los 3 fragmentos correspondientes a la región 5' del gen *gpa12*; *pyrG* y la región 3' *gpa12* fueron purificados, se utilizaron como templado para la PCR en fusión. El producto se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% y se purificó recortando únicamente la banda correspondiente al tamaño esperado de la fusión de los 3 fragmentos, es decir el fragmento recombinante de 4 kb (**Fig. 14**).

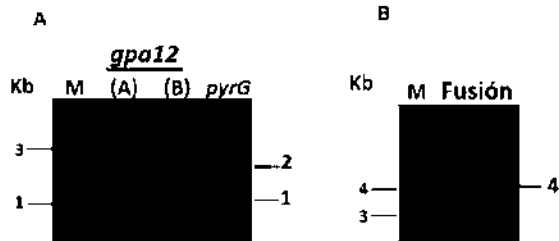


Figura 14. Productos de la PCR convencional y la PCR en fusión requeridos para la construcción del fragmento recombinante para la delección del gen *gpa12*. (A) M: el marcador de peso molecular de DNA GeneRuler DNA Ladder Mix; en el carril (A) el fragmento de 1 kb rio arriba del codón de inicio (5´); en carril (B) el producto correspondiente a la región de 1 kb rio abajo del codón de paro (3´), y en *pyrG* el producto de la amplificación del gen *pyrG* de 2 kb. (B) Visualización del producto generado por PCR en fusión en gel de agarosa usando los fragmentos correspondientes a las regiones 5´ y 3´del gen *gpa12* y de *pyrG* para obtener el fragmento recombinante de 4 kb.

6.4 Transformación de *M. circinelloides* con los fragmentos recombinantes *gpa11* y *gpa12*

Para determinar la función de los genes *gpa11* y *gpa12*, se generaron las mutantes de dichos genes mediante reemplazamiento del ORF del gen a interrumpir por el gen de selección *pyrG*.

Las transformaciones como se describe en Materiales y Métodos con los fragmentos recombinantes de cada uno de los genes *gpa11* y *gpa12*. En el primer pase de selección se obtuvieron seis transformantes para el gen *gpa11* y ocho para *gpa12*. Cabe hacer mención que las transformantes de *M. circinelloides* en el primer pase de selección son mutantes heterocarióntes, debido a la presencia de varios núcleos en los protoplastos y a que el DNA exógeno (fragmentos recombinantes) no se integra en todos los núcleos de dichos protoplastos. Del 5 al 10% de las esporas de *M. circinelloides* son mononucleadas, y el resto pueden contener en promedio de 5 a 10 núcleos, por lo tanto para la obtención de las mutantes homocarióntes fue necesario realizar varios ciclos de esporulación (6 ciclos, cada uno de 10 días de duración en promedio) en medio selectivo, esto favorece el enriquecimiento de núcleos transformados en las esporas.

Finalmente, tras varios ciclos de esporulación en medio MMC sin uracilo, se seleccionaron sólo dos transformantes para el gen *gpa11* y dos para *gpa12*.

6.5 Confirmación molecular de mutantes en los genes *gpa11* y *gpa12* en *M. circinelloides*

Después de la selección de las presuntas mutantes en los genes *gpa11* y *gpa12*, se procedió al análisis molecular de las mismas con la finalidad de comprobar la delección de los genes en *M. circinelloides*. Se realizaron los ensayos de amplificación por análisis de PCR con el cual se puede comproar rápidamente si ocurrió el evento de recombinación homóloga en el locus deseado. Además, se realizó un análisis tipo Southern Blot, el cual además de demostrar la recombinación homóloga puede indicar si ocurrió más de un1 evento de integración. En ambos

análisis fue necesario la extracción de DNA genómico tanto de la cepa silvestre como de las presuntas cepas mutantes en los genes *gpa11* y *gpa12*.

Para la confirmación de la mutación en el gen *gpa11*, se llevó a cabo la amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos 11-C-Fwd (directo) y PyrG-R2 (reverso), el oligonucleótido directo hibrida río arriba (fuera) del fragmento de recombinación del gen *gpa11* y el reverso en el gen *pyrG*. Por lo tanto una banda de amplificación positiva de 1.4 kb indicaría la integración del gen *pyrG* en el locus del gen *gpa11*, y la obtención de la mutante esperada: Mientras que si no se presenta la amplificación antes mencionada, esto sugeriría la presencia de un genotipo silvestre para *gpa11*.

Un enfoque similar se llevó a cabo para la confirmación de la mutación en el gen *gpa12*, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos 12-C-Fwd y PyrG-R2, que en caso de haber recombinación homóloga del fragmento recombinante en el locus deseado se esperaría una banda de amplificación de 1.3 kb. Si no se obtiene la amplificación, sugeriría un genotipo silvestre

Por otra parte, se obtuvo un control interno de amplificación positiva para el DNA tanto de cepas con genotipo silvestre o mutante, mediante una amplificación por PCR con los oligonucleótidos Gpa11-T-Sac-Fwd y Gpa11-T-Xba-Rev que amplifican a un producto de 1.1 kb, que corresponde al fragmento de la región 3' río abajo del codón de paro de la traducción del gen *gpa11*. Dicha región, se encuentra tanto en la cepa silvestre como en las cepas mutantes en el gen *gpa11* y *gpa12*.

Se analizaron las dos clonas presuntamente mutantes para el gen *gpa11* y dos clonas para el gen *gpa12*. El resultado mostró que de las clonas analizadas para *gpa11*, solamente una poseía la banda de tipo mutante, sugiriendo una integración ectópica para la otra transformante. En cambio las dos clonas analizadas para *gpa12* resultaron ser mutantes al mostrar la banda predicha (**Fig. 15 y 16**). Estos resultados indican que se obtuvo del reemplazamiento de los genes silvestres *gpa11* y *gpa12* por sus respectivos fragmentos recombinantes.

Para comprobar que se llevó a cabo un único evento de recombinación en el genoma de *M. circinelloides*, se realizó un ensayo tipo Southern Blot, usando como

sonda radioactiva dCTP-(³²P) con el fragmento de 1 kb del extremo 5' río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *gpa11* marcado . Se aisló el DNA genómico tanto de la cepa silvestre como de la mutante; el cual se sometió a una restricción enzimática con la enzima *HincII*, esperando la detección de fragmentos de distintos tamaños para cada genotipo (**Fig. 17-A**). Se observó una banda de hibridación de 2.3 kb que identifica al genotipo de tipo silvestre (MU402); mientras que para la mutante en el gen *gpa11* se observó una banda de hibridación de 3.5 kb, lo que indica que se obtuvo un único evento de recombinación en el locus deseado, con lo cual se generó una cepa mutante homocariónte en el gen *gpa11* (**Fig. 17-B**).

En el caso del gen *gpa12*, se llevó a cabo de forma similar un ensayo tipo Southern blot, para lo cual se marcó con radioactividad un fragmento correspondiente a la región de 1 kb río abajo del codón de paro de la traducción del gen *gpa12*. El DNA genómico de la cepa silvestre (MU402) y de las dos colonias mutantes fueron digeridos con la enzima *NcoI*, con lo cual se esperaba la detección de bandas de distintos tamaños de acuerdo a su genotipo (**Fig. 18-A**). En la cepa Mu402 se observó una banda de hibridación de un tamaño de 2.1 kb, que identifica al genotipo silvestre para el gen *gpa12*; mientras que para las dos mutantes independientes se observó una banda de 1.3 kb que revela la mutación en el gen *gpa12*. Este dato indica que en las dos mutantes se llevó a cabo un único evento de recombinación en el locus del gen *gpa12*, resultando en mutantes homocariotes para este gen (**Fig. 18-B**).

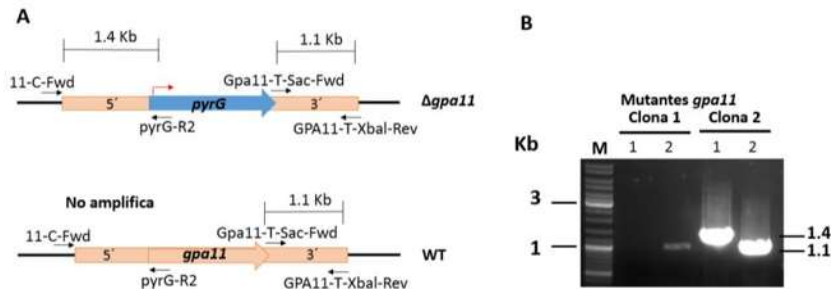


Figura 15. Confirmación mediante PCR de la mutante *gpa11* de *M. circinelloides*. (A) Amplificación por PCR de la inserción del fragmento recombinante en el locus del gen *gpa11*. En la parte superior se ilustran los fragmentos de amplificación esperados en caso de un evento de recombinación homóloga debido a la amplificación por PCR de un fragmento de 1.4 kb con los oligonucleótidos 11-C-Fwd y PyrG-R2 indicando un genotipo mutante. En la parte inferior se muestra que si no hay amplificación corrobora un genotipo silvestre con los oligonucleótidos 11-C-Fwd y PyrG-R2. En ambos genotipos la amplificación por PCR de 1.1 kb con los oligonucleótidos Gpa11-T-SacI-Fwd y Gpa11-T-Xba1-Rev corresponden a un control de integridad de DNA, el cual está presente tanto para la cepa silvestre como en la mutante. (B) Gel de agarosa al 1%. M: marcador de tamaño GeneRuler DNA Ladder Mix. Clona 1 y clona 2 corresponden a dos colonias mutantes analizadas, el ensayo de amplificación por PCR con los oligonucleótidos 11-C-Fwd y PyrG-R2 corresponden al carril 1 donde un tamaño de 1.4 kb indicaría un evento de integración por recombinación homóloga; el carril 2 corresponde a la amplificación por PCR con los oligonucleótidos Gpa11-T-SacI-Fwd y Gpa11-T-Xba1-Rev para demostrar la integridad del DNA, el tamaño esperado es de 1.1 kb tanto para un genotipo silvestre o mutante.

