

Estudio del efecto de la subunidad $G\alpha$ del subgrupo 1 codificada por *agal*
de *Acremonium chrysogenum* en la respuesta a diferentes
tipos de estrés fisiológico

Presentado por

Sandra Milena Aldana Bohórquez

Para optar por el título de Maestra en Biología Molecular y Biotecnología

PROGRAMA DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
PAMPLONA,

2019

Estudio del efecto de la subunidad $G\alpha$ del subgrupo 1 codificada por *agal*
de *Acremonium chrysogenum* en la respuesta a diferentes
tipos de estrés fisiológico

Presentado por:

Sandra Milena Aldana Bohórquez
Bióloga de la Universidad Industrial de Santander
Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Magister en Biología Molecular y Biotecnología

Director

Ramón Ovidio García Rico
PhD. Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de León
Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO)
rovigar@hotmail.com

PROGRAMA DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
PAMPLONA,
2019

Agradecimientos

Primeramente, a JHA, por su inconmensurable bondad.

Al equipo asesor y crítico nacional e internacional de cada uno de los pasos realizado para alcanzar los objetivos no solo propios de esta investigación, sino de aquellos objetivos personales que subyacen en la voluntad para investigar.

A la infinidad de tropiezos propios del crecimiento de *A. chrysogenum*, porque conocerle no fue fácil, y me ha dejado con la curiosidad de muchas de sus formaciones e impetuosos arranques de crecimiento.

Contenido

Índice de Figuras	7
Índice de Tablas	8
Índice de Abreviaturas	8
INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO	12
RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION	16
3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....	18
3.1 Ciclo de Vida Asexual.....	18
3.2 La Colonia Fúngica y Su Auto-Integración.....	21
3.3 Transducción de Señales: Proteínas G Heterotriméricas Intermediarios Moleculares de la Señalización Celular.....	21
3.3.1 Subunidad G α del grupo 1.....	23
3.4 Transducción de Señales Reguladoras de las Respuestas a Estrés Ambiental.....	24
3.4.1 Estrés lumínico	26
3.4.2 Estrés Oxidativo.....	28
3.4.3 Estrés Osmótico.....	29
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo General	31
4.2 Objetivos Específicos.....	31
5. METODOS y MATERIALES.....	32
5.1 Microorganismos utilizados	32
5.1.1 Cepas bacterianas	32
5.1.2 Cepas fúngicas.....	32
5.2 Medios de Cultivo.....	32
5.3 Conservación de las cepas bacterianas.....	34
5.4 Conservación de las cepas fúngicas	34
5.4.1 Criopreservación:	34
5.4.2 Cultivo Periódico	35
5.4.3 Preparación del inóculo de <i>A chrysogenum</i>	35
5.5 Obtención de alelos mutantes y transformación de <i>A. chrysogenum</i>	36
5.5.1 Plásmidos de clonación.	36

5.5.2 Marcadores de Selección	37
5.6 Construcción de los Alelos <i>aga1</i> ^{G203R} <i>aga1</i> ^{G42R} y <i>aga1</i> ^{Q204L} por mutagénesis sitio-dirigida.....	38
5.7 Transformación de <i>A. chrysogenum</i> ATC11550	41
5.8 Protocolos de extracción, purificación y análisis de ADN	42
5.8.1 Extracción de ADN genómico	42
5.8.2 Verificación de la inserción de alelos <i>aga1</i> ^{G203Rd+} , <i>aga1</i> ^{G42Rd+} y <i>aga1</i> ^{Q204Ld+}	42
5.9 Caracterización de <i>A. chrysogenum</i>	43
5.9.1 Macromorfología.....	43
5.9.2 Micromorfología.....	43
5.9.3. Conidiación	44
5.10 Respuesta a estrés fisiológico en función de la Tasa de extensión radial relativa.....	45
5.10.1 Estrés Osmótico.....	46
5.10.2 Estrés Oxidativo.....	46
5.10.3 Estrés Lumínico	47
5.11 Análisis estadístico	47
6. CONSIDERACIONES ETICAS.....	47
7. RESULTADOS	48
7.1. Mutagénesis sitio dirigida del gen <i>aga1</i> y verificación de la transformación de <i>A. chrysogenum</i>.....	48
7.1.1 Integración de los plásmidos que llevan la mutación dominante del gen <i>aga1</i> y Comprobación por PCR.	50
7.2 Caracterización fenotípica de <i>A. chrysogenum</i> y sus transformantes G42R y Q204L.	52
7.2.1 Macromorfología.....	52
7.2.2 Micromorfología.....	53
7.2.3 Conidiación de <i>aga1</i> , <i>aga1</i> ^{G42R} y <i>aga1</i> ^{Q204L} de <i>A. chrysogenum</i>	54
7.2.4 Tasa de Extensión Radial Relativa de <i>aga1</i> , <i>aga1</i> ^{G42R} y <i>aga1</i> ^{Q204L} de <i>A. chrysogenum</i>	55
7.2 La Tasa de extensión radial relativa (TERR) y sus variaciones frente a condiciones de estrés ambiental	57
7.2.1 Participación de la proteína Gα heterotrimérica en la respuesta a estrés osmótico.	57
7.2.2 Participación de la proteína Gα heterotrimérica en la respuesta a estrés oxidativo	60
7.2.3 Participación de la proteína Gα heterotriméricas en la respuesta a estrés lumínico.....	61
8.1 Efecto de la señalización de la subunidad Gα heterotrimérica <i>Aga1</i> sobre la morfología, la conidiación y el crecimiento vegetativo.....	63
8.1.1 Papel de la subunidad Gα en la Morfología	64

8.1.2 Papel de la subunidad Gα en la Conidiación	65
8.1.3 Papel de la subunidad Gα en la Tasa de Extensión Radial Relativa	67
8.2 La señalización de la subunidad G α heterotrimérica <i>Aga1</i> bajo diferentes condiciones de estrés.....	69
8.2.1 Estrés Osmótico	69
8.2.2 Estrés Oxidativo.....	75
8.2.3 Estrés lumínico	78
CONCLUSIONES	81
RECOMENDACIONES	81
BIBLIOGRAFÍA.....	83

Índice de Figuras

Figura 1 A. Ciclo de vida asexual de <i>A. chrysogenum</i> . Una colonia se origina vegetativamente de un núcleo hifal sencillo o a través de la germinación de un conidio; luego se forma el micelio, desarrolla conidióforos sobre células especializadas, los conidióforos llegan a ser competentes para producir esporas. B. Colonia consistente de micelio vegetativo en crecimiento, y estructuras especializadas de reproducción asexual o conidióforos de los que derivan conidios o esporas asexuales (esquema correspondiente a observaciones microscópicas y estereoscópicas).	20
Figura 2 Proceso de respuesta de los sistemas fúngicos a condiciones ambientales mediado por proteínas G heterotriméricas.	25
Figura 3 Vectores empleados en la transformación de <i>A. chrysogenum</i> . A. Plásmido pULC43. B. Plásmido pJET1.2aga1.	37
Figura 4. Mutagénesis sitio dirigida sobre el gen <i>aga1</i> . Procedimiento general de obtención de la mutación Q204L realizado igualmente para obtener la mutación G42R y G203R. A. Plásmido pJET1.2 con inserción del gen <i>aga1</i> molde de la mutagénesis. B. PCR: Representación del alineamiento del par de oligonucleótidos empleados para obtener el alelo <i>aga1</i> ^{Q204L} . C. Productos de la PCR, a la izquierda plásmidos metilado o hemimetilado con el alelo silvestre <i>aga1</i> ; a la derecha amplicon no circularizado con todos los elementos de pJET1.2aga1 con la mutación Q204L. D. transformación de <i>E. coli</i> con pJET1.2aga1 ^{Q204L} E. Electroferograma del cambio de nucleótidos ocurrido por la mutagénesis sitio dirigida.	39
Figura 5 Mapas circulares de los plásmidos pC43aga1G203R, pC43aga1G42R , pC43aga1Q204 , mostrando la ubicación de algunos sitios de restricción, y la ubicación de las mutaciones.....	41
Figura 6 Esquema del fragmento del plásmido pC43aga1 en el que se representa el gen <i>ble</i> de resistencia a fleomicina y el gen <i>aga1</i> codificante de la subunidad $G\alpha 1$. Los números indican los sitios de unión de los oligonucleótidos empleados en la comprobación de la inserción de la mutación en el ADN genómico de <i>A. chrysogenum</i> que han sido listados a la derecha de la imagen. Las estrellas indican los sitios de ocurrencia de la mutagénesis sitio-dirigida.....	50
Figura 7 Análisis de transformantes por PCR de la inserción de la resistencia a fleomicina en <i>A. chrysogenum</i> , empleando los oligonucleótidos Tcyc-tr1-R y Ble-tr1-F con la polimerasa Taq Platinum. El programa de PCR se expone en la figura.	51
Figura 8. PCR de la integración del alelo <i>aga1</i> Q204L, se emplearon los pares de oligonucleótidos listados en la figura y la polimerasa Pfu Ultra II; esta metodología fue empleada para todos los alelos transformantes. El programa de PCR se expone en la figura, siendo 30X el número de ciclos.	51
Figura 9 Micrografías y macromorfología de <i>A. chrysogenum</i> y sus cepas transformantes dispuestas de izquierda a derecha las correspondientes al alelo <i>aga1</i> ^{G42R} , seguido del alelo <i>aga1</i> ^{Q204L} y finaliza con la cepa silvestre. Las micrografías muestran estructuras reproductoras y vegetativas que fueron tincionadas con azul de lactofenol y se visualizaron en un microscopio de contraste de fase (OLYMPUS CH30). En la parte superior se observaron con aumento de 40X y las dos inferiores con aumento de 100X. Las flechas negras señalan conidióforos. Las placas Petri superiores muestran el anverso y debajo de estas el reverso de cultivos por inoculación central en agar CCM con 10 días de crecimiento a 26°C para las cepas de <i>A. chrysogenum</i> y sus transformantes.	53
Figura 10 Conidiación promedio de las de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo <i>aga1</i> ^{G42R} y Q204L correspondiente al alelo <i>aga1</i> ^{Q204L} creciendo en medio CCM.	55

Figura 11 Tasa de extensión radial relativa promedio en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo $aga1^{G42R}$ y Q204L correspondiente al alelo $aga1^{Q204L}$ creciendo en medio CCM, para cada uno de los triplicados realizados	56
Figura 132 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo $aga1^{G42R}$ y Q204L correspondiente al alelo $aga1^{Q204L}$ creciendo en medio CCM suplementado con NaCl 0,5M.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo $aga1^{G42R}$ y Q204L correspondiente al alelo $aga1^{Q204L}$ creciendo en medio CCM suplementado con NaCl 1M.....	58
Figura 14 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo $aga1^{G42R}$ y Q204L correspondiente al alelo $aga1^{Q204L}$ creciendo en medio CCM suplementado con KCl 0,5M y 1M.	59
Figura 15 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo $aga1^{G42R}$ y $aga1^{Q204L}$ correspondiente al alelo $aga1^{Q204L}$ creciendo en medio CCM suplementado con Glicerina 0,5M.....	60
Figura 16 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo $aga1^{G42R}$ y Q204L correspondiente al alelo $aga1^{Q204L}$ creciendo en medio CCM suplementado con Glicerina 1M.....	59
Figura 17 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo $aga1^{G42R}$ y Q204L correspondiente al alelo $aga1^{Q204L}$ creciendo en medio CCM suplementado con H ₂ O ₂ 0,5M y 1M.	61
Figura 18 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo $aga1^{G42R}$ y Q204L correspondiente al alelo $aga1^{Q204L}$ creciendo en agar CCM y sometidas a fotoperiodicidad LD y LL.....	61

Índice de Tablas

Tabla 1 Subunidad $G\alpha$ heterotrimérica de ascomicetos considerados como organismos modelo y su efecto sobre el desarrollo morfológico	24
Tabla 2 Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis sitio dirigida	38
Tabla 3 Oligonucleótidos empleados en los análisis por PCR	42
Tabla 4 Condiciones y componentes de la reacción para PCR	43

Índice de Abreviaturas

Δ	delección, cuando está asociado a un gen, 77
7-TM	
	Receptor transmembranal heptahelicoidal, 14
ADN	

Ácido desoxirribonucleico, 40
ADP
Adenosin-monofosfato, 23
Aga1
Subunidad G alfa heterotrimérica del subgrupo I, 82
AMPc
Adenosin-monofosfato cíclico, 22
ARN
Ácido ribonucleico, 80
cbp
Cuanto baste para, 44
CCM
Medio complejo de cultivo, 34
CPC
Cefalosporina C, 73
DD
Condición de ausencia de radiación por luz (Dark/Dark), 48
FD
Factor de Dilución, 45
FHV
Fragmentos hifales viables, 44
G
Aminoácido glicina, 50
GAPs
Proteínas activadoras o aceleradoras de la actividad GTPasa (por su nombre en inglés
GTPase-activating protein or GTPase accelerating protein), 75
GDP
Guanosin-difosfato, 14
GEF
Factor de intercambio de nucleótidos de guanina (por su nombre en inglés
Guanine nucleotide exchange factors), 75
GMPc
Guanosin-monofosfato cíclico, 65, 75
GPCR
Receptores acoplados a proteínas G (por su nombre en inglés
G-Protein-Coupled Receptor, 22
GTP
Guanosin-trifosfato, 14
H₂O₂
Peróxido de Hidrógeno, 13
HCl
Ácido clorhídrico, 47
HOG
Alta osmolaridad del glicerol (por su nombre en inglés
High osmolarity glycerol, 85
IBM
por su nombre en inglés
International Business Machines Corporation, 48
KCl

Cloruro de potasio, 13
L
Aminoácido leucina, 49
LB
Luria Bertani, 34
LD
Condición de radiación por luz, 12 horas de luz /12 horas de oscuridad (Light/Dark), 48
LL
Condición de radiación por Luz constante (Light/Light), 48
LOV
Dominio de la familia de proteínas que reaccionan a la luz, el oxígeno y el voltaje (por su nombre en inglés. light-oxigen voltaje, 27
MgSO₄
Sulfato de magnesio, 44
min
Minuto, 44
MPAK
Proteína cinasa activada por mitógenos (por su nombre en inglés mitogen-activated protein kinase, 22
n.d
No determinado, 24
NaCl
Cloruro de Sodio, 13
NaOH
Hidróxido de Sodio, 47
NT
Solución de NaCl 0.9% y TritónX100, 45
OA
Oxidasa alternativa, 78
OIE
Organización Internacional para la Sanidad Animal, 16
OligoF
Oligonucleótido dirigido hacia adelante, de unión a la cadena de ADN molde, 44
OligoR
Oligonucleotido antisentido, localizado en la cadena de ADN complementario, 44
OMS
Organización Mundial de la Salud, 16
p/v
Relación peso -volumen de una solución, 45
pb
Pares de bases, 41
PCR
reacción en cadena de la polimerasa, 40
PDE
Fosfodiesterasa, 81
PKA
Fosfocinasa A, 81
PLCB1
fosfolipasa C-β, 75

Proteínas G
Proteínas G heterotriméricas, 14

Q
Aminoácido glutamina, 49

R
Aminoácido arginina, 50

RGS
Regulador de la señal de las proteínas G (por su nombre en inglés
Regulator of G protein signaling), 69

ROS
Especies reactivas al oxígeno (por su nombre en inglés. Reactive oxygen species), 85

rpm
Revoluciones por minuto, 45

s
Segundo, 44

SOD, 85
superóxido dismutasa, 85

SPR
Resonancia de plasmón superficial (por su nombre en inglés
surface plasmon resonance, 49

SPSS
Programa estadístico para las ciencias sociales (por su nombre en inglés
Statistical Package for the Social Sciences, 48

TaqDNAPolymerase
ADN Polimerasa de *Thermus aquaticus*, 43

TBS
por su nombre en inglés
tryptic soy broth, 42

TERR
Tasa de extensión radial relativa, 46

UAM
Universidad Autónoma de México, 48

UAM-I
Universidad Autónoma de México unidad Iztapalapa, 49

v/v
Relación volumen-volumen de una solución, 45

INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO

Título: Estudio del efecto de la subunidad G α del subgrupo 1 codificada por <i>agal</i> de <i>Acremonium chrysogenum</i> en la respuesta a diferentes tipos de estrés fisiológico
Realizado por: Sandra Milena Aldana Bohórquez
Director del Proyecto: Ramón Ovidio García Rico
Línea de Investigación: Biotecnología
Área: Biología Molecular
Línea estratégica: Transducción de señales
Grupo de Investigación: Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO)
Fuentes de Financiación: Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad de Pamplona.
Institución: Universidad de Pamplona
Localización: Pamplona, 31 de agosto de 2018

RESUMEN

Las proteínas G α heterotriméricas median la transducción de señales que regulan diversos procesos del desarrollo de los hongos y de la respuesta a estrés ambiental. *A. chrysogenum*, es el productor de uno de los antibióticos más comercializados en el mundo, la cefalosporina C, y del que poco se conoce sobre sus rutas de señalización, y de su respuesta a condiciones de estrés, por lo que se construyeron alelos que dan una señal constitutivamente activa de la proteína G α del subgrupo 1, los alelos *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q204L}*. Para cada alelo se obtuvieron colonias que fueron expuestas a diversos agentes, (KCl, NaCl y Glicerina al 0,5M y 1M; H₂O₂ 50mM y 100mM), se usó la cepa silvestre como control. Los resultados obtenidos se analizaron con pruebas no paramétricas, y sugieren que la proteína G α heterotrimérica regula negativamente la tolerancia a ambientes hiperosmóticos y oxidativos, haciendo más sensible al hongo a los factores de estrés, lo cual se refleja en la disminución de la tasa de extensión radial. La respuesta a estrés lumínico bajo luz constante, y fotoperiodo 12horas Luz/12 oscuridad, no mostró alteración significativa sobre la tasa de crecimiento e indica una posible ausencia de ritmo circadiano en *A. chrysogenum*.

Palabras Clave: GTPasa heterotrimérica, Subunidad G α , *Acremonium chrysogenum*, extensión hifal, estrés fisiológico.

1. INTRODUCCIÓN

Las condiciones medio ambientales generan estímulos que influyen en el comportamiento y respuesta de los seres vivos, la forma en que son transmitidas estas señales cumplen un papel fundamental en el ambiente intracelular, permitiendo generar respuestas necesarias para la supervivencia. Entre las rutas de señalización celular de mayor interés se encuentran aquellas mediadas por las proteínas G heterotriméricas (Proteínas G) que se encuentran conservadas evolutivamente (Milligan & Kostenis, 2006) desde bacterias hasta mamíferos y participan en la regulación de diversos procesos celulares., Jančič et al., 2016

La señalización de las proteínas G está comúnmente involucrada en el crecimiento y la diferenciación de las células eucariotas (Fang & Dean, 2000). Estas actúan como transductores de las señales, se localizan en la superficie interna de la membrana celular (Liu & Dean, 1997) y están acoplados a receptores transmembranales que recogen los estímulos del exterior celular como los receptores GPCR (G-Protein-Coupled Receptor) o heptahelicoidales (7-TM) (Wal, et al., 1995; Nichols, et al., 2013; Seibt, et al., 2013)

Las proteínas G heterotriméricas son un complejo proteico formado por tres subunidades: $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$. $G\alpha$ mantiene unido GDP, mientras que $G\beta\gamma$ forma un dímero que al estar unido a las $G\alpha$ las mantiene inactivas y ancladas a la parte interna de la membrana plasmática, una vez son activadas por los receptores de membrana, se separa la subunidad $G\alpha$ que intercambia GDP por GTP y el dímero $G\beta\gamma$, los cuales activan efectores en las rutas de señalización celular (Cabrera, et al., 2003; García, et al., 2017a; Liu & Dean, 1997; Zuber, et al., 2002).

La forma en la que la proteína G opera al interior celular en hongos filamentosos no ha sido dilucidada, las investigaciones existentes han permitido establecer que participa en procesos de desarrollo vegetativo, conidiación, germinación conidial, reproducción sexual, respuesta a estrés físico y químico, biosíntesis de metabolitos secundarios, entre otros, sin conocerse totalmente los efectos de la señal emitida por estas proteínas, pues presentan un efecto pleiotrópico no dilucidado totalmente.

La participación de las proteínas G ha sido estudiada a partir de interrupciones, deleciones y mutagénesis sitio dirigidas que conducen a señales dominantes constitutivamente activas e inactivas, con las cuales se han observado diferentes efectos sobre el desarrollo fúngico

Acremonium chrysogenum desde su descubrimiento por Brotzu en 1948, ha despertado especial interés biotecnológico debido a su producción de metabolitos secundarios, principalmente de Cefalosporina C, un antibiótico de amplio espectro, empleado bastamente en el control de diversas enfermedades, siendo un antibiótico de gran impacto económico.

Dado que la Subunidad G α del grupo I ha sido asociada a la biosíntesis de metabolitos secundarios, esta investigación analiza el papel de la subunidad G α del grupo 1 de *A. chrysogenum* en la respuesta a diferentes condiciones de estrés a través de la conversión de glicina 42 a arginina y de glutamina 204 a lisina en el gen *agal* codificante de esta subunidad.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

Los hongos filamentosos, entre otras cosas, han sido reconocidos por su capacidad metabólica para producir una amplia diversidad de enzimas y metabolitos de interés industrial, medioambiental y clínico (Elader, et al., 2003; Foz. & Howlett, 2008; Bloemendal, et al., 2014). Por este motivo, en la clase Sordariomycetes, destaca *Acremonium chrysogenum*, ya que se trata del hongo que produce naturalmente cefalosporina C, antibiótico beta-lactámico de amplio espectro, catalogado como un antimicrobiano de importancia crítica para la salud humana, por la OMS y para la sanidad animal por la OIE. La continua demanda de antibióticos ha generado un mercado global, donde los antibióticos β -lactámicos son los fármacos más utilizados con una facturación anual estimada en 22 billones de dólares, donde se estima que el 50% corresponde a derivados de Cefalosporina C (Demain, 2009).

En los hongos filamentosos, se ha encontrado una relación estrecha entre el metabolismo secundario y la morfogénesis, en los cuales se han descrito varios reguladores globales para ambos procesos (Calvo, et al., 2002; Hoff, et al., 2005). Tal es el caso del complejo Velvet que en *Aspergillus nidulans* y *Penicillium chrysogenum* regula tanto la conidiación como la producción de antibiótico (Kopke, 2013). Papel que parece conservarse en *A. chrysogenum*, en el que AcVEA (además de regular la expresión de los genes de la ruta biosintética) también está involucrada en la fragmentación hifal, proceso activo del desarrollo en la diferenciación de *A. chrysogenum* que resulta en la formación de células esféricas llamadas artrosporas (Dreyer, et al., 2007).

Tomando en cuenta este vínculo entre la morfogénesis y el metabolismo secundario, existe claramente un contraste en la investigación en torno a *A. chrysogenum*, ya que mientras que la ruta biosintética de las cefalosporinas ha sido ampliamente estudiada, los procesos de desarrollo biológico de *A. chrysogenum* y los mecanismos reguladores de sus características morfofisiológicas apenas han sido abordados. Lo anterior adquiere una mayor relevancia si se considera que se han reportado que algunas de estas características se relacionan con los niveles de producción del antibiótico en este hongo (Yu, et al., 1990). Esta situación ha con-

llevado a la necesidad de estudiar este hongo a nivel básico y molecular, para lo cual recientemente se han optimizado metodologías que permiten la manipulación y estudio genético del mismo (Bloemendal, et al., 2014).

A parte del poco conocimiento que se tiene sobre la morfofisiología del hongo, se requiere determinar su tolerancia a diferentes condiciones de estrés, las cuales están determinadas por los distintos factores abióticos que pueden presentarse durante el cultivo del hongo en medio sólido y líquido (fermentaciones).

Los cambios morfológicos del micelio durante las fermentaciones y dependiendo de las condiciones de operación han sido clasificados como: la forma dispersa y la forma de pellet (Sandor, et al. 2011); siendo ambas formas determinantes en la producción de cefalosporina C, así como la presencia de diversas fuentes de carbono, la fuente de nitrógeno, la cantidad de oxígeno disuelto y el tiempo de la fermentación, incluso para procesos de producción por fermentación en estado sólido (Raju, et al., 2012), dado que pasadas 48 horas de cultivo se presentan fenómenos de fragmentación hifal o artrosporación, siendo la formación de agregados miceliales un indicador visual de este fenómeno que conduce a una disminución gradual en la producción de Cefalosporina C (Sandor, et al., 2011).

A su vez los mecanismos fisiológicos, pueden verse afectados por el reloj biológico intrínseco del hongo el cual es inherente al movimiento rotacional de la tierra, derivando en ciclos circadianos dependientes de luz (Ramsdale, 2001), en los que participan proteínas capaces de detectar la luz y de activar señales de respuesta fisiológica y morfológica (Avalos, et al., 2010). Estas formas de reacción frente a los estímulos ambientales son reguladas por la transducción de señales, y pueden ser determinadas a fin de describir los mecanismos de tolerancia frente a las condiciones medioambientales que le resulten adversas (Ferreira, et al., 2007), su dilucidación permite mantener su integridad y funcionalidad en los procesos de manipulación *in vitro* y a gran escala.

El desarrollo morfofisiológico en hongos filamentosos es coordinado y retroalimentado por diferentes vías de señalización que son activadas por agentes extracelulares y reguladas internamente a partir de la transducción de señales.

