



# Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

---

Caracterización de la función de la proteína PcSNT y su papel en la vía de señalización celular mediada por proteínas G heterotriméricas en *Penicillium chrysogenum*

P R E S E N T A

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

I.B.I. MARIA FERNANDA CERON MORENO

Director:

Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesores:

Dr. Ulises Carrasco Navarro

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Iztapalapa, Ciudad de México, 18 de noviembre de 2020.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Mejoramiento Genético de Microorganismos Industriales del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Francisco Fierro Fierro.



Ciudad de México a 18 de noviembre de 20202

El H. jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

Caracterización de la función de la proteína PcSNT y su papel en la vía de señalización celular  
mediada por proteínas G heterotriméricas en *Penicillium chrysogenum*

Que presentó

I.B.I María Fernanda Cerón Moreno

Comité Tutorial:

Dr. Francisco Fierro Fierro

Asesor: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Asesor: Dr. Ulises Carrasco Navarro

Jurado:

Presidente Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

---

Secretario: Dr. Ulises Carrasco Navarro

---

Vocal: Dra. Dulce María Andrade Pavón

---

Vocal: Francisco Javier Figueroa Martínez

---

*A mi familia*

“En ciencia y arte, conocimiento y sentimiento están muy vinculados. La emoción sin comprensión es ciega. La comprensión sin emoción es vacía.” (Nelson Goodman)

## *Agradecimientos*

*Al Dr. Francisco Fierro Fierro, por permitir que formara parte de su equipo de laboratorio, por transmitir sus conocimientos, por sus continuos consejos, por el apoyo incondicional y la confianza depositada en mí para el desarrollo de este proyecto.*

*Al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por aceptar asesorar este proyecto.*

*Al Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez y la Dra. Dulce María Andrade Pavón, por aceptar revisar este trabajo a pesar de la premura.*

*Al Dr. Ulises Carrasco Navarro por su asesorar este trabajo, por compartir sus conocimientos, por sus sabios consejos dentro y fuera del laboratorio y por enseñarme que uno puede reírse de sus errores porque es posible solucionarlos.*

*A la Dra. Wylma Dolores Pérez Pérez, por su constancia y paciencia en la enseñanza de técnicas en el laboratorio; por las charlas; y por enseñarme que gran parte del éxito es constancia y práctica.*

*Al Dr. Eduardo Zúñiga León, a quién agradezco su ayuda en el desarrollo del pipeline, por compartir sus conocimientos relacionados con las técnicas aplicadas, por adoptarme como su pupilo en el campo de la bioinformática, por enseñarme que el camino de la buena ciencia suele ser duro y cansado, pero siempre muy satisfactorio, por mostrarme que más que un equipo de laboratorio, somos una familia que debe brindarse apoyo continuo. Muchas gracias.*

*A la M. en C. Vanessa Polania, por su apoyo compartiendo su conocimiento y por su compañía los miércoles de pandemia con música nueva.*

*A mis compañeros y amigos de laboratorio, Montse, Fer, Caro, Arturo y Gerardo, por siempre tener tiempo para una charla, una duda de pasillo, por prestarme material y compartir su comida conmigo.*

*A mi madre, a quién admiro por estar presente en cada momento alegre, triste, de triunfo, de duda y tener siempre las palabras justas que me motivaban a seguir. Sin tu gran labor como mamá, llegar a este punto hubiera sido muy difícil.*

*A Oscar, por ser mi tío, papá y hermano. Gracias por hacerme saber que siempre puedo contar contigo.*

*A mi gato hermana, Ximena, y a mi hermana Daniela, por aguantar mi mal genio y apoyarme siempre. Las quiero mucho.*

*A mis hermanos Omar y Héctor que, aunque nos vemos poco, siempre están disponibles para brindar su ayuda.*

*A mis tíos Lulú, Rocío, Evelia y Heriberto, por su apoyo. A mi sobrino Ismael, por enseñarme lo que es paciencia.*

*A Ángel, a quién quiero agradecer nuestro tiempo juntos, los buenos y malos momentos. Este andar nos ha dejado aprendizaje, madurez y certeza. En palabras de Sabines, que volvimos nuestras, Te muero.*

*A mis perrhijos, Pinga, Rabo y Nipis (Yoko, Duke, Rocko, Charlie y Fiona), que llegaron a hacer más grande la familia y por hacer de cada día una sorpresa.*

*Cuando este proyecto dio inicio nunca imaginé que se viviría un cambio de laboratorio, una huelga y una pandemia, entre otras cosas. Muchas gracias a todos porque con su ayuda se han logrado materializar estas líneas.*

## ÍNDICE

Resumen.....	11
Abstract.....	11
1. Introducción.....	13
1.1 Hongos filamentosos y Metabolitos secundarios.....	13
1.2 Cepas de <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	13
1.3 Vías de Transducción de señal.....	15
1.4 Proteínas G Heterotriméricas.....	16
1.5 Silenciamiento.....	17
1.5.1 Silenciamiento vía RNAi.....	18
1.6 Vectores de silenciamiento.....	19
1.7 Ciencias ómicas.....	19
1.8 Proteómica.....	19
1.9 Epigenética.....	19
1.10 Bioinformática.....	20
1.10.1 Ontología Genética (GO).....	20
1.11 Modificaciones postraduccionales.....	20
1.12 Análisis de la expresión.....	21
1.13 Estrés Celular.....	21
1.13.1Estrés Oxidante.....	22
2. Antecedentes.....	22
2.1 Análisis proteómico y fosfoproteómico.....	22
2.2 Proteínas G Heterotriméricas y <i>P. Chrysogenum</i> .....	23
3. Justificación.....	25
4.Hipótesis.....	26
5.Objetivos.....	26
5.1 Objetivo general.....	26
5.2 Objetivos particulares.....	26
6.Materiales y Métodos.....	27
6.1 Microorganismos.....	27
6.1.1 Cepas Bacterianas.....	27
6.1.2 Cepas Fúngicas.....	27
6.1.2.1 Crecimiento y Mantenimiento.....	27
6.2 Antibióticos.....	27
6.3 Medios de cultivo y Amortiguadores.....	28