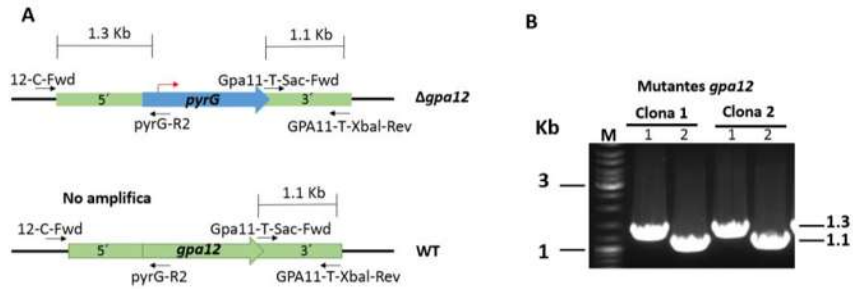


Figura 16. Confirmación mediante PCR de la mutante *gpa12* de *M. circinelloides*. (A) Amplificación por PCR de la inserción del fragmento recombinante en el locus del gen *gpa12*. En la parte superior ilustran los fragmentos de amplificación esperados en caso de un evento de recombinación homóloga debido a que la amplificación por PCR de un fragmento de 1.3 kb con los oligonucleótidos 12-C-Fwd y PyrG-R2 indican un genotipo mutante. En la parte inferior se ilustra la no amplificación con los oligonucleótidos 12-C-Fwd y PyrG-R2 sugiriendo un genotipo silvestre. En ambos genotipos la amplificación por PCR de 1.1 kb con los oligonucleótidos Gpa11-T-SacI-Fwd y Gpa11-T-XbaI-Rev corresponde a un control de integridad de DNA, presente en la cepa silvestre y la mutante. (B) Gel de agarosa al 1% M: marcador de tamaño GeneRuler DNA Ladder Mix. Clona 1 y clona 2 pertenecen a las colonias presuntas mutantes analizadas, los carriles 1 corresponden al ensayo de amplificación por PCR con los oligonucleótidos 12-C-Fwd y PyrG-R2, en caso de ser una integración por recombinación homóloga el tamaño esperado es de 1.3 kb; los carriles 2, corresponde a la amplificación por PCR con los oligonucleótidos Gpa11-T-SacI-Fwd y Gpa11-T-XbaI-Rev para demostrar la integridad del DNA, el tamaño esperado de dicha banda de DNA es de 1.1 kb tanto para un genotipo silvestre como uno mutante.

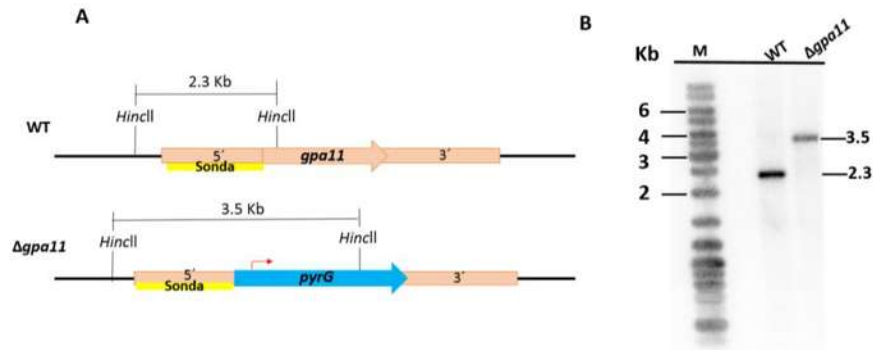


Figura 17. Southern Blot de la mutante en el gen *gpa11* de *M. circinelloides*.

(A) Esquema de la restricción del DNA genómico con la enzima *HincII*, se usó como sonda un fragmento de 1.1 kb correspondiente a la región 5' río arriba del codón de inicio de la traducción (sonda ilustrada en color amarillo) del gen *gpa11* marcada con ^{32}P . La presencia de una banda de 2.3 kb identifica al gen *gpa11* silvestre; mientras que una banda de 3.5 kb indica la presencia del gen *gpa11* mutante. **(B)** Se muestra el autorradiograma del Southern Blot. M: Marcador de tamaño de DNA usado GeneRuler DNA Ladder Mix; WT: DNA genómico digerido con *HincII* de la cepa silvestre MU402; DNA genómico digerido con *HincII* de la cepa mutante en el gen *gpa11* que muestra una única banda de 3.5 kb lo que indica un solo evento de recombinación en el *locus* esperado.

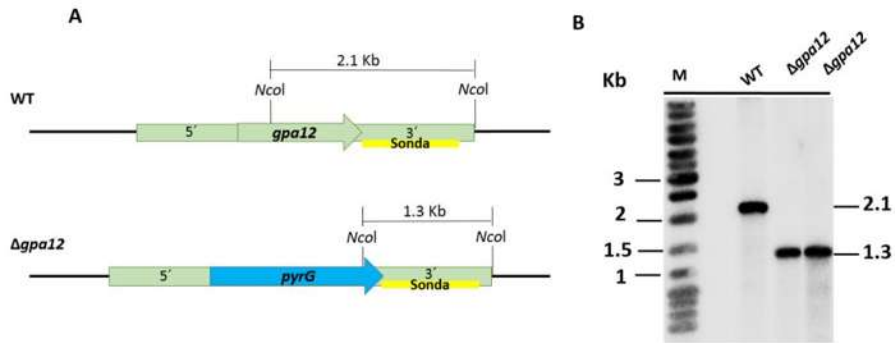


Figura 18. Southern Blot de la mutante *gpa12* de *M. circinelloides*. (A)

Esquema de la restricción del DNA genómico con la enzima *NcoI*, se usó como sonda un fragmento de 1.1 kb correspondiente a la región 3' río abajo del codón de paro de la traducción del gen *gpa12* marcada con P^{32} (sonda ilustrada en color amarillo). La presencia de una banda de 2.1 kb identifica al gen *gpa12* silvestre; mientras que una banda de 1.3 kb indica la presencia del gen *gpa12* mutante. (B) Autorradiograma del Southern Blot. M: Marcador de tamaño de DNA usado GeneRuler DNA Ladder Mix; WT: DNA genómico digerido con *NcoI* de la cepa silvestre MU402; DNA genómico digerido con *NcoI* de las colonias mutantes en el gen *gpa12* que muestra una única banda de 1.3 kb lo que indica un solo evento de recombinación homóloga en el locus esperado.

6.6 Generación de la cepa doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ de *M. circinelloides*

Con la finalidad de determinar la posible redundancia de los productos de los genes *gpa11* y *gpa12* en la esporulación y crecimiento de *M. circinelloides* se llevó a cabo la generación de una cepa mutante en ambos genes, utilizando como segundo marcador de selección al gen *leuA* necesario para la síntesis de leucina (Van Heeswijk y Roncero, 1984). Para la obtención de la doble mutante se utilizó la mutante de *M. circinelloides* $\Delta gpa12$ previamente generada, la cual es protótrofa a uracilo y auxótrofa a leucina. Para llevar a cabo la mutación en el gen *gpa11*, se construyó su fragmento recombinante con el gen de selección *leuA*. Primero se amplificó por PCR al gen *leuA*, de 3.7 kb; de cuyo tamaño se comprobó en un gel de agarosa al 0.7%, a partir del cual se purificó para su posterior digestión con la enzima *SacI* (Fig. 19-A).

A su vez el plásmido pGpa115'-*pyrG*-3' que mide 7.2 kb fue digerido con la enzima *sacI* para la liberación del gen *pyrG* de 2 kb dejando extremos *SacI* en el vector, dicho vector fue purificado. El gen *leuA* y el vector antes mencionado fueron ligados con la enzima T4 DNA ligasa (Fig. 19-B) y *E. coli* se transformó con dicho producto de ligación (Fig. 19-C). De las colonias transformantes se aislaron los plásmidos recombinantes, los cuales fueron analizados por restricción con la enzima *EcoRI* y los fragmentos digeridos fueron visualizados en un gel de agarosa a 0.7% donde se generaron dos tamaños de banda una de 5.5 kb y otra de 3.2 indicando la presencia del plásmido esperado, denominado pGpa115'-*LeuA*-3' (Fig. 19-D). El fragmento recombinante fue obtenido posteriormente mediante PCR con los oligonucleótidos Gpa11-P-Fwd y Gpa11-T-Xba-Rev, generando una banda de 5.8 kb (Fig. 19-D).