Este trabajo se enfoca en la señalización mediada por proteínas G, una de las rutas de señalización más universal y que tiene injerencia tanto sobre la morfología, como en el metabolismo secundario de los hongos filamentosos; particularmente sobre el papel que desempeña la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica ($G\alpha$), la cual se ha reportado como el componente más activo e importante de esta ruta de señalización (Li, et al., 2007).

Con la dilucidación del efecto de la $G\alpha$, se pretende dar los primeros pasos en la descripción del mecanismo regulador de las características morfológicas asociadas al establecimiento y crecimiento de *A. chrysogenum*, así como el papel de esta ruta en la respuesta del hongo a diferentes condiciones de estrés.

3. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

El ciclo de vida de los hongos filamentosos se caracteriza por el desarrollo de dos fases, la primera, una fase somática o vegetativa, encargada principalmente de la actividad trófica, y la segunda, una fase reproductiva. La fase somática corresponde a las células no reproductivas, que debido a su actividad trófica están relacionadas a la producción de enzimas extracelulares que permiten realizar la digestión de nutrientes para luego ser absorbidos.

3.1 Ciclo de Vida Asexual.

En Ascomycetos, la esporulación asexual es la forma de reproducción más común y más fácil de observar macroscópicamente, por la pigmentación característica que se produce durante la conidiogénesis (Adams, et al., 1998); ésta fase inicia con la germinación de una

espora, generada mitóticamente (conidiospora) en el conidióforo. Los conidios son las estructuras mayormente producidas por los hongos filamentosos y constituyen estructuras de resistencia al estrés mediante el almacenamiento de azúcares y polioles, que confieren tolerancia a diversas condiciones ambientales (Hagiwara, et al., 2014) afectando las características morfogénicas del hongo (Xu, & Mitchell, 2012.).

La germinación conidial incluye tres etapas: activación, crecimiento isotrópico y crecimiento polarizado. La activación se da como respuesta a algún estímulo ambiental, los principales factores que influyen en la activación son: la disponibilidad de agua, la relación oxígeno/dióxido de carbono, la disponibilidad de nutrientes (generalmente azúcares de bajo peso molecular) y/o la concentración de sales inorgánicas.

El conjunto de estos factores propicia un incremento de la actividad metabólica característica del crecimiento isotrópico, en el cual se observa un aumento de tamaño de la espora por absorción de agua y producción de pared celular. La formación de depósitos de pared celular en un determinado punto de la espora, indica la transición del crecimiento isotrópico al crecimiento polarizado donde se forma el tubo germinal (d'Enfert, 1997).

Cuando el tubo germinal alcanza un ancho equivalente al largo, se demarca el límite entre la germinación y el crecimiento vegetativo (d'Enfert, 1997), caracterizado por la elongación del tubo germinal que posteriormente se ramifica formando una red ordenada y organizada coherentemente en función de la distribución de energía, existiendo un proceso de auto-integración del micelio que permite reducir o minimizar el costo energético y opera mediante la fusión de los bordes entre hifas o anastomosis

El proceso puede ocurrir entre hifas individuales y entre agregados hifales, convirtiendo al sistema ramificado del hongo en una red de trabajo de mayor resistencia, que permite amplificar la escala organizacional del micelio, y permite distribuir mejor los recursos, que conducen a la formación de sitios específicos para el desarrollo de estructuras reproductoras. (Rayner, et al., en Gow, et al., 1999) Este tipo de crecimiento, en un sustrato sólido, forma una colonia con simetría radial, que se expande indefinidamente a una tasa constante,

en ausencia de limitantes; el crecimiento hifal sigue un modelo de polarización por extensión apical (Trinci, 1971), donde el control molecular del crecimiento hifal, de la formación de la colonia, así como los factores que gobiernan la diferenciación celular permanece aún por caracterizar. (Engh, et al., 2010; Jeraj, et al., 2012)

El micelio contiene varias células que interactúan y juegan distintos papeles en la adquisición de nutrientes desde el ambiente, alcanzando un estado de desarrollo que le permita formar estructuras reproductivas especializadas, la exposición a condiciones ambientales claves estimulan la formación del denominado micelio aéreo (Springer, & Yanofsky, 1989), caracterizado por hifas que se levantan del sustrato, y pueden diferenciarse en conidióforos a medida que se extiende el micelio, los conidióforos más antiguos quedan hacia el centro de la colonia, formándose nuevos conidióforos hacia el margen de la colonia (Adams, et al., 1998; Moore, 1996). El proceso involucrado en la conidiación incluye una regulación génica temporal y espacial, especialización celular y comunicación intracelular (Adams, et al., 1998); mediante cascadas de reacciones activadas por estímulos ambientales e intracelulares en los que participan proteínas intermediarias activadores de efectores que generan una respuesta celular o supresora de la señal.

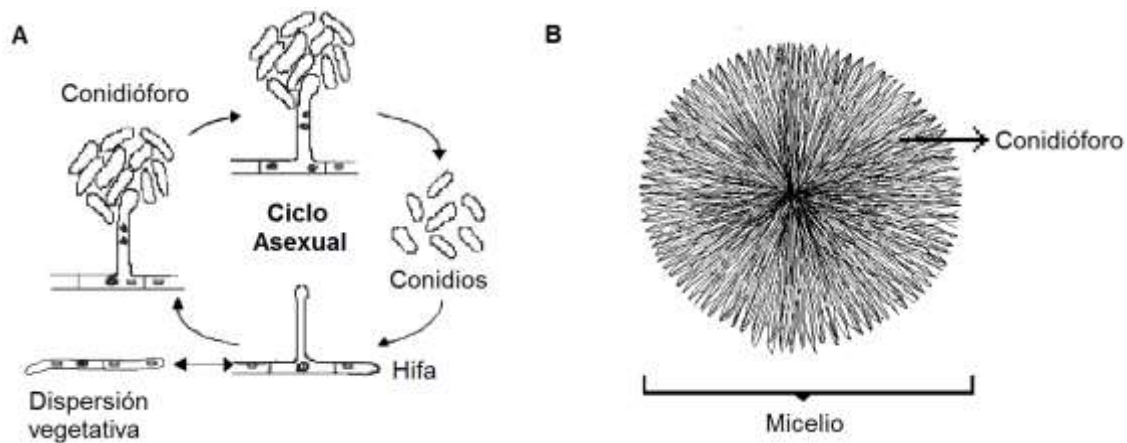


Figura 1 A. Ciclo de vida asexual de *A. chrysogenum*. Una colonia se origina vegetativamente de un núcleo hifal sencillo o a través de la germinación de un conidio; luego se forma el micelio, desarrolla conidióforos sobre células especializadas, los conidióforos llegan a ser competentes para producir esporas. B. Colonia consistente de micelio vegetativo en crecimiento, y estructuras especializadas de reproducción asexual o conidióforos de los que derivan conidios o esporas asexuales (esquema correspondiente a observaciones microscópicas y estereoscópicas).

3.2 La Colonia Fúngica y Su Auto-Integración

La auto-integración está acompañada de una reducción de la permeabilidad y un incremento del aislamiento del sistema, que resulta en la producción de estructuras de supervivencia (esporas, esclerocios etc.) y estructuras con funciones exploratorias; los bordes de las hifas se sellan lateralmente formando un canal, manteniendo su borde apical deformable y habilitado para responder a estímulos direccionales y desempeñar funciones tróficas, condición que incrementa la eficiencia energética de cualquier sistema distributivo, en el que también ocurre redistribución de recursos, esta redistribución puede conducir a la compartimentalización de segmentos hifales (Moore, 1996) y al transporte de recursos desde sitios degenerativos a sitios generativos, proceso observado durante la autólisis o auto-parasitismo (Rayner, et al., en Gow, et al., 1999).

3.3 Transducción de Señales: Proteínas G Heterotriméricas Intermediarios Moleculares de la Señalización Celular

El normal desarrollo morfogénico de los hongos filamentosos está asociado a las proteínas G heterotriméricas de las células eucariotas (Anantharaman, et al., 2011), desempeñándose como intermediarios entre los receptores y los efectores en las vías de señalización celular, permitiendo que las células den respuesta a estímulos ambientales. Estas proteínas G heterotriméricas, se caracterizan por su capacidad para unirse a nucleótidos de Guanina (Turner, & Borkovich, 1993; Friedman, et al., 2009) actuando como interruptores, activando o desactivando la señal en diversas rutas de señalización (Lambrigh, et al., 1994; Wall, et al., 1995; Li, et al., 1997).

Las proteínas G heterotriméricas están conformadas por tres subunidades; α , β , γ , que unidas se mantienen inactivas y ancladas a la parte interna de la membrana plasmática (Liu & Dean, 1997), la subunidad α mantiene unido GDP (Wall, et al., 1995; Truesdell, et al.,

2000). La recepción de una señal (ligando) por receptores transmembranales heptahelicoidales (7-TM) o GPCR (Wal, et al., 1995; Nichols, et al., 2013; Seibt, et al., 2013), desencadenan la separación de la subunidad $G\alpha$ del dímero $G\beta\gamma$.

La disociación de la $G\alpha$ se logra por su alta afinidad por GTP, intercambiando GDP por GTP, quedando libre $G\alpha+GTP$ y el dímero $G\beta\gamma$ para activar efectores específicos down y upstream, además de segundos mensajeros de las vías de señalización (Wall, et al., 1995; Nance, M. et al., 2013), siendo responsable de la interacción específica entre el receptor y el efector, generando cambios en la fisiología celular (Turner & Borkovich, 1993; Baltoumas, et al., 2013). La inactivación de la subunidad α ocurre cuando el GTP es hidrolizado a GDP, por interacción con el dímero $G\beta\gamma$ y con sus receptores (Liu, & Dean, 1997) los cuales actúan como estabilizadores de la proteína G (Truesdell, et al., 2000).

Varios investigadores han encontrado que las proteínas G, especialmente las subunidades alfa ($G\alpha$), participan en distintos procesos fisiológicos de organismos eucariotas (Ross, & Wilkie, 2000), particularmente en hongos filamentosos han observado que regulan el tráfico vesicular a través del aparato de Golgi (Jamora, et al., 1997) intervienen en la regulación de los canales de iones como los canales de calcio Ca^{+2} importantes en la proliferación celular (Turner & Borkovich, 1993; Jain, et al., 2005), regulan la concentración de segundos mensajeros como el AMPc por inhibición o activación de la adenilato ciclasa (Liu, & Dean, 1997; Omero, et al., 1999; Lafon, et al., 2006; Poli, et al., 2009; Engh, et al., 2010; Hu, et al., 2013; Kaneko, et al., 2013) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos, MPAKs (Peeters, et al., 2007; Borges, & Walmsley, 2000).

La $G\alpha$ intervienen en la regulación de la producción de enzimas, micotoxinas, y otros metabolitos secundarios (Reithner, et al., 2005; García, et al., 2011; Tish, et al., 2011; Gruber, et al., 2012; Degani, 2013; Gummer, et al., 2013), biosíntesis de enzimas degradadoras de polisacáridos y producción de factores de virulencia, determinantes del grado de patogenicidad o avirulencia (Choi, et al., 1995; Omero, et al., 1999; Truesdell, et al., 2000; Gronover, et al., 2001; Prados, et al., 2006; Tan, et al., 2009), la capacidad para adherirse e invadir al

huésped, interviniendo en la no formación de apresorios o desarrollo anormal de los mismos (Liu y Dean, 1997)

Adicionalmente, participan en los mecanismos de recepción de estímulos externos, como la respuesta sexual frente al apareamiento (Horwitz, et al., 1999) y la percepción de feromonas (Yu, et al., 1996, 2006; Liu & Dean, 1997; Omero, et al., 1999), sensibilidad a fuentes de carbono (Harashima, et al., 2002; Yu, et al., 2006), y de respuesta a estrés ambiental y fisiológico (García, et al., 2009, 2011; Nguyen, et al., 2012; Degani, 2013).

También se han referenciado cambios a nivel morfológico durante el crecimiento vegetativo, grado de pigmentación y utilización de fuentes de Nitrógeno (Gummer, et al 2013;), desarrollo de estructuras reproductivas como conidióforos y cuerpos fructíferos (Han, et al 2008; Yang, et al., 2012), producción de esporas asexuales y sexuales maduras, viabilidad celular y capacidad germinativa de las esporas, efecto que altera la cinética del crecimiento de los hongos filamentosos (Delgado, et al., 2005; García, et al., 2007; Tzima, et al., 2012; Degani, 2013).

Entre los hongos filamentosos caracterizados, la mayoría presenta tres grupos de subunidad α de las proteínas G, siendo de interés para esta investigación, las subunidades α del grupo I, las cuales son altamente conservadas entre los hongos filamentosos y se les ha reconocido como un regulador de múltiples rutas de señalización.

3.3.1 Subunidad $G\alpha$ del grupo 1

La subunidad $G\alpha$ del grupo I, fue identificada en el hongo *Neurospora crassa*, denominada *GNA-1*, y guarda un 55% de identidad con las proteínas G heterotriméricas de mamíferos, se caracteriza por una secuencia consenso para miristolación (MGXXXS) en el extremo amino terminal, un sitio de ADP-ribosilación por la toxina Pertussis (CAAX) en el extremo carboxilo terminal, la cual interviene ampliamente en diversas rutas de la señalización celular (Turner & Borkovich, 1993). Su estudio en ascomycetes refleja una participación

activa de la G α en el desarrollo morfológico y las rutas metabólicas de estos hongos filamentosos. En la tabla 1 se resume el papel funcional en el que participa la subunidad G α en organismos ascomicetes considerados como modelos fúngicos.

Tabla 1 Subunidad Ga heterotrimérica de ascomicetes considerados como organismos modelo y su efecto sobre el desarrollo morfológico

Especie fúngica	Tipo de subunidad Ga: gen	Efecto sobre:			Referencia
		Germinación conidial	Crecimiento vegetativo	Conidiación	
1. <i>Aspergillus nidulans</i>	GaI: <i>fadA</i>	n.d.	+	-	Yu, et al., 1996 Lafon, et al 2006
2. <i>Cryphonectria parasitica</i>	GaI: <i>cpg-1</i>	n.d.	¿?	-	Segers, y Nuss, 2003 Choi, et al., 1995
3. <i>Fusarium oxysporum</i>	GaI: <i>fga1</i>	n.d.	+	+	Jain, et al., 2005
4. <i>Magnaporthe grisea</i>	GaI: <i>magB</i>	n.d.	+	+	Liu, & Dean, 1997
5. <i>Neurospora crassa</i>	GaI: <i>gna1</i>	+	+	-	Turner, & Borkovich, 1993
6. <i>Penicillium chrysogenum</i>	GaI: <i>pga1</i>	+	+	-	García, et al., 2011. Seibel, et al., 2009.
7. <i>Trichoderma reesei</i> (<i>Hypocrea jecorina</i>)	GaI: <i>gna1</i>	+	¿?	-	Tish, et al., 2011 Gruber, et al., 2012

(*): Se usó el gen heterólogo de un hongo relativo, no se describió el gen homólogo.
 (+): Efecto positivo de la subunidad
 (-): Efecto negativo de la subunidad
 (?): Efecto contradictorio o no claro
 None: La una subunidad no produce efecto sobre la característica analizada
 n.d.: No determinado

3.4 Transducción de Señales Reguladoras de las Respuestas a Estrés Ambiental.

En ambientes naturales, el ciclo de vida de los hongos filamentosos es afectado por distintos factores abióticos y bióticos, los cuales se presentan en gradientes o como depósitos puntuales, debido a la heterogeneidad del hábitat donde se desarrollan.

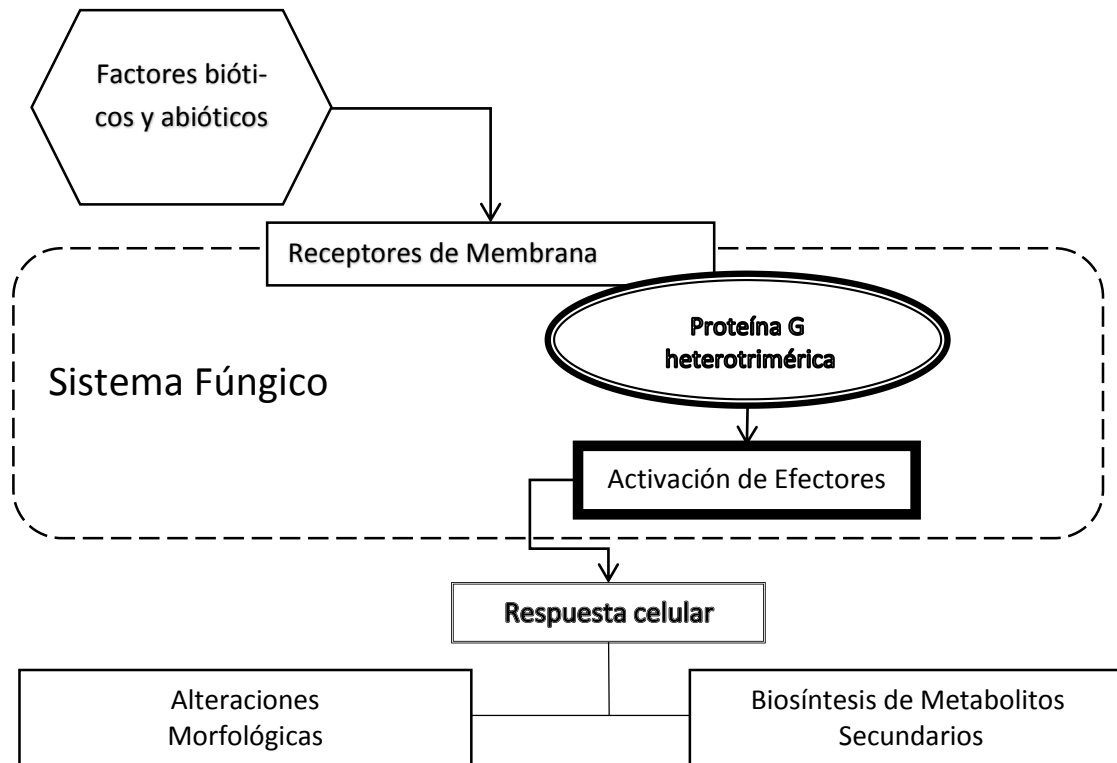


Figura 2 Proceso de respuesta de los sistemas fúngicos a condiciones ambientales mediado por proteínas G heterotriméricas.

Los factores bióticos ejercen presión sobre el desarrollo a medida que el hongo interactúa con otras especies, mientras que los factores abióticos mantienen un efecto que se ve reflejado en el desarrollo del hongo a distintas escalas temporales con determinada regularidad (Ramsdale, et al., 2001), emitiendo una respuesta mediante ajustes en el metabolismo o cambios morfológicos (Xu & Mitchell, 2012) que le permitan superar la adversidad de una condición ambiental o tomar ventaja de las condiciones favorables (Lee, et al 2006; Rangel, et al 2008).), siendo la plasticidad fenotípica una respuesta específica a un ambiente determinado o a una condición nutricional (Rangel, et al 2008).

Las respuestas emitidas frente a una condición ambiental se han visto mediadas por las proteínas G heterotriméricas, mediante la activación de elicitores o efectores, viéndose reflejado su efecto en cambios metabólicos (metabolismo de trehalosa, polioles etc.) y en la morfología del hongo, como lo son la producción de conidios, tasa de germinación conidial, extensión radial, formación de estructuras de resistencia entre otros.

3.4.1 Estrés lumínico

Los hongos filamentosos presentan sensibilidad a la radiación lumínica que induce a respuestas de activación o inactivación a través de la transducción de señales. Los hongos responden a un amplio espectro de luz donde los efectos más notorios sobre su crecimiento, morfología y metabolismo, se observan cuando son expuestos a luz azul y a la luz roja (Atoui, et al., 2010). Las respuestas aparecen como un mecanismo para anticipar los cambios ambientales que ocurren a una escala temporal regular, permitiéndole al hongo adaptarse, coordinando actividades metabólicas y modificaciones en su desarrollo para evitar daños.

La sensibilidad a la luz ha sido observada en hongos como *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulus*, *Fusarium sp*, entre otros, en los que se presentan modificaciones metabólicas, que incluso afectan la biosíntesis de productos naturales y de metabolitos secundarios como los antibióticos, muchas de las fotorepuestas favorecen la producción de pigmentos terpenoides hidrofóbicos como los carotenos y sus derivados, micotoxinas, etc. (Atoui, et al., 2010; García-Cela, et al., 2015).

A nivel morfológico el efecto sobre el crecimiento, la esporulación y la germinación de las esporas (Lokhandwala, et al., 2015), es dependiente del tiempo y la longitud de onda a la que se expone el hongo, debido a que las radiaciones de longitud de onda corta (200-240 nm), son más deletéreas para los sistemas biológicos porque acarrearán más energía por fotón que las longitudes de onda largas (García-Cela, et al 2015) causando daño al ADN y estrés oxidativo (Lokhandwala, et al., 2015)

Los cambios de ritmo lumínico al que están sujetos diversos organismos, son inherentes al movimiento rotacional de la Tierra, que marca un periodo de 12 horas Luz/ 12 horas oscuridad (ritmo circadiano de 24 horas), para lo cual diversos organismos han desarrollado su propio Reloj Biológico, el cual puede ser reiniciado por un estímulo externo o inducido por cambios recurrentes en el estímulo ambiental (Ramsdale, 2001).

La adaptación de los hongos para optimizar la regulación de este recurso energético, incluye un mecanismo de respuesta que se ha descrito ampliamente en *Neurospora crassa*, cuyo efecto se ve reflejado en la esporulación asexual, visible como una serie de bandas alternas de elevada esporulación e interbandas de esporulación limitada, formando zonas concéntricas sobre la superficie del medio sólido en que se expande el micelio en crecimiento, siendo la Luz un factor controlador de la esporulación asexual.

El mecanismo de respuesta a la luz, comprende tres componentes, una ruta de entrada (detección de la luz azul por los productos de los genes White collar-1 y 2) encargada de recibir la señal ambiental externa hacia el reloj, un sistema oscilatorio central (conformado por el producto de siete genes, principalmente por las proteínas FRQ, codificadas por el gen *frq*) que genera un periodo intrínseco, y una ruta de salida (factores de transcripción interruptores de la expresión de *frq* y *wc1/2*, regulados por el gen *ccg2* que a su vez es regulado por tres rutas independientes: una dependiente de luz, otra de la condición nutricional y otra de la hora) que retransmite la información de la hora del día del oscilador a la célula (Ramsdale, 2001).

La foto-adaptación de regulación a la luz azul es facilitado por las proteínas fúngicas LOV (light-oxygen voltaje), subclase de la familia con dominio PAS (Period ARNT single-minded) cuya interacción resulta en un módulo sensorial que acopla a un factor de reconocimiento al químico de activación de la señal de transducción.

En los dominios LOV, la activación fotoquímica y los cambios estructurales están bien caracterizados como fototropinas VVD (vivid descrita en *Neurospora crassa*) y proteínas de estrés en bacterias. La activación por acción de la luz azul es reversible en oscuridad, donde los eventos de señalización son sensibles a un amplio rango de influencias ambientales y permite la adaptación a niveles altos de luz azul, determinando la capacidad de respuesta o sensibilidad a los estímulos ambientales (sensibilidad a compuestos orgánicos, estrés oxidativo etc.) (Lokhandwala, et al., 2015).

3.4.2 Estrés Oxidativo

La respuesta al estrés oxidativo y el metabolismo secundario han sido considerados como procesos integrados, donde el metabolismo secundario es frecuentemente inducido como una respuesta celular al estrés oxidativo (Amare & Keller, 2014), el estrés oxidativo causa cambios sustanciales en las biomoléculas (proteínas, lípidos y ADN) con subsecuente inactivación de sus funciones (Acevedo, et al., 2014)

El exceso de peróxido de hidrogeno perturba la homeostasis y causa estrés oxidativo, así se induce un proceso de afinamiento adaptativo y de activación de mecanismos protectores (Diezman, 2014), que se refleja en modificaciones del metabolismo secundario, por ejemplo: un incremento en la concentración- de cationes Cu^{+2} en el medio de crecimiento, altera la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Penicillium verrucosum* de ocratoxina a citrinina, (Schmidth, et al., 2015).

Se ha encontrado que la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo es la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual toma el superóxido, una forma especie reactiva al oxígeno ROS (por su nombre en inglés Reactive Oxygen Species) perjudicial y la convierte a peróxido de hidrogeno otra forma ROS, sobre la que actúan la catalasa y peroxidasa protegiendo a la célula mediante la degradación del peróxido a oxígeno y agua; las mitocondrias fúngicas contienen una enzima constitutiva oxidasa alternativa (AO), que reduce oxígeno a agua por aceptación de electrones directamente del ubiquinol (Uribe y Khachatourians, 2008). Una vez en la célula, estas enzimas limitan los niveles de ROS y minimizan su daño.