6.3.1 Medios de Cultivo para Bacterias .....	28
6.3.2 Medios de Cultivo para Hongos.....	28
6.3.3 Amortiguadores.....	29
6.4 Manipulación de DNA y RNA .....	31
6.4.1 Vector de silenciamiento .....	31
6.4.2 Extracción de DNA Genómico .....	32
6.4.2.1 Cultivo de <i>P. Chrysogenum</i> .....	32
6.4.2.2 Lisis celular.....	32
6.4.2.3 Extracción y Purificación de DNA genómico.....	32
6.4.3 Extracción de RNA .....	33
6.4.4 Síntesis de cDNA .....	33
6.4.5 TENS-Mini Prep .....	33
6.4.6 Megaprep .....	33
6.4.7 Oligonucleótidos .....	34
6.4.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	34
6.4.8.1 Obtención del Amplicón del gen <i>PcSnt</i> .....	34
6.4.8.2 Confirmación de la construcción del vector pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> .....	36
6.4.8.3 PCR de confirmación de integración del vector en el genoma del hongo .....	36
6.4.9 Digestiones enzimáticas .....	37
6.4.10 Desfosforilación del vector de silenciamiento .....	38
6.4.11 Ligación de Amplicón y Vectores.....	38
6.4.12 Purificación.....	38
6.5 Transformación de bacterias.....	38
6.5.1 Obtención de Células ultra competentes.....	38
6.5.2 Transformación por choque térmico de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	39
6.6 Transformación de <i>P. chrysogenum</i> por protoplastos .....	39
6.6.1 Obtención de Protoplastos .....	39
6.6.2 Transformación .....	40
6.6.3 Plaqueo .....	40
6.6.4 Selección de clonas .....	40
6.6.4.1 Primer pase .....	41
6.6.4.2 Segundo pase .....	41
6.6.4.3 Tercer pase.....	41
6.6.4.4 Cuarto pase .....	41
6.6.4.5 Quinto pase .....	41
7. Análisis Fenotípico .....	41
7.1 Extensión Radial .....	41
7.2 Cinética de conidiación .....	41
7.3 Microcultivos.....	42
8. Análisis de la Expresión génica .....	42
9. Análisis Bioinformático .....	43
10. Resultados y Discusión .....	46
10.1 Obtención, purificación y digestión del Amplicón .....	46
10.2 Digestión, Desfosforilación y purificación del vector de silenciamiento .....	47

10.3 Minipreps.....	48
10.4 Digestiones Minipreps.....	49
10.5 Megapreps .....	50
10.6 Confirmación de la construcción por PCR .....	51
10.7 Obtención de transformantes .....	52
10.8 Extracción de DNA genómico de las transformantes.....	53
10.9 Comprobación de la integración del vector pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> en el genoma de Wis 54-1255 .....	53
10.10 Análisis de la Expresión .....	54
10.11 Caracterización Fenotípica .....	57
10.11.1 Microcultivos .....	57
10.11.2 Extensión Radial .....	62
10.11.3 Conidiación.....	63
10.12 Análisis bioinformático .....	64
10.12.1 Dominios .....	64
10.12.2 Búsqueda de patrones reguladores en zonas intergénicas de <i>P. chrysogenum</i> .....	66
10.12.3 Interactoma .....	75
10.12.4 Fosforilación .....	77
11 Conclusiones.....	78
12 . Referencias .....	79
Anexos .....	83

## Resumen

Los hongos filamentosos son de interés biotecnológico por múltiples razones, siendo una de ellas la producción de metabolitos secundarios, los cuales suelen ser moléculas de alto valor agregado para el ser humano, tales como los antibióticos.

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar la función del gen *PcSnt* y conocer el fenotipo asociado al silenciamiento de su expresión. Se abordaron diferentes puntos, primero la obtención de cepas silenciadas mediante RNAi; un primer análisis fenotípico (cinética de conidiación, extensión radial y microcultivos); el análisis bioinformático se llevó a cabo utilizando un pipeline personalizado (Fbox) a partir del cual se identificaron genes que pueden estar regulados por *PcSnt*. Gracias al análisis de la ontología genética, fue posible observar los procesos en los que los genes regulados están involucrados.

Los niveles en que una proteína juega un papel crucial para la célula son diversos, van del punto de lo que regula su transcripción, las interacciones que tiene con otras proteínas (inclúyanse vías de transducción de señal) .

Puesto que *PcSnt*, es una proteína multidominio, en este trabajo se sugiere que esta proteína media estrés oxidante y forma parte de diversos complejos en distintos momentos de la vida del hongo, así también se le considera un lector epigenético ya que interactúa con diversas histonas e histonas acetil transferasas promoviendo la remodelación de la cromatina, por otro lado también se le encuentra como un inhibidor de la septación, cuya función también puede verse afectada por fuentes de carbono.

## Abstract

Filamentous fungi play an important role in biotechnology for many reasons. One of those reasons is that they produce secondary metabolites, that are considered as high added value molecules by humans, such as antibiotics.

The main objective in this project was to characterize the function of *PcSnt* and to identify the phenotype associated with the knockdown mutants. First, Knockdown mutants were obtained by RNAi silencing strategy. After, the phenotype was characterized by measuring conidiation and radial extension; then, morphology was analyzed in micro-cultures using three different media. Talking all together, the phenotype associated to *PcSNT* silencing is characterized by the reduction in conidia formation. A bioinformatic analysis using a customized pipeline was done to identify the genes that are probably regulated by *PcSnt*. Then a Gene Ontology analyses were performed to identify different biological process where *PcSnt* might be involved in.

There are different levels where a protein can play an important role in the cell, it can go from a transcriptional regulation, to the interactions that can have with other proteins (singal pathways are considered). PcSnt is a multidomain protein because of the kind and number of domains that it has. In this lines we suggested that PcSnt is a oxidative stress regulator, it can be a structural and a functional part of different complexes and it can be called an epigenetic reader because of its interaction with histones and histone acetyl transferases promoting chromatine remodelation. Apart from that, PcSnt inhibits septation, it might be regulated by carbon sources.

## 1. Introducción

### 1.1 Hongos filamentosos y Metabolitos secundarios

Los hongos filamentosos son organismos eucariotas que al desarrollarse crecen formando hifas, las cuales son estructuras tubulares multinucleadas que se encuentran interconectadas formando una red compleja que permite la comunicación célula a célula. (Fischer y Glass, 2019) Son de importancia ecológica como degradadores de materia orgánica. Hongos y bacterias son capaces de coexistir en el mismo hábitat, sin embargo, existe competencia por los nutrientes que se albergan en ese lugar. Esta competencia deriva en que cada grupo de manera individual es capaz de producir moléculas de bajo peso molecular llamadas metabolitos secundarios. (Cole., 1996) Algunas de estas moléculas son de alto valor agregado para el ser humano y se utilizan como antibióticos u otros fármacos, además de pigmentos y otros usos en la industria alimentaria, mientras que otras tienen una incidencia negativa como es el caso de las micotoxinas. (Yu y Keller, 2005) Aunque la producción de algunas de estas moléculas está vinculada con la competencia que puede darse con otros organismos, el beneficio que pueden generar al hongo no siempre es conocido. Por otro lado, la producción de metabolitos secundarios se ha demostrado estar relacionada con el desarrollo y diferenciación celular de este; inducir la conidiación, producirse durante esta fase o dar pigmento a los conidios son ejemplos generales de esta relación. El puente que une estos eventos son vías de transducción de señal, entre ellas las mediadas por proteínas G heterotriméricas. (Calvo et al., 2002)

### 1.2 Cepas de *Penicillium chrysogenum*

Fue en el año de 1929 que Alexander Fleming encontraría un halo de inhibición rodeando a un hongo perteneciente al género *Penicillium*, en una placa de *Staphylococcus*. La sustancia causante de esta inhibición del crecimiento bacteriano resultó ser el antibiótico penicilina. Este descubrimiento daría pauta a la búsqueda de una forma industrial de producirlo y con ello a la selección de cepas sobre productoras. (Shaughnessy, 2010)