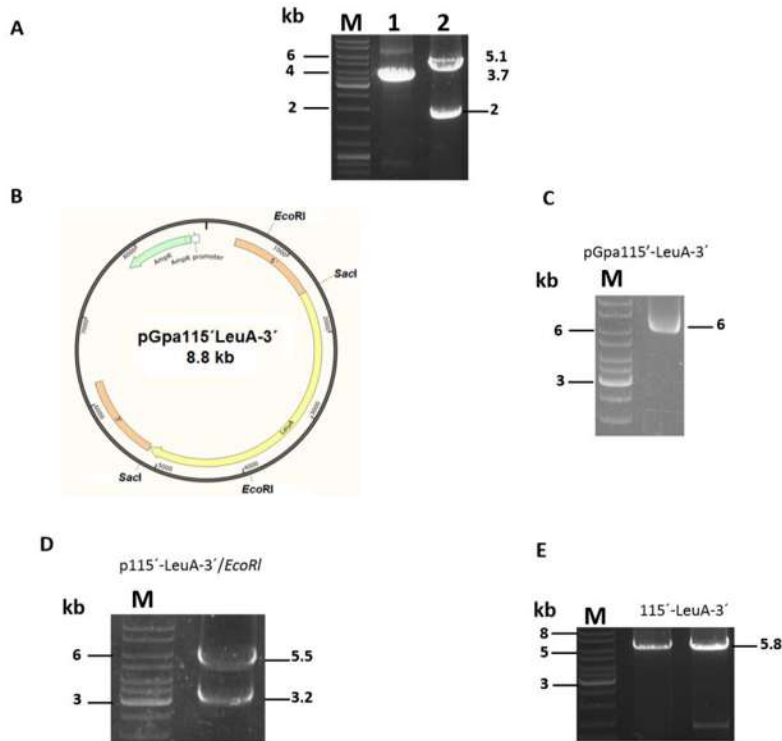


Figura 19. Construcción del plásmido p115'-LeuA-3'. (A) Gel de agarosa donde se muestra en el carril M; marcado de DNA GeneRuler DNA ladder Mix. Carril 1; el plásmido p115'-pyrG-3', 2 el plásmido p115'-pyrG-3' digerido con la enzima *SacI* mostrando la liberación del gen *pyrG* de 2 kb y el fragmento de 5.1 kb el cual fue purificado. (B) Plásmido p115'-LeuA-3' con las regiones 5' y 3' flanqueando al gen *leuA* el cual fue subclonado en p115'-pyrG-3' previamente digerido con *SacI* para la liberación de *pyrG*. (C) Gel de agarosa donde se muestra el plásmido pGpa115'-LeuA-3'. (D) Comprobación de la inserción de *leuA* en el plasmido pGpa115'-pyrG-3' sin el gen *pyrG* mediante restricción enzimática con *EcoRI*, generando las bandas de 5.5 y 3.2 kb indicando la presencia del plásmido con el fragmento recombinante. (E) Gel de agarosa al 0.7% donde se muestra la amplificación mediante PCR del fragmento recombinante con los oligonucleótidos Gpa11-P-Fwd y Gpa11-T-Xba-Rev con un tamaño de 5.8 kb, se usó el DNA de dos clonas independientes como templado.

6.7 Comprobación molecular por PCR de la integración homóloga de la interrupción del gen *gpa11* en la cepa mutante $\Delta gpa12$ de *M. circinelloides*.

Los experimentos de transformación de la mutante $\Delta gpa12$ con el fragmento recombinante para mutagenizar el gen *gpa11* dieron lugar a 19 transformantes protótrofos a leucina (LeuA⁺) en medio mínimo YNB. Los transformantes fueron sometidos a cinco ciclos de esporulación en medio selectivo (YNB sin aminoácidos). Finalmente se analizaron seis colonias mediante PCR para comprobar la integración del gen *leuA* en el locus del gen *gpa11*. La reacción de PCR con los oligonucleótidos 11-C-Fwd y Leu4-Rev se llevó a cabo usando DNA genómico de las colonias transformantes; el oligonucleótido directo hibrida río arriba (fuera) del fragmento recombinante usado para interrumpir el gen *gpa11* y el reverso en el gen *leuA*; por lo tanto una amplificación de 2.2 kb indicaría la inserción del fragmento de recombinación en el locus del gen *gpa11*. Mientras que cuando no se presenta una amplificación, esto sugiere la presencia de un genotipo silvestre para *gpa11*. Se utilizó como control de la integridad del DNA una reacción de PCR con los oligonucleótidos 11-C-Fwd y Gpa11-P-Sac-Rev, este último oligonucleótido hibrida río arriba del fragmento de recombinación y amplificar un producto de 1.3 kb aproximadamente tanto para un genotipo mutante en *gpa11*, como silvestre (**Fig. 20**).

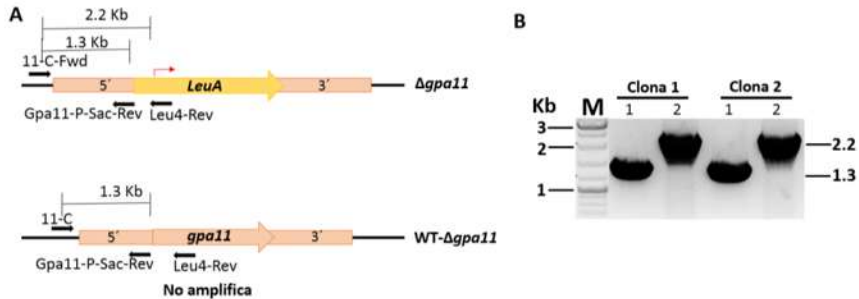


Figura 20. PCR de la mutación en el gen *gpa11* de la cepa $\Delta gpa12$ de *M. circinelloides*. **A.** Amplificación por PCR de la inserción del fragmento recombinante en el locus del gen *gpa11*; en la parte superior se ilustran los fragmentos de amplificación esperados en caso de un evento de recombinación homóloga, la cual se demuestra por la presencia de un fragmento de 2.2 kb amplificado mediante PCR con los oligonucleótidos 11-C-Fwd y Leu4-Rev lo cual indicaría un genotipo mutante; en la parte inferior se muestra la no amplificación con el uso de los oligonucleótidos 11-C-Fwd y Leu4-Rev sugiriendo un fenotipo silvestre. La región amplificada de 1.3 kb corresponde al PCR usado para demostrar la integridad de DNA con los oligonucleótidos 11-C-Fwd y Gpa11-P-SacI-Rev, este fragmento de PCR presente tanto en la cepa silvestre como para la mutante. **B.** Gel de agarosa al 1% M: marcador de tamaño GeneRuler DNA Ladder Mix. Dos colonias presuntas mutantes fueron analizadas (Clona 1 y 2) Carril 1: PCR de control de integridad del DNA con los oligonucleótidos 11-C-Fwd y Gpa11-P-Sac-Rev, el tamaño esperado de dicha banda de DNA es de 1.3 kb. Carril 2: Amplificación con los oligonucleótidos 11-C-Fwd y Leu4-Rev donde una amplificación de 2.2 kb nos indica la mutación en el gen *gpa11*.

7. Evaluación del efecto de las mutaciones de *gpa11* y *gpa12* sobre el crecimiento de *M. circinelloides*

7.1 Determinación del crecimiento radial en las mutantes *gpa 11* y *gpa12* de *M. circinelloides*

Con la finalidad de demostrar la participación de los productos de los genes *gpa11* y *gpa12* sobre el crecimiento de *M. circinelloides*, se llevó a cabo un ensayo de crecimiento radial. Se inocularon en placas de medio YPG sólido 50 esporas por placa y se registró a lo largo de 4 días el diámetro de la colonia. Se observó un diámetro de 1.4 (± 0.05) y 1.5 (± 0.05) cm desde las 24 h en las cepas mutantes $\Delta gpa11$ y $\Delta gpa12$ respectivamente. La silvestre MU402-P mostró un diámetro de 1.7 cm. La doble mutante $\Delta gpa11/gpa12$ generó un crecimiento similar a la silvestre a este tiempo. La disminución del crecimiento radial se observó hasta el día 3, donde el diámetro de la cepa silvestre fue de 6.7 (± 0.05) cm, mientras que la mutante sencilla $\Delta gpa11$ y la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ presentaron un diámetro de 6.4 (± 0.1) cm; mientras que la mutante $\Delta gpa12$ generó un diámetro de 6.3 (± 0.1) cm (**Fig. 21**).

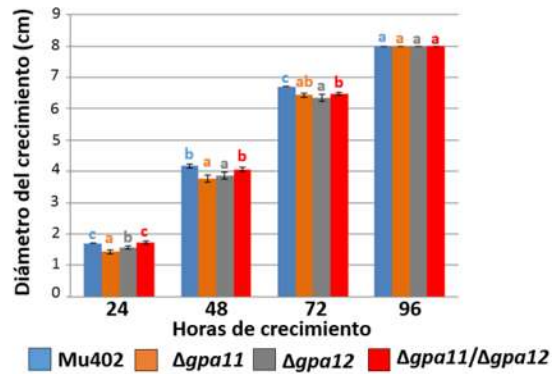


Figura 21. Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* sobre el crecimiento radial. 50 esporas de las cepas analizadas fueron inoculadas en el centro de la placa en medio YPG sólido, se incubaron a 28°C en presencia de luz. N=3, las barras corresponden a la desviación estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p < 0.05$.

7.2 Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* sobre la producción de esporas de *M. circinelloides*.

Debido a que los genes *gpa11* y *gpa12* se expresan con mayor nivel en el estadio de espora, donde la suma de ambos transcritos corresponden al 70% del total de los doce genes $G\alpha$ en dicho estadio morfológico (Valle-Maldonado y col., 2015); se cuantificó la producción de esporas de las cepas mutantes. Se realizó un ensayo inoculando 50 esporas por placa de medio YPG sólido, las cuales fueron incubadas por cinco días. Finalmente las esporas fueron cosechadas y contadas. Se encontró que la producción de esporas en las mutantes $\Delta gpa11$ y $\Delta gpa12$ fue de $7 \times 10^5/\text{cm}^2 (\pm 0.3)$ y $7 \times 10^5 (\pm 0.5) \times 10^5/\text{cm}^2 (\pm 0.5)$ mientras que la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ es de $6 \times 10^5 \times 10^5/\text{cm}^2 (\pm 0.2)$ con respecto a la cepa silvestre MU402 que genero un promedio de $1.7 \times 10^6 (\pm 0.29)^6/\text{cm}^2$ (Fig. 22).