Dado que durante la biosíntesis de cefalosporina C se han identificado pasos donde se consume oxígeno, siendo el oxígeno disuelto uno de los factores de mayor efecto sobre la producción de cefalosporina (Liu, et al., 2013) es importante evaluar la capacidad de *A. chrysogenum* para soportar distintos niveles de estrés oxidativo, en el que media el sistema tioredoxina reductasa codificado por el gen ActrxR1 descrito en *A. chrysogenum*, el cual es usado

como defensa contra el estrés oxidativo, cuya disrupción afecta la diferenciación morfológica probablemente debido a cambios en la homeostasis de compuestos redox (Liu, et al., 2013)

3.4.3 Estrés Osmótico

La osmolaridad externa en un rango mayor a la fisiológica, es uno de los factores ambientales que pueden no solo afectar el ciclo de vida de los hongos filamentosos sino incluso conducirlos a la muerte. Está condición deriva en estrés hiperosmótico, el cual activa un mecanismo celular protector mediante la movilización de *solutos compatibles*, que conduce a su acumulación. Los *solutos compatibles* son sustancias orgánicas de bajo peso molecular, altamente solubles, como azúcares, polioles y aminoácidos, empleados por el hongo para balancear la osmolaridad (Boudreau, et al., 2013), previniendo la pérdida de agua (Duran, et al., 2010).

Entre las rutas de señalización celular vinculadas al estrés osmótico se ha encontrado un osmosensor denominado para el organismo modelo *Neurospora crassa* OS-1 (osmosensor histidine kinase) y en *Fusarium graminearum* FgOs1, una proteína fosfotransferasa HPT-1 (histidine phosphotransfer protein) en *N. crassa* y un mecanismo regulador de la osmolaridad en el que se encuentra la ruta de alta osmolaridad del glicerol o HOG (por sus siglas en inglés high osmolarity glicerol), relevante en la adaptación al estrés hiperosmótico en varios tipos de hongos (Jones, et al., 2007; McCormik, et al., 2012).

La ruta HOG de respuesta al estrés, tiene implicaciones morfofisiológicas en hongos filamentosos como *Aspergillus sp.* a nivel de la pigmentación, tasa de crecimiento y germinación, patogénesis, desarrollo sexual y asexual (Zhao, et al., 2007; Duran, et al., 2010). De igual forma participa en la osmoregulación, la ruta de señales de transducción de las MAPK en hongos como *N. crassa* (Ochiai, et al., 2007), proteínas cinasas que se ha visto tienen interacción con las proteínas G heterotriméricas (Li, et al., 2007).

Estudiando *Aspergillus sp* como organismo modelo se ha identificado la presencia de genes responsables de sensibilidad a sales, como el *sltA1* que confiere una actividad arginasa alterada, la arginasa es una enzima responsable del catabolismo de la arginina para producir ornitina y urea, y responde a fenómenos de estrés osmótico y oxidativo a través de la ruta HOG en la que intervienen procesos de fosforilación autónomos y mediados por MAPK quinasas, conduciendo a la fosforilación de residuos de aminoácidos de diferentes enzimas fosfato dependientes, las cuales juegan un papel en los mecanismos de resistencia al estrés tanto osmótico como oxidativo (Duran, et al., 2010).

Esta capacidad de osmoadaptación es crucial en las rutas de biosíntesis de metabolitos, siendo el estrés osmótico un factor crítico en la producción de enzimas de interés en fermentaciones industriales, también se ha encontrado que la presión osmótica determinada por concentraciones de NaCl conduce a alteraciones en las tasas de crecimiento (Ochiai, et al., 2007), modificaciones en el grado de plasmólisis y vacuolización hifal (Mahmoud, et al., 2007), incremento en la producción y secreción de metabolitos como la glucosa oxidasa durante la fermentación de *Aspergillus niger*; y aumento en la actividad glucoamilasa de *A. oryzae* (Duran, et al., 2010),

Metabolismo secundario en el que ubicuamente participan componentes de la transducción de señales que incluyen la ruta de señalización mediada por las proteínas cinasas A (PKA) y la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G, la ruta de señalización mediada por las subunidades $G\beta\gamma$ y la ruta de señalización de las proteínas cinasas C (PKC) que median la localización nuclear de un factor de transcripción (Ochiai, et al., 2007).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar el rol del gen *agal* en la respuesta a diferentes condiciones de estrés en el hongo filamentoso *Acremonium chrysogenum*.

4.2 Objetivos Específicos

- Describir el efecto de la activación constitutiva de Aga1 sobre la conidiación y el crecimiento vegetativo.
- Describir el efecto de gen *agal* sobre el crecimiento vegetativo en condiciones hipertónicas.
- Determinar la implicación de *agal* en la tolerancia a condiciones de estrés oxidativo.
- Describir el impacto que tiene el gen *agal* en el desarrollo hifal sometido a fotoperiodicidad regular.

5. METODOS Y MATERIALES

5.1 Microorganismos utilizados

Para la realización de la presente investigación se emplearon varias cepas de microorganismos, las cuales se describen a continuación.

5.1.1 Cepas bacterianas

Debido a la alta eficiencia de transformación, no patogenicidad y amplio uso en la manipulación de ADN, se empleó *Escherichia coli* DH5a para el proceso de clonación y selección de transformantes bacterianos. La preparación de estas células ultra-competentes se realizó siguiendo lo descrito por Inoue y colaboradores. (1990) y Hengen (1996).

5.1.2 Cepas fúngicas

La cepa silvestre de *Acremonium chrysogenum* ATC11550 (Brotzu, 1948) se obtuvo en el Laboratorio de Genética y Metabolitos Secundarios de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

5.2 Medios de Cultivo

Medio Luria-Bertani empleado para el crecimiento de *E coli*, ésta compuesto por:

Bacto-Triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

Agua destilada 1 L

pH 7.0

Para medio sólido se añadió agar al 2 %.

Medio CCM (medio complejo de cultivo) se empleó para el crecimiento y pruebas de estrés fisiológico de *A. chrysogenum*. Sus componentes son:

Sacarosa 3 g

Medio TSB (Tryptic Soy Broth) 5 g

Extracto de carne (Difco) 1 g

Extracto de levadura 1 g

Glucosa 15 g

NaCl 0.5 g

K₂HPO₄ 0.5 g

MgSO₄·7H₂O 0.5 g

FeSO₄ 0.018 g

Agua destilada hasta 1 L

pH 7.0

Para medio sólido se añadió agar al 2 %.

Medio TSB. Fue empleado durante la selección de los transformantes de *A. chrysogenum*.

Peptona de caseína 10 g

Peptona de soya 3 g

Glucosa 2.5 g

NaCl 6 g

K₂HPO₄ 2.5 g

Agua destilada hasta 1 litro

pH 7.0

Para medio sólido se añadió agar 1.5%

5.3 Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas de *E. Coli* para su crecimiento fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) líquido a 37°C durante 16 horas, una vez fueron transformadas el medio se suplemento con el marcador de selección, el antibiótico ampicilina.

Algunos de los transformantes fueron conservados en un vial de polipropileno estéril, conteniendo 1 ml de solución estéril (a 121°C, 20min) constituida V/V por glicerol al 40% y agua destilada a -20°C

5.4 Conservación de las cepas fúngicas

Cada una de las cepas fueron recuperadas de los crioviales, mediante inoculación de 10µl de material fúngico en agar CCM, e incubados a 26°C por 15 días; luego de la revitalización, las cepas fueron sometidas a dos métodos de conservación: criopreservación y método alternativo de cultivo periódico.

En el caso de las cepas con los alelos mutantes para el gen *agal* estos cultivos se mantuvieron en medio CCM suplementado con fleomicina. Los procedimientos para evaluar la eficacia de los métodos de conservación se realizaron por duplicado y en cámara de flujo laminar para garantizar la ausencia de contaminantes.

5.4.1 Criopreservación:

Las cepas revitalizadas fueron sembradas en masivo sobre placas de agar CCM, preincubadas a 26°C en total oscuridad durante 2 días, para evitar contaminantes. Las placas inoculadas fueron incubadas a 26°C durante 7 días en total oscuridad, luego se sometieron a tres lavados consecutivos con 0,85% p/v de NaCl y agua destilada, la solución resultante fue

colectada en un tubo de centrifuga de 15 ml y sometida a centrifugación a 4000 rpm por 10 min.

El pellet fue resuspendido en un vial de polipropileno estéril, conteniendo 1-3 ml de solución estéril (121°C, 20min) constituida V/V por glicerol al 40% y agua destilada. Los viales fueron sometidos a un proceso de congelación gradual y se almacenaron a una temperatura de -20°C.

La conservación de las cepas fue evaluada por descongelamiento de un vial que fue calentado en baño maría a 37°C durante 15 min y se procedió a sembrar 10µl en medio de mantenimiento CCM suplementado con fleomicina.

5.4.2 Cultivo Periódico

El cultivo periódico fue realizado sobre medio agar CCM, esterilizado a 15lbs, 121°C por 15 min, servido en cajas Petri estériles. Las placas de agar CCM fueron pre-incubadas a 26°C por 48 horas en total oscuridad antes de ser inoculadas.

La inoculación se realizó por duplicado con asa recta previamente esterilizada, en otros casos se realizó una dispersión sobre la totalidad de la superficie del medio, posteriormente se incubaron las placas a 26°C por 15 días. En el caso de los alelos mutantes se empleó medio suplementado con el marcador de selección, el antibiótico fleomicina.

5.4.3 Preparación del inóculo de *A chrysogenum*

A partir de un cultivo en agar CCM de 7 días de desarrollo, el cual fue lavado tres veces consecutivamente, con 5ml de solución salina NaCl 0,85% p/v, y con ayuda de un asa curva se auxilió el desprendimiento del micelio del medio sólido. El micelio fue depositado en un tubo para centrifugadora de 50ml, al que se adicionaron 20 ml de solución salina y 10-

15 perlas de vidrio de 4mm de diámetro, posteriormente fue macerado el micelio por vórtex hasta que se obtuvo una suspensión fúngica homogénea.

La viabilidad de los fragmentos hifales se estimó mediante tinción con rojo neutro, para esto se tomó una alícuota de 100µl que fue centrifugada a 4000 rpm durante 10 min, el sobrenadante fue descartado y el micelio fue lavado dos veces con agua destilada estéril, y un tercer lavado se hizo con PBS, posteriormente el micelio fue resuspendido con 200µl de rojo neutro y la suspensión se incubó durante 1h a 26°C. La viabilidad de los fragmentos se contabilizó en cámara de Neubauer. (Fukuda, et al., 1996).

La suspensión micelial fue sometida a diluciones sucesivas hasta obtener una concentración de 1×10^6 fragmentos hifales viables ml^{-1} , de la cual se tomaron 0.2µl que fueron depositados en el centro de la placa de medio agar CCM servido en cajas de Petri de 90mmx15mm, previamente incubado, garantizando la misma concentración de inóculo para cada cepa objeto de estudio.

La inoculación se realizó en la zona media de la placa Petri o microplacas según el caso, mediante punción con asa recta previamente esterilizada, los cultivos fueron incubados a 26°C en total oscuridad y observados periódicamente cada 24 horas.

5.5 Obtención de alelos mutantes y transformación de *A. chrysogenum*

5.5.1 Plásmidos de clonación.

- **Plásmido pULC43.** De 4869 pb, del cual se obtuvo el gen de resistencia a fleomicina de *Streptoalloteichus hindustanus* expresado bajo el control de las regiones promotoras del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* (Figura 3). También presenta el terminador de la transcripción del gen *cyc1* de *S. cerevisiae* y un gen de resistencia a cloranfenicol (Gutiérrez, et al., 1997)

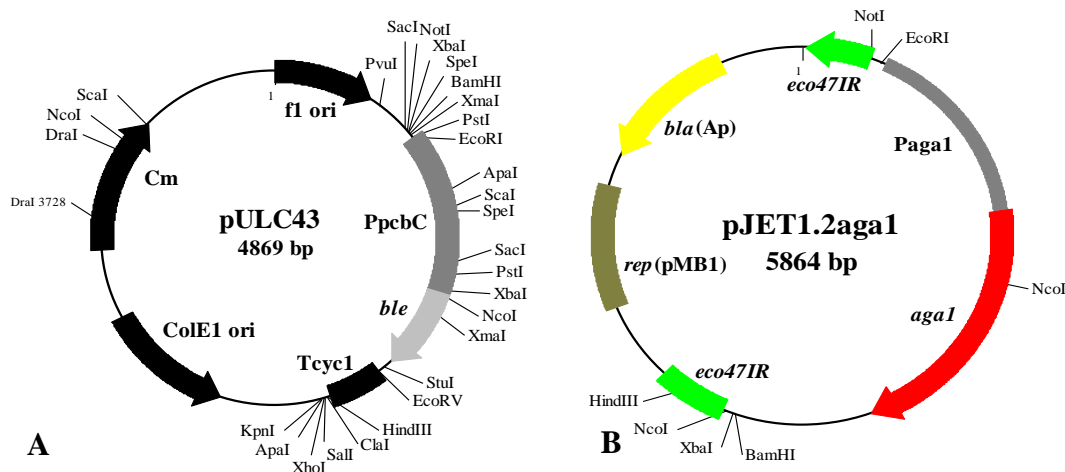


Figura 3 Vectores empleados en la transformación de *A. chrysogenum*. A. Plásmido pULC43. B. Plásmido pJET1.2aga1.

- **Plásmido pJET1.2aga1.** de un tamaño de 5864 pb, presenta el gen *aga1* conservando su propio promotor, el gen *bla* que codifica a una β -lactamasa encargada de degradar antibióticos β -lactámicos como la ampicilina, que fue empleada para seleccionar y mantener células recombinantes de *E. coli*. A partir del este plásmido se construyeron los vectores de transformación, siendo base de la mutagénesis sitio dirigida (Figura 3).

5.5.2 Marcadores de Selección

Acorde a los plásmidos y vectores de clonación se prepararon soluciones de los antibióticos:

- **Ampicilina** se preparó a una concentración de 100 mg/ml. La solución de ampicilina se preparó con agua bidestilada y fue esterilizada por filtración a través de una membrana con tamaño de poro de 0,22 μ m de diámetro, que se conservó en volúmenes de 1,5 ml a -20°C en viales de polipropileno estériles. Durante la selección de transformantes de *E coli* los medios de cultivos fueron suplementados con una concentración final de 100 μ g/ml de ampicilina.

- **Cloranfenicol** se preparó a una concentración de 10 mg/ml de etanol absoluto como solvente, fue esterilizada por filtración a través de una membrana de 0,22 μ m de

diámetro de poro y conservada en viales de polipropileno estériles de 2 ml a -20°C. Para seleccionar transformantes de *E. coli*, los medios de cultivo fueron suplementados a una concentración final de 30 µg/ml de cloranfenicol.

- **Fleomicina** se preparó a una concentración de 20 mg/ml en solución acuosa. Como solvente se utilizó agua o Buffer HEPES a pH 7.25, y fue esterilizada por filtración a través de una membrana de tamaño de poro de 0,22 µm de diámetro y conservada en viales de polipropileno estériles de 2ml a -20°C. Este antibiótico fue utilizado para la selección de los transformantes de *A. chrysogenum* que según el origen comercial del antibiótico se empleó a una concentración 30 µg/ml a 90 µg/ml según la curva de respuesta del hongo al antibiótico.

Para cada producto comercial nuevo de fleomicina, se realizó una curva de sensibilidad de la cepa silvestre con estos resultados se estableció la concentración empleada en el cultivo de selección de transformantes.

5.6 Construcción de los Alelos *aga1*^{G203R} *aga1*^{G42R} y *aga1*^{Q204L} por mutagénesis sitio-dirigida

A partir del plásmido pJET1.2aga1 (Figura 3), fueron desarrollados los plásmidos de clonación pJETaga1Q204L, pJETaga1G42R y pJETaga1G203R, los cuales contienen los alelos *aga1*^{Q204L}, *aga1*^{G42R} y *aga1*^{G203R}, los dos primeros causantes de la señal activa de la proteína Ga y el tercero de señal inactiva.

Tabla 2 Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis sitio dirigida

Nombre	Secuencia
G203R-F	5'TG TTC GAT GTC GGT CGC CAG CGA TCC GAG CG3'
G203R-R	5'CG CTC GGA TCG CTG GCG ACC GAC ATC GAA CA3'
G42R-F	5'CCC CAG TCA GGT GCC CGC GAA TCT GGA AAG TCG3'y
G42R-R	5'CGA CTT TCC AGA TTC GCG GGC ACC TGA CTG GGG3'
Q204L-F	5'-TTC GAT GTC GGT GGT CTC CGA TCC GAG CGG-3'
Q204L-R	5'-CCG CTC GGA TCG GAG ACC ACC GAC ATC GAA-3'

En color rojo se indica la posición de la mutación.

La construcción de los plásmidos se realizó a partir de mutagénesis sitio dirigida, donde la mutación es introducida por PCR empleando pares de oligonucleótidos con la mutación (tabla 2), siguiendo las especificaciones del QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies).

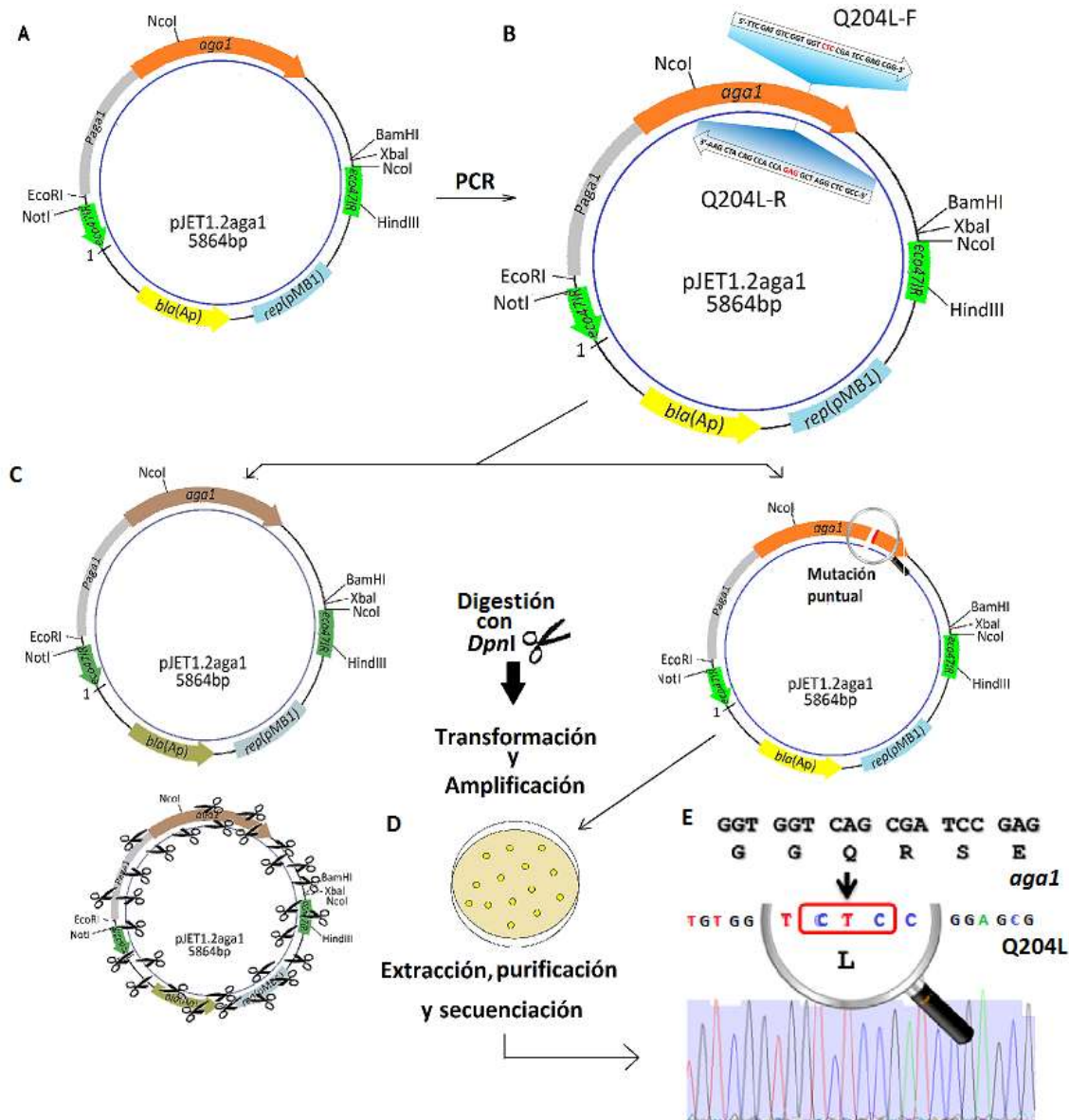


Figura 4. Mutagénesis sitio dirigida sobre el gen *aga1*. Procedimiento general de obtención de la mutación Q204L realizado igualmente para obtener la mutación G42R y G203R. A. Plásmido pJET1.2 con inserción del gen *aga1* molde de la mutagénesis. B. PCR: Representación del alineamiento del par de oligonucleótidos empleados para obtener el alelo *aga1*^{Q204L}. C. Productos de la PCR, a la izquierda plásmidos metilado o hemimetilado con el alelo silvestre *aga1*; a la derecha amplicon no circularizado con todos los elementos de pJET1.2aga1 con la mutación Q204L. D. transformación de *E. coli* con pJET1.2aga1^{Q204L}. E. Electroferograma del cambio de nucleótidos ocurrido por la mutagénesis sitio dirigida.

Previamente los oligonucleótidos con la mutación deseada, tienen variación en uno a tres pares de bases que generan cambios en la expresión del aminoácido, en el caso de la mutación G42R y G203R se introdujo un cambio de glicina por arginina, en la posición 42 y 203 de la subunidad $G\alpha$ *Aga1* respectivamente, mientras que para la mutación Q204L se introdujo el cambio de una glutamina por leucina en la posición 204 en *Aga1* (figura 4B).

Siguiendo las especificaciones del kit, se obtiene la modificación puntual de un nucleótido empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifica el vector de doble cadena por acción de la ADNpolimerasa *PfuUltraHF*. Seguido de la digestión de las cadenas de ADN molde que al ser previamente amplificadas en cepas de *E.coli*, quedan metiladas o hemimetiladas (en este caso *pJET1.2aga1*) y son susceptibles a la acción de la endonucleasa *DpnI* (ver figura 4C). La digestión garantiza la síntesis del ADN que contiene la mutación deseada el cual se empleó para la transformación de las células bacterianas en la que se amplifica y se conserva el vector con la mutación.

Las condiciones de reacción durante la mutagénesis sitio dirigida comprende: una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, seguido de 25 ciclos donde cada ciclo comprende las siguientes tres etapas: una desnaturalización a 95°C por 30 s, una etapa de alineamiento de 55°C-65°C por 30s, y una etapa de extensión a 69°C por 6 minutos. La PCR culmina con una última etapa de extensión a 68°C durante 7min.

Los resultados de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa, a partir del cual se amplificaron y se purificaron los fragmentos correspondientes a la banda de interés formada por 5864pb, con las que se procedió a transformar las células de *E. coli* DH5 α . (figura 4D), obteniéndose los plásmidos con los alelos mutantes *pJETaga1Q204L*, *pJETaga1G42R* y *pJETaga1G203R*, los cuales fueron verificados mediante secuenciación (Zúñiga, 2014).

El electroferograma (figura 4E) muestra la mutación puntual introducida para el caso del alelo Q204L, procedimiento que se empleó de igual manera para obtener los demás alelos

de fleomicina fue de 60 µg/ml, correspondiente al doble del umbral de resistencia al anti-biótico que se determinó previamente mediante una curva de sensibilidad a fleomicina, asegurando la obtención de cepas transformantes con los alelos deseados

5.8 Protocolos de extracción, purificación y análisis de ADN

5.8.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico fue realizada con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor. El pellet obtenido fue re-suspendido en agua estéril y se analizó en gel de agarosa, empleando 10 µl de la muestra. Luego se realizó un Megaprep mediante lisis alcalina y fenolización siguiendo un método modificado de TENS-Mini Prep (Zhou, et al., 1990), en el que se incluyó una fenolización empleando fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1 de Sigma Aldrich Co.

5.8.2 Verificación de la inserción de alelos *aga1*^{G203Rd+}, *aga1*^{G42Rd+} y *aga1*^{Q204Ld+}.

En gel de agarosa se evaluó la presencia de los alelos mutantes en cada uno de los transformantes obtenidos, para tal fin se emplearon los oligonucleótidos listados en la tabla 3 (Zúñiga, 2014; Cruz 2014) que se muestra a continuación.