*Penicillium chrysogenum*, es un hongo filamentoso perteneciente al orden de los eurotiales, el cual, es conocido por ser utilizado en la industria para la producción de penicilina a nivel mundial. (Alberti, Foster, y Bailey, 2017)

*P. chrysogenum* fue aislado de un melón de variedad dulce infectado en Peoria (Illinois) durante los años 40 del siglo pasado, el cual, mostraba rendimientos de producción específica de penicilina más altos que *Penicillium notatum* – hongo en que la penicilina fue aislada por primera vez. La cepa original de *P. chrysogenum*, NRRL 1951, fue a procesos de mutagénesis usando primero Rayos X hasta obtener la mutante X-1612, la cual, sería sometida a procesos de mutación con luz UV hasta obtener la Q-176, esta cepa tendría altos rendimientos de producción del antibiótico y de esta derivarían todas las cepas Wisconsin. Wis 54-1255, tal y como se observa en la Figura 1, se convertiría en un modelo de estudio para el hongo además de ser el ancestro de las actuales cepas productoras de penicilina en la industria (Jami et al., 2010) También es la primera cepa cuyo genoma se secuenció (van den Berg et al., 2008), y es el genoma de referencia utilizado habitualmente. Se pensó mucho tiempo que *P. chrysogenum* carecía de ciclo sexual y fue clasificado como Deutoromiceto, (Hoff et al., 2008) sin embargo, recientemente se ha probado que cuenta con la maquinaria necesaria para lograr su reproducción sexual. Los tipos de apareamiento están relacionados con mecanismos moleculares que permiten la compatibilidad sexual y se ha visto que *P. chrysogenum* y *P. notatum* son dos especies que pueden ser compatibles sexualmente, formando ascosporas viables contenidas en una estructura denominada cleistotecia. (Böhm et al., 2013) En estudios filogenéticos recientes, se ha visto que *P. chrysogenum* contiene más de una especie, *Penicillium rubens* y *P. chrysogenum*, reclasificando así a estas dos y sus derivadas como *P. rubens*.

En la búsqueda para mejorar la eficiencia de transformación de la cepa Wis 54-1255, se desarrolló la cepa Wis 54-1255 pyrG, la cual es auxótrofa de uridina y posee un fenotipo muy similar a la Wis 54-1255 (B. Diez, 1987).

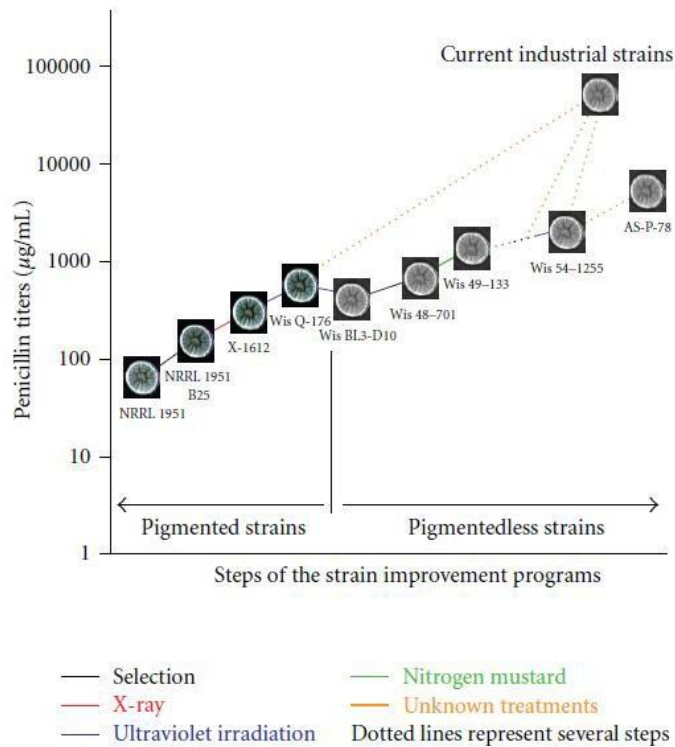


Figura 1. Mejoramiento de cepas de *P. chrysogenum*, Barreiro et al., 2011.

### 1.3 Vías de Transducción de señal

El lenguaje permitió que las sociedades se desarrollaran ya que esto permitió la comunicación entre los individuos. Establecer redes de comunicación no es mérito único de los seres humanos -animales conscientes-. Los organismos vivos en la naturaleza desarrollan redes de comunicación y si echamos mano de la teoría celular, la unidad mínima con vida es: “la célula” y su identidad morfológica y funcional emerge de las redes de comunicación que es capaz de establecer en su interior, con el entorno y con otras células. Las vías de transducción de señal son la serie de redes de comunicación que se establecen en el interior celular que permiten dar respuesta específica a un estímulo ambiental. La respuesta que tiene lugar puede ser un fenotipo particular, la división celular, la viabilidad de la célula, etc. Estas interacciones están mediadas por un gran número de proteínas, es por lo que la proteómica resulta una herramienta de utilidad en el estudio de las vías de transducción de señal. (Koseska & Bastiaens, 2017) La transducción de señales altera de manera regular el estado de fosforilación de proteínas diana y está modulada también por segundos mensajeros. Cabe mencionar

que las redes de comunicación permiten que la señal que el estímulo produce se amplifique en el interior. (HuanHuang, 2011)

#### 1.4 Proteínas G Heterotriméricas

El crecimiento, desarrollo sexual y asexual de hongos filamentosos está mediado por vías de señalización, denominadas vías de transducción de señal las cuales como ya se ha explicado anteriormente son las encargadas de emitir una respuesta celular específica al comunicar un estímulo extracelular al interior de la célula; las proteínas G heterotriméricas coordinan muchas de estas vías. (Li, J.Wright, y Svetlana Krystofova, 2007)

Las proteínas G se encuentran asociadas a receptores de membrana específicos que cuentan con siete dominios transmembrana, el extremo amino fuera de la membrana y el carboxilo al interior celular. Estos receptores de membrana permiten que los cambios en el medio en el cual se desarrolla el hongo desencadenen una respuesta celular específica que permita al hongo adaptarse- cambios en la fuente de nutrientes o iluminación. (Li, J.Wright, y Svetlana Krystofova, 2007)

Cada proteína G está compuesta por tres subunidades distintas  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ . Este trímero se disocia en el monómero  $G\alpha$  y un dímero  $G\beta\gamma$ , cuando una molécula de GTP se une a la subunidad  $G\alpha$ , se desencadenan entonces distintas cascadas de señalización, entre ellas las mediadas por fosforilación de la adenilato ciclasa; (AC) que cataliza la formación del segundo mensajero AMP cíclico (AMPc). Otras proteínas que pueden resultar fosforiladas son las MAPK's. Esto distingue dos vías de señalización para obtener una respuesta celular – las dependientes de cAMP y las que no lo son. (Li, J.Wright, y Svetlana Krystofova, 2007) Las subunidades  $G\alpha$  en hongos filamentosos se clasifican en tres grupos, I, II y III. (Bölker, 1998) Las subunidades  $G\alpha$  del grupo I controlan procesos celulares como la germinación, crecimiento y desarrollo asexual, etc.-, además de la producción de metabolitos secundarios (Carrasco-Navarro et al., 2016) En la Figura 2 se muestra un esquema del ciclo de las proteínas G heterotriméricas, se observa como las subunidades se disocian y vuelven a asociarse cuando están transmitiendo la señal a efectores contiguos.