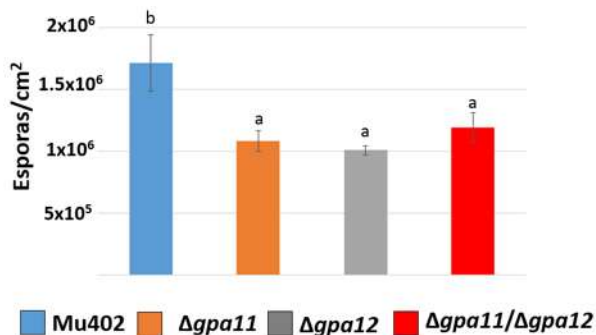


Figura 22. Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* sobre la esporulación. Se inocularon 50 esporas en placas de medio YPG sólido, se incubaron a 28°C en presencia de luz por 5 días. Al final de este tiempo las esporas fueron cosechadas y contadas, N=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p < 0.05$.

7.3 Efecto de la doble mutante *gpa11* y *gpa12* sobre el tamaño de las esporas

Al contar las esporas de las distintas cepas, se observó en la doble mutante un mayor tamaño de las esporas. Por lo tanto, para determinar si las mutantes señaladas $\Delta gpa11$ y $\Delta gpa12$ también producían esporas con distintos tamaños, se analizó una de las cepas. Dicho parámetro en 100 esporas de cada cepa, los datos se graficaron y se observó que se redujo la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$, presentaba esporas más grandes respecto al resto de las cepas. El tamaño promedio de dichas esporas fue de $15 (\pm 3) \mu\text{m}$ a diferencia de la silvestre Mu402-P, cuyo tamaño fue de $10 (\pm 2) \mu\text{m}$ en promedio. Las esporas producidas por las mutantes sencillas $\Delta gpa11$ tienen un tamaño de $10.2 (\pm 2) \mu\text{m}$ y la cepa $\Delta gpa12$ mostro un ligero aumento del tamaño $11.5 (\pm 3) \mu\text{m}$. Es decir que la cepa doble mutante genera esporas más grandes que el resto de las cepas analizadas (**Fig. 23 A y B**). Se ha reportado que la proteína SCH9 en *S. cerevisiae*, homóloga de la S6K de humano (sustrato de la cinasa TOR), en la biogénesis de ribosomas así como también en la regulación del tamaño celular (**Jorgensen y col., 2002**). Así mismo, se ha descrito en *M. circinelloides* que la mutación en el gen *cnaA* (subunidad catalítica de la calcineurina) produce esporas más grandes respecto a la cepa silvestre. Debido a que la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ presentó un aumento en el tamaño de las espóra, se decidió la expresión de los genes *s6k* y *cnaA*. Por esto, se utilizó el RNA proveniente de esporas de las cepas mutantes $\Delta gpa11$, $\Delta gpa12$, $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ y la cepa silvestre Mu402-P. En la (**Fig. 24**) se puede observar que no se presentación diferencias en los niveles de *s6k* en las cepas analizadas, excepto en la cepa $\Delta gpa11$, quien mostró una disminución de $\approx 40\%$ respecto a la cepa control. Por otra parte, en la expresión de *cnaA* se registró una disminución considerable (tres veces menos) respecto a la doble mutante y la $\Delta gpa12$ en comparación con la silvestre, estas dos últimas cepas mutantes mostraron un aumento significativo del tamaño de sus esporas respecto a la cepa silvestre (**Fig. 23**).

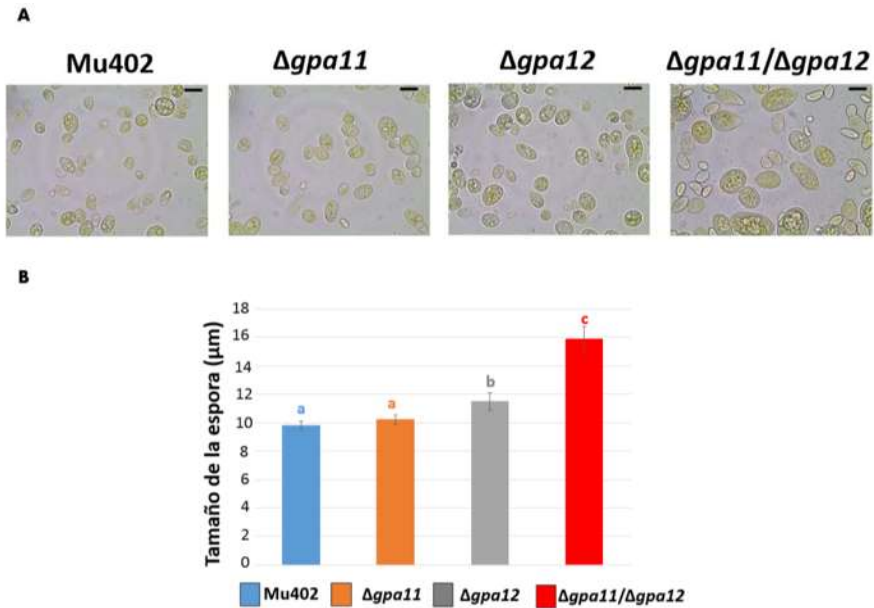


Figura 23. Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* sobre el tamaño de las esporas. A. Morfología de las esporas tomadas en microscopio con objetivo 100X barra de magnitud 10 μm . B. Tamaño de las esporas de la cepa silvestre Mu402, las mutantes $\Delta gpa11$, $\Delta gpa12$, y la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$. N=50, las barras corresponden al error estándar; análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p < 0.05$.

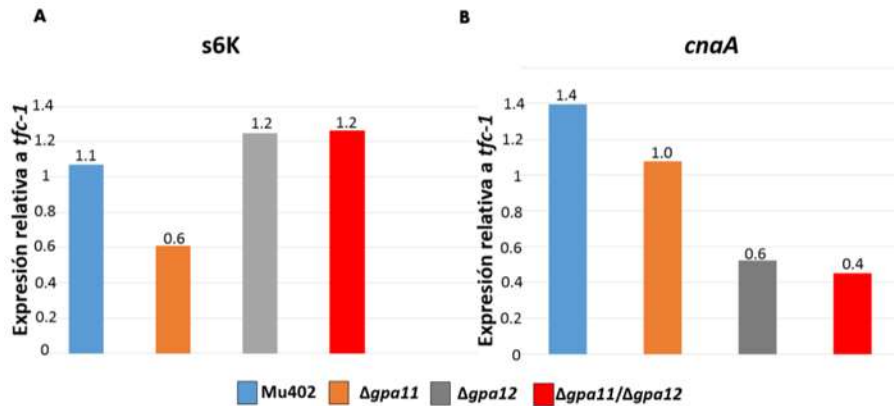


Figura 24. Efecto de la mutación en los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* sobre la expresión del gen *s6k* y *cnaA*. El RNA total de las esporas de las cepas Mu402, $\Delta gpa11$, $\Delta gpa12$ y de la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ fue aislado y sometido a un ensayo de qRT-PCR con los oligonucleótidos correspondientes a los genes *s6k* (A) y *cnaA* (B) de *M. circinelloides*. Los valores de expresión fueron relativos al gen de referencia *tfc-1*. Los resultados muestran el promedio de dos datos independientes.

7.4 Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* sobre la germinación aerobia

Se ha descrito en *M. circinelloides* que el aumento en el tamaño de las esporas conduce a un incremento en la velocidad de germinación aeróbica (Li y col., 2011). Con la finalidad de observar el efecto de las mutaciones de los genes *gpa11* y *gpa12* sobre la germinación en crecimiento aerobio, se realizó un ensayo en medio YPG líquido. Se determinó el porcentaje de células que emitieron el tubo germinativo a 1, 2, 3, 4 y 5 h de incubación, observándose que en la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ a la primera hora de crecimiento ya mostraba células hinchadas, efecto que precede a la emisión del tubo germinativo. No se observaron diferencias

significativas a las primeras horas entre todas las cepas analizadas; en cambio, a las 3 horas, la cepa mutante $\Delta gpa12$ presentó una germinación del 70% respecto a la cepa silvestre MU402-P (45%). En las cepas $\Delta gpa11$ y doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ no se observan diferencias en la germinación con respecto a la cepa silvestre (Fig. 25 y 26).

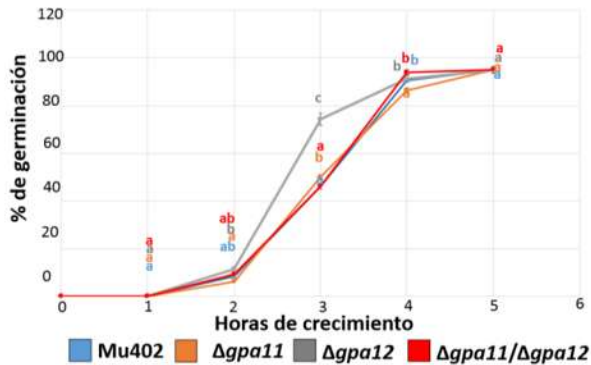


Figura 25. Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* sobre la germinación aerobia. Fueron inoculadas 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG a 28°C y se registró la germinación en aerobiosis durante los tiempos indicados. $N=3$, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p < 0.05$.