Tabla 3 Oligonucleótidos empleados en los análisis por PCR

Nombre	Secuencia
Tcyc-tr1-R	5'-GACAACCTGAAGTCTAGGTCCCT-3'
Ble-tr1-F	5'-AAGTTGACCAGTGCCGTTCC-3'
aga1-Q204L-R	5'-CCGCTCGGATCGGAGACCACCGACATC GAA-3'
R967-aga1	5'-CAGGCAGCTTCTCCTTGA-3'
RT-AGAWT-R	5'-CACCGCCCTCGTAGTCTGGGAAG-3'
Aga1-840R	5'-AAGTAGTTCTTCATGGGGCTGA-3'
Q204L-R1	5'-AAGCGGAGGTTCTCCTGGATGATGATGT-3'

La PCR empleada para la amplificación de secuencias plásmidicas y genómicas fue realizada empleando la enzima TaqDNA Polymerase, recombinant /Thermo Scientific). Las condiciones de reacción y componentes de la mezcla de reacción se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Condiciones y componentes de la reacción para PCR

Etapa	Temperatura	Duración	Componente	Concentración final	
Desnaturalización inicial	94°C	3min	10X Pfx Buffer	1X	
			MgSO ₄ (25mM)	1,5 mM	
			dNTPs (10mM)	0,2mM	
30 ciclos	Desnaturalización	94°C	45s	OligoF (10µM)	0,5 µM
	Alineamiento	50-72°C	45s	OligoR (10µM)	0,5 µM
	Extensión	72°C	2min	PfxADNpol(5 U/µl)	0,5 U
			ADN(10ng/µl)	0,4ng/µl	
Extensión final	72°C	7min	Agua esterilizada	cbp	
			Total	25µl	

5.9 Caracterización de *A. chrysogenum*.

5.9.1 Macromorfología

La caracterización macromorfológica se realizó de forma simultánea para todas las cepas objeto de estudio, aplicando las dos formas de inoculación del medio agar CCM en placas Petri de 90mmX15mm. Igualmente se observó su apariencia en medio CCM líquido, para esto se adicionaron 5ml de inóculo a una concentración 1×10^6 FHV/ml a un volumen de 245 ml de medio CCM líquido y se observó durante 5 días la evolución del cultivo

5.9.2 Micromorfología

La caracterización microscópica de *A. chrysogenum* y las cepas transformantes, se realizó a partir de cultivos sobre medio agar CCM, en el que se insertaron laminillas de vidrio de 2x2mm y en cuya base fue depositado el inóculo. Los cultivos fueron incubados a 26°C

durante 7 días. Posterior al periodo de incubación, del cultivo se retiraron las lamillas cubiertas por el hongo, estas estructuras fúngicas fueron tincionadas con azul de lactofenol y se observaron en un microscopio óptico. Se realizó un registro fotográfico con cámara digital de las estructuras observadas.

5.9.3. Conidiación

El análisis de la conidiación fue realizado mediante tres ensayos por triplicado con el que se estableció el promedio de producción de conidios por cepa a partir de cultivos de las cepas de *A. chrysogenum* ATCC11550, y sus transformantes en 15ml de medio agar CCM en placas Petri (50mmx15mm) con un crecimiento de 7 días de incubación a 26°C en total oscuridad, la placa petri fue lavada 3 veces cuidadosamente con solución amortiguadora NT (NaCl 0,90% p/v, tween 80 al 0.01% v/v) y con ayuda de un asa de hockey se facilitó el desprendimiento de los conidios.

El producto de cada lavado se depositó en un tubo de 15ml el cual fue centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en solución amortiguadora NT hasta obtener un volumen final de 2 ml y se homogenizó por agitación con vórtex.

Se contabilizó el número de conidios en cámara de Neubauer. Tomando el área de conteo de 5 cuadrados en la región central de la cámara de Neubauer, cada cuadrado con arista de 0,2mm, la profundidad de la cámara es 0,1mm). El número de conidios μl^{-1} se determinó mediante la fórmula:

$$\text{Conidios } \mu\text{l}^{-1} = \frac{(\text{No Conidios})}{(\text{Superficie de conteo})(\text{Profundidad})(\text{factor de dilución})}$$

Ej: $\text{Conidios } \mu\text{l}^{-1} = \frac{(\text{No Conidios}) 500}{(0,2\text{mm}^2) (0,1\text{mm}) (1)}$

Donde, FD: corresponde al factor de dilución de la muestra. Ej. 1:500.

5.10 Respuesta a estrés fisiológico en función de la Tasa de extensión radial relativa

Los hongos filamentosos sobre medio sólido se extienden radialmente formando anillos concéntricos, la magnitud a la cual el radio se extiende, permite determinar de forma directa la velocidad de crecimiento del micelio vegetativo del hongo. A partir del crecimiento radial se establece la tasa de extensión radial.

Inicialmente se realizó un cultivo por siembra en masivo de fragmentos hifales viables, para cada una de las cepas transformantes y la cepa silvestre en agar CCM, una vez se obtuvo crecimiento, se extrajeron de los cultivos, discos de 5mm de diámetro por 2mm de alto, antes de que el hongo desarrollara conidióforos.

Los discos con micelio fueron transferidos a una placa Petri con medio agar CCM suplementado para valorar la respuesta a estrés fisiológico y sin suplementar como control. Las placas Petri inoculadas con los discos fueron incubadas a 26°C, luego de 24 horas, se demarco el crecimiento de las colonias y posteriormente se siguió la demarcación en anillos concéntricos del crecimiento del micelio tomando como referencia el reverso de la colonia. Las mediciones fueron registradas fotográficamente y mediante el uso del software ImageJ se estimó la extensión radial diferencial entre los tiempos de medición que obedecen a intervalos entre 48 y 96 horas dependiendo del crecimiento observado.

Posteriormente se calculó la Tasa de extensión radial relativa (TERR), como la relación entre la tasa de crecimiento bajo tratamiento y la tasa de crecimiento de los cultivos control por 100, obteniéndose el porcentaje que refleja el crecimiento del hongo. El análisis de la respuesta de *A. chrysogenum* y sus transformantes a condiciones de estrés, se realizó en medio agar CCM, teniendo como control positivo el cultivo de cada cepa sin ser sometido a los tratamientos y el medio no inoculado sometido al tratamiento.

El inóculo para cada cepa objeto de estudio fue obtenido a partir de un precultivo en Erlenmeyer de 500ml con 90 ml de medio CCM al que se le adicionó 10ml de suspensión fúngica 1×10^6 FMH/ml⁻¹, por un tiempo no mayor a 48 horas de incubación a 26°C y en

agitación constante a 150 rpm, el micelio en crecimiento fue recuperado en tubos Falcón y centrifugado por 20 min a 4000 rpm, el sobrenadante se descartó.

El micelio fue lavado con agua destilada estéril 2 veces, repitiendo la centrifugación y descarte del sobrenadante. Por último, el micelio fue resuspendido en 20ml de solución amortiguadora de fosfatos y sometido a maceración con perlas de vidrio durante 10 minutos. Luego se extrajo una alícuota de la suspensión con la que se determinó la concentración de fragmentos hifales viables ml^{-1} mediante rojo neutro (Fukuda, et al., 1996).

5.10.1 Estrés Osmótico

La respuesta a distintas concentraciones de sales se analizó a partir del crecimiento fúngico en medio agar CCM suplementado con una sal, para tal fin se tomaron bocados de 5mm de diámetro de un precultivo con cinco días de desarrollo a 26°C en total oscuridad que fueron transferidos a placas petrí de 90mmx15mm con medio agar CCM suplementado con uno de los siguientes osmolitos, cloruro de sodio, cloruro de potasio y glicerol, a concentraciones (0,5M y 1M) manteniendo un pH ajustado =6,8 con NaOH o HCl (adaptado de Rangel, et al., 2008).

5.10.2 Estrés Oxidativo

En placas de agar CCM se estableció la sensibilidad de *A. chrysogenum* y sus transformantes a diferentes concentraciones de H_2O_2 . Las cepas precultivadas por siembra en masivo con cinco días de crecimiento en agar CCM se les extrajeron bocados de 5mm diámetro que fueron llevados a placas conteniendo H_2O_2 a concentraciones de 50mM y 100mM, luego fueron incubados a 26°C (Shin y Yu, 2013), para determinar la tasa de crecimiento radial diferencial teniendo como control la cepa silvestre.

5.10.3 Estrés Lumínico

Se realizaron cultivos en agar CCM por inoculación central de un bocado de 5mm de diámetro que fue insertado dentro del medio e incubado a 26°C durante 24 horas en total oscuridad antes de ser sometida a radiación de luz blanca en un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y radiación de luz blanca constantemente, manteniendo la temperatura de incubación de 26°C.

Por convención y manejo de información, los ciclos luz oscuridad frecuentemente usados en estudios experimentales del reloj biológico corresponden DD= oscuridad constante, LL=luz constante y 12:12 LD= ciclo luz-oscuridad de 12 horas en cada condición (Ramsdale, en Gow, et al., 1997)

5.11 Análisis estadístico

Las pruebas fueron realizadas de forma simultánea para *A. chrysogenum* y sus transformantes aplicando los distintos tratamientos por triplicado en cada prueba. Los resultados obtenidos en los distintos ensayos fueron analizados con el software estadístico SPSS vs 21, diseñado por IBM teniendo en cuenta la distribución de los datos y las medidas de tendencia central, se llevaron a cabo análisis paramétricos y no paramétricos, así como análisis de comparación múltiple de muestras.

Igualmente se empleó la herramienta de hoja de cálculo Excel de Microsoft office 2016 para la organización, análisis y representación gráfica de los resultados.

6. CONSIDERACIONES ETICAS

La presente investigación se desarrolló siguiendo la normatividad vigente, los parámetros de bioseguridad establecidos por el grupo de investigación GIMBIO y el laboratorio

de Ingeniería Genética y de Metabolitos secundarios de la UAM unidad Iztapalapa-(UAM-I), los lineamientos bioéticos relacionados con la manipulación de organismos genéticamente modificados, con especial énfasis en el confinamiento de estos organismos con resistencia a antibióticos.

Las normas de bioseguridad en el laboratorio siguieron los parámetros establecidos por la OMS [8], y los lineamientos sobre la disposición de los espacios para la investigación y la docencia aprobados por el consejo académico de la UAM-I [9], [10].

7. RESULTADOS

7.1. Mutagénesis sitio dirigida del gen *agaI* y verificación de la transformación de *A. chrysogenum*.

La función de la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica fue examinada empleando dos alelos mutantes dominantes obtenidos mediante mutagénesis sitio dirigida, ambas mutaciones fueron empleadas previamente en mamíferos y analizadas por cristalografía y por resonancia de plasmón superficial (SPR: surface plasmon resonance) empleada para estudiar las interacciones proteína ligando (Bosch et al., 2012).

El primer alelo *agaI*^{G42R} la modificación de glicina (G) por arginina(R) en la posición 42 de la estructura primaria de la subunidad G α que es necesaria para la actividad GTPasa, la glicina se encuentra dentro de la caja G-1 (P-loop) con secuencia consenso G₄₂XXXXGK responsable de la unión de los fosfatos α y β del GTP a la subunidad G α , aunque éste cambio no evita la actividad GTPasa, altera la configuración de la proteína impidiendo que adopte la forma típica de transición para la hidrólisis del GTP, así como altera la interacción de G α con la proteína RGS, que promueve la hidrólisis de GTP a GDP, activando la señal (Bosch et al., 2012).

Estudios de la modificación de la glutamina (Q) altamente conservada por leucina (L) en la posición 204 de la estructura primaria de la subunidad G α muestra inhibición total

de la actividad GTPasa, dado que el posicionamiento de la glutamina 204 coordina el ataque nucleofílico de la molécula de agua (Raw et al., 1997) que permite la disociación del fosfato gamma del GTP, dando como resultado la formación de GDP.

La modificación de la glicina (G) de la posición 203 de la estructura primaria de la subunidad $G\alpha$ por una arginina (R), localizada en la caja G-3 de secuencia consenso DXXG₂₀₃, conduce a un cambio conformación en el sitio de unión a GTP que impide la disociación de esta subunidad con el dímero $G\beta\gamma$ evitando que se desencadene la señal de la subunidad $G\alpha$ (Fang & Dean, 2000; Hicks et al., 1997)

la glicina es necesaria para la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$. El segundo alelo *aga1*^{Q204L} consiste en un cambio de glutamina (Q) por leucina (L) igualmente necesario para la actividad GTPasa, ambas mutaciones resultan en una señal constitutivamente activa, que mantienen formado el complejo $G\alpha$ -GTP separado del dímero $G\beta\gamma$, impidiendo la hidrólisis del GTP a GDP, y la formación del complejo $G\alpha$ -GDP capaz de reasociarse al dímero $G\beta\gamma$ de la proteína G heterotrimérica.

Un tercer alelo dominante causante de inactivación constitutiva, fue desarrollado mediante la conversión de una glicina por arginina en la posición 203. La modificación estructural del alelo *aga1*^{G203R} impide la separación de la subunidad $G\alpha$ del dímero $G\beta\gamma$.

Las mutaciones fueron introducidas con el plásmido pC43aga1G203R, pC43aga1G42R, pC43aga1Q204, previamente fueron secuenciados para garantizar la presencia de la mutación y confirmar que no tengan cambios adicionales

La transformación de *A. chrysogenum* con cada uno de los plásmidos pC43aga1G203R, pC43aga1G42R, pC43aga1Q204 produjeron pocos transformantes con resistencia a fleomicina, que fueron posteriormente analizados por PCR para determinar: (1.) la presencia del gen *ble* de resistencia a fleomicina y (2) la presencia de forma correcta del gen *aga1*

7.1.1 Integración de los plásmidos que llevan la mutación dominante del gen *aga1* y Comprobación por PCR.

Los transformantes obtenidos para cada uno de los alelos que presentaron resistencia a fleomicina fueron evaluados para la presencia del gen *ble* de resistencia a fleomicina con los oligonucleótidos Tcyc1-tr1-R y Ble-tr1-F (ver tabla 3 y 4), cuyo punto de unión dentro del casett de transformación se muestra en la figura 6.

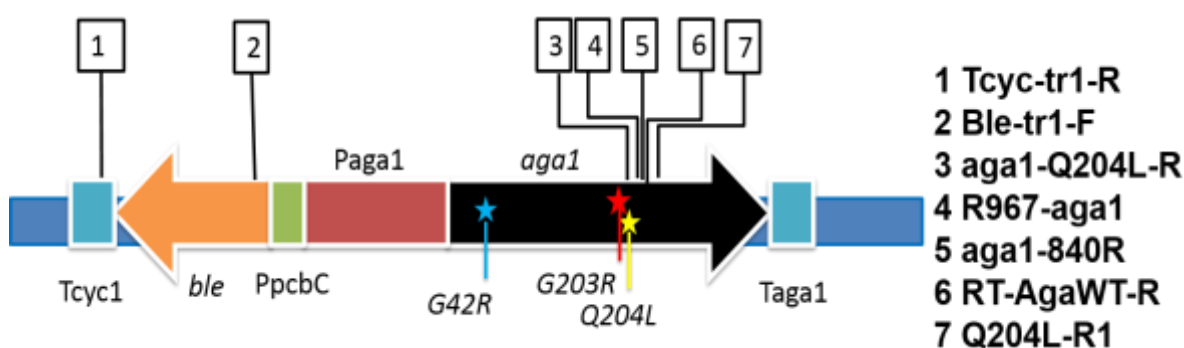


Figura 6 Esquema del fragmento del plásmido pC43aga1 en el que se representa el gen *ble* de resistencia a fleomicina y el gen *aga1* codificante de la subunidad Ga1. Los números indican los sitios de unión de los oligonucleótidos empleados en la comprobación de la inserción de la mutación en el ADN genómico de *A. chrysogenum* que han sido listados a la derecha de la imagen. Las estrellas indican los sitios de ocurrencia de la mutagénesis sitio-dirigida.

En el caso del alelo *aga1*^{G203R} aunque se observó crecimiento de estos transformantes en medio CCM suplementado con fleomicina, al ser evaluado por PCR no se obtuvo la banda de interés de 551pb (Figura 7) por lo que se descartó de ensayos posteriores.

Los transformantes que dieron positivo para la amplificación del gen de fleomicina (ver figura 7), fueron sometidos a una segunda PCR, para determinar la integridad de la inserción del casett de transformación, empleando 6 pares de oligonucleótidos (ver tabla 3), con cada una de las cepas transformadas.

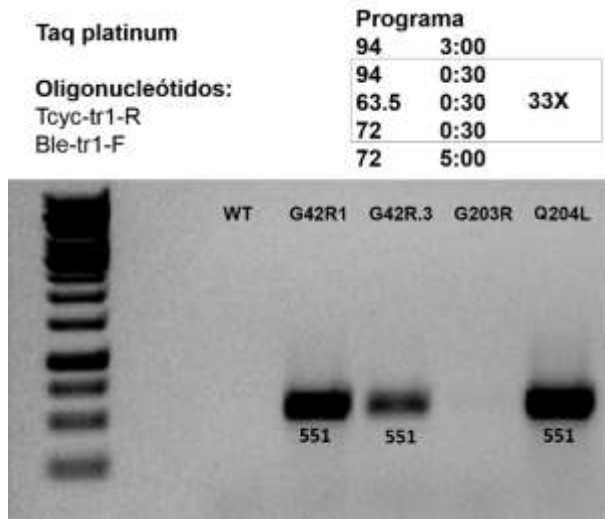


Figura 7 Análisis de transformantes por PCR de la inserción de la resistencia a fleomicina en *A. chrysogenum*, empleando los oligonucleótidos Tcyc-tr1-R y Ble-tr1-F con la polimerasa *Taq Platinum*. El programa de PCR se expone en la figura.

En la figura 8 se muestra los resultados obtenidos para la cepa con el alelo *aga1*^{Q204L} utilizando el par de primers que amplifican para un fragmento del gen de resistencia a fleomicina de 551pb y los demás fragmentos que involucran parte del gen *aga1* con tamaños que van desde 3051pb a 3527pb.

La comprobación por PCR nos permitió establecer que hubo transformación efectiva para los alelos *aga1*^{G42R}

y *aga1*^{Q204L} (Figura 7 y 8). Con una eficiencia de transformación para ambos alelos de 1 a 2 transformante por cada 10µg de ADN plasmídico.

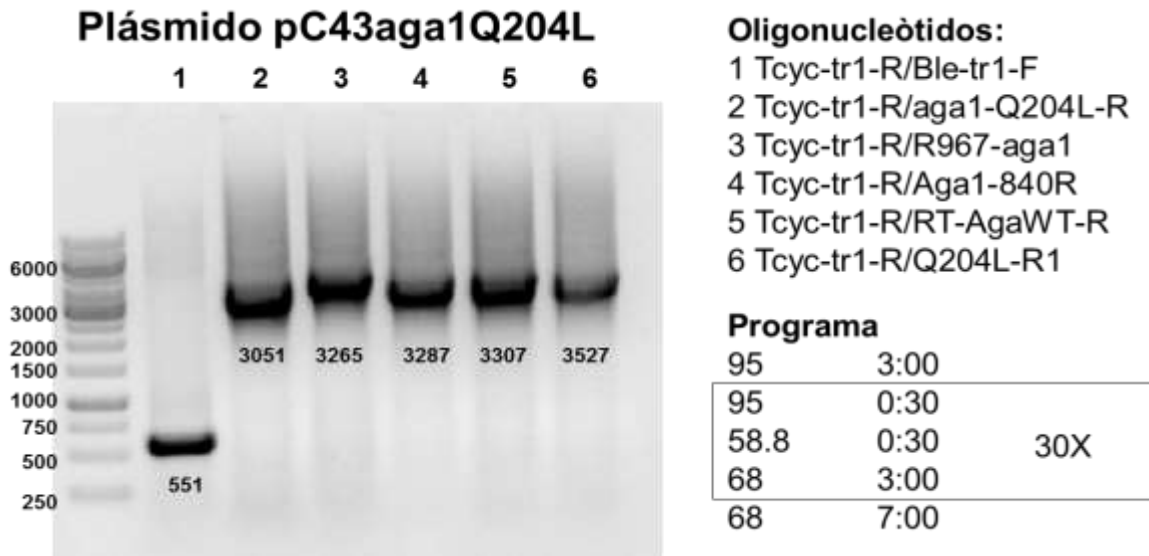


Figura 8. PCR de la integración del alelo *aga1*^{Q204L}, se emplearon los pares de oligonucleótidos listados en la figura y la polimerasa *Pfu Ultra II*; esta metodología fue empleada para todos los alelos transformantes. El programa de PCR se expone en la figura, siendo 30X el número de ciclos.

Previo a la realización de cada uno de los ensayos las cepas fueron sometidas a crecimiento sobre agar CCM suplementado con fleomicina, empleando las diferentes estructuras fúngicas utilizadas para su propagación, conidios y fragmentos hifales viables.

7.2 Caracterización fenotípica de *A. chrysogenum* y sus transformantes G42R y Q204L.

7.2.1 Macromorfología

Las colonias de *A. chrysogenum* se caracterizan por formar un botón central de mayor densidad aparente, rodeado por un anillo de filamentos radiales (Brotzu, 1948).

A principio de su desarrollo las colonias son blancas de aspecto liso que luego de 2 a 3 días se colorean de amarillo, en algunos casos esta coloración se mantiene debajo del micelio por lo que conservan una coloración más blanca vistas por el anverso de la caja. El color amarillo se debe a la presencia del pigmento crisogenina del que recibe el epíteto específico (Asilone, et al., 2000).

La pigmentación de las colonias después de los primeros tres días de crecimiento fue mayor en *agaI^{G42R}* seguido por *agaI^{Q204L}*. La cepa silvestre presenta una pigmentación ligeramente menor en comparación con sus transformantes (Figura 9), situación que se observó durante el transcurso de los ensayos.

La formación de conidióforos es difícil de diferenciar del micelio vegetativo. La cepa silvestre se observa más algodonosa, mientras que las cepas con los alelos mutantes tienen un aspecto más corrugado. Las colonias con alelos *agaI^{G42R}*, suelen ser más corrugadas a medida que se acerca hacia el centro de la misma, mientras que colonias con alelo *agaI^{Q204L}* suelen tener un aspecto menos denso y más liso.

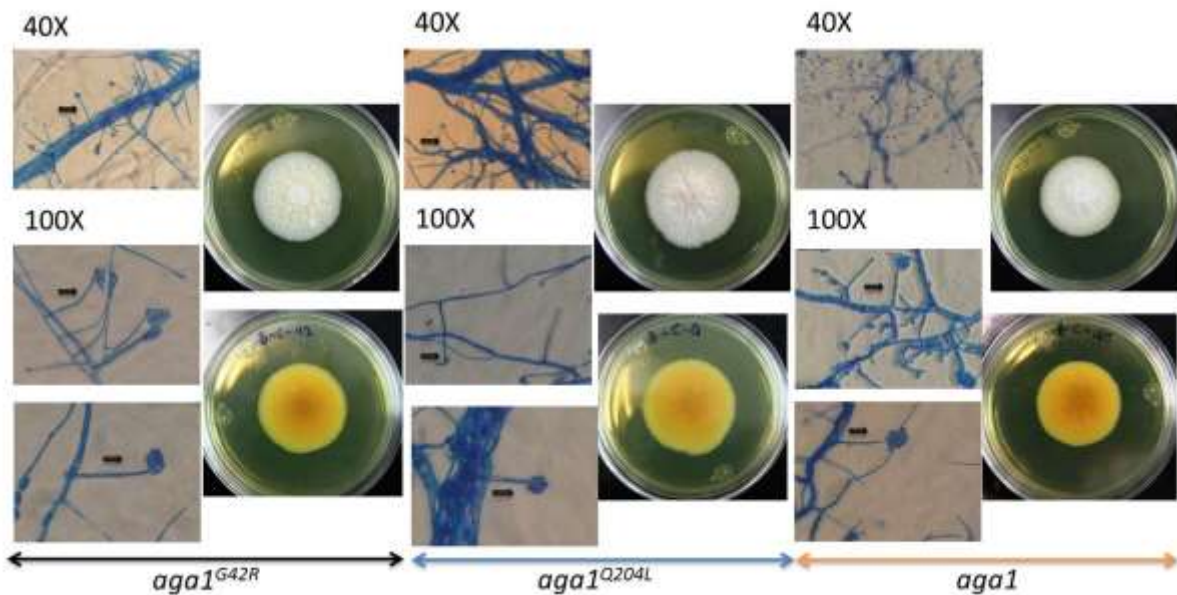


Figura 9 Micrografías y macromorfología de *A. chrysogenum* y sus cepas transformantes dispuestas de izquierda a derecha las correspondientes al alelo *aga1*^{G42R}, seguido del alelo *aga1*^{Q204L} y finaliza con la cepa silvestre. Las micrografías muestran estructuras reproductoras y vegetativas que fueron tincionadas con azul de lactofenol y se visualizaron en un microscopio de contraste de fase (OLYMPUS CH30). En la parte superior se observaron con aumento de 40X y las dos inferiores con aumento de 100X. Las flechas negras señalan conidióforos. Las placas Petri superiores muestran el anverso y debajo de estas el reverso de cultivos por inoculación central en agar CCM con 10 días de crecimiento a 26°C para las cepas de *A. chrysogenum* y sus transformantes.

7.2.2 Micromorfología

Luego de diez días de crecimiento se pueden observar las distintas morfologías celulares de *A. chrysogenum*. Las hifas son hialinas (hongo mucedináceo) delgadas, septadas, uninucleadas en cada segmento (Peberdy, 1987), desarrolla hifas áreas que suelen dar paso a la formación de conidióforos, estructuras de reproducción asexual que parecen estar en cantidades similares en las cepas con alelo silvestre y alelo *aga1*^{G42R}.

La conidiogénesis es blástica, los conidióforos se forman por una célula sencilla, en su extremo se forma la célula conidiogénica (formación holoblástica), productora de conidios de forma enteroblástica (Peberdy, 1987).

Los conidios son unicelulares dispuestos en cabezas mucosas (Figura 9), hialinos, de forma elíptica a fusiforme de aproximadamente 25-50 μm de longitud y pueden ser en ocasiones ligeramente curvados (Peberdy, 1987). Algunas hifas se ensanchan y aumentan de tamaño, tomando la hifa un aspecto de rosario o cadena de cuentas, presentan un proceso de fragmentación que da lugar a la formación de artrosporas este tipo de conidios se producen por la simple separación de tabiques en la hifa (Arenas, 2014)

Todas las cepas presentaron artrosporas después de 10 días de crecimiento en agar CCM, las cuales se vieron más comúnmente en la cepa silvestre, seguido de la cepa *aga1^{G42R}* y en menor proporción en la cepa *aga1^{Q204L}*, donde el micelio tiene una apariencia menos corrugada (Figura 9).