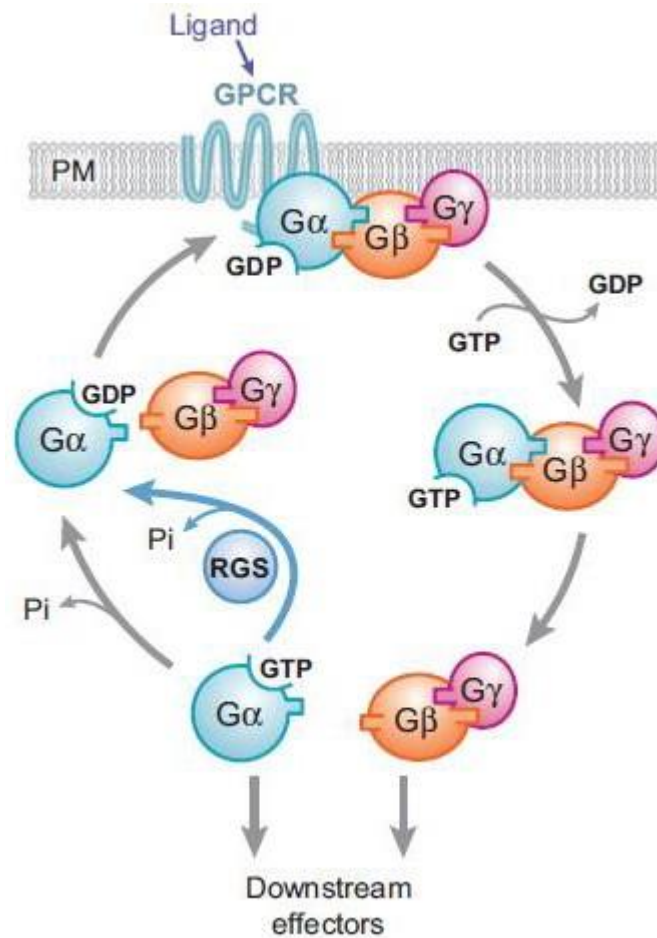


Figura 2. Ciclo de las proteínas G heterotriméricas, Li, et al, 2007.

### 1.5\_Silenciamiento

El silenciamiento de la expresión génica hace referencia a los procesos que impiden, o disminuyen, la síntesis de una proteína, este puede darse en varios niveles, transcripcional y postranscripcional (traduccional). Silenciar un gen no implica la completa eliminación de los transcritos de ese gen y la proteína correspondiente, frecuentemente lo que se produce es una disminución en su número, por lo cual el proceso se denomina también atenuación. El silenciamiento por RNAi (RNA de interferencia) es un mecanismo altamente conservado en la naturaleza en el cual moléculas de RNA de doble cadena regulan la expresión de genes. El uso de este mecanismo es una herramienta para caracterizar -con sus limitaciones- la función un gen. (López, Silva, y López, 2014)

Aunque conservado el mecanismo de silenciamiento vía RNAi no está bien caracterizado en los hongos filamentosos. Los RNA de interferencia se agrupan en tres clases principales, siRNAs,

miRNA, y piRNA -abreviados así por sus siglas en inglés, siendo short interfering RNAs, microRNAs y Piwi-interacting RNAs -. Los RNAs de interferencia corto y los micro RNAs comparten que sus precursores son RNAs de doble cadena, sin embargo, no son de la misma naturaleza. (Dang et al., 2011)

### 1.5.1 Silenciamiento vía RNAi

En la degradación de los transcritos vía RNAi un RNA de doble cadena que se vuelve blanco de una enzima denominada Dicer, la cual tiene dos dominios importantes (dominio ARNasa III y un dominio RNA helicasa). Esta enzima se encarga de moverse a lo largo del RNA de doble cadena y lo secciona en pequeños segmentos. De estos segmentos se degrada una de las cadenas y la otra se une a un complejo enzimático denominado RISC (RNA-induced silencing complex). Tal y como se puede observar en la figura 3 el segmento que permanece unido al complejo permite que este identifique la secuencia complementaria que se encuentra en el mRNA para que se degrade. Este proceso se lleva a cabo en el citoplasma celular.

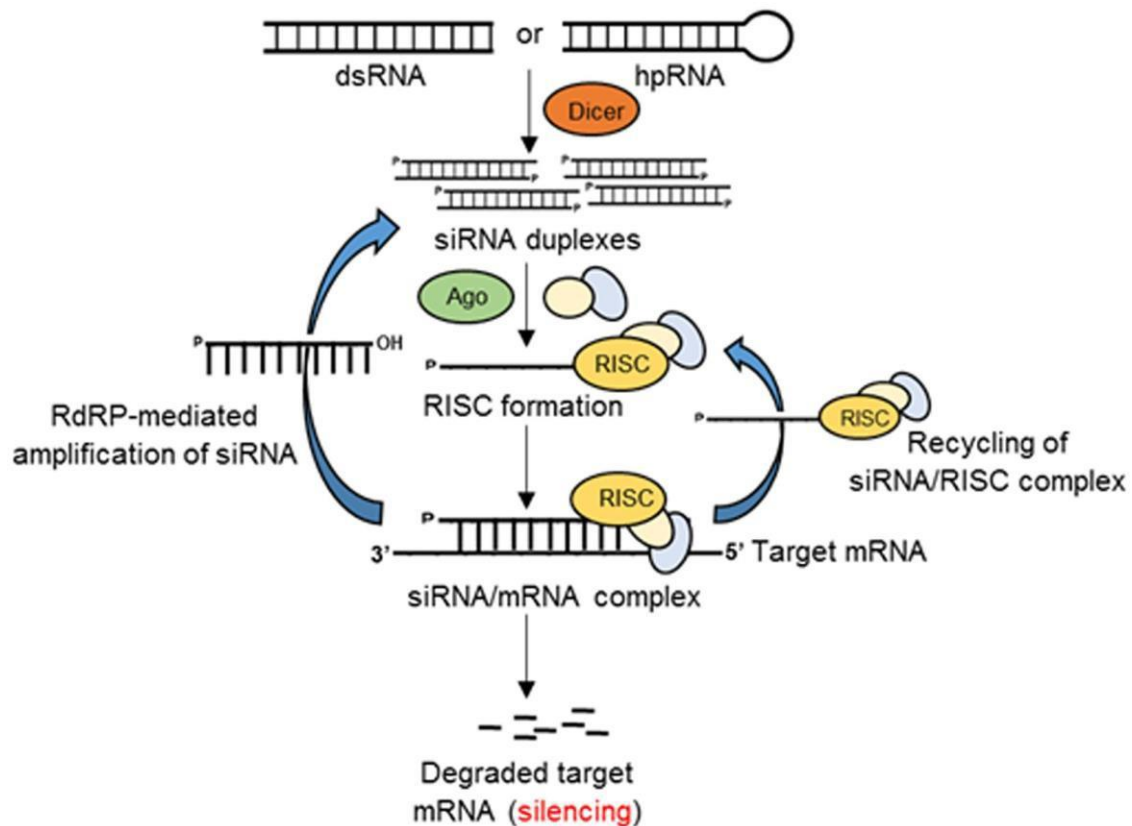


Figura 3. Esquema del silenciamiento de genes vía RNAi en eucariotas. Tomada de Majumdar et al., 2017