Con el experimento anterior (Fig. 25) únicamente se determinó las esporas que germinaban, independientemente del tamaño de las hifas. En el presente experimento decidimos evaluar la longitud y morfología de las hifas. Dichas estructuras se observaron al microscopio y se midió su longitud. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 27, donde se puede observar una diferencia en la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ presentó en términos generales el tubo germinativo de mayor extensión respecto a las mutantes sencillas $\Delta gpa11$ y

$\Delta gpa12$, las cuales no presentaron diferencias significativas respecto a Mu402-P. De igual manera, se midió el tamaño de la célula madre donde la mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ muestra una diferencia significativa en comparación a Mu402-P (Fig. 27).

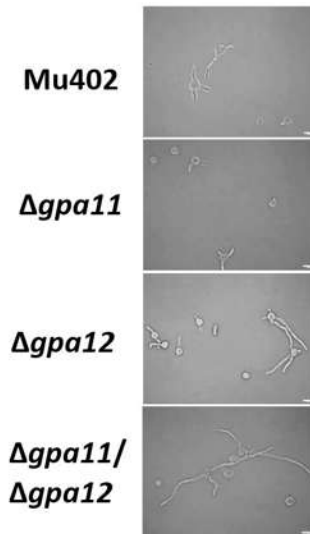


Figura 26. Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* en la morfología en aerobiosis. Se muestran fotografías representativas a 5 campos de germinación aeróbica a 28°C. Fotos tomadas a las 3 horas de germinación. Medio YPG líquido, 5×10^5 esporas/mL, N=3, Barra =20 μ m.

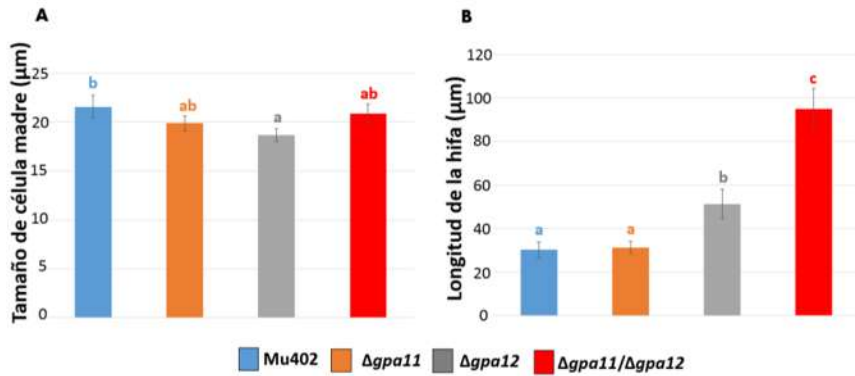


Figura 27. Tamaño de la célula madre y longitud de la hifa en diferentes cepas mutantes. A). Tamaño de la célula madre de la cepa silvestre Mu402 y de las mutantes $\Delta gpa11$, $\Delta gpa12$, y la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ a las 3 horas de crecimiento en medio YPG a 28°C. **B)** Longitud en μm del tubo germinativo a las 3 horas de crecimiento en medio YPG a 28°C de las distintas cepas. N=20, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p < 0.05$.

7.5 Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* sobre el crecimiento en aerobiosis

Para determinar si el aumento en la longitud de las hifas de la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ afecta la generación de biomasa, se procedió a medir el crecimiento. Para ello se realizaron curvas de crecimiento en condiciones aeróbicas en medio YPG líquido a 28°C, determinando la biomasa, representada por el peso seco (g) por cada litro de medio en cada uno de los cultivos de las cepas analizadas a las 6, 12 y 24 h de crecimiento. Se observó una tendencia a disminuir la biomasa a partir de las 12 h de crecimiento en la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$. Las demás cepas mostraron un crecimiento significativamente menor a las 24 horas respecto al resto de las cepas (**Fig. 28**). Mientras que la mutante sencilla $\Delta gpa12$ generó significativamente una mayor cantidad de biomasa respecto a la cepa silvestre a las 6 horas de crecimiento, a diferencia de la mutante $\Delta gpa11$ que generó una menor cantidad de biomasa respecto a la cepa silvestre al mismo tiempo analizado. Finalmente a las 24 h en términos generales la cepa silvestre tiene una tendencia a generar más biomasa respecto a las demás cepas. De igual forma las mutaciones sencillas generaron un mayor crecimiento a las 24 horas respecto a la cepa doble mutante.

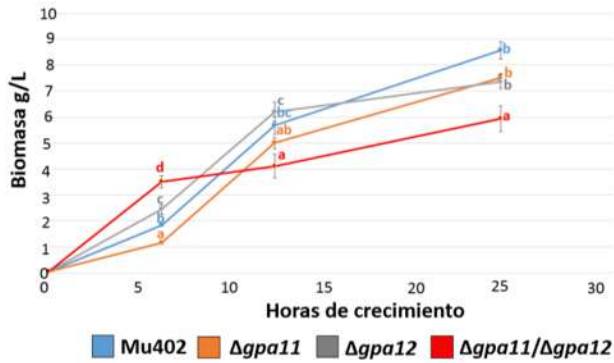


Figura 28. Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* en el crecimiento aerobio. Fueron inoculadas 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG líquido, se registró la biomasa generada a las 6, 12 y 24 horas de crecimiento. N=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p < 0.05$.

7.6 Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* sobre la germinación en anaerobiosis.

Debido a que la doble mutación en los genes *gpa11* y *gpa12* generaron un tamaño de las esporas mayor a la cepa silvestre Mu402-P y a las mutantes sencillas $\Delta gpa11$ y $\Delta gpa12$, se procedió a analizar si también podría presentarse un defecto en condiciones anaeróbicas. Por lo tanto, se determinó la germinación levaduriforme en las cepas mutantes. Por lo cual, se realizó un ensayo en medio YPG líquido inoculando 5×10^5 esporas por cada mL. Se cuantificó el porcentaje de germinación a las 3, 6 y 12 h. La mutante sencilla $\Delta gpa12$ presentó un mayor porcentaje de germinación (13%), mientras que la cepa mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ germinó en un (8%) la silvestre Mu402-P (3%) y la mutante $\Delta gpa11$ (3%), es decir, tres veces más que la silvestre a las 3 h. Esta tendencia de una mayor germinación en la cepa $\Delta gpa12$ se mantuvo a las 6 horas ya que se registró una germinación del 80%, cifra similar a la observada en la cepa doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$. La cepa silvestre mostró un 70% de germinación y la $\Delta gpa11$ un 60% de germinación. Por lo tanto el producto de los genes *gpa11* y *gpa12* involucrados en la germinación anaeróbica (**Fig. 29 y 30**).

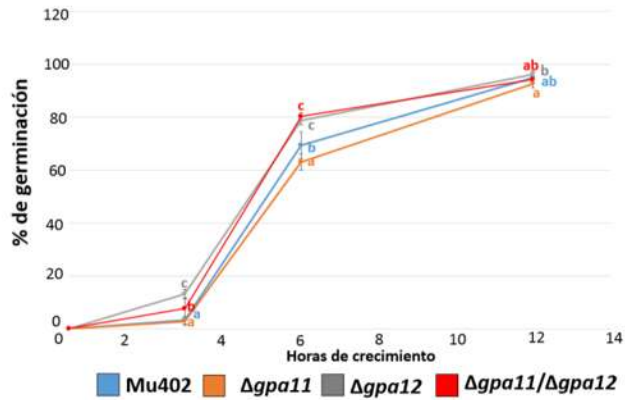


Figura 29. Efecto de la mutación de los genes $\Delta gpa11$ y $\Delta gpa12$ de *M. circinelloides* sobre la germinación en anaerobiosis. Fueron inoculadas 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG, se registró la germinación en anaerobiosis a las 3, 6 y 12 horas de crecimiento. N=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p < 0.05$.

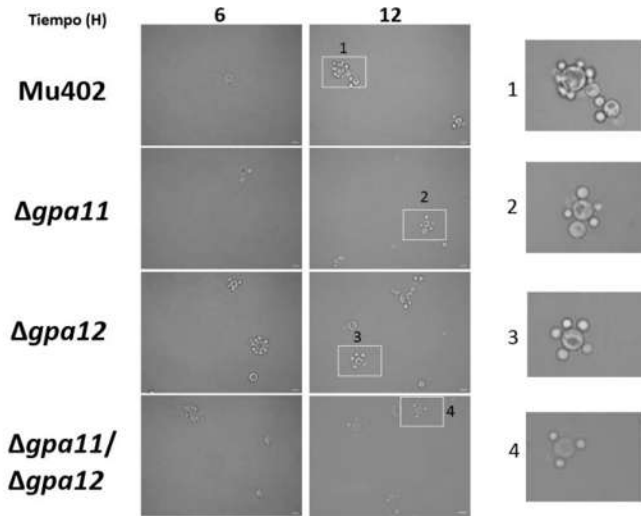


Figura 30. Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* en la morfología en anaerobiosis. Se muestran fotografías de germinación anaeróbica representativas. De lado derecho se ilustra un acercamiento de las levaduras generadas por las diferentes cepas a las 12 horas. Fotos tomadas a las 6 y 12 horas de germinación. Medio YPG líquido, 5×10^5 esporas/mL, N=3, Barra 20 μ m.