La conidiación en *A. chrysogenum* es escasa, sin embargo, la cepa *aga1^{G42R}* no se diferenció microscópicamente de la cepa silvestre, ambas presentaron conidióforos con gran cantidad de conidios, a diferencia de *aga1^{Q204L}*, quien presentó formación de hifas aéreas algunas con desarrollo de escasa cantidad de conidios y otras no desarrollaron conidios. La frecuencia de conidióforos es similar en la cepa silvestre y en la cepa *aga1^{G42R}* visualizándose la formación de conidióforos defectuosos y en menor frecuencia en la cepa *aga1^{Q204L}* (Figura 9).

7.2.3 Conidiación de *aga1*, *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q204L}* de *A. chrysogenum*.

Luego de estimar los conidios totales, se halló el promedio de producción de conidios por cepa (figura 10).

La formación de conidios se presenta en mayor cantidad en la cepa silvestre en relación con las cepas de señal constitutiva activa, indicando que la proteína $G\alpha$ regula negativamente la conidiación en *A. chrysogenum*, a tal punto que llega a inhibirla casi totalmente en el mutante *aga1^{Q204L}* que solo produce en promedio un 1,94% de conidios respecto a la cepa silvestre.

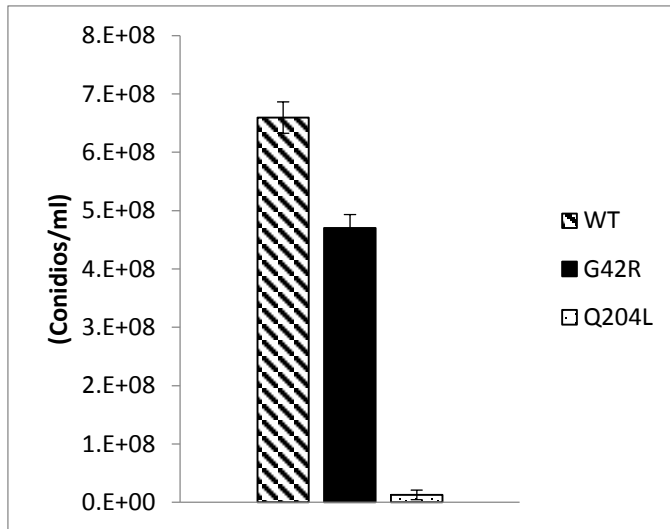


Figura 10 Conidiación promedio de las de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo *aga1^{G42R}* y Q204L correspondiente al alelo *aga1^{Q204L}* creciendo en medio CCM.

La cepa con el alelo *aga1^{Q204L}* muestra una reducción en la formación de conidios mayor al 98%, mientras que la reducción en la conidiación en los mutantes *aga1^{G42R}* en relación a la cepa silvestre es de un 28,73%.

La baja producción de conidios en las cepas con alelos *aga1^{Q204L}* no se relaciona con el aspecto fenotípico del hongo, dado que la no formación de conidios, no

implicó la no diferenciación de conidióforos, en estas cepas se observó el desarrollo de conidióforos con muy poca a nula cantidad de conidios.

El aspecto algodonoso de la cepa silvestre no es un indicador de mayor cantidad de conidióforos, en comparación con las cepas corrugadas no algodonosas con el alelo *aga1^{G42R}* donde la frecuencia de conidióforos para ambas cepas fue similar, aun cuando se presentó diferencia en la producción de conidios, siendo la cepa silvestre la que mostró mayor conidiación.

7.2.4 Tasa de Extensión Radial Relativa de *aga1*, *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q204L}* de *A. chrysogenum*.

La influencia de la señal constitutiva activa sobre el crecimiento vegetativo del hongo se llevó a cabo mediante el análisis de cada una de las cepas con los alelos mutantes en relación a la cepa silvestre, se estimó la tasa de extensión radial relativa como el porcentaje de la relación entre la extensión radial de la cepa con alelo mutante y la extensión radial de la cepa silvestre (Figura 11).

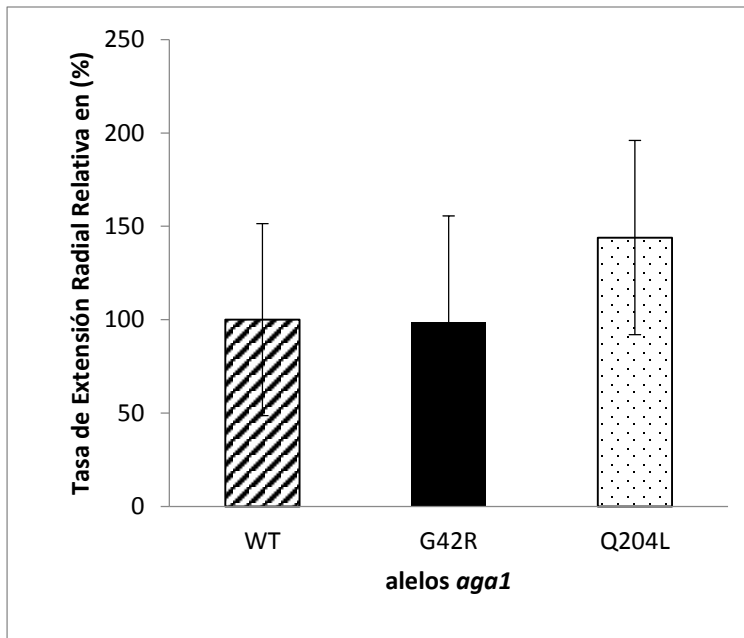


Figura 11 Tasa de extensión radial relativa promedio en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo *aga1*^{G42R} y Q204L correspondiente al alelo *aga1*^{Q204L} creciendo en medio CCM, para cada uno de los triplicados realizados

La cepa con el alelo *aga1*^{Q204L} difiere en su distribución y mediana de las demás cepas en cuanto a su extensión radial, mostrando las colonias de mayor crecimiento para los periodos de tiempo analizados.

La cepa silvestre y la cepa con el alelo *aga1*^{G42R} no presentan diferencias significativas en cuanto a su crecimiento vegetativo, sus colonias son de tamaños similares, aunque su apariencia externa difiere en la organización de sus hifas, teniendo un aspecto más corrugado las colonias con alelo *aga1*^{G42R} mientras que el alelo silvestre da un aspecto más algodonoso.

La tasa de extensión radial relativa entre la cepa silvestre y la cepa con alelo *aga1*^{G42R} difieren en tan solo un 1,11%, siendo de menor tamaño las colonias con el alelo *aga1*^{G42R}, resultado contrario a lo esperado, pues en otros hongos filamentosos se ha visto que las mutaciones de señal constitutivamente activa de la subunidad G α , presentan crecimiento incontrolado y gran formación de micelio aéreo (García, et al., 2011; Jain, et al.,

Posteriormente se realizó un análisis de la distribución de los datos y de las medianas, mediante pruebas no paramétricas con un nivel de significancia de 0.05% lo que permitió establecer que existen diferencias significativas en la tasa de extensión radial para las cepas en estudio.

Mediante las pruebas de comparaciones múltiples entre muestras se encontró que la

2005; Yang & Borkovich, 1999; Yu, 2006) , resultado que fue observado en las cepas con alelo *aga1*^{Q204L}, que tuvieron un crecimiento del 143,9 % respecto al de la cepa silvestre.

El comportamiento observado indica que la proteína G α estaría regulando positivamente el crecimiento vegetativo de *A. chrysogenum* indicando que el crecimiento vegetativo se ve favorecido cuando la proteína G α se encuentra activa.

7.2 La Tasa de extensión radial relativa (TERR) y sus variaciones frente a condiciones de estrés ambiental

Las proteínas G heterotriméricas han sido involucradas como estimuladores o atenuadores en procesos de respuesta a condiciones ambientales, y su participación se puede ver reflejada en cambios morfológicos de los hongos filamentosos.

La participación de la proteína G-alfa de *A. chrysogenum* codificada por el gen *aga1* sobre el crecimiento del hongo, se evaluó mediante la respuesta de los mutantes con señal constitutiva activa y de la cepa silvestre en medio sólido CCM suplementado a diferentes concentraciones de sustancias que inducen estrés osmótico y oxidativo, también se analizó la respuesta de las cepas expuestas a fotoperiodicidad LD (12 horas luz/12 horas oscuridad), y luz constante LL.

7.2.1 Participación de la proteína G α heterotrimérica en la respuesta a estrés osmótico.

Las cepas objeto de estudio fueron sometida a estrés osmótico mediante la suplementación del medio de crecimiento agar CCM con NaCl, KCl y glicerina, a dos diferentes concentraciones (0,5M y 1M).

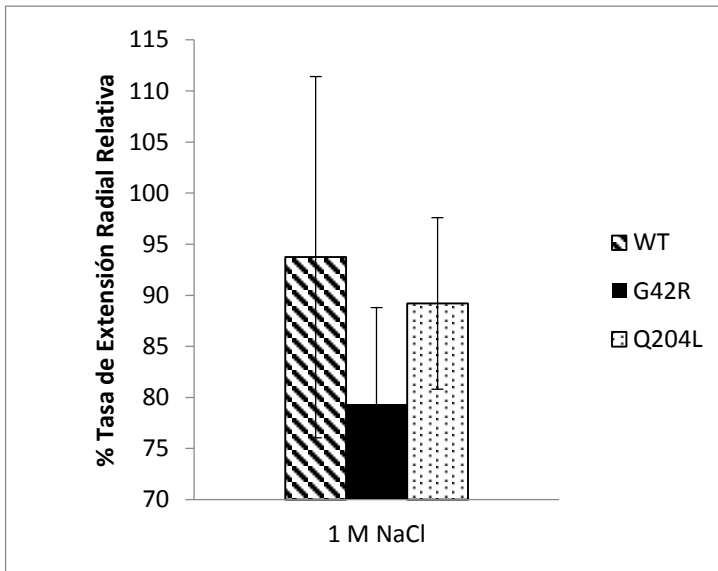


Figura 12 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo *aga1^{G42R}* y Q204L correspondiente al alelo *aga1^{Q204L}* creciendo en medio CCM suplementado con NaCl 1M

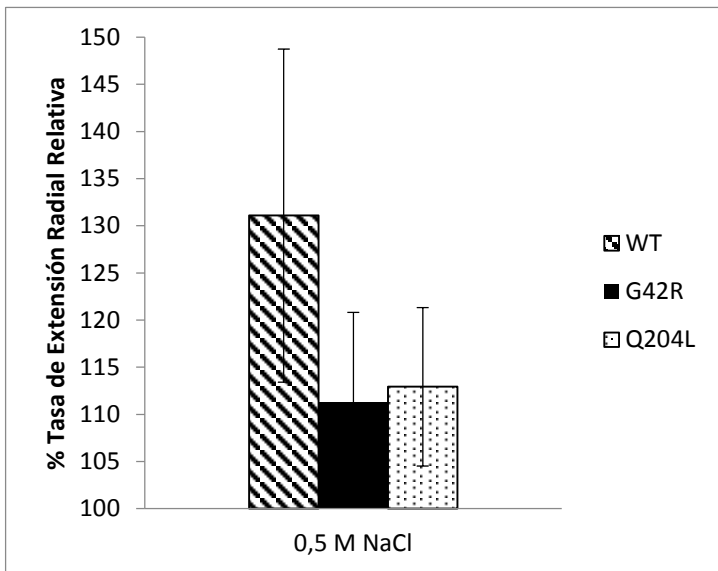


Figura 13 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo *aga1^{G42R}* y Q204L correspondiente al alelo *aga1^{Q204L}* creciendo en medio CCM suplementado con NaCl 0,5M

Se observó un efecto ligeramente inhibitor del crecimiento por cloruro de Sodio 1M sobre todas las cepas, obteniéndose un retraso en el desarrollo del 6,3% para la cepa silvestre, 10,8% para *aga1^{Q204L}* y en mayor proporción sobre *aga1^{G42R}* con el 20,68% (figura 12).

A una concentración de 0,5M, el NaCl estimuló el crecimiento de todas las cepas, principalmente de la cepa silvestre que creció 31,08% más que la cepa silvestre control, en el caso de *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q204L}* presentan un 11,33 % y un 12,92% de crecimiento al de sus respectivas cepas control (figura 13).

En presencia de cloruro de potasio, el efecto a una concentración 1M fue más drástico que con NaCl 1M, reprimiendo el desarrollo de todas las cepas en

proporciones mayores al 85%, la cepa con mayor tolerancia al estrés osmótico fue la cepa silvestre, mostrando un TERR del 14%, en comparación con sus transformantes de *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q204L}* que tuvieron TERR del 5,41% y 9,88% respetivamente (Figura 12 y 13).

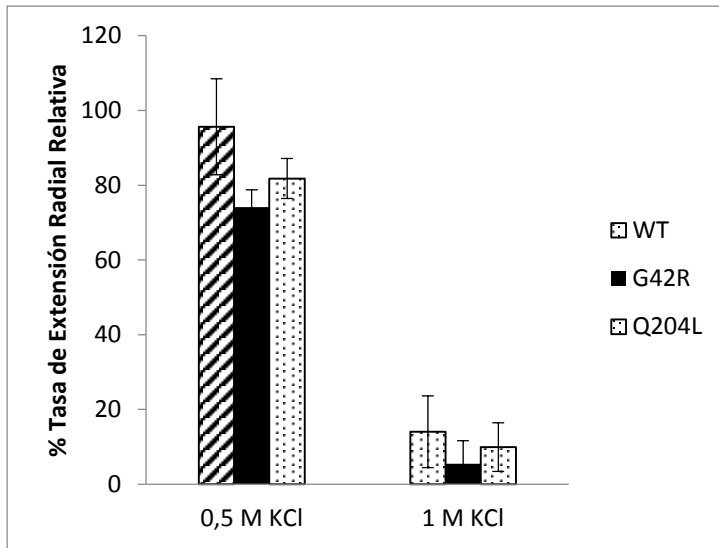


Figura 14 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo *aga1^{G42R}* y Q204L correspondiente al alelo *aga1^{Q204L}* creciendo en medio CCM suplementado con KCl 0,5M y 1M.

Igualmente se presentó inhibición del crecimiento a una concentración de KCl 0,5M y en menor proporción que al 1M, donde las TERR no se inhibieron por más del 19%, de igual manera la cepa silvestre mostró un mejor desarrollo bajo estas condiciones, en comparación con los transformantes *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q204L}* (ver Figura 14).

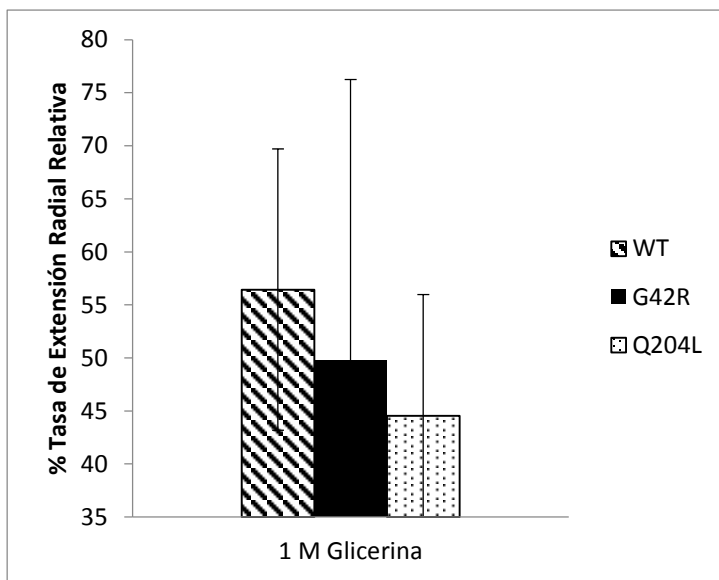


Figura 14 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo *aga1^{G42R}* y Q204L correspondiente al alelo *aga1^{Q204L}* creciendo en medio CCM suplementado con Glicerina 1M.

Por otra parte, el crecimiento de las cepas en presencia de Glicerina 1M se vio inhibido en proporciones del 43,57% para la cepa silvestre, 50,28% para *aga1^{G42R}* y del 55,46% para *aga1^{Q204L}*, indicando que la cepa silvestre es ligeramente más tolerante a la presencia de altas concentraciones de glicerina (figura 15).

Este efecto no se evidencia a concentraciones de Glicerina 0,5M, pues contrariamente las cepas silvestre y *aga1^{G42R}* muestran una TERR ligeramente mayor a las cepas control, la cepa *aga1^{Q204L}* presenta una ligera susceptibilidad a la presencia de glicerina 0,5M, observándose un retraso de solo el 6,54% en su crecimiento (Figura 16).

Este efecto no se evidencia a concentraciones de Glicerina

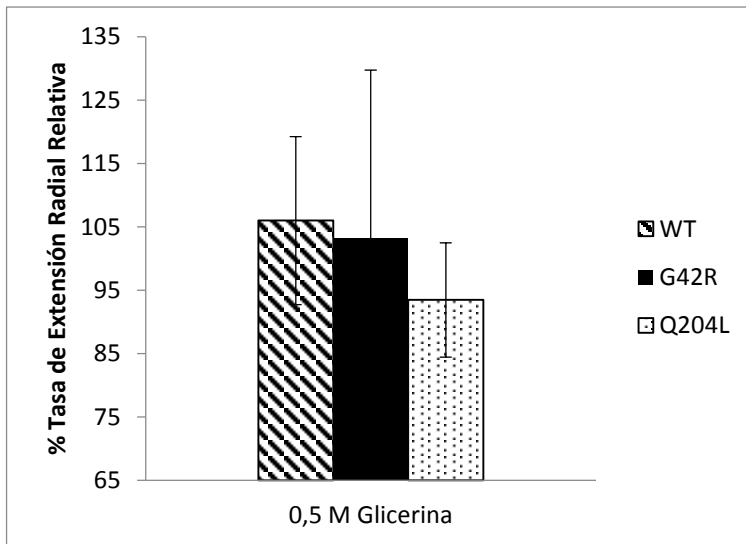


Figura 15 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q204L}* correspondiente al alelo *aga1^{Q204L}* creciendo en medio CCM suplementado con Glicerina 0,5M

frente a condiciones de estrés osmótico.

A concentraciones más bajas (0,5M) la TERR de las cepas no parece sufrir mayores afectaciones, sin embargo, *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q204L}* muestran mayor sensibilidad, de los tres osmolitos analizados el KCl fue el de mayor impacto negativo en el crecimiento de *A. chrysogenum*. Esta situación parece indicar que la proteína $G\alpha$ heterotrimérica, regula negativamente el crecimiento

7.2.2 Participación de la proteína $G\alpha$ heterotrimérica en la respuesta a estrés oxidativo

La respuesta de las distintas cepas frente a la presencia de peróxido de hidrogeno sobre su crecimiento muestran una mayor susceptibilidad de la cepa *aga1^{G42R}* con TERR del 53,97% y del 4,8% a concentraciones de H_2O_2 50mM y 100mM respectivamente seguido de la cepa *aga1^{Q204}* con reducción de su TERR de un 14,84% y 3,47% frente a concentraciones de H_2O_2 50mM y 100mM (figura 17).

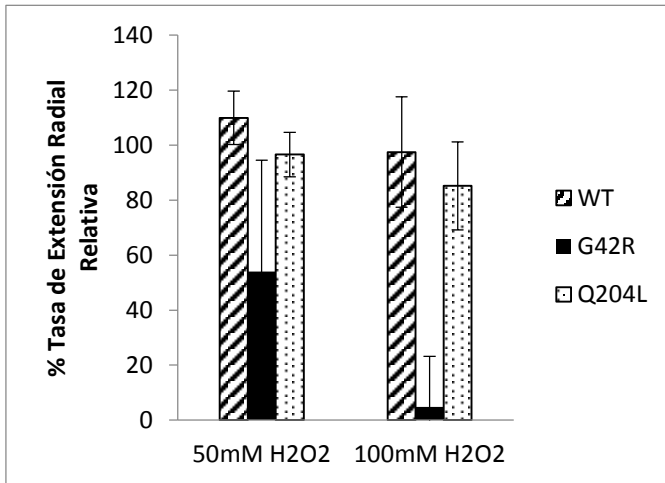


Figura 16 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo *aga1^{G42R}* y Q204L correspondiente al alelo *aga1^{Q204L}* creciendo en medio CCM suplementado con H₂O₂ 0,5M y 1M.

La cepa silvestre presenta una mejor tolerancia frente a ésta especie ROS, viéndose ligeramente favorecido su crecimiento a una concentración de H₂O₂ 50mM, y un ligero retraso en su TERR del 2,43% bajo una concentración de H₂O₂ 100mM (figura 17). Indicando una posible regulación negativa de la proteína Ga heterotriméricas sobre el crecimiento en condiciones de estrés oxidativo.

7.2.3 Participación de la proteína Ga heterotriméricas en la respuesta a estrés lumínico

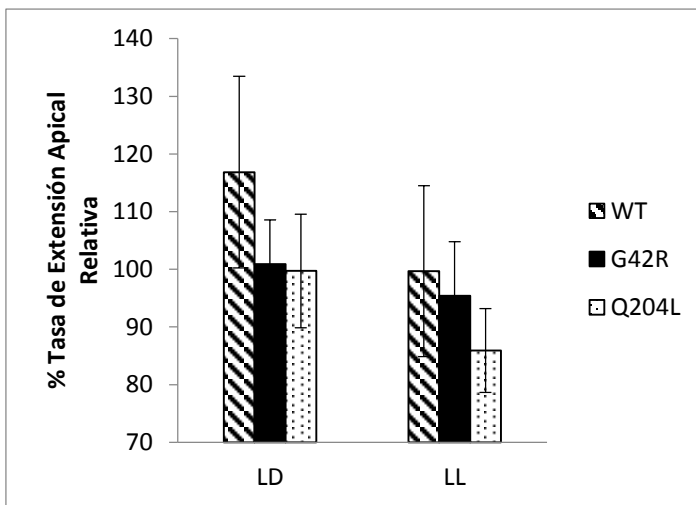


Figura 17 Tasa de extensión radial relativa en porcentaje de las cepas WT o silvestre, G42R correspondiente alelo *aga1^{G42R}* y Q204L correspondiente al alelo *aga1^{Q204L}* creciendo en agar CCM y sometidas a fotoperiodicidad LD y LL

Bajo un ritmo de LD (12 horas Luz /12 oscuridad) se promueve ligeramente el desarrollo de la cepa silvestre en un 16,85%), mientras que la Luz constante (LL) durante más de 200 horas no afectó la TERR, siendo un indicador de la carencia en *A. chrysoeum* de ritmo circadiano para estos intervalos de radiación (figura 18).

El comportamiento de la cepa *aga1^{G42R}* y la cepa *aga1^{Q204L}* es similar al de la cepa silvestre en condiciones LD, y en LL se observó un ligero retraso en el crecimiento para ambos transformantes siendo mayor

en el caso de la cepa *aga1^{Q20LA}* donde la TERR se redujo en un 14,1%. El retraso en el crecimiento bajo LL en las cepas con señal constitutiva activa para *Agal* es un indicio de una posible regulación negativa del crecimiento por la proteína $G\alpha$ heterotrimérica que debe estudiarse más a fondo, pues los fenómenos de respuesta a la luz están también asociados a respuesta térmica.

8. DISCUSIÓN

La dilucidación del efecto que tiene la subunidad alfa de las proteínas $G\alpha$ heterotriméricas en las rutas de señalización celular de *A. chrysogenum* se encuentran pobremente investigado, existiendo escasos estudios sobre este tema aún para otros hongos filamentosos de interés comercial y agrícola.

Los análisis en varios de los procesos fisiológicos sobre la participación de $G\alpha$ del grupo I están asociados principalmente al crecimiento vegetativo, desarrollo de estructuras de reproducción sexual y asexual, conidiación, patogenicidad, formación de apresorio, metabolismo secundario, y en menor proporción a mecanismos de respuesta a estrés ambiental.

Diversos estudios han demostrado que las células fúngicas son capaces de percibir y responder a señales externas como hormonas, estímulos físicos y químicos, en el que las proteínas $G\alpha$ heterotriméricas como mediadores de la señal intracelular juegan un importante papel en la comprensión de las respuestas fisiológicas y bioquímicas del hongo (Neves, et al., 2002).

Los estímulos ambientales son activadores de receptores de membrana, como los GPCR que están compuestos por siete estructuras helicoidales con dominio de unión a proteínas G heterotriméricas, los cuales en ausencia de estímulo permanece como un complejo donde el dímero $G\beta\gamma$ está asociado al complejo $G\alpha$ -GDP, cuando la señal es activada por unión de un ligando al receptor GPCR, éste cataliza el intercambio de GDP a GTP de la

G α , causando la disociación del dímero beta-gamma del complejo G α -GTP. La señal se apaga cuando ocurre la hidrólisis de GTP a GDP en el sitio de actividad catalítica de G α , inactivando las subunidades de las proteínas G heterotriméricas, siendo G α un represor de la actividad como del dímero G beta-gamma

La activación de la señalización por acción de las proteínas G heterotriméricas da paso a la producción y liberación de gran variedad de segundos mensajeros como AMPc, inositol 1,4,5-trifosfato, diacilglicerol, GMPc, iones Calcio, óxido nítrico, que a su vez actúan como amplificadores de la señal celular y permiten la respuesta del hongo al estímulo (Hank, et al., 2004).