### 1.6 Vectores de silenciamiento

Una de las estrategias para el silenciamiento vía RNAi es el uso de vectores con promotores encontrados y flanqueando el sitio de clonación, de manera que al insertar un fragmento del gen a silenciar se sinteticen RNAs de doble cadena como sustrato de la enzima DICER, la cual, realizará cortes en el dsRNA para formar los pequeños ARN de interferencia (siRNA). (Ullán et al., 2008) El vector de silenciamiento empleado en este trabajo es el pGpdPki-RNAi.

### 1.7 Ciencias ómicas

Para abordar este campo es necesario definir el concepto de “ómicas”. Contradiendo un poco la oración inicial del párrafo “ómicas” u “ómico” no es un concepto per se, es un sufijo que se emplea para hacer referencia a algo que es “grande”; en el contexto de las ciencias naturales es empleado para hacer referencia al campo de estudio que procesa una gran cantidad de datos o de información. Como ejemplos de disciplinas que integran este campo se encuentran la proteómica, la genómica, metabolómica, transcriptómica, etc. (Yadav, 2007)

### 1.8 Proteómica

La proteómica, es una de las llamadas ciencia ómicas que se encarga de estudiar las proteínas presentes en la célula en un determinado momento y bajo condiciones específicas; ha mostrado ser una herramienta útil para encontrar efectores de vías de señalización celular (Aslam et al., 2017) Las fosfoproteómica por otro lado se encarga de estudiar sólo aquellas proteínas que se encuentren fosforiladas. (Mayya y Han, 2010)

### 1.9 Epigenética

La epigenética estudia los diferentes mecanismos a través de los cuales se ejerce un control de la expresión génica que no depende estrictamente de la secuencia génica. La remodelación de la cromatina y la metilación de bases son los dos mecanismos más importantes en la regulación epigenética. Las proteínas que están involucradas en la remodelación de la cromatina se clasifican en tres grupos: lectores, borradores y escritores. Los lectores reconocen y se unen a modificaciones específicas de las histonas; los borradores son enzimas que remueven modificaciones de las histonas; los escritores, son enzimas que agregan modificaciones a las histonas. (Allis y Jenuwein, 2016)

## 1.10 Bioinformática

La bioinformática es una rama en el ámbito científico, cuyo propósito es la aplicación de herramientas computacionales para la recopilación, interpretación y análisis de datos biológicos, cuyo desarrollo tendría un importante impulso con la secuenciación del genoma humano. La bioinformática se caracteriza por el uso y desarrollo de herramientas de software, muchos de los cuales son de disponibilidad libre en internet, uno de los más comunes es BLAST. Usar internet, ha facilitado la construcción y uso de las bases de datos. (Bayat, 2002)

### 1.10.1 Ontología Genética (GO)

Ontología Genética (*Gene Ontology*), es un concepto que hace referencia a la organización de toda la información disponible de un gen y su producto génico. Basándose en resultados experimentales publicados y la comparación con ortólogos de diferentes especies. Agrupa tres términos: **Proceso biológico**, son los procesos a los cuales el producto del gen contribuye y que a menudo implican una transformación química o física; **Función molecular**, que se define como la actividad bioquímica de un producto génico; **Componente celular**, se refiere a su ubicación en la célula, el compartimento celular, en el cual, el producto del gen es activo. (ver Figura 4)

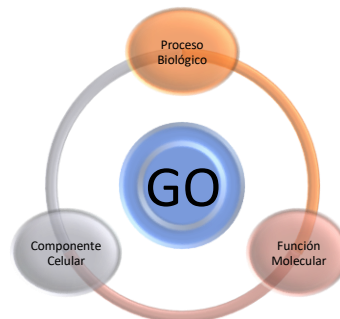


Figura 4. Ontología Genética.

## 1.11 Modificaciones postraduccionales

Se llaman modificaciones postraduccionales a aquellos cambios que las proteínas sufren una vez que ha finalizado su síntesis en el ribosoma, aunque algunas de ellas pueden de hecho producirse durante

su síntesis. Entre ellas la más importantes es la adición covalente de grupos químicos en residuos de aminoácidos o en los extremos de la proteína. Las modificaciones pueden ser fosforilaciones, ubiquitinaciones, glucosilaciones, acetilaciones, metilaciones, sumoilaciones, etc; estas determinan la estructura, función y en algunos casos localización de las proteínas. (Leach & Brown, 2012) La fosforilación se encarga de la adición de un grupo fosfato en alguno de los residuos de las proteínas, siendo los más frecuentes y estables Serina, Treonina y Tirosina. (Ardito et al., 2017) La fosforilación a menudo sirve como un interruptor que controla las actividades de las proteínas involucradas en la señalización celular -incrementando o disminuyendo su actividad- esta modificación puede regular diferentes procesos celulares, como la localización celular de la propia proteína, la proliferación celular, el desarrollo celular y la transcripción de genes. (Ya y He, 2008)

### *1.12 Análisis de la expresión*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas más empleadas en biología molecular con sus respectivas variantes. El principio básico de la PCR consiste en que pequeñas cantidades de DNA pueden ser amplificadas en regiones específicas de manera exponencial. La PCR cuantitativa (qPCR) añade la posibilidad de monitorear qué cantidad de DNA se está acumulando en cada ciclo, lo cual permite deducir de qué cantidad se partió inicialmente. Esta técnica permite analizar la expresión de genes mediante el uso de fluoróforos, sondas y un gen de referencia. La cuantificación en esta técnica puede realizarse de dos maneras: cuantificación absoluta (emplea una curva de calibración) y la relativa (empleando el gen de referencia). La reacción de qPCR puede realizarse en forma One-step o Two-steps, cuya diferencia radica en que en la primera el cDNA y la reacción de qPCR se llevan a cabo en un solo tubo, la segunda sintetizar el cDNA y después este se utiliza para la reacción de qPCR. La ventaja de la primera sobre la segunda es que la muestra de la que se parte se manipula poco, aunque la técnica es muy sensible lo más importante es mantener calidad en la muestra para obtener un resultado confiable. Los pasos que lleva un ciclo de qPCR son los mismos a un ciclo de PCR convencional. (Life technologies, 2012)