7.7 Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* sobre el crecimiento anaerobio

Con la finalidad de conocer el efecto de la mutación de los genes $\Delta gpa11$ y $\Delta gpa12$ sobre el crecimiento en condición anaerobiosis, se realizaron curvas de crecimiento en medio YPG líquido, inoculando 5×10^5 esporas/mL. Se cuantificó la biomasa representada por el peso seco en gramos (g) por cada litro de medio a las 3, 6, 12 y 24 h de crecimiento. Diferencias significativas se presentan a las 3 y 6 horas en la mutante $\Delta gpa12$ con un aumento del 70% y 40% respectivamente de la biomasa en comparación con Mu402-P, mientras que la mutante $\Delta gpa11$ y $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ tienen un crecimiento similar entre ellas y ligeramente mayor en un 40% a las 3 horas en comparación con Mu402-P (Fig. 31).

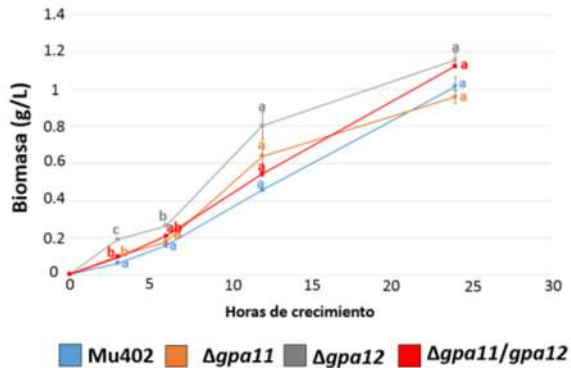


Figura 31. Efecto de la mutación de los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides* en el crecimiento anaerobio. Fueron inoculadas 5×10^5 esporas por cada mL de medio YPG líquido, se registró la biomasa generada a las 3, 6, 12 y 24 horas de crecimiento en anaerobiosis, N=3, las barras corresponden al error estándar, análisis de varianza, ANOVA de una vía, Fisher, $p < 0.05$.

VIII. RESUMEN DE RESULTADOS

- Las cepas mutantes sencillas $\Delta gpa11$ y $\Delta gpa12$ y la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ presentaron una disminución similar en la producción de esporas (<30%) respecto a la silvestre Mu402.
- La doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ generó esporas más grandes (>15 μm) en comparación a la cepa silvestre Mu402 y las mutantes sencillas $\Delta gpa11$ y $\Delta gpa12$ (10 μm en promedio). Sin embargo, las esporas de la cepa doble mutante no germinan más rápido que el resto de las cepas, aunque si presentan una mayor longitud en las hifas. Las esporas de la cepa doble mutante no mostraron cambios en los niveles de RNAm del gen *s6k*, mientras que si mostró una clara disminución en la expresión del gen *cnaA*, el cual está implicado en la regulación del tamaño de las esporas.
- Las esporas de la cepa doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ aunque generaron hifas de mayor longitud, esto no se reflejó en una mayor biomasa respecto a las demás cepas.

IX. Perspectivas

1. Realizar la transformación en la cepa doble mutante con el gen *cnaA* de *M. circinelloides* con la finalidad de sobreexpresar dicho gen y revertir el fenotipo de esporas más grandes. Lo cual en caso de ser cierto indicaría la regulación de la vía de la calcineurina por parte de Gpa11 y Gpa12.

X. Discusión

Las vías de señalización mediadas por proteínas G heterotriméricas en hongos controlan una amplia gama de funciones celulares. *Mucor circinelloides* posee el mayor número de subunidades G heterotriméricas en el reino Fungí reportadas hasta la fecha **(Valle-Maldonado y col., 2015)**.

El planteamiento de este proyecto estuvo basado en el hecho de que los genes que codifican a las subunidades Gpa11 y Gpa12 mostraron los niveles de expresión más elevados en el estadio de espora, respecto a todas las subunidades G heterotriméricas (18 en total) **(Valle-Maldonado y col., 2015)**. Las esporas en el reino fúngico son consideradas medios de reproducción, de dispersión en el medio ambiente y también representan un estadio de resistencia. Cuando las condiciones son favorables las esporas permiten nuevamente el crecimiento vegetativo, por lo tanto resulta interesante investigar la función de estos dos genes en *M. circinelloides* en la generación de las esporas y su función en términos de germinación.

La proteína Gpa11 de *M. circinelloides* pertenece al grupo I de la clasificación filogenética en hongos y los miembros de este grupo muestran homología con las subunidades $G\alpha_s$ de mamíferos, las cuales tienen por lo general una actividad estimuladora sobre la adenilato ciclasa, aumentando los niveles de AMPc **(Santos de Medeiros y col., 2013)**. Gpa11 muestra una identidad del 60% con FadA de *A. nidulans*, la cual participa como regulador negativo de la esporulación; las mutantes constitutivamente activas bloquean la producción de esporas en *A. nidulans* **(Hicks y col., 1997)**. Gpa11 de *M. circinelloides* muestra el mismo porcentaje de identidad (60%) con MagB de *M. grisea* y FGA1 de *F. oxysporum* las cuales están involucrados en virulencia y resistencia al calor **(Sona y col., 2004; Li y col., 2007)**; ambas proteínas pertenecen al mismo grupo filogenético que Gpa11.

En cambio, Gpa12 pertenece al grupo III de la clasificación filogenética y homóloga a las subunidades del $G\alpha_i$ de mamíferos. Estas últimas por lo general inhiben la actividad de adenilato ciclasa y así los niveles de AMPc. Además, miembros de $G\alpha_i$ de mamíferos pueden tener otros efectores como fosfodiesterasas, las cuales

degradan al AMPc (**Artemeyev y col., 2006**) y canales iónicos, entre otros (**Zhang y col., 2009**). Gpa12 de *M. circinelloides* muestra un 63% de identidad con FGA2 de *F. oxysporum* (**Sona y col., 2004**) cuya participación se ha descrito en virulencia, y un 60% de identidad con la subunidad GanB de *A. nidulans* y GNA3 de *N. Crassa*; FGA2 y GanB se ha reportado que participan como reguladores negativos de la producción de esporas (**Kays y col., 2000; Li y col., 2007**).

Por otra parte, la mutación sencilla en el gen *gpa12* generó un fenotipo más propenso a formar levaduras; esto quizás debido a que la proteína *GPA12* muestra homología con las subunidades $G\alpha_i$ de mamíferos. Dichas subunidades por lo general, inhiben la actividad de la adenilato ciclasa disminuyendo los niveles de AMPc. Este dato sugiere que la ausencia de Gpa12 en *M. circinelloides* aumentaría los niveles de AMPc. A diferencia del gen *gpa11*, *gpa12* mostró mayores niveles de expresión aumentados en levaduras de 12 h (al igual que el gen *gpa4*), sugiriendo también un posible papel en el estadio levaduriforme (**Valle-Maldonado y col., 2015**). Se sabe que niveles altos de AMPc acompañan a un crecimiento levaduriforme en especies dimórficas de *Mucor* (**Orlowski, 1991**), de igual forma la administración de dibutilil AMPc (análogo del AMPc más permeable a las membranas celulares) a esporas de varias especies dimórficas de *Mucor*, también conlleva a un crecimiento levaduriforme a pesar de crecer en presencia de oxígeno (**Orlowski, 1991**). La mutación sencilla en el gen *gpa11* no generó ningún efecto en la morfología de levaduras.

En este estudio se observó que la doble mutación en los genes *gpa11* y *gpa12* de *M. circinelloides*, no generó ningún cambio dramático en la producción de esporas respecto a la cepa silvestre y las cepas mutantes sencillas. Sin embargo, las esporas de esta doble mutante fueron más grandes. Por lo general, las esporas de la cepa silvestre de *M. circinelloides* presentaron un tamaño promedio de 10 μM (**Li y col., 2011**), mientras que la cepa doble mutante generó esporas con un tamaño promedio de 16 μM . Es de hacer notar que ninguna de las mutantes sencillas generó este fenotipo, lo cual sugiere que ambos genes tienen funciones

redundantes en la regulación del tamaño de las esporas. Cabe mencionar que el transcrito de ambos genes en esporas corresponde a cerca del 70% del total de los transcritos de los doce genes $G\alpha$ de *M. circinelloides*, sugiriendo que los productos de ambos genes son necesarios para la producción y/o función de las esporas **(Valle-Maldonado y col., 2015)**.

Por otra parte se ha reportado *M. circinelloides* que el gen que codifica a la subunidad catalítica A de la calcineurina (*cnaA*) está implicado en el control del tamaño de las esporas, la cepa mutante en dicho gen generó esporas más grandes (16 μ M) respecto a la cepa silvestre **(Lee y col., 2013)**. Así mismo, se ha reportado que el control del tamaño celular es dependiente de la activación de S6K en el ascomiceto levaduriforme *S. cerevisiae*, S6K es uno de los sustratos de la cinasa TOR, SK6 en *S. cerevisiae* está implicada en la biogénesis de ribosomas, síntesis de proteínas y regulación del tamaño celular **(Jorgensen y col., 2002)**. El análisis de la expresión del homólogo S6K de *S. cerevisiae* en *M. circinelloides*, no reveló mayor acumulación del transcrito de *s6k* en las esporas de la doble mutante respecto a las cepas silvestres y mutantes sencillas, sugiriendo que la vía TOR no está implicada en esta doble mutante. Sin embargo, es interesante observar que la cepa *Δ gpa11* disminuyó en un 40% los niveles de RNAm del gen *s6k* respecto a la cepa silvestre. Aunque no se observó ningún cambio en los fenotipos analizados en dicha mutante. Son necesarios más análisis para demostrar las implicaciones de esta disminución de RNAm de *s6k* en dicha mutante *Δ gpa11*, como la respuesta a nutrientes (nitrógeno) en donde la vía TOR está implicada en hongos.