La presente investigación y discusión de resultados, se centra en como el gen *agal* codificante de la proteína G α heterotrimérica *Agal* de *A. chrysogenum* participa en la respuesta a condiciones de estrés osmótico, oxidativo y lumínico, en función de la TERR, dado que una de las principales manifestaciones del efecto de los agentes estresores o tóxicos son los cambios en el crecimiento vegetativo.

8.1 Efecto de la señalización de la subunidad G α heterotrimérica *Agal* sobre la morfología, la conidiación y el crecimiento vegetativo.

La expresión fenotípica resultante de las modificaciones genéticas del gen *agal* conduce a variaciones del fenotipo silvestre, donde hay una marcada diferencia entre los fenotipos de los alelos *agal* y *agal*^{Q204L}, mientras que hay un traslape de características entre *agal* y *agal*^{G42R}, derivadas de la señal constitutivamente activa de la subunidad G α , fenómeno que se ha observado en otros hongos filamentosos.

El efecto de la señalización de la subunidad G α se detallará sobre tres aspectos, la morfología, la conidiación y el crecimiento vegetativo, a continuación:

8.1.1 Papel de la subunidad $G\alpha$ en la Morfología

Las proteínas G heterotriméricas participan en procesos morfogénicos influyendo en la expresión genética, los aspectos macromorfológicos de las colonias con mutaciones o deleciones para los genes codificantes de la subunidad $G\alpha$ han sido descritos en escasas investigaciones, a cambio ofrecen una visión más cuantitativa de las alteraciones producto de la activación o inactivación de la ésta subunidad.

Los aspectos macromorfológicos descritos en estudios funcionales en hongos filamentosos, como los realizados en *A. nidulans* que involucran las mutaciones G42R, R178L, G183S, R178C y Q204L (Yu, 2006; Yu, et al, 1996) , *N. crassa* R178C y Q204L (Yang & Borkovich, 1999); *P. chrysogenum* G42R (García, 2008) dan una señal constitutivamente activa, que conducen a la formación de colonias algodonosas o “fluffy”, en las que el micelio vegetativo crece de forma incontrolada seguido en algunos casos por procesos de autólisis (Yu, et al 1996) . Contrariamente en *A. chrysogenum*, las mutaciones G42R y Q204L dan paso a la formación de colonias de aspecto corrugado a liso con baja formación de micelio aéreo.

El fenotipo “fluffy” también ha sido observado en otras especies del genero *Aspergillus* [17], en *P. marneffei* el fenotipo “fluffy” se observó en mutantes con alelo *pga1* G203R de señal inactiva y su deleción, en presencia de AMPc extracelular y teofilina que inhibe la acción de la fosfodiesterasa, mientras que la mutación *pga1*G42R no mostró ningún fenotipo adicional bajo diferentes condiciones de cultivo (Zuber, et al., 2002), similarmente los alelos *aga1*^{G42R} y *aga1*^{Q204L} de *A. chrysogenum* no muestran éste fenotipo, siendo la cepa silvestre la que exhibe colonias más algodonosas, sin ser propiamente un fenotipo fluffy.

Las colonias con fenotipo fluffy de *A. nidulas* y *N. crassa* al igual que la cepa *aga1*^{Q204L} de *A. chrysogenum* analizadas microscópicamente muestran conidióforos defectuosos, bloqueo en la esporulación (Jain et al 2005; Yu, 1996) curiosamente la mutación

aga1^{G42R} de *A. chrysogenum* es muy similar a la cepa silvestre, tanto en la frecuencia de conidióforos como en la formación de conidios, contrario a lo observado en *P. marneffeii pga1^{G42R}*, que no presentó formación de conidios ni desarrollo de conidióforos, por lo que sus colonias son planas, sus hifas áreas fueron delgadas, fenotipo que en presencia de AMPc exógeno no tuvo cambios [6].

El fenotipo observado en *P. marneffeii pga1^{G42R}* fue muy similar al obtenido en con *aga1^{Q204L}* de *A. chrysogenum*, las mutaciones dominantes de señal constitutivamente activa de la subunidades $G\alpha$ están relacionadas a alteraciones en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Calvo, et al., 2002; Jain, et al., 2005; Yu, et al., 1996) como ocurre con el gen *Fad A* codificante de la subunidad $G\alpha$, que conduce a colonias que carecen de la micotoxina esterigmatocistina (Yu, 2006) a través de la casaca de señalización de AMPc/PKA [17].

La biosíntesis de crisogenina en *P. chrysogenum* fue mejorada por la presencia del alelo dominante *pga1^{G42R}* (García, et al., 2008), pigmento amarillo producido en medio sólido al igual que en *A. chrysogenum*, donde las cepas con los alelos *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q204L}* tuvieron una mayor pigmentación de color amarillo intenso que en las silvestres, indicador de que la subunidad $G\alpha$ interviene en la producción de crisogenina.

8.1.2 Papel de la subunidad $G\alpha$ en la Conidiación

El efecto de la subunidad $G\alpha 1$ sobre la conidiación ha sido descrito más ampliamente a partir de estudios funcionales que emplean la disrupción genética, la delección de los genes de interés y las mutaciones sitio dirigidas, hallándose que la formación de conidios se relaciona con la actividad adenilato ciclasa y fosfodiesterasa que aumentan y disminuyen la concentración de AMPc intracelular respectivamente, donde la subunidad $G\alpha$ es un regulador de la actividad adenilato ciclasa (Bahn & Jung, 2013; d'Enfert, 1997; Doehlemann, et al., 2006; Krijgsheld et al., 2013; Neer, 1995).

El papel de la subunidad G α sobre la conidiación no muestra un patrón general para todos los hongos filamentosos lo cual demuestra el efecto pleiotrópico de la subunidad G α 1, encontrándose dos efectos sobre la conidiación, el primero es que la proteína G α 1 estimula o regula positivamente la conidiación y conduce a fenotipos hiperconidiantes y el segundo es un efecto negativo sobre la conidiación causando reducción o inhibición de la misma.

En el caso de *A. chrysogenum* el efecto de la activación de la señal por la subunidad G α 1, tiene un efecto negativo sobre la conidiación, observándose para el alelo *aga1*^{G42R} una reducción en la producción de conidios, mientras que el alelo *aga1*^{Q204L} presentó una drástica reducción que tendió a la inhibición total de la conidiación.

El efecto negativo en la conidiación en medio de cultivo sólido también se ha observado en mutantes de señal constitutivamente activa para los alelos *pga-1*^{G42R} de *P. chrysogenum*, *P. marneffeii*, *P. camemberti* (García, et al., 2017; 2011; 2009; 2008b), *fadA*^{G42R} y *fadA*^{Q204L} de *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. flavus* (Calvo, et al., 2002; Krijgsheld, et al., 2013; Mah & Yu, 2006; Yu, 2006; Yu, et al., 1996), y *cpg-1*^{Q204L} y *cpg-1*^{R178C} de *C. parasitica* (Segers & Nuss, 2003), *gna1*^{Q204L} de *N. crassa* (Yang & Borkovich, 1999), contrario a lo observado en cepas con alelo *magB*^{Q204L} de *M. grisea* donde se ve favorecida la conidiación al haber una activación constitutiva de la subunidad G α 1 (Liu & Dean, 1997).

Este mecanismo de reproducción asexual no presenta diferencias significativas entre los alelos alelo *aga1*^{G42R} y la cepa silvestre, mientras que el alelo *aga1*^{Q204L} tiene casi totalmente inhibida su capacidad para conidiar.

Esta gran diferencia en la conidiación de ambos alelos mutantes, podría deberse a que la conformación espacial de la proteína codificada por el alelo *aga1*^{G42R} mutación que le permitiría realizar hidrólisis de GTP en muy baja proporción y retornar a su estado inactivo, similarmente al alelo *gna1*^{R178C} (Bosch et al., 2012; Yang & Borkovich, 1999), mientras que la proteína codificada por el alelo *aga1*^{Q204L} es más estable y no puede retornar a su estado inactivo debido a la inhibición total de la actividad GTPasa que fue generada con el

cambio de la glutamina por Lisina (Yu, 2006), haciendo más evidente el papel de la proteína Gα1 activa.

8.1.3 Papel de la subunidad Gα en la Tasa de Extensión Radial Relativa

La subunidad Gα1 cumple un papel relevante como reguladora de los procesos de conidiación, mecanismo de reproducción asexual que puede afectar la tasa de crecimiento vegetativo, pues se ha visto que el desarrollo de conidios, interrumpe o disminuye la tasa extensión radial y viceversa, como lo observado con el alelo *aga1^{Q204L}* que mostró una tasa de extensión radial relativa mayor a la de la cepa silvestre en un 43,95% y una conidiación de tan solo 1,11% respecto a la cepa silvestre

Similarmente durante el análisis de la participación de *fadA* en el desarrollo *A. nidulans* se evidenció que el bloqueo de la actividad de *fadA* por una proteína RGS *flb A* conduce a una reducción del crecimiento vegetativo y el cual fue necesario para que ocurriera la esporulación (Yu et al., 1996), resultado que concuerda con el fenotipo de la señal constitutivamente inactiva obtenida con la mutación *fadA^{G203R}*, que muestra un reducido crecimiento vegetativo e hiperactividad de esporulación asexual (Yu, 2006), antagónicamente la señalización constitutivamente activa del complejo GTP-Gα, promueve el crecimiento vegetativo aéreo e interfiere bloqueando la conidiación (Krijgsheld, et al., 2013; Yu, 2006),

La mutación dominante de señal activa *GpaA^{Q204L}* en *A. fumigatus* resulta en una reducida conidiación con incremento de la proliferación hifal, indicando que el gen GpaA de señal constitutivamente activa favorece el crecimiento vegetativo mientras inhibe la conidiación (Mah y Yu, 2006), tal y como se observó en cepas con el alelo *aga1^{Q204L}* de *A. chrysogenum*.

Otra respuesta del efecto de Gα está dado por reducción en la conidiación acompañado de un desarrollo de hifas aéreas, como en el caso de *P. chrysogenum*, *P. roqueforti* y

Fusarium sporotrichioides donde la activación de Ga1 con el alelo G42R presenta resultados consistentes a lo observado con el alelo *aga1*^{G42R} en *A. chrysogenum*.

Los alelos G42R generan una reducción en la conidiación y en la tasa de extensión apical en medio sólido (reducción en el diámetro de la colonia) con mayor desarrollo de micelio aéreo (tendencia a fenotipo fluffy), (Tag et al., 2000; García, et al., 2007; García, et al., 2009; García, et al., 2017) similarmente en el caso de *A. nidulans*, *M. grisea* estimula el micelio aéreo, más no el crecimiento radial, con baja esporulación (Fang & Dean, 2000; Yang & Borkovich, 1999; Yu. et al., 1996), lo que sugiere un efecto negativo sobre la tasa de extensión radial, una regulación negativa de la conidiación, y un efecto positivo sobre la formación de micelio aéreo.

En el caso de *M. grisea* con alelos *magB*^{G42R} se presentó mayor desarrollo de hifas áreas, reducción de la conidiación con pérdida de la pigmentación en sus conidios (melanización) y procesos autolíticos en medio V8, que fueron suprimidos con 3% de NaCl y condujo al desarrollo de un fenotipo algodonoso o fluffy, mientras que en medio rico en nutrientes y con adición de 3% de NaCl no hubo desarrollo de hifas áreas y el micelio creció sobre la superficie del medio sólido, sin presentar diferencias significativas en el crecimiento vegetativo en medio sólido entre la cepa silvestre y cepas con los alelos *magB*^{G42R} y *magB*^{G203R} de señal Ga1 inactiva. Semejante a lo observado entre la cepa silvestre de *A. chrysogenum* y aquellas con el alelo *aga1*^{G42R}, las cuales presentan tasas de crecimiento radial similares.

La subunidad Ga1 está implicada en los procesos de conidiación, crecimiento radial y desarrollo de hifas áreas, lo cual provoca una variabilidad fenotípica que resulta ser específica para cada especie.

8.2 La señalización de la subunidad $G\alpha$ heterotrimérica *Aga1* bajo diferentes condiciones de estrés.

8.2.1 Estrés Osmótico

Las condiciones de osmolalidad externa e internas son determinantes en la supervivencia celular, pues son responsables del equilibrio hídrico y del volumen celular generado por osmosis.

Ivey y colaboradores (1996), analizaron la respuesta a estrés osmótico de *Neurospora crassa* empleando concentraciones 0,75M de KCl y NaCl, y 1,5M de sorbitol, obteniendo una reducción en la tasa de extensión radial para la cepa silvestre, indicando que la proteína $G\alpha$ codificada por *gna-1* proporciona osmosensibilidad (Ivey, et al., 2002), ésta respuesta es similar para las $G\alpha$ heterotriméricas codificadas por *cpg-1* de *Cyphonectria parasitica* (Segers, et al., 2003; Seibel, et al., 2009), *cga-1* de *Cochliobolus heterostrophus* (Horwitz, et al., 1999), *pga-1* de *Penicillium camemberti* (García, et al., 2017), *Ppga-1* de *P. chrysogenum* (García, et al., 2011), *pga1* de *P. roqueforti* (García, et al., 2009),

Igualmente la exposición de las cepas *aga1^{G42R}* y la cepa *aga1^{Q20L4}* a sales como KCl y NaCl mostraron comportamientos contrarios, dado que en presencia de KCl se presentó una disminución en la TERR a 0,5M, habiendo un efecto más drástico a una concentración de 1M KCL, mientras que en presencia de NaCl 0,5M se favoreció el crecimiento de todas las cepas, con ligeras reducciones es el desarrollo del hongo a 1M, de tal manera que la señal constitutivamente activa de $G\alpha$ produce mayor sensibilidad de las cepas a estrés por KCl, contrario a la presencia de NaCl donde se observa una mayor tolerancia

Esta tendencia también fue vista en las especies de *Penicillium sp* mencionadas anteriormente, en los que hubo disminución en la tasa de extensión radial bajo condiciones hiperosmóticas, las tasas de crecimiento en las cepas con señal constitutivamente activa del gen *pga-1* vistas durante la expresión de los alelos *pga1^{G42R}* fueron aun menores, indicando que la $G\alpha$ activa otorgó menor resistencia a condiciones de estrés osmótico (García, et al.,

2009, 2011, 2017) sensibilidad de estas mutaciones compartida para los alelos *cpg-1QL* y *cpg-1RC* de *C. parasítica* (Segers, et al.,2003) .

La diferencia encontrada entre *A. chrysogenum* y las especies de *Penicillium sp.* radica en la respuesta a NaCl, donde *P. chrysogenum*, *P. roqueforti* y *P. camemberti* son más sensible a altas concentraciones de NaCl (1,5M) en comparación con su respuesta a KCl (1,5M) y con tasas de crecimiento hasta 40% menos respecto a la cepas parentales (García, et al, 2009, 2011, 2017); mientras que *A. chrysogenum* muestra más tolerancia a NaCl (1M) y ve favorecido su desarrollo en aproximadamente un 30% a 0,5M de NaCl, lo cual puede estar relacionado a su origen evolutivo o a su hábitat y al potencial toxicológico del Sodio. *A. chrysogenum* fue aislado de aguas residuales en la costa de la isla de Cerdeña (Brotzu, 1948).

En los casos referenciados anteriormente la delección del gen codificante para las Gα heterotriméricas permite una mayor tolerancia a estrés hipertónico (Seibel, et al., 2009; García, et al., 2009, 2011, 2017; Ivey, et al., 2002), salvo en *N. crassa*, *C. parasítica* y *C. heterostrophus*, cuya $\Delta cga-1$ mostró ser osmosensible a NaCl 0,7M que a 1M de sorbitol, en ambos casos se presentó reducción de la tasa de crecimiento en mayor proporción a la tasa de crecimiento reducida de la cepa silvestre (Horwitz, et al., 1999).

La cepa $\Delta gna-1$ de *N crassa* presentó mayor disminución en su tasa de crecimiento en comparación con la cepa silvestre, siendo más sensible a medio hiperosmótico. En el caso de *C. parasítica* la cepa $\Delta cpg-1$ presenta un crecimiento reducido semejante al de la cepa silvestre en medio hipertónico, más no mostró reducción en su crecimiento en condiciones de estrés osmótico.

La exposición en medios suplementados con concentraciones de 0,75M NaCl, 0,75M KCl y 1,5M Sorbitol, no reflejaron diferencias significativas entre las TERR de la cepa silvestre y las correspondientes cepas delecionadas ($\Delta gna-1$ y $\Delta cpg-1$), ni diferencia en medios sin suplementar, sin embargo, a mayor concentración se observó inhibición del crecimiento en la cepa $\Delta gna-1$, siendo esta última más osmosensible (Ivey, et al., 1996).

Seibel y colaboradores (2009) determinaron que la proteína $G\alpha$ *gna-1* de *Hypocrea jecorina* (anamorfo *Trichoderma reesei*) es dependiente de luz, el crecimiento de *gna-1* se vio ligeramente afectado en presencia NaCl 1M y fue menor al de la cepa *gna-1^{Q204L}* en luz continúa (LL), y más drásticamente en presencia de Sorbitol 1M, en ausencia de luz (DD) no hubo diferencias significativas en el crecimiento de *gna-1^{Q204L}* y Δ *gna-1*.

Por otra parte, la cepa silvestre fue sensible a NaCl y Sorbitol mostrando reducción de su crecimiento en mayor proporción con sorbitol en condiciones de LL. En oscuridad fue mayor el decrecimiento en ambos osmolitos, sin embargo, en medio suplementado con NaCl presentó un leve decrecimiento en presencia de luz, tanto que en oscuridad alcanzo una reducción cercana al 30%, indicando que la participación de $G\alpha$ heterotrimérica cumple un papel menor en la regulación de la respuesta a estrés osmótico en *T. reesei* (Seibel, et al., 2009).

La tolerancia osmótica presentada a concentración 1M por *T. reesei* puede estar relacionada con su filogenia, ésta característica puede deberse a un ancestro común con *A. chrysogenum*, también perteneciente al orden Hypocreales

Ambos alelos *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q20L4}* tuvieron leves disminuciones en las TERR respecto a la cepa silvestre, sin embargo el crecimiento de las cepas silvestre y *aga1^{G42R}* fue estimulado a concentraciones de glicerina 0,5M, mientras que *aga1^{Q20L4}* disminuyó ligeramente, estos hallazgos concuerdan con los estudios de Lee y colaboradores (2016) cuando trabajaron con la cepa de *A. chrysogenum* M35, en la que estimaron luego de 96h de crecimiento la concentración de cefalosporina (CPC), donde a concentraciones entre el 0 y 8% de glicerol no hay inhibición de la producción de CPC, habiendo disminución de su producción a concentraciones superiores a 8%, teniendo en cuenta que existe una correlación directa entre el crecimiento del hongo y la producción de metabolitos secundarios, el glicerol podría actuar como estimulante del crecimiento a bajas concentraciones.

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, en los que a concentraciones de glicerina 1M en el medio de crecimiento *A. chrysogenum* mostró un efecto más drástico, con disminución hasta del 56% en la TERR de las cepas, mostrando mayor sensibilidad *aga1^{G42R}* seguido de la cepa *aga1^{Q20LA}*.

La respuesta a diversos tipos de estrés involucra la ruta de señalización HOG, que es bien conservada en hongos aun cuando no sea idéntica para todas las especies, (Duran, et al., 2010). La ruta HOG es responsable de mantener un balance de agua en condiciones hiperosmóticas e hiposmóticas, e induce la síntesis y acumulación de glicerol, que es un “osmolito compatible”.

Los osmolitos compatibles son acumulados en la célula para contrarrestar los efectos de la deshidratación generada por estrés hiperosmótico y tienen la característica de acumularse en grandes cantidades sin afectar el funcionamiento de la célula. El glicerol es también utilizado como fuente de carbono y como agente de protección frente a estrés térmico, y es acumulado intracelularmente cuando hay una alta osmosis externa (Bahn, et al., 2013), igualmente es concentrado en estructuras implicadas en la patogenicidad, como en el caso de *Magnaphorte grisea*, donde excede concentraciones de 3M de glicerol en el apesorio mejorando la turgencia del mismo, en correspondencia a la presencia de melanina como estabilizador de la semipermeabilidad de la membrana celular (Horwitz, et al., 1999).

Bahn y Jung (2013) revisan la ruta HOG en *C. neoformans*, las manifestaciones fenotípicas de cepas con mutaciones de algunos genes implicados en la ruta HOG, tienen resultados similares a la actividad de la G α heterotrimérica sobre el desarrollo del hongo, particularmente sobre el crecimiento, la patogenicidad (virulencia), desarrollo del apesorio, síntesis de metabolitos secundarios, pigmentos entre otros.

La ruta HOG se activa por diversas formas de estrés, e involucra la participación de proteínas dependientes de AMPc (Bahn & Jung, 2013), y su concentración intracelular es a su vez regulado por la subunidad G α heterotrimérica modulando la actividad de la adenilato ciclasa (Tisch et al., 2011), y los receptores acoplados a proteínas G (Neer, 1995) que

responden a componentes nutricionales (Gummer, et al., 2013), explicando así las similitudes fenotípicas que generan las disrupciones, atenuaciones y deleciones de la $G\alpha$ y genes implicados en la ruta HOG.

Por otra parte, Ross y colaboradores (2000) encontraron que proteínas de actividad GTPasa (GAPs) se asocian a la subunidad $G\alpha$ de las proteínas heterotriméricas aumentando la tasa a la cual $G\alpha$ hidroliza GTP, induciendo su inactivación y la desactivación de la adenilato ciclasa. Las GAPs incluyen a efectores (como la fosfolipasa C- β o PLCB1, etc.) y reguladores de las Proteínas G heterotriméricas, los RGS.

La formación del complejo $G\alpha$ -GTP (en el momento de intercambio GDP por GTP) requiere de proteínas reguladores tipo fosfolipasa y RhoGEF (dominio presente en las proteínas RGS), que median la activación de proteínas Rho de unión a GTP y la fosfodiesterasa PDE-GMPc que se une a $G\alpha$ heterotrimérica aumentando su tasa de hidrolisis.

Estos procesos de inactivación son importantes para propiciar la formación del complejo heterotrimérico $G\alpha\beta\gamma$, e inactivar la ruta de señalización del dímero $G\beta\gamma$ que regula el funcionamiento de canales K^+ , la unión del dímero $G\beta\gamma$ al transportador de K^+ , abre los canales K^+ (Jin, et al., 2002, Yang, et al., 2002, Barman & Tamuli, 2015) lo que conduce a una alcalinización intracelular, y acidificación del medio externo en la medida que se liberan protones, mientras ingresa el potasio al citoplasma (Ross & Wilkie, 2000).

En ambientes hiperosmóticos por altas concentraciones de potasio, el gradiente de concentración obliga a una toma de potasio que luego será eliminado para restablecer las condiciones normales y el potencial de membrana (Bahn & Jung, 2013), la salida de potasio origina acidez en el citosol que es compensada con la toma de Ca^{+2} , las altas concentraciones intracelulares de Ca^{+2} disminuye el crecimiento en *N. crassa* (Thevissens, et al 1996, Silverman y Lew, 2003) y causar citotoxicidad.

La alcalinización del medio de cultivo por la salida del potasio, obliga la salida de Ca^{+2} y posterior ingreso de potasio, este ingreso de potasio ocurre por intercambio de un

protón H⁺ que acidifica el medio externo. Sí la salida de calcio, es alta, es probable que el requerimiento mínimo de calcio necesario para la extensión apical del hongo no se cumpla, y sea la causal del drástico decrecimiento observado en *A. chrysogenum* en medio CCM suplementado con KCl 1M, que no ofrece fuente de calcio extracelular.

La regulación de la concentración de calcio ha sido estudiada en *N. crassa*, y ha sido asociada a las funciones de la fosfolipasa C (Ivey, et al., 1996), codificada por el gen *pcl-1*, y es responsable de la liberación de Ca⁺, de la extensión apical y desarrollo conidial, siendo un efector de MAPK (Lew, et al., 2015) sobre el cual actúan las proteínas G heterotriméricas (Ross & Wilkie, 2000; García & Fierro, 2017).

Las variaciones en el pH inducen la activación de genes asociados a la respuesta de estrés osmótico, y son codificantes de transportadores de sodio, como Ena1 y Nah1 que son regulados por genes *hog1* (Jung, et al 2012); la expresión de Ena1 es un transportador Na⁺/ATPasa, que responde a condiciones de medio alcalino y a concentraciones bajas de cationes, es responsable del movimiento de cationes tóxicos de sodio y litio, por el contrario Nah1 responde a pH ácido y regula la homeostasis de potasio más que de sodio, ambos transportadores son regulados por la ruta de señalización HOG, y de la calcineurina, donde a pH alto (8.5) retrasa la expresión de *ena1* requerido para responder a estrés por iones Na⁺ y K⁺ (Jung, et al 2012; Bahn, et al 2008; 2013)

Los cambios en el pH no solo están asociados al flujo de iones, sino también a los productos del metabolismo, como en el caso de la ruta de señalización por AMPc, cuya producción estimula la secreción de H⁺, propiciando la acidificación intracelular (Neer, et al.,1995). El AMPc es sintetizado por la adenilato ciclasa que es regulada por la ruta de señalización de la subunidad G α (Omero, 1999; Lafon et al, 2006; 2000; Ivey, et al., 2002; Liu, et al., 2018).