### *1.13 Estrés Celular*

La célula constantemente se enfrenta a situaciones “hostiles” ambientales, que ponen a prueba sus mecanismos de homeostasis, a esto se le puede llamar estrés celular. Existen distintos tipos de estrés celular (estrés osmótico, estrés oxidante, estrés por nutrientes, etc.). Según el tipo de estrés y su severidad es que se desencadena una respuesta celular, dicha respuesta podría asegurar la supervivencia de la célula, por ejemplo, induciéndose sistemas bioquímicos de resistencia al estrés o

mediante un proceso de diferenciación a formas de resistencia como las esporas o en ocasiones dirigir la célula hacia la muerte celular. (Fulda, Gorman, Hori, y Samali, 2010)

### 1.13.1 Estrés Oxidante

En los inicios de la vida, el ambiente no era como hoy lo conocemos, la atmósfera en el planeta tenía un perfil reductor, por lo tanto, los cuerpos de agua y el aire eran anóxicos. Al surgir los organismos fotosintéticos -ancestros de las algas verde azules- fue que la atmósfera comenzó a llenarse de oxígeno y con ello nuevas formas de vida se abrieron paso.

Pese a que el oxígeno es tan importante para la vida como la conocemos ya que participa en eventos del metabolismo como la respiración celular-sistemas aerobios-, los seres vivos necesitan de una homeostasis.

Como productos del metabolismo de los organismos aerobios se forman radicales libres como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, los cuales se conocen como especies reactivas de oxígeno -ROS, por sus siglas en inglés-, la formación de estas moléculas se da principalmente durante la cadena de transporte de electrones. Estas moléculas pueden oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; los daños que ocasionan pueden desencadenar muerte celular. Para ello la célula desarrolló sistemas antioxidantes como las enzimas superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa. (Aguirre et al., 2005)

En *P. chrysogenum*, poco se ha descrito de los sistemas antioxidantes. En 1998 Diez y colaboradores publicaron la secuencia de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso, en este artículo concluyeron también que el gen de la SOD está presente en una sola copia por genoma haploide

## 2. Antecedentes

### 2.1 Análisis proteómico y fosfoproteómico

Como se ha descrito hasta ahora la proteómica es una poderosa herramienta para encontrar efectores de vías de transducción de señal. Los métodos y técnicas aplicadas son variadas, entre ellas destaca la técnica LC-MS/MS “*label free*” que por sus siglas en inglés significa liquid chromatography tandem mass spectrometry, es decir, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, esta técnica es empleada para conocer la secuencia de aminoácidos en una proteína entre otros usos. “*Label free*” hace referencia a la técnica en la cual las proteínas no tienen que ser marcadas. Otra de las facilidades que implica esta técnica es evitar el uso de geles para la separación de proteínas.

## 2.2 Proteínas G heterotriméricas y *P. chrysogenum*

Se ha demostrado que las proteínas G heterotriméricas median muchas vías de señalización en hongos filamentosos; que la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G del grupo I está altamente conservada, permitiendo de mejor manera su caracterización en un mayor número de microorganismos. Pga1 en *P. chrysogenum* tiene relación con el proceso de la germinación de conidios. Mutantes con el gen deletado ( $\Delta Pga1$ ) tienen una tasa de germinación que va del 70 al 80% en presencia de fuentes de carbono como glucosa o sacarosa, sin embargo, cuando se crecen en medio mínimo la tasa de germinación disminuye. Existe entonces una regulación alterna a la vía de Pga1 mediada por AMPc que depende de la fuente de carbono que se esté empleando. Pga1 regula de manera positiva la producción de penicilina y, la transcripción de genes de penicilina, además de que incrementa la biosíntesis de ATP, NADPH y cisteína; moléculas necesarias para la producción de este antibiótico. (García-Rico, Martín, y Fierro, 2010) (Carrasco-Navarro et al., 2016)

Se observaría también que los procesos de desarrollo y conidiación de los hongos filamentosos están regulados por las proteínas G heterotriméricas, para un estudio profundo de cómo podían relacionarse se obtuvieron las cepas  $\Delta pgal$  -el gen de la subunidad  $\alpha$  perteneciente a la familia I se encuentra deletado- y  $pga1^{G42R}$  -mantiene la subunidad  $\alpha$  constitutivamente activa-. Para  $\Delta pgal$  el efecto sobre el fenotipo es que es hiperconidiante y para  $pga1^{G42R}$  en contraste se tiene un fenotipo poco conidiante cuando las cepas se crecen en medio sólido como se observa en la figura 5 (García-Rico et al., 2007)

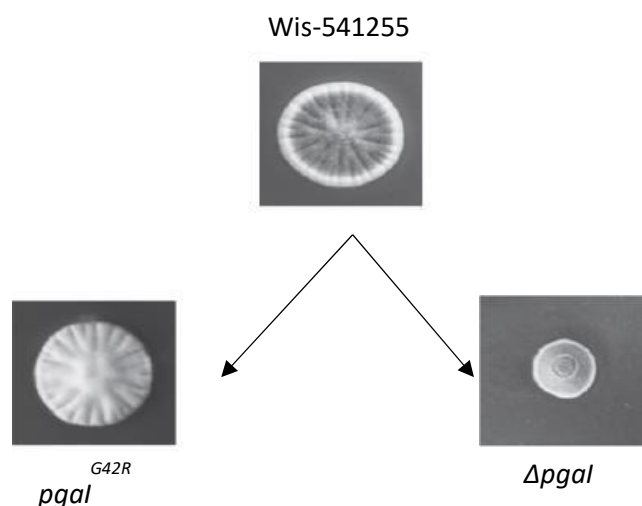


Figura 5. Mutantes que se han obtenido a partir de la Wis 54-1255 y con las cuales se ha estudiado las vías de transducción de señal mediadas por las proteínas g heterotriméricas -Pga1-. Modificada de (García-Rico et al., 2007)

En el año 2016 Carrasco-Navarro et al., (2016) con la finalidad de encontrar efectores de la vía de transducción de señal mediada por Pga1, subunidad  $G\alpha$  de las proteínas G heterotriméricas en *P. chrysogenum*. Para ello se trabajó como control la cepa Wis 54-1255, la mutante  $\Delta pga1$ , la mutante  $pga^{G42R}$  y una condición adicional que fue  $\Delta pga1 + AMPc$ . De manera general la técnica consiste en digerir con tripsina las proteínas que se obtuvieron para que los péptidos obtenidos después de la digestión por el patrón de corte de la tripsina sean péptidos cargados positivamente, ayudando así al proceso de ionización, ya que muchas veces los compuestos orgánicos presentan cierta dificultad para ionizarse. Estos péptidos fueron separados por cromatografía líquida, para después ser ionizados por ESI -*Electrospray ionization*-, este tipo de ionización permite la formación de una interfase entre el cromatógrafo de líquidos y el espectro de masas. Espectrometría de masas en tándem hace referencia a que se fragmento dos veces la muestra, obteniendo de esta manera mayor sensibilidad para llevar a cabo el análisis de datos. Posteriormente y con las mismas cepas se realizó un análisis fosfoproteómico (Carrasco-Navarro et al. Resultados no publicados), en el cual se analizan por el mismo método muestras de péptidos fosforilados, previamente enriquecidos a partir de extractos peptídicos producto de digestión con tripsina.