En el ascomiceto dimórfico patógeno de humanos *Candida albicans* se ha descrito vía PKA, la cual involucra al AMPc y es regulada por proteínas G heterotriméricas; de alguna forma aún no conocida regula la fosforilación de la proteína S6K, pero aún no se ha determinado si dicha fosforilación es efectuada directamente por la cinasa PKA o a través de la fosforilación de TOR **(Chowdhry y Köhler, 2015)**. Sería interesante demostrar posteriormente en *M. circinelloides* si la vía de AMPc/PKA, al igual que en *C. albicans*, conduce a la regulación de la fosforilación de S6K.

La doble mutación en los genes *gpa11* y *gpa12* generó un aumento del tamaño de las esporas, aunque éste fue un efecto heterogéneo; es decir, la mayoría de las esporas de esta doble mutante fueron de mayor tamaño que la silvestre. Aún (cerca del 20%) de la población de esporas fue tamaño similar a la cepa silvestre. Una posible explicación podría deberse a una mayor cantidad de subunidades $G\alpha$, podrían estar participando en el proceso de formación y/o función de las esporas. Un nuevo análisis matemático, usando los datos de expresión de los genes que codifican a las subunidades $G\alpha$ de *M. circinelloides* previamente reportados (Valle-Maldonado y col., 2015), sugiere que un mayor número de genes que codifican a subunidades $G\alpha$ pudieran estar implicados en el estadio de esporas (Fig. XX). Estas subunidades se asocian dentro de los grupos filogenéticos de la siguiente manera: I: *gpa2*, *gpa8*, *gpa11* y III: *gpa9*, *gpa10* y *gpa12*. El grupo I y III se asocian filogenéticamente con $G\alpha$ estimuladoras e inhibidoras de la actividad de adenilato ciclasa, respectivamente en mamíferos.

Esta multiplicidad de genes que posiblemente contribuyen con la producción y/o función de las esporas, hace que el análisis con un enfoque de interrupción genética sea muy complejo, debido a que solamente se cuenta con dos marcadores de selección para la recuperación de transformantes en *M. circinelloides*. Sin embargo, podrían usarse técnicas alternativas como el silenciamiento simultáneo de genes que se están empezando a implementar.

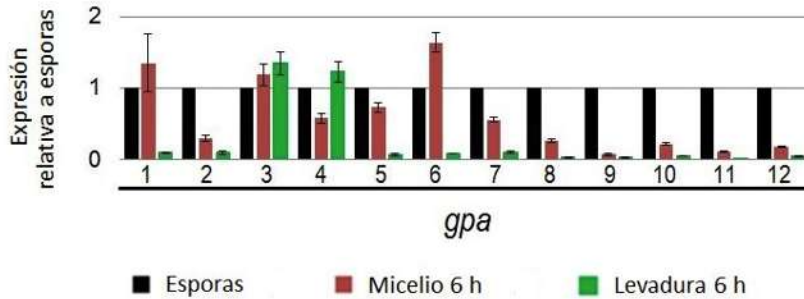


Figura 32. Análisis de la expresión de los genes $G\alpha$ en el dimorfismo de *M. circinelloides*. Los datos previamente reportados por Valle-Maldonado y col., 2015) fueron vueltos a ser analizados con el modelo matemático ($\Delta\Delta Ct$) en donde el estadio de espora, barra en color negro, es el punto de referencia (valor de 1 en la escala de expresión relativa); los datos del crecimiento vegetativo son comparados al estadio de espora.

Las esporas más grandes en *M. circinelloides* tienen implicaciones en un aumento en la velocidad de germinación y virulencia (Li y col., 2011). El producto del gen *cnaA* regula negativamente el tamaño de las esporas, y su mutación generó un aumento de dichas células, las cuales germinaron más rápido respecto a la cepa silvestre (Lee y col., 2013). El aumento en el tamaño de las esporas de la cepa doble mutante no condujo a una mayor germinación de las mismas; sin embargo, éstas emitieron un tubo germinativo más largo, siendo de 90 μM en promedio, mientras que las demás cepas emitieron un tubo de 30 μM para el caso de Mu402 y $\Delta gpa11$ y de 50 μM en $\Delta gpa12$ al mismo tiempo de crecimiento. Esto pudiera contribuir a un aumento de su potencial virulento ya que un incremento ya sea en la germinación o en el tamaño de la hifa contribuye de manera positiva en la virulencia de este Mucoral (Li y col 2011).

Por otra parte, sería interesante demostrar diferencias a nivel de polímeros de pared celular (quitina y quitosana), síntesis de proteínas, lípidos a nivel global y contenido

de agua en las esporas de la doble mutante $\Delta gpa11/\Delta gpa12$ para conocer si existen alteraciones a nivel de síntesis de macromoléculas de dicha mutante. Sería importante explorar a nivel de proteína si ocurre un cambio tanto en la cantidad total de proteína y el nivel de fosforilación de S6k en la mutante sencilla $\Delta gpa11$ de este Mucoral; dicha mutante mostró una reducción de transcrito en un 50% aproximadamente respecto a la cepa silvestre.

En conclusión, este estudio demostró la función de los productos de los genes *gpa11* y *gpa12* en la producción de las esporas de *M. circinelloides*, generando una alteración del tamaño en dicha doble mutante, implicando una desregulación en los niveles de transcrito de *cnaA*. Hasta la fecha, en hongos no se ha descrito la regulación de la vía TOR o de calcineurina por parte de proteínas G heterotriméricas, lo cual sin duda sería una contribución importante al conocimiento sugerido por este trabajo de investigación

XI. Conclusión

Los productos de los genes *gpa11* y *gpa12* presentan funciones redundantes en el control del tamaño de las esporas y en el crecimiento aerobio de *Mucor circinelloides*, implicando una desregulación de la transcripción del gen *cnaA*.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams T. H., Wieser J. K., y Yu J-H. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 35-54.
- Arnau J., Sørensen K. I., Appel K. F., Vogensen F. K., y Hammer, K. 1996. Analysis of heat shock gene expression in *Lactococcus lactis* MG1363. *Microbiology*, 142: 1685–1691.
- Artemeyev N. O., Rarick H. M., Mills J. S., Skiba N. P., y Hamm. 1992. Sites of Interaction between Rod G-protein α -Subunit and cGMP-phosphodiesterase γ -Subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 25067-25072.
- Bahn Y. S., Xue C., Idnurm A., Rutherford J. C., Heitman J., y Cardenas M.E. 2007. Sensing the environment: lessons from fungi. *Natural Review Microbiology*, 5: 57-69.
- Bastidas R. J., Shertz C. A., Lee S. C., y 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.
- Bartnicki-Garcia, S. 1968. Control of Dimorphism in *Mucor* by Hexoses: Inhibition of Hyphal Morphogenesis. *Journal of Bacteriology*. 96: 1586-1594.
- Bölker M., 1998. Sex and Crime: Heterotrimeric G Proteins in Fungal Mating and Pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 25: 143-156.
- Boyce K., McLauchlan A., y Schreider L. 2015. Intracellular Growth Is Dependent on Tyrosine Catabolism in the Dimorphic Fungal Pathogen. *PLoS Pathogens*, 11: 556-568.
- Camilli A., y Bassler B. L. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311: 1113–1116.
- Chowdhury T. y Köhler R. J. 2015. Ribosomal protein S6 phosphorylation is controlled by TOR and modulated by PKA in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 98: 384–402
- Corrochano L. M., y Ruiz-Albert J. 2004. Nucleotide composition in protein-coding and non-coding DNA in the zygomycete *Phycomyces blakesleeanus*. *Mycological Research*, 108: 858-863.
- David H., Özçelik, İ. Ş., Hofmann, G., y Nielsen, J. 2008. Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC Genomics*, 163.
- Donzeau M., y 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: 6110-6119.