Los resultados obtenidos son un indicador de la presencia en *A. chrysogenum* de un posible mecanismo de regulación de movimiento de cationes mediado por acción de las proteínas G heterotriméricas, en el que la ruta de señalización por la subunidad G α y la ruta

de señalización del dímero Gβγ serían complementarias y necesarias para garantizar el desarrollo del hongo.

8.2.2 Estrés Oxidativo

Estudios realizados por Yang & Borkovich (1999) sobre Gα heterotrimérica *gna-1* de *N crassa*, y de García y colaboradores (2009, 2011, 2017) sobre los genes *pga1* de *P. camemberti*, *P. chrysogenum*, revelan que interviene en la sensibilidad a estrés oxidativo, donde la cepa con delección para este gen presentó alteraciones en su desarrollo, dificultades en la diferenciación sexual, reducción en la extensión radial, con menor efecto de agentes oxidativos como H₂O₂ sobre la germinación de conidios, y el crecimiento vegetativo.

Con la disrupción y delección del gen *gna-1* codificante de la Gα en *N. crassa*, se observan defectos por sensibilidad a estrés oxidativo, donde la geminación en las cepas con delección de *gna-1* son más resistentes a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y su tasa de extensión radial se ve reducida con desarrollo de escaso micelio aéreo, la cepa silvestre se vio ligeramente afectada por la presencia de H₂O₂ a 10mM, con consecuencias más drásticas sobre la viabilidad germinal en las cepas con los alelos *gna-1*^{R178C} y *gna-1*^{Q204L} de señal constitutivamente activa (Yang & Borkovich, 1999).

La no diferencia en cuanto a la respuesta de las cepas de señal activa e inactiva frente a paraquat, otro agente oxidante, puede deberse a la intensidad oxidativa del mismo, que puede ser regulado por mecanismos metabólicos de control de ROS (Yang & Borkovich, 1999).

Los mutantes con los alelos de señal constitutivamente activa *gna-1*^{R178C} y *gna-1*^{Q204L} de *N crassa* y los alelos *aga1*^{G42R} y *aga*^{Q240L} de *A. chrysogenum* presentaron mayor sensibilidad a la presencia de H₂O₂, donde la extensión radial se ve reducida en comparación con su antagonista Δ *gna-1* en *N crassa* en posible relación al desarrollo de hifas aéreas (Yang & Borkovich, 1999) y con *Agal* de la cepa silvestre respectivamente.

La cepa silvestre de *A. chrysogenum* expuesta a condiciones oxidativas 50mM y 100mM de H₂O₂, no mostró mayores diferencias en la TERR, mostrando una leve estimulación del crecimiento a 50mM H₂O₂ y ligero retraso en el desarrollo a 100mM de H₂O₂. Hace pensar que la participación de *agal* en respuesta a estrés oxidativo es baja.

El ligero retraso en el desarrollo a 100mM de H₂O₂ también fue observado por Karaffa y colaboradores (2003) quienes encontraron que los niveles de producción de biomasa no disminuyeron durante el experimento, pero si hubo un retraso transitorio, relacionado posiblemente, a que la concentración 100mM de H₂O₂ no permite hacer el balance dependiente de citocromo generando ATP, y estimula la actividad de la Oxidasa alternativa (OA), perteneciente al sistema de respiración alternativo resistente a cianuro presente en las mitocondrias de muchos hongos, afectando la respiración que soporta el crecimiento (Karaffa, et al., 2003).

Resultado similar se obtuvo en la germinación de conidios de *N. crassa* expuestos a paraquat (Yang, et al (1999), y sobre el crecimiento de *Hypocrea jecorina* en total oscuridad, donde no se presentaron diferencias significativas en el crecimiento de las cepas expuestas a estrés oxidativo con menadiona, el alelo *gna-1^{Q204L}* creció ligeramente un poco más que las cepas con delección del gen, situación que se vio alterada por acción de la luz, donde en condiciones de LL, Δ *gna-1* presenta un mayor crecimiento que *gna-1^{Q204L}* en presencia de menadiona y crece menos que *gna-1^{Q204L}* en ausencia de menadiona (Seibel, et al., 2009).

Lo anterior sumado al comportamiento de la cepa silvestre en la que expuesta a menadiona en LL presenta mayor reducción en su TERR que en condiciones DD, sugiere que la proteína Gna-1 no tienen una mayor participación en la respuesta a estrés oxidativo (Seibel, et al., 2009).

El papel de $G\alpha$ como un regulador negativo de la respuesta a estrés oxidativo visto en *N. crassa*, y miembros del género *Penicillium sp* puede estar relacionado a otros mecanismos, lo que sugiere la necesidad de profundizar en la dilucidación de la respuesta a estrés oxidativo, y de analizar los mecanismos que permitan explicar las diferencias entre las tasas de crecimiento de cepas con alelos de señal constitutivamente activa Q204L y G42R.

La ruta HOG ha sido considerada como una ruta constitutiva de respuesta a estrés en hongos filamentosos y las vías de señalización con las que interactúa la ruta HOG, igualmente pudiesen estar compartidas en las diferentes especies. Frente al estrés oxidativo se ha visto que el peróxido de hidrógeno, inducen la señal activadora de la MAPK cinasa HogA (Furukawa, et al 2005) que actúa sobre la transcripción de genes como *veA* de *A. flavus*, que lo hace más tolerante a este tipo de estrés, por activación de genes de respuesta a estrés oxidativo, donde el factor de transcripción que se une a regiones promotoras de estos genes *AtfB*, también es dependiente de *VeA* y activa a la Super Oxido Dismutasa (SOD) dependiente de magnesio y a genes vinculados a la producción de aflotoxinas (Baida, et al., 2014).

Genes ortólogos a *Hog1* de *S. cerevisiae* (*Hog1*), fueron encontrados en varios hongos filamentosos como *M. grisea* (*Osm-1*), *N. crassa* (*Os-2*), *C. parasítica* (*CpMk1*), *Colletotrichum lagenarium* (*Osc-1*), son genes considerados como esenciales para sobrevivir a condiciones de alta osmolaridad (Furukawa, et al 2005). En el que La SOD actúa sobre especies ROS, eliminando aniones superóxido producto de la respiración aerobia (Pérez et al., 2010), por lo que la participación de *aga1* estaría ocurriendo mediante la activación indirecta de un posible gen ortólogo a *HogA* de *A. nidulans*. (Furukawa, et al 2005).

En este contexto se realizó un blast P utilizando la secuencia de aminoácido de HOG A de *A. nidulans* para encontrar la proteína ortóloga en *A. chrysogenum*, la búsqueda realizada permitió identificar la proteína registrada con el número de acceso KFH47112.1 de la base de datos del NCBI, la cual presenta un 83% de identidad.

Otros sistemas degradadores de ROS hallados en *A. chrysogenum*, son la catalasa, el sistema glutatión reductasa y el sistema tioredoxina reductasa (Liu, et al 2011). La flavo-proteína tioredoxina reductasa (codificada por *actrxRI*) cataliza la reducción de tioredoxina (codificada por *trxR*), y se considera es responsable de la respuesta a estrés oxidativo de baja intensidad; mientras que el sistema glutatión reductasa (codificado por *grlA*) es responsable de la respuesta a estrés oxidativo de alta intensidad, donde la ausencia de *grlA* por delección mostró reducción en la tasa de crecimiento, reducción de la germinación de esporas (Liu, et al., 2012). Por otro lado, mediante análisis de ARN encontraron que la respuesta al estrés oxidativo en *A. chrysogenum* está vinculado a la ruta de señal de Ca⁺. (Kluge, et al., 2017)

De esta forma la eficiencia en el control del estrés oxidativo se debe al trabajo complementario de los sistemas que favorecen la disponibilidad de oxígeno y reducen las especies ROS (Kluge, et al., 2017) que se forman durante el metabolismo principalmente por respiración (Yang & Borkovich, 1999) y consecuentemente favorecen el desarrollo del hongo, donde la participación de las proteínas G heterotriméricas, ocurre de una forma indirecta activando efectores derivados de la ruta de señalización de G α y la ruta de señalización de G $\beta\gamma$

8.2.3 Estrés lumínico

La fotoperiodicidad puede tener efectos sobre los hongos filamentosos, así como existen hongos que no despliegan respuestas a la influencia de la Luz. La respuesta a diferentes longitudes de onda se relaciona con cambios térmicos, que a su vez activan moléculas fotosensibles.

Los ritmos lumínicos se conocen como ritmos circadianos que influyen sobre el desarrollo y metabolismo de los hongos. Los ritmos circadianos pueden llegar a comprender cortas pulsaciones de luz o exposiciones más prolongadas durante el día, el estado nutricional puede alterar este ritmo.

Las consecuencias morfológicas más evidentes de un ritmo circadiano es la formación de zonas concéntricas de mayor conidiación, la luz constante altera el ritmo haciendo que los hongos esporulen más o menos continuamente. El crecimiento es regulado por el reloj biológico intrínseco de cada especie que se conecta con distintas rutas de transducción de señales en la que participan diversos pigmentos fotosensibles.

Muchos pigmentos fotoreceptores son reguladores de las señales intracelulares y están relacionados a la Luz azul como las flavinas y los carotenoides (Ramsdale, en Gow, et al., 1997) aunque poco se conoce sobre su relación con las proteínas G α heterotriméricas.

Analizando la participación de *aga1* de *A. chrysogenum* en función de la fotoperiodicidad, se observó que un fotoperiodo LD favorece en un 16,85% el crecimiento de la cepa silvestre, mientras que no muestra un efecto sobre el crecimiento de las cepas *aga1*^{G42R} y *aga1*^{Q204L}, similarmente ocurre en condiciones LL donde se observó un ligero decrecimiento en colonias con el alelo *aga1*^{Q204} y en las cepas con alelos *gna-1*^{R178C} y *gna-1*^{Q204L} de *N. crassa*, situación que indica que el efecto de la luz sobre *A. chrysogenum* y *N. crassa*, actúa por otro mecanismo que puede tener una respuesta en común con G α , pero que genera una inhibición del crecimiento quizás debido a mecanismos de retroalimentación negativa de las rutas de señalización

Diversos estudios establecen que las proteínas G α heterotriméricas son activadoras de la enzima adenilato ciclasa responsable del aumento de AMPc intracelular (Yang & Borovich, 1999; Tisch, et al., 2011), responsable del crecimiento por ser activador de diversas rutas que se relaciona con proteínas Ros y Ras que intervienen en el crecimiento y activación del ciclo celular, desarrollo de hifas aéreas, fertilidad sexual, producción de metabolitos secundarios (Liu & Dean, 1997; Lafon et al., 2006; Tisch, et al. 2011; Degani, et al., 2013; Liu et al., 2018) A su vez el AMPc en exceso conduce a inhibir su producción por retroalimentación negativa pues es activador de la fosfocinasa A (PKA), que se une a fosfodiesterasas (PDE) responsables de degradar AMPc,.

La adenilato ciclasa también se ha visto que es activada por acción de la luz, mediante la señalización que involucra la activación de proteínas con dominio PAS/LOV (LOV, sensibilidad a luz azul) como ENVOY, que es un activador de la proteína Gα heterotrimérica Gna-3 de *T. reesei* (Schuster & Schmoll, 2009), la cual también actúa sobre PDE, activándolas (Schmoll, et al., 2005; Tisch, et al., 2011). La activación de sistemas de fotorecepción como ENVOY de especies de *Trichoderma sp.* o white collar WC1 y WC2 que interactúa con VIVID una flavoproteína que responde a la luz azul y regula los genes del reloj circadiano en *N. crassa*, crean un efecto estimulador del crecimiento y favorecen otros procesos morfogénicos (Schmoll, et al., 2005).

Lo anterior explicaría la ligera estimulación del crecimiento de *A. chrysogenum* bajo fotoperiodicidad LD, sin embargo bajo un régimen LL es probable que se haya presentado una sobre producción de adenilato ciclasa y con esto una inhibición de la acción del AMPc donde la no afectación sobre el crecimiento sería un indicativo de que *aga1* es independiente de la Luz, lo cual también es soportado por las TERR halladas que indican que la cepa silvestre en condiciones de iluminación constante o en oscuridad crecen a la misma velocidad.

En las transformantes *aga1^{G42R}* y *aga1^{Q204L}* por estar la señal activa de Gα, sumada a la posible activación de una ruta de señalización activada por Luz que involucre proteínas homologas a VIVID de *N. crassa* o ENVOY de *T. reesei*, conduciría a concentraciones bajas de AMPc intracelular y como consecuencia habría una reducción en el crecimiento y proliferación similar sobre estos alelos, lo que explicaría porque en condiciones de LL *A. chrysogenum* haya mostrado un ligero retraso en su crecimiento, soportando aún más la idea de que la señalización de la proteína Aga1 es independiente de Luz, y que pueden haber proteínas reguladas por acción de la luz.

El fenotipo macroscópico de la cepa silvestre de *A. chrysogenum* no muestra formación de bandas de conidiación e interbandas sin formación de hifas aéreas características del ritmo circadiano en *N. crassa* no muestra indicios de ritmicidad asociada al crecimiento

hifal (o no para los fotoperiodos empleados), por lo que es posible que carezca de ritmo circadiano. La ausencia de ritmos circadianos en hongos se relaciona con la autosostenibilidad de los ciclos metabólicos (Ramsdale, en Gow, et al., 1999) que explicaría la capacidad de *A. chrysogenum* para adaptarse a nuevos ambientes (Karaffa, et al., 2003) y el desarrollo de hifas de crecimiento rápido observado en la macromorfología de las colonias en condiciones de crecimiento normales y bajo condiciones de estrés.

CONCLUSIONES

La subunidad $G\alpha$ del subgrupo 1 de *A. chrysogenum* regula la conidiación negativamente, mientras que su participación sobre la regulación del crecimiento radial es positiva.

La subunidad $Aga1$ actúa como un regulador negativo de la respuesta a estrés hiperosmótico causado por sales, lo que conduce a un retraso en el crecimiento. Frente a osmolitos como la glicerina, no se observó el mismo efecto.

La subunidad $Aga1$ participa en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno, lo que resultó evidente bajo el efecto del alelo *aga1*^{G42R}.

La subunidad $Aga1$ bloquea la respuesta al estímulo positivo que genera la fotoperiodicidad 12horas luz-12 horas oscuridad sobre el crecimiento vegetativo de *A. chrysogenum*.

RECOMENDACIONES

Las rutas de transducción de señales de las proteínas G heterotriméricas, implican diversos mediadores (efectores y reguladores) y factores de transcripción que aún permanecen desconocidos en *A. chrysogenum* y muchos hongos filamentosos, haciéndose necesario

profundizar a través de la investigación, en la dilucidación de los mismos y de su papel en la morfofisiología de los hongos.

Particularmente el papel de $G\alpha$ como un regulador negativo de la respuesta a estrés oxidativo visto también en otras especies de ascomicetos puede estar relacionado a otras rutas de señalización, lo que sugiere la necesidad de analizar la interacción entre las rutas de señalización de la respuesta a estrés oxidativo y osmótico.

Dada la alta conservación de la ruta de señalización HOG, es necesario investigar la posible existencia de un gen ortólogo al gen *hogA* presente en *A. flavus*, al cual se le atribuyen la activación de la ruta de la SOD y de control de especies ROS, al igual que la presencia de intercambiadores de iones activados de forma directa e indirecta por las proteínas G heterotriméricas.

Las variaciones de pH intracelular por presencia de AMPc, la activación de enzimas adenilato ciclasa, fosfolipasas y fosfodiesterasas en función de la posible especificidad de las subunidades de las proteínas $G\alpha$ heterotriméricas, es una línea de trabajo amplia, que requiere de mayores estudios en los hongos como *A. chrysogenum*, para comprender mejor las vías de señalización intracelular.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, T., Wieser, J., & Yu, J. (1998). Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1):35-54.
- Aharon, G., Gelli, A., Snedden, W., & Blumwald, E. (1998). Activation of a Plant Plasma Membrane Ca^{+2} Channel by TGK1, Heterotrimeric G Protein α -Subunit Homologue Federation of European Biochemical Societies FEBS. Letters, 424:17-21.
- Amare, M., & Keller, N. (2014). Molecular mechanisms of *Aspergillus flavus* secondary metabolism and development. *Fungal Genetics and Biology*, 66:11-18
- Anantharaman, V., Abhiman, S., de Souza, R., & Aravind, L. (2011). Comparative Genomics Uncovers Novel Structural and Functional Features of the Heterotrimeric GTPase Signaling System. *Gene*, 475:63–78.
- Arenas, R. (2014). *Micología Médica Quinta edición*. Ed McGraw-Hill interamericana S.A de C.V. Mexico D.F.
- Asilonu, E., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2010). Enhancement of chrysoginin production in cultures of *Penicillium chrysogenum* by uronic acid oligosaccharides *Biotechnology Letters* 22: 931–936.
- Atoui, A., Kastner, C., Larey, C., Thokala, R., Etxebeste, O., Espeso, E., Fischer, R., & Calvo, A. (2010). Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 47:962–972
- Azevedo, R., Souza, R., Braga, G., & Rangel, D. (2014). Responsiveness of entomopathogenic fungi to menadione-induced oxidative stress. *Fungal Biology*, 118:990-995.
- Bahn, Y. (2008). Master and Commander in Fungal Pathogens: the Two-Component System and the HOG Signaling Pathway *Eukaryotic Cell* 7(12) p. 2017–2036

- Bahn, Y., & Jung, K. (2013). Stress Signaling Pathways for the Pathogenicity of *Cryptococcus* Eukaryotic Cell 12:1564–1577
- Baidya, S., Duran, R., Lohmar, J., Harris, P., Cary, J., Hong, S., Roze, L., Linz, E., & Calvo, A. (2014). VeA is associated with the response to oxidative stress in the aflatoxin producer *Aspergillus flavus*. Eukaryotic Cell doi:10.1128/EC.00099-14
- Bakti, F., Király, A., Orosz, E., Miskei, M., Emri, T., Leiter, E., & Pócsi, I. (2017). Study On the Glutathione Metabolism of the Filamentous Fungus *Aspergillus Nidulans* Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. Doi: 10.1556/030.64.2017.003.
- Baltoumas, F., Theodoropoulou, M., & Hamodrakas, S., (2013). Interactions of the α -Subunits of Heterotrimeric G-Proteins with GPCRs, Effectors and RGS Proteins: A Critical Review and Analysis of Interacting Surfaces, Conformational Shifts, Structural Diversity and Electrostatic Potentials. Journal of Structural Biology, 182:209–218.
- Baranyi, J., & Roberts, T. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International journal of food microbiology, 23(3),277-294
- Barman A., & Tamuli, R. (2015). Multiple cellular roles of *Neurospora crassa* plc-1, splA2, and cpe-1 in regulation of cytosolic free calcium, carotenoid accumulation, stress responses, and acquisition of thermotolerance. Journal of Microbiology. DOI 10.1007/s12275-015-4465-1
- Bloemendal, S., Löper, D., Terfehr, D., Kopke, K., Kluge, J., Teichert, I., & Kück, U. (2014). Tools for advanced and targeted genetic manipulation of the β -lactam antibiotic producer *Acremonium chrysogenum*. Journal of Biotechnology, 169:51-62
- Borges, M., & Walmsley, A. (2000). cAMP Signalling in Pathogenic Fungi: Control of Dimorphic Switching and Pathogenicity. Trends In Microbiology, 8(3):133-141.

- Bosch, D. E., Willard, F. S., Ramanujam, R., Kimple, A. J., Willard, M. D., Naqvi, N. I., & Siderovski, D. P. (2012). A P-loop mutation in G α subunits prevents transition to the active state: Implications for G-protein signaling in fungal pathogenesis. *PLoS Pathogens*, 8(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002553>
- Boudreau, B., Larson, T., Brown, D., Busman, M., Roberts, E., Kendra, D., & McQuade, K. (2013). Impact of temperature stress and validamycin A on compatible solutes and fumonisin production in *F. verticillioides*: Role of trehalose-6-phosphate synthase. *Fungal Genetics and Biology*, 57:1–10.
- Brotzu G. (1948). Ricerche Su di un Nuovo Antibiotico. *Lavori Dell'Instituto D'Igiene du Cagliari*. 1-11.
- Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R., & Hamm, H. E. (2003). Insights into G Protein Structure, Function, and Regulation. *Endocrine Reviews*, 24(6), 765–781.
<https://doi.org/10.1210/er.2000-0026>
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 66(3), 447–59, table of contents.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002>
- Calvo, A., Wilson, R., Bok, J., & Keller, N. (2000). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Rev.* 66(3):447-59.
- Castrillo, M., & Avalos, J. (2014). Light-Mediated Participation of the VIVID-like Protein of *Fusarium fujikuroi* VvdA in Pigmentation and Development. *Fungal Genetics and Biology*, 71:9–20.
- Choi, G., Chen, B., & Nuss, D. (1995). Virus-mediated or transgenic suppression of a G-protein α subunit and attenuation of fungal virulence. *Proc. National Academic of Science, USA*, 92:305-309.

- Consejo Académico UAM-I. (2009). Instructivo del funcionamiento interno y operativo para regular el uso de los servicios e instalaciones de los laboratorios de docencia. Retrieved from http://www2.izt.uam.mx/con-acad/doc_relevantes/instructivos/Instructivo_Lab_Doc_09.pdf
- Cruz, J. (2014). Informe de Avances del proyecto de Investigación titulado Regulación De La Morfogénesis Y Biosíntesis De Antibióticos β -Lactámicos Por La Subunidad Alfa De Una Proteína G Heterotrimérica De *Acremonium chrysogenum*. Presentado a la Universidad Autónoma Metropolitana UAM-I. Mexico D. F:
- d'Enfert, C. (1997). Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 21(2), 163–172. <https://doi.org/10.1006/FGBI.1997.0975>
- Dantigny, P., Marín, S., Beyer, M., & Magan, N. (2007). Mould germination: data treatment and modelling. *International journal of food microbiology*, 114(1):17-24.
- Dantigny, P., Nanguy, S., Judet, D., & Bensoussan, M. (2011). A new model for germination of fungi. *International journal of food microbiology*, 146(2):176-181.
- De Bioseguridad En, M., & Laboratorio, E. L. (2005). Organización Mundial de la Salud. Ginebra. Retrieved from http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
- Degani, O. (2013). *Cochliobolus heterostrophus* G-Protein Alpha and β Subunit Double Mutant Reveals Shared and Distinct Roles in Development and Virulence. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 82:35-45
- Delgado, J., Martínez, A., Roldán, R., Roncero, M., & Di Pietro, A. (2005). *Fusarium oxysporum* G-Protein β Ssubunit Fgb1 Regulates Hyphal Growth, Development, and Virulence Through Multiple Signalling Pathways. *Fungal Genetics and Biology*, 42:61–72.

- Demain, A. (2009). Antibiotics: Natural products essential to human health. *Medial Research Reviews*, 29(6):821-824.
- Diezmann, S. (2014). Oxidative stress response and adaptation to H₂O₂ in the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* and its human pathogenic relatives *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Fungal Biology reviews*, 28 :126-136
- Doehlemann, G., Berndt, P., & Hahn, M. (2006). Different signalling pathways involving a G?? protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Molecular Microbiology*, 59(3), 821–835.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04991.x>
- Dreyer, J., Eichhorn, H., Friedlin, E., Kürnsteiner, H., & Kück, U. (2007). Applied Environmental Microbiolgy, 73(10):3412-22
- Duran, R., Cary, J., & Calvo, A. (2010). Role of the Osmotic Stress Regulatory Pathway in Morphogenesis and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. *Toxins* 2:367-381
- Engh, I., Nowrousian, M., & Kück, U. (2010). *Sordaria macrospora*, a Model Organism to Study Fungal Cellular Development. *European Journal of Cell Biology*, 89:864–872.
- Fang, C., & Dean, A. (2000). Site-Directed Mutagenesis of the magB Gene Affects Growth and Development in *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(11), 1214–1227.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1214>
- ra, A., Tótola, M., & Borges, A. (2007). Physiological implications of trehalose in the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus sp.* under thermal stress. *Journal of Thermal Biology* 32:34–41
- Fox, E., & Howlett, B. (2008). Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current of Microbiolo. Current Opinion in Microbiology* 11:481–487
- Friedman, E., Temple, B., Hicks, S., Sondek, J., Jones, C., & Jones, A. (2009). Prediction of Protein–Protein Interfaces on G-Protein β Subunits Reveals

- a Novel Phospholipase C β 2 Binding Domain. *Journal Molecular Biology*, 392:1044–1054.
- Fukuda, T., Naka, W., Tajima, S., & Nishikawa, T. (1996). Neutral red assay in minimum fungicidal concentrations of antifungal agents. *Journal of Medical & Veterinary Mycology*, 34:353-356
- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., & Abe, K. (2005). *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Molecular Microbiology* 56(5), 1246–1261
- García, O., Chávez, R., Fierro, F., & Martín, J. (2009). Effect of a heterotrimeric G protein α subunit on *Conidia* Germination, Stress Response, and Roquefortine C Production in *Penicillium roqueforti*. *International Mycology*, 12:123-129.
- García, O., Martín, J., & Fierro, F. (2007). The *pgal* Gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 Encodes a Heterotrimeric G Protein Alpha Subunit that Controls Growth and Development. *Research in Microbiology*, 158:437-446.
- García, E., Marin, S., Sanchis, V., Crespo, A., & Ramos, A. (2015). Effect of Ultraviolet Radiation A and B On Growth and Mycotoxin Production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus parasiticus* in Grape and Pistachio Media. *Fungal Biology*, 119:67-78
- García, O & Fierro, F. (2017). Papel de las subunidades alfa de proteínas G en los procesos morfogénicos de hongos filamentosos de la división Ascomycota. *Rev Iberoam Micol.*34(1):1–9
- García, O., Gil, C, Rojas, J., Vaca, I, Figueroa, L., Levic, G., & Chavez, R. (2017). Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. *fungus biology* 121:754-762.