En el análisis fosfoproteómico se identificaron proteínas cuya ontología indica que intervienen en diferentes procesos celulares, PcSNT fue identificada como una proteína que pertenece al grupo de factores de transcripción y remodeladores de la cromatina ya que cuenta con dominios de interacción con DNA y proteína a proteína. En el análisis de sitios de fosforilación a partir de los espectros obtenidos, esta proteína presentó sitios de fosforilación diferencial; en todas las condiciones presentó la fosforilación en la serina 738 y únicamente la mutante  $\Delta pga1$  presentó un sitio de fosforilación adicional, serina 742. A continuación, se muestra un diagrama que lo describe (figura 6).

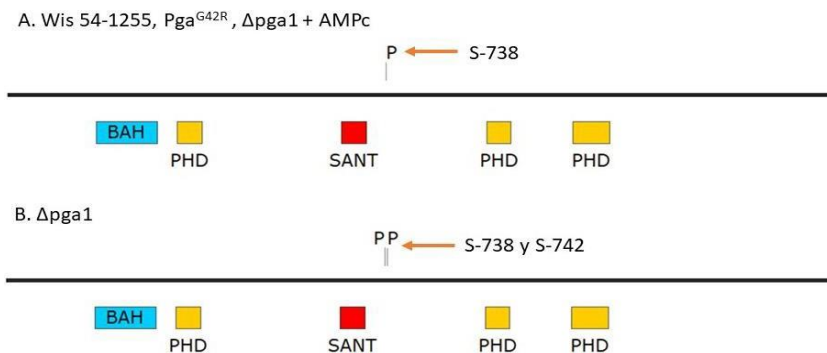


Figura 6. Diagrama de sitios de fosforilación diferencial. Elaborado con SnapGene viewer, basado en el diagrama de Dominios generado con SMART.



<b>Tabla 1. Péptidos Fosforilados</b>		
<b>Proteína</b>	<b>Similitud</b>	<b>Péptidos Fosforilados</b>
<b>PcSnt (Pc16g10400)</b>	Débil similitud con la proteína hipotética YGL131c - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Nombre estándar SNT2)	(K)LLDDVADDHDDpSAFDSEK(A) (K)LLDDVADDHDDSAFDpSEK(A) (K)LLDDVADDHDDSAFDpSEKAVVQK(R)

La probable participación de PcSnt en la vía de transducción de señal mediada por la subunidad  $G\alpha$  Pga1, y su presunto papel como regulador de la transcripción mediante remodelación de la cromatina, nos animaron a estudiarla y comprobar si es un mediador de la respuesta celular a la activación de la vía de las proteínas G heterotriméricas, y si participa en alguno de los procesos celulares que están regulados por Pga1, como el desarrollo morfológico del hongo y la producción de metabolitos secundarios.

### 3. Justificación

Los hongos son organismos eucariotas de interés ambiental ya que son clave en la degradación de compuestos orgánicos y de compuestos recalcitrantes; son de interés biotecnológico y de manera indirecta de interés social ya que son capaces de producir metabolitos secundarios, entre ellos pigmentos, inmunosupresores, estatinas, antibióticos e incluso son usados en la producción industrial de bebidas alcohólicas. (Barreiro y García-Estrada, 2012).

Haciendo énfasis en la producción de antibióticos *P. chrysogenum* -cepas optimizadas-, es el productor de penicilina G a nivel industrial, antibiótico  $\beta$ -lactámico, que es muy utilizado debido a su eficacia y baja toxicidad. (Barreiro y García-Estrada, 2012) Por otro lado *P. chrysogenum* es considerado un organismo modelo para el estudio de la regulación de genes involucrados en el metabolismo secundario en hongos filamentosos y la bioquímica de estos. Las cepas usadas hoy en día a nivel industrial para la producción de penicilina G, derivan de *P. chrysogenum*, dichas cepas fueron sometidas a procesos de mutagénesis en la búsqueda de encontrar cepas hiperproductoras de penicilina, sin embargo, poco se conoce de su bioquímica y regulación a nivel génico (Jami et al., 2010).

El estudio de los efectores de las vías de transducción de señal de las proteínas G heterotriméricas brindarían más información sobre la bioquímica y regulación de importantes procesos celulares. PcSnt fue encontrada como resultado de un análisis de fosfoproteómica llevado a cabo con diferentes cepas de *P. chrysogenum* mutantes en la vía de las proteínas G: W-541255,  $\Delta pga1$  y  $pga1^{G42R}$ ; Debido a los dominios estructurales que tiene esta proteína puede deducirse que es un remodelador de la cromatina que regula a nivel transcripcional, además de presentar un patrón de fosforilación diferencial indica que podría estar regulado por la vía de las proteínas G heterotriméricas/Pga1 (Carrasco-Navarro et al., 2016).

PcSnt muestra gran similitud con la proteína SNT2 de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual está involucrada en defensa frente a estrés oxidante. Caracterizar la función de PcSnt permitirá profundizar en los mecanismos regulatorios de los procesos celulares que están bajo control de la vía de las proteínas G heterotriméricas, procesos tan importantes como la respuesta a estrés oxidante, el desarrollo morfológico y la producción de penicilina y otros metabolitos secundarios.

#### 4. Hipótesis

PcSnt es un mediador de la respuesta celular a estrés oxidante como se ha visto con una proteína ortóloga en *S. cerevisiae*, *Fusarium oxysporum* y *Neurospora crassa*, y es un posible regulador del metabolismo secundario y desarrollo morfológico de *P. chrysogenum* actuando como efector en la vía de transducción de señal de las proteínas G heterotriméricas/Pga1.

#### 5. Objetivos

*5.1 Objetivo general:* Caracterizar la función de la proteína PcSnt en la célula y conocer el fenotipo asociado al silenciamiento de su expresión.

*5.2 Objetivos particulares:*

1. Amplificación por PCR de un fragmento de la secuencia codificante del gen *PcSnt* para el silenciamiento de este.
2. Obtención del plásmido de silenciamiento pGpdPki-RNAi-*PcSnt*
3. Obtención de cepas de *P. chrysogenum* silenciadas en la expresión de *PcSnt* mediante RNAi.
4. Análisis de expresión del gen *PcSnt* en las mutantes silenciadas mediante qPCR Análisis del fenotipo de las mutantes silenciadas.
5. Análisis bioinformático de los hipotéticos genes regulados por PcSnt.

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1 Microorganismos

#### 6.1.1 Cepas Bacterianas

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Esta cepa bacteriana fue obtenida por Douglas Hanahan es conocida por su alta eficiencia de transformación -hasta  $5 \times 10^8$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA-. Se utilizará para la clonación de las construcciones plasmídicas. Su crecimiento se llevará a cabo en medio sólido y líquido Luria Bertani a  $37^\circ\text{C}$  durante 12 h. Para llevar a cabo la selección de colonias transformantes el medio se complementará con el antibiótico correspondiente. Las cepas transformadas se conservarán en glicerol al 40% a  $-20^\circ\text{C}$ .

*Micrococcus luteus* ATCC-9341. Esta cepa será empleada para la realización de bioensayos, para ello se utilizará TSB con 1% de agar bacteriológico.

#### 6.1.2 Cepas fúngicas

*P. chrysogenum* Wis 54-1255. Cepa parental de las cepas productoras de penicilina a nivel industrial y de las mutantes  *$\Delta\text{pgal}$*  y  *$\text{pgaI}^{\text{Q204L}}$* . (García-Rico et al., 2007)

##### 6.1.2.1 Crecimiento y Mantenimiento

La esporulación de *P. chrysogenum* se realizará en medio sólido power, incubado a  $27^\circ\text{C}$  de 5 a 7 días. Para el crecimiento de *P. chrysogenum* en medio líquido se utilizaron matraces de 250 con 50 mL de medio y se incubarán a  $27^\circ\text{C}$  de 5 a 7 días y con agitación a 150 rpm. El inóculo se preparará a partir de conidios. La conservación de las cepas de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 se hará por suspensión de conidios en glicerol al 40% almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

## 6.2 Antibióticos

Ampicilina. Se preparará una solución madre de 100 mg/mL con agua inyectable, una vez disuelta se esterilizará por filtración con jeringa a través de una membrana de  $0.22\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se almacenará a  $-20^\circ\text{C}$ .

Fleomicina. Se preparará una solución madre de 20 mg/mL con amortiguador Hepes (5g/mL) pH 7.2, una vez disuelta se esterilizará por filtración con jeringa a través de una membrana de  $0.22\mu\text{m}$  de diámetro de poro y se almacenará a  $-20^\circ\text{C}$ . Será empleada durante la selección de transformantes de *P. chrysogenum* a una concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se almacenará a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 6.3 Medios de cultivo y Amortiguadores

#### 6.3.1 Medios de Cultivo para Bacterias

---

**Medio Luria-Bertani**

Bacto-Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	1 L

**pH 7.0**

**Añadir agar al 2 % para medio sólido**

#### 6.3.2 Medios de Cultivo para hongos

---

**Sales Power**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1 g
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.4 g
CuSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.2 g
Agua destilada	200 mL

**Conservar en un frasco sellado a temperatura ambiente hasta su uso.**

---

**Medio Power**

Sacarosa	25 g
Lactosa	5 g
Peptona de caseína	2.5 g
Solidos de maceración de maíz	0.5 g
KCl	26.1 g
NaCl	2 g
NaNO <sub>3</sub>	1.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.25 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.25 g
Sales Power	1000 µL
Agar bacteriológico	20 g
Agua destilada	1L

**pH de 6.75 ± 0.2**

<b>Medio PMMY</b>	
Glucosa	40 g
NaNO <sub>3</sub>	3 g
Extracto de levadura	2 g
KCl	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Agua destilada	1L

<b>Medio Czapek</b>	
Sacarosa	30 g
NaNO <sub>3</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Agar	10 g
Agua destilada	1L

**Se añade sorbitol 1M como estabilizador osmótico.**

### 6.3.3 Amortiguadores

<b>TPP</b>	
KCl	0.7 M
Amortiguador de fosfato potásico	50 M

**pH 5.8**

<b>KCM</b>	
CaCl <sub>2</sub>	50 mM
KCl	0.7 M
MES	10 M
<b>pH 5.8</b>	

<b>PCM</b>	
CaCl <sub>2</sub>	50 mM
MES	10 mM
Polietilenglicol 6000	50%
<b>pH 5.8</b>	

<b>TB</b>	
Pipes	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl	250 mM
MnCl <sub>2</sub>	55 mM
<b>Ajustar pH a 6.7 y MnCl<sub>2</sub> se esteriliza por separado</b>	

<b>TE (Tris-EDTA)</b>	
EDTA	1 mM
Tris-HCl	10 mM 1:1
<b>Ajustar pH 8</b>	

<b>TENS</b>	
EDTA pH 8	1 mM
Tris-HCl pH 8	10 mM
NaOH	0.1N
SDS	0.5 % (p/v)
<b>CIA</b>	
CHCl <sub>3</sub>	24 volúmenes
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	1 volumen

## 6.4 Manipulación de DNA y RNA

### 6.4.1 Vector de silenciamiento

En el presente trabajo se empleó el vector de silenciamiento pGPpdPki-RNAi. Este vector fue desarrollado a partir del vector PJL43RNAi; Contiene el gen de resistencia a fleomicina *-ble-* bajo el promotor de la enzima glutamato deshidrogenasa de *Aspergillus awamori* *-Pgdh-* y el terminador de la citocromo oxidasa de *S. cerevisiae* *-Tcyc-*; El sitio de clonación está flanqueado por los promotores de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa y de la piruvato cinasa *-Pgpd* y *pki* respectivamente-. El sitio de clonación contiene una secuencia de corte *NcoI*. En la figura siguiente se muestra el vector de silenciamiento. (Figura 7)

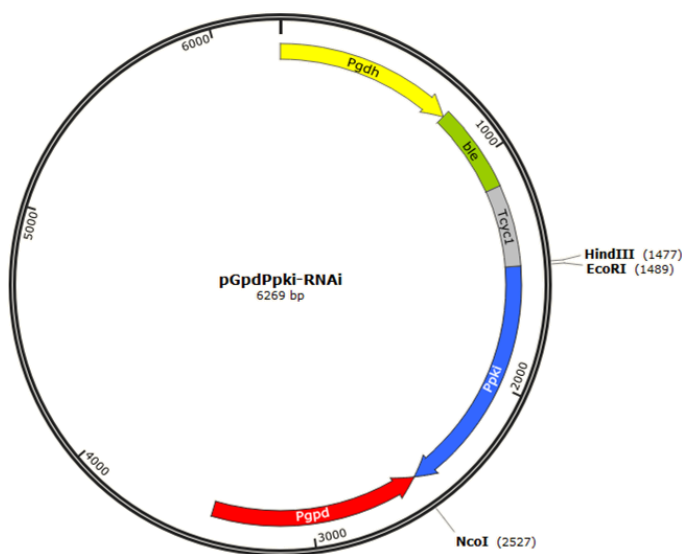


Figura 7. En amarillo se muestra el promotor de la glutamato deshidrogenasa, en verde el gen de resistencia a fleomicina, en gris el terminador de la citocromo oxidasa y finalmente por los promotores de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa *-Pgpd-* y de la piruvato cinasa *-Pki-* en rojo y azul respectivamente.

## 6.4.2 Extracción de DNA Genómico

### 6.4.2.1 Cultivo de *P. chrysogenum