- Drinkard L., Nelson G., y Sutter R. 1982 Growth arrest: A prerequisite for sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Experimental Mycology*, 6: 52-59.
- Etienne-Manneville S., y Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420: 629-635.
- Etxebeste O., Garzia A., Espeso EA., y Ugalde U. 2010. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends in Microbiology*, 18: 569-576.
- Feldbrügge M., Kamper J., Steinberg G., y Kahmann R. 2004. Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7: 666-672
- Han K. H., Seo J.A., y Yu J. H. 2004. Regulators of G-proteins signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (G α) signaling. *Molecular Microbiology*, 53: 529-540.
- Hee-Soo P. y Yu J. H. 2012 Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 15:669-677.
- Heisenberg M., y Cerdá-Olmedo E. 1968. Segregation of heterokaryons in asexual cycle of *Phycomyces*. *Molecular and General Genetics*, 102: 187-195.
- Hicks J. K., Yu J-H., Keller N. P., y 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: 4916-4923.
- J. L. Bos., H. Rehmann., y A. Wittinghofer. 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129(5):865-77.
- Kalthoff, K. 1996. Analysis of Biological Development. *McGrawHill New York*.
- 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., y Birren B.W. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444: 97-101.
- Klein, B. S., y Tebbets, B. 2007. Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 314-319.
 - Kozubowski L., Chan L. S., y Heitman J. 2009 Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*. *Cell Microbiology*, 11: 370–380.
 - Landry S., Pettit M. T., Apolinario E., y Hoffman C.S. 2000. The fission yeast *git5* gene encodes a G β subunit required for glucose-triggered adenylyate cyclase activation. *Genetics*, 154: 1463-1471.
 - Lasker B. A y Borgia P. T 1980. High-frequency heterokaryon formation by *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology*, 141:565-9.
 - Lee S.C., Li A., Calo S., y Heitman J. 2013. Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens* 9(9):
 - Li C. H., Cervantes M., Springer D. J., Boekhout T., Ruiz-Vazquez R. M., Torres-Martinez S. R., y Lee S. C. 2011. Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*, 7: e1002086.
 - Li L., Wright S. J., Krystofova S., Park G., y Borkovich K. A. 2007. Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *The Annual Review of Microbiology*, 61: 423–52.
 - Lozano P., Rocha R., y Martínez Y. 2005. Modelos de la patogénesis de las enfermedades infecciosas. Puebla: Universidad Autonoma de Puebla.
 - Lorca-Pascual J. M., Murcia-Flores L., Garre V., Torres-Martinez S., y 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: 1463-1474.
 - Lübbehüsen T. L., Nielsen J., y 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., Rodríguez-Romero J., Ruiz-Herrera J., Shen Y. Q., Zeng Q., Galagan J., Birren B. W., Cuomo C. A., y Wickes, B.L. 2009. Genomic analysis of the basal lineage fungus *rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genetics*, 5:e1000549.
 - Martos P., y Salido F. 2007. Microbiología clínica práctica. Cádiz: Universidad de Cádiz.

- McCudden C. R., Hains M. D., Kimple R. J., Siderovski D. P., y 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., y Nielsen J. 2002. Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 495-502.
- Mi-Hee C., Keon-Sang C., Dong-Min H., y Kwang-Yeop J. 2004. The GanB G protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics Society of American*, 10: 1534.
- Miller J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 325-355.
- Milligan G., y Kostenis E. 2006. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *British Journal of Pharmacology*, 1: 46-55.
- Morris J. A., y Malbon C. C. 1999. Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling. *Physiological Review*, 79: 1373-1430.
- Montoya H. H. 2008. Microbiología básica para el área de la salud y afines. Colombia: Universidad de Antioquia.
- Mukherjee P. K., Latha J., Hadar R., y 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.
- Murcia-Flores L., Lorca-Pascual J.M., Garre V., Torres-Martínez S., y 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.
- Nakafuku M., Itoh H., Nakamura S., y 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 Science*. 84: 2140-2144.
- Navarro E., Ruiz-Pérez V.L., y 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.
- Ni, M., Feretzaki, M., Sun, S., Wang, X., y Heitman, J. 2011. Sex in fungi. *Annual Review of Genetics*, 45, 405-415.
- Nicolas F.E., de Haro J.P., Torres-Martinez S., y Ruiz-Vázquez R.M. 2007. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* *dicer*-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics Biology*, 44; 504-516

- Nishijima K.A., y Wall M.M. 2011. First Report of Association of *Mucor circinelloides* on Noni (*Morinda citrifolia*) in Hawaii. *Plant Disease*, 95: 360.
- Noothalapati H., Sasaki T., Kaini T., Kawamukai M., Ando M., Hamaguchi H., y Yamamoto T. 2016 Label-free chemical imaging of fungal spore walls by raman microscopy and multivariate curve resolution analysis. *Scientific Reports* 9;6:27789.
- Ocampo J., McCormack B., Navarro E., Moreno S., Garre V., y Rossi S. 2012. Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4. *Eukaryotic Cell*, 11: 989-1002.
- Orłowski, M. 1991. *Mucor* dimorphism. *Microbiological Reviews*, 55: 234-258.
- Palomero G., y Vasquez T. 2005. Lecciones de embriología. Oviedo: Universidad de Oviedo.
- Pérez de Camino Cantos D. 2015. Diversidad y ecología de los Mucorales. Tesis Doctoral, Departamento de Genética, Universidad de Sevilla (España) pags. 14, 15 y 46.
- Ponnusamy M. P. y Batra S. K 2008. Ovarian cancer: emergin concept on cancer stem cells. *Journal of ovarian Reserch*, 1757-2215-1-4.
- Prats G. 2005. Microbiología Clínica. Argentina: Médica Panamericana.
- Rappleye C. A., y Goldman W. E. 2006. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annual Review of Microbiology*, 60: 281–303.
- Repasky G. A., Chenette E. J., y Der C. J. 2004. Renewing the conspiracy theory debate: does *Raf* function alone to mediate *Ras* oncogenesis? *Trends in Cell Biology*, 14: 639-647.
- Roncero M. I., Jepsen L. P., Strøman P., y van Heeswijck R. 1989. Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene*, 84: 335-343.
- Salcedo-Hernández R., y 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.
- Sambrook J., y Russell D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York*.
- Sánchez-Martínez C., y Pérez-Martín, J. 2002. Gpa2, a G-Protein α subunit required for hyphal development in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 1: 865-874.
- Schmoll M., Schuster A., do Nascimento Silva R., y 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: 410-420.

- Soll D. R., Srikantha T., Morrow B., Chandrasekhar A., Schröppel K. y Lockhart S. 1995. Gene regulation in the white-opaque transition of *Candida albicans*. R. Prasad. Berlin: Springer, 20-45.
- Sharma P. D. 2005. Fungi and Allied Organisms. Alpha Science International. Oxford, United Kingdom, 300.
- Silva F., Navarro E., Peñaranda A., Murcia - Flores L., Torres - Martínez S., y Garre V. 2008. A RING - finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis - independent ubiquitylation of a White Collar - 1 - like activator. *Molecular Microbiology*, 70: 1026-1036.
- Singh L. P., Gill S. S., y Tuteja N. 2011. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior*. 6: 175-191.
- Sona J., Kouichi A., Renkichi T., y Tomizo O. 2004. Signaling via the G protein α subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiology*, 165-172.
- Sprang R. S. 2016. Activation of G Proteins by GTP and the Mechanism of Ga-Catalyzed GTP Hydrolysis. Wiley Online Library 22836.
- Schwindinger W. F., y Robishaw J.D. 2001. Heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene*, 20: 1653-1660.
- Takai Y., Sasaki T., y Matozaki T. 2001. Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews*, 81: 154-188.
- Tan S. I. y Ramamurthi S. K. 2014. Spore formation in *Bacillus subtilis* *Environ Microbiology Report*. 6: 212–225.
- Tazi L., y Zeiger E. 2002. Fisiología vegetal. México: Sinauer Associates. Inc.
- Tesmer J.J.G. 2010. The Quest to Understand Heterotrimeric G protein signaling. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17: 650-658.
- Tortora G., Funke B. 2007. Introducción a la microbiología. México: Médica Panamericana.
- Tu J.C., y Malhotra S.K. 1976. The formation of sporangiospores in *Phycomyces*. *Microbios*, 15: 15-25.
- Turner G.E., y 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.
- Valle-Maldonado M.I., Jácome-Galarza I.E., Díaz-Peréz A., Martínez-Cadena G., Campos-García J., Ramírez-Díaz M.I., Reyes-de la Cruz H., Riveros-Rosas, Díaz-Pérez C., y Meza-Carmen V. 2015. Phylogenetic analysis of fungal heterotrimeric G protein-encoding genes and their expression during dimorphism in *Mucor circinelloides*. *Fungal Biology*, 119:1193.

- Van Heeswijck R., Roncero M. I. y Jepsen L. P. 1988. Genetic analysis and manipulation of *Mucor* species by DNA mediated transformation. In: Linskens JH, Jackson JF (eds) *Modern methods of plant analysis*, Vol VII. Springer Verlag, Berlin, 207–220
- Veening J. W., y Smits W. K. 2008. Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annual Review Microbiology*, 193–210.
- Weis K. 2003. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, 112: 441-451.
- White, M. M., James, T. Y., O'Donnell, K., Cafaro, M. J., Tanabe, Y., y Sugiyama, J. 2006. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, 98, 872-884.
- Whiteway M., Hougan L., Dignard D., Thomas D. Y., Bell L., Saari G. C., Grant F. J., y 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: 467-477.
- Wikandari R., Millati R., Lennartsson P.R., Harmayani E., y Taherzadeh M.J.2012. Isolation y Characterization of Zygomycetes Fungi from Tempe for Ethanol Production and Biomass Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167: 1501-1512.
- Wolff, A.M. y Arnau, J. 2002. Cloning of glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal Genetics and Biology*, 35: 21–29.
- Wright S. K., Inchausti R., Eaton C. J., Krystofova S., y Borkovich K.A. 2011. *RIC8* is a guanine-nucleotide exchange factor for G alpha subunits that regulates growth and development in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 189: 165-176.
- Xia C., Zhang J., Zhang W., y Hu B. 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., y Lipke P.N. 2010. On the evolution of fungal and yeast cell walls. *Yeast*, 27: 479-488.
- Yamada-Okabe, T., Mio, T., Ono, N., Kashima, Y., Matsui, M., Arisawa, M., y Yamada-Okabe, H. 1999. Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 181: 7243-7247.
- Yamaguchi M., Dieffenbach C.W., Connolly R., Cruess D.F., Baur W., y 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.

- Yamamoto T. 2016 Label-free Chemical Imaging of Fungal Spore Walls by Raman Microscopy and Multivariate Curve Resolution Analysis. *Scientific Reports* 6, Article number: 27789.
- Zerial M., y McBride H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2: 107-117.