- García, O., Martín, J., & Fierro, F. (2011). Heterotrimeric G α Protein Pga1 from *Penicillium chrysogenum* Triggers Germination in Response to Carbon Sources and Affects Negatively Resistance to Different Stress Conditions Fungal Genetics and Biology, 48:641–649.
- García-Rico, R. O., Chávez, R., Fierro, F., & Martín, J. F. (2009). Effect of a heterotrimeric G protein α subunit on conidia germination, stress response, and roquefortine C production in *Penicillium roqueforti*. International Microbiology, 12(2), 123–129. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.89>
- García-Rico, R. O., Fierro, F., & Martín, J. F. (2008a). Heterotrimeric G α protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum* controls conidiation mainly by a cAMP-independent mechanism. Biochemistry and Cell Biology, 86(1), 57–69. <https://doi.org/10.1139/O07-148>
- García-Rico, R. O., Fierro, F., Mauriz, E., Gómez, A., Fernández-Bodega, M. A., & Martín, J. F. (2008). The heterotrimeric G α protein Pga 1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. Microbiology, 154(11), 3567–3578. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019091-0>
- García-Rico, R. O., Gil-Durán, C., Rojas-Aedo, J. F., Vaca, I., Figueroa, L., Levicán, G., & Chávez, R. (2017). Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. Fungal Biology, 121(9), 754–762. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2017.05.007>
- García-Rico, R. O., Martín, J. F., & Fierro, F. (2007). The pga1 gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. Research in Microbiology, 158(5), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.03.001>
- García-Rico, R. O., Martín, J. F., & Fierro, F. (2011). Heterotrimeric G α protein Pga1 from *Penicillium chrysogenum* triggers germination in response to

carbon sources and affects negatively resistance to different stress conditions. *Fungal Genetics and Biology*, 48(6), 641–649.

<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.11.013>

Gronover, S., C., Kasulke, D., Tudzynski, P., & Tudzynski, B. (2001). The Role of G Protein Alpha Subunits in the Infection Process of the of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001 Nov;14(11):1293-302

Gruber, S., Omann, M., Escobar, C., Radebner, T., & Zeilinger, S. (2012). Generation of *Trichoderma atroviride* Mutants with Constitutively Activated G Protein Signaling by Using Geneticin Resistance as Selection Marker. *BioMed Central Research Notes*, 5:641-649.

Gummer, J., Trengove, R., Oliver, R., & Solomon, P. (2013). Dissecting the Role of G-Protein Signalling in Primary Metabolism in the Wheat Pathogen *Stagonospora nodorum*. *Microbiology*, 159(9):1972-1985.

Gutiérrez, S., Velasco, A., Marcos, F., Fernández, F., Fierro, F., Barredo, J., Díez, B., & Martín, J. (1997). Expression of the *cefG* gene is limiting for cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:606-614.

Hagiwara, D., Suzuki, S., Kamei, K., Gono, T., & Kawamoto, S. (2014). The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 73:138–149

Han, K., Kim, J., Moon, H., Kim, S., Lee, S., Han, D., Jahng, K., & Chae, K. (2008). The *Aspergillus nidulans* *esdC* (early sexual development) Gene is Necessary for Sexual Development and is Controlled by *veA* and a Heterotrimeric G protein. *Fungal Genetics and Biology*, 45:310–318.

Harashima, T., & Heitman, J. (2002). The G α Protein Gpa2 Controls Yeast Differentiation by Interacting with Kelch Repeat Proteins that Mimic G β Subunits. *Molecular Cell*, 10:163–173.

Hengen, P. (1996). Methods and reagents: Preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends in Biochem. Science.* 21(2):75-76.

- Hoff, B., Schmitt, E., & Kück, U. (2005). CPC1, but not its interacting transcription factor AcFKH1, controls fungal arthrospore formation in *Acremonium chrysogenum*. *Molecular Microbiology* 56(5),1220–1233
- Horwitz, B., Sharon, A., Lu, S., Ritter, V., Sandrock, T., Yoder, O., & Turgeon, B. (1998). A G Protein Alpha Subunit from *Cochliobolus heterostrophus* Involved in Mating and Appressorium Formation. *Fungal Genetics and Biology*, 26:19–32.
- Hu, Y., Liu, G., Li, Z., Qin, Y., Qu, Y., & Song, X. (2013). G protein-cAMP Signaling Pathway Mediated by PGA3 Plays Different Roles in Regulating the Expressions of Amylases and Cellulases in *Penicillium decumbens*. *Fungal Genetics and Biology*, 58(59):62–70.
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96:23-28.
- Ivey, F., Hodge, R., Turner, G., & Borkovich, K. (1996). The Gai Homologue gna-1 Controls Multiple Differentiation Pathways in *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the Cell* 7:1283-1297.
- Ivey, F., Kays, A., & Borkovich, K. (2002). Shared and Independent Roles for a Gi Protein and Adenylyl Cyclase in Regulating Development and Stress Responses in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 1(4): 634–642
- Jain, S., Akiyama, K., Takata, R., & Ohguchi, T. (2005). Signaling via the G Protein α Subunit FGA2 is Necessary for Pathogenesis in *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiology Letters*, 243:165–172
- Jamora, C., Takizawa, P., Zaarour, R., Denesvre, C., Faulkner, D., & Malhotra, V. (1997). Regulation of Golgi Structure through Heterotrimeric G Proteins. *Cell*, 91:617–626
- Jančič, S., Frisvad, J. C., Kocev, D., Gostinčar, C., Džeroski, S., & Gunde, N. (2016). Production of secondary metabolites in extreme environments: Food- and airborne *Wallemia spp.* produce toxic metabolites at hypersaline conditions. *PLoS ONE*, 11(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169116>

- Jeraj, N., Stilla, A., Petric, S., Di Girolamo, M., Cresnara, B., & Lenasi, H. (2012). Identification and Partial Characterization of *Rhizopus nigricans* G β Proteins and Their Expression in the Presence of Progesterone. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 129:99–105.
- Jin, T., Peng, L., Mirshahi, T., Rohacs, T., Chan, K., Sanchez, R., & Logothetis, D. (2002). The Subunits of G Proteins Gate a K Channel by Pivoted Bending of a Transmembrane Segment. *Molecular Cell* 10:469–481
- Jones, C., Greer, S., & Borkovich, K. (2007). The Response Regulator RRG-1 Functions Upstream of a Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Impacting Asexual Development, Female Fertility, Osmotic Stress, and Fungicide Resistance in *Neurospora crass*. *Molecular Biology of the Cell*, 18:2123–2136
- Jung, K., Strain, A., Nielsen, K., Jung, K., & Bahn, Y. (2012). Two cation transporters Ena1 and Nha1 cooperatively modulate ion homeostasis, antifungal drug resistance, and virulence of *Cryptococcus neoformans* via the HOG pathway. *Fungal Genetics and Biology* 49 :332–345
- Kaneko, I., Iyama, M., Togashi, K., Yamaguchi, I., Teraoka, T., & Arie, T. (2013). Heterotrimeric G protein β subunit GPB1 and MAP-kinase MPK1 Regulate Hyphal Growth and Female Fertility in *Fusarium sacchari*. *Mycoscience*, 54:148-157.
- Karaffa, L., Sándor, E., Fekete, E., Kozma, J., Szentirmai, & A., Pócsi, I. (2003). Stimulation of the cyanide-resistant alternative respiratory pathway by oxygen in *Acremonium chrysogenum* correlates with the size of the intracellular peroxide pool *Can. J. Microbiol.* 49: 216–220.
- Kirk., P. (2013). *Species Fungorum* (version 9.0, Sep 2010). In: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*, 11th March 2013 (Roskov Y., Kunze T., Paglinawan L., Orrell T., Nicolson D., Culham A., Bailly N., Kirk P., Bourgoin T., Baillargeon G., Hernandez F., De Wever A., eds). Digital resource at www.catalogueoflife.org/col/. Species 2000: Reading, UK

- Kluge, J & Kück, U. AcAxl2 and AcMst1 regulate arthrospore development and stress resistance in the cephalosporin C producer *Acremonium chrysogenum* Current Genetics <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0790-8>
- Kopke, K., Hoff, B., Bloemendal S, Katschorowski A, & Kamerewerd J, et al. (2013) Members of the *Penicillium chrysogenum velvet* complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation. Eukaryot Cell, 12:299–310
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. Studies in Mycology, 74(1), 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>
- Lafon, A., Han, K., Seo, J., Yu, J., & d’Enfert, C. (2006). G-Protein and cAMP-Mediated Signaling in Aspergilli: A genomic perspective. Fungal Genetics and Biology, 43:490–502.
- Lambright, D., Noel, J., Hamm, H., & Sigler, P. (1994). Structural Determinants for Activation of the α -subunit of a Heterotrimeric G Protein. Nature, 369:621-628.
- Lambright, D., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N., Hamm, H., & Sigler, P. (1996). The 2.0Å Crystal Structure of a Heterotrimeric G Protein. Nature, 379:311-319.
- Laxalt, A., Latijnhouwers, M., van Hulten, M., & Govers, F. (2002). Differential Expression of G Protein α and β Subunit Genes During Development of *Phytophthora infestans*. Fungal Genetics and Biology, 36:137–146.
- Lee, J, Yoo, H: Yang, X., Kim, D., Lee, Ju., Lee, S., Han S., & Kim, S. (2016). Utilization of Algal Sugars and Glycerol for Enhanced Cephalosporin C Production by *Acremonium chrysogenum* M35. Letters in Applied Microbiology. Doi: 10.1111/lam.12684
- Lee, K., Singh, P., Chung, W., Ash, J., Kim, T., Hang, L., & Park, S. (2006). Light regulation of asexual development in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. Fungal Genetics and Biology, 43:694–706

- Lew, R., Giblon, R., & Lorenti, M. (2015). The phenotype of a phospholipase C (plc-1) mutant in a filamentous fungus, *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol.* 82:158-67. doi: 10.1016/j.fgb.2015.07.007
- Li, L., Wright, S., Krystofova, S., Park, G., & Borkovich, K. (2007). Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi *Annual Review in Microbiology*, 61:423–52.
- Liu, Li., Long, L., An, Y., Yang, J., Xu, X., Hu, C., & Liu, G. (2013). The thioredoxin reductase-encoding gene *ActrxRI* is involved in the cephalosporin C production of *Acremonium chrysogenum* in methionine-supplemented medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6):2551-2562
- Liu, S., & Dean, R. a. (1997). G protein alpha subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 10(9), 1075–1086.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.9.1075>
- Liu, Y., Yang, K., Qin, Q., Lin G, Hu, T., Xu, Z., & Wang, S. (2018). Protein Subunit GpaB is Required for Asexual Development, Aflatoxin Biosynthesis and Pathogenicity by Regulating cAMP Signaling in *Aspergillus flavus*. *Toxins* 10:117., doi:10.3390/toxins10030117.
- Liu, W., Soulié, M., Perrino, C., & Fillinger, S. (2012). The osmosensing signal transduction pathway from *Botrytis cinerea* regulates cell wall integrity and MAP kinase pathways control melanin biosynthesis with influence of light. *Fungal Genetics and Biology* 48:377–387
- Lokhandwala, J., Hopkins, H., Rodriguez, A., Dattenbock, C., Schmoll, M., & Zoltowski, B. (2015). Structural Biochemistry of a Fungal LOV Domain Photoreceptor Reveals an Evolutionarily Conserved Pathway Integrating Light and Oxidative Stress. *Structure*, 23:116–125

- Lozano, D., Rodríguez, A., Bernáldez, V., Córdoba, J., & Rodríguez, M. (2013). Influence of temperature and substrate conditions on the omt-1 gene expression of *Aspergillus parasiticus* in relation to its aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology* 166:263–269
- Mah, J. H., & Yu, J. H. (2006). Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1585–1595. <https://doi.org/10.1128/EC.00192-06>
- Mahmoud, Y., Mohamed, E., & Abd E. (2007). Response of the Higher Basidiomycetic *Ganoderma resinaceum* to Sodium Chloride Stress. *Mycobiology* 35(3):124-128
- McCormick, A., Jacobsen, I., Broniszewska, M., Beck, J., Heesemann, J., & Ebel, F. (2012). The Two-Component Sensor Kinase TcsC and Its Role in Stress Resistance of the Human-Pathogenic Mold *Aspergillus fumigatus* PLoS One. 7(6):e38262. doi: 10.1371
- Milligan, G., & Kostenis, E. (2006). Heterotrimeric G-proteins: A short history. *British Journal of Pharmacology*, 147(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706405>
- Moore, E. (1996). *Fundamentals of the fungi*. Cuarta edición Ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey.
- Nance, M., Kreutz, B., Tesmer, V., Sterne, R., Kozasa, T., & Tesmer, J. (2013). Structural and Functional Analysis of the Regulator of G Protein Signaling 2-Gaq Complex. *Structure*, 21:438–448.
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric C proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80(2), 249–257. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90407-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90407-7)
- Neves, S., Ram, P., & Iyengar R. (2002). G protein pathways. *Science*. 31-296(5573):1636-9
- Nguyen, C., Zhao, P., Sobiesiak, A., & Chidiac, P. (2012). RGS2 is a Component of the Cellular Stress Response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426:129–134.

- Ni, M., Rierson, S., Seo, J., & Yu, J. (2005). The *pkaB* Gene Encoding the Secondary Protein Kinase A Catalytic Subunit Has a Synthetic Lethal Interaction with *pkaA* and Plays Overlapping and Opposite Roles in *Aspergillus nidulans* Eukaryotic Cell, 4(8):1465–1476.
- Nichols, A., Floyd, D., Bruinsma, S., Narzinski, K., & Baranski, T. (2013). Frizzled Receptors Signal Through G proteins. Cellular Signalling, 25:1468–1475.
- Ochiai, N., Tokai, T., Nishiuchi, T., Takahashi, N., Fujimura, M., & Kimura, M. (2007). Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 363:639–644
- Omero, C., Inbar, J., Rocha, V., Herrera, A., Chet, I., & Horwitz, B. (1999). G Protein Activators and cAMP Promote Mycoparasitic Behaviour in *Trichoderma harzianum* Mycology. Researchs, 103(12):1637-1642
- Park, A., Cho, A., Seo, J., Min, K., Son, H., Lee, J., Choi, G., Kim, J., & Lee, Y. (2010). Functional Analyses of Regulators of G Protein Signaling in *Gibberella zeae*. Fungal Genetics and Biology, 49:511–520.
- Peberdy J. (1987). Penicillium and Acremonium. En: Biotechnology Handbooks. Peberdy J. F. (Ed.). Plenum Press, Springer, vol. 1, New York.
- Peeters, T., Versele, M., & Thevelein, J. (2007). Directly from Gα to Protein kinase A: The Kelch Repeat Protein Bypass of Adenylate Cyclase. Trends in Biochemical Sciences. 32(12):547-554
- Pérez, L., González, E., Colón, E., González, W., González, R., & Rodríguez, N. (2010). Interaction of the heterotrimeric G protein alpha subunit SSG-1 of *Sporothrix schenckii* with proteins related to stress response and fungal pathogenicity using a yeast two-hybrid assay. BMC Microbiology, 10:317
- Poli, A., Di Pietro, A., Zigonc, D., & Lenasi., H. (2009). Possible Involvement of G-Proteins and cAMP in the Induction of Progesterone Hydroxylating

- Enzyme System in the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum*.
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 113:241–247.
- Prados, R., Serena, C., Delgado, J., Guarro, Josep., & Di Pietro, A. (2006). Distinct signalling pathways coordinately contribute to virulence of *Fusarium oxysporum* on Mammalian Hosts. *Microbes and Infection*, 8:2825-2831.
- Raju, E., Lalmahammed, N., Sateesh, J., Swetha, C., Swethaprathusha G., & Srujana, D. (2012). Optimization and Production of Cephalosporin P From *Acremonium Chrysogenum* NCIM 893 by Using Different Agro Industrial Wastes in Solid State Fermentation *International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences* 1(2):704-803.
- Ramsdale, M. (2001). Fungi with a sense of time: Molecular genetics of temporal organization in *Neurospora crassa*. *Mycologist* 15(1):10-15
- Rangel, D., Alston, D., & Roberts, D. (2008). Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus *Mycological Research*, 112:1355–1361.
- Raw A. S., D. E. Coleman, A. G. Gilman, y S. R. Sprang. 1997. Structural and biochemical characterization of the GTP gamma S-, GDP.Pi-, and GDP-bound forms of a GTPase deficient Gly42→Val mutant of Gialpha1. *Biochem.* 36:15660-15666
- Reithner, B., Brunner, K., Schuhmacher, R., Peissl, I., Seidl, V., Krska, R., & Zeilinger, S. (2005). The G protein α Subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is Involved in Chitinase Formation and Differential Production of Antifungal Metabolites. *Fungal Genetics and Biology*, 42:749–760.
- Ross, E., & Wilkie, T. (2000). GTPase-Activating Proteins for Heterotrimeric G Proteins: Regulators of G Protein Signaling (RGS) and RGS-Like Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 69:795–8
- Sándor, E., Szentirmai, A., Paul, G., Thomas, C., Pócsi, I., & Karaffa, L. (2001). Analysis of the relationship between growth, cephalosporin C production,

- and fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. Canadian Journal of Microbiology. 47: 801–806.
- Schmidt, M., Stoll, D., Schütz, P., & Geisen, R. (2015). Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. International Journal of Food Microbiology, 192:1–6
- Schmoll, M., Franchi, L. & Kubicek C. (2005). Envoy, a PAS/LOV Domain Protein of *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*), Modulates Cellulase Gene Transcription in Response to Light. Eukaryot Cell. 4(12): 1998–2007. Doi: 10.1128/EC.4.12.1998-2007.2005
- Segers, G. C., & Nuss, D. L. (2003). Constitutively activated G α negatively regulates virulence, reproduction and hydrophobin gene expression in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. Fungal Genetics and Biology, 38(2), 198–208. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00534-0](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00534-0)
- Seibel, C., Gremel, G., do Nascimento, R., Schuster, A., Kubicek, C., & Schmoll, M. (2009). Light-dependent roles of the G-protein α subunit GNA1 of *Hypocrea jecorina* (anaorph *Trichoderma reesei*). Bio Med Central Biology 1-15
- Seibt, B., Schiedel, A., Thimm, D., Hinz, S., Sherbiny, F., & Müller, C. (2013). The Second Extracellular Loop of GPCRs Determines Subtype-Selectivity and Controls Efficacy as Evidenced by Loop Exchange Study at A2 Adenosine Receptors. Biochemical Pharmacology, 85:1317–1329.
- Shin, K., & Yu, J. (2013). Expression and Activity of Catalases Is Differentially Affected by *GpaA* (G α) and *FlbA* (Regulator of G Protein Signaling) in *Aspergillus fumigatus*. Mycobiology, 41(3):145-148.
- Silverman, G., & Lew, R. (2003). Calcium gradient dependence of *Neurospora crassa* hyphal growth. Microbiology. 149(9):2475-85.
- Springer, M., & Yanofsky, C. (1989). A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. Genes and Development 3:559-571

- Summerbell, R., Gueidan, C., Schroers, H., de Hoog, G., Starink, M., Arocha, Y., Guarro, J., & Scott, J. (2011). *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, 68:139–162.
- Svanström, A., & Melin, P. (2013). Intracellular trehalase activity is required for development, germination and heat-stress resistance of *Aspergillus niger* conidia. *Research in Microbiology*, 164:91-99
- Tag, A., Hicks, J., Garifullina, G., Ake, C., Phillips, T. D., Beremand, M., & Keller, N. (2000). G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Molecular Microbiology*, 38(3), 658–665.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02166.x>
- Tan, K., Heazlewood, J., Millar, A., Oliver., & Solomon, P. (2009). Proteomic Identification of Extracellular Proteins Regulated by the Gna1 G α Subunit in *Stagonospora nodorum*. *Mycological Search*, 113:523–531.
- Thevissen, K., Ghazi, A., De Samblanx, G., Brownleei, C., Osborn, R., & Broekaert, W. (1996). Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *THE Journal Of Biological Chemistry* 271(25)21:15018–15025,
- Tisch, D., Kubicek, C., & Schmoll, M. (2011). New Insights into the Mechanism of Light Modulated Signaling by Heterotrimeric G-proteins: ENVOY acts on *gna1* and *gna3* and adjusts cAMP Levels in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Fungal Genetics and Biology*, 48:631–640.
- Trinci, A. (1971). Influence of the Width of the Peripheral Growth Zone on the Radial Growth Rate of Fungal Colonies on Solid Media. *Journal of General Microbiology*, 67:325-344.
- Trinci, A. (1971). Exponential Growth of the Germ tubes of Fungal Spores. *Journal of General Microbiology*, 67:345-348.
- Truesdell, G., Yang, Z & Dickman, M. (2000). G α Subunit Gene from the Phytopathogenic Fungus *Colletotrichum trifolii* is Required for Conidial Germination. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56:131-140

- Turner, G., & Borkovich, K. (1993). Identification of a G Protein α Subunit from *Neurospora crassa* That Is a Member of the Gi Family. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(20):14805-14811.
- Tzima, A., Paplomatas, E., Tsitsigiannis, D., & Kang, S. (2012). The G Protein β Subunit Controls Virulence and Multiple Growth and Development-Related Traits in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 49:271–283.
- Unidad Iztapalapa, & División de Ciencias Biológicas y de la Salud. (2010). Lineamientos para la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Retrieved from http://cbsuami.org/documentos/comisiones/lin_etica.pdf
- Uribe, D., & Khachatourians, G. (2008). Identification and characterization of an alternative oxidase in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 54:119-127.
- Gams, W. (1971). In: *Cephalosporium-artige Schimmelpilze* (Stuttgart):10
- Wall, M., Coleman, D., Lee, E., Iñiguez, J., Posner, B., Gilman, A., & Sprang, S. (1995). The Structure of the G Protein Heterotrimer $G_{i\alpha 1}\beta 1\gamma 2$ Cell, 83:1047-1058.
- Wauson, E., Dbouk, H., Ghosh, A., & Cobb, M. (2014). G Protein-coupled Receptors and the Regulation of Autophagy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(5):274-282.
- Xu, W., & Mitchell, A. (2012). Fungal Morphogenesis: In Hot Pursuit. *Current Biology* 22(7):225-227.
- Yang, Q., & Borkovich, K. A. (1999). Mutational activation of a $G\alpha(i)$ causes uncontrolled proliferation of aerial hyphae and increased sensitivity to heat and oxidative stress in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 151(1), 107–117.
- Yang, Y., Li, X., Shao, Y., & Chen, F. (2012). *mrflbA*, encoding a Putative *FlbA*, is Involved in Aerial Hyphal Development and Secondary Metabolite Production in *Monascus ruber* M-7. *Fungal Biology*, 116:225-233.

- Yang, Q., Poole, S., & Borkovich, K. (2002). A G-Protein Subunit Required for Sexual and Vegetative Development and Maintenance of Normal G Protein Levels in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 1(3): 378–390
- Yu, J. H., Wieser, J., & Adams, T. H. (1996). The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *The EMBO Journal*, 15(19), 5184–5190.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00903.x>
- Yu, J.-H. (2006). Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Microbiology The Microbiological Society of Korea*, 44(2), 145–154.
- Yu, J.-H., Wieser, J., & Adams, T. H. (1996). The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *The EMBO Journal*, 15(19), 5184–5190.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00903.x>
- Yu, J., Wieser, J., & Adams, T. (1996). The *Aspergillus FlbA* RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *The EMBO Journal*, 15(19):5184-5190
- Zampieri, E., Balestrini, R., Kohler, A., Abbà, S., Martin, F., & Bonfante, P. (2011). The Perigord black truffle responds to cold temperature with an extensive reprogramming of its transcriptional activity. *Fungal Genetics and Biology*, 48:585–591.
- Zhao, X., Mehrabi, R., & Xu, J. (2007). Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways and Fungal Pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 6(10):1701-1714.
- Zuber, S., Hynes, M. J., & Andrianopoulos, A. (2002). G-protein signaling mediates asexual development at 25 degrees C but has no effect on yeast-like growth at 37 degrees C in the dimorphic fungus *Penicillium marmeffei*. *Eukaryotic Cell*, 1(3), 440–447. <https://doi.org/10.1128/EC.1.3.440-447.2002>

Zuñiga, J. 2014. Estudio de la relación entre la subunidad Ga Aga1 y el proceso de formación de artrosporas en *Acremonium chrysogenum*. Tesis para optar por el título de Maestría, Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autonoma Metropolitana unidad Iztapalapa. México D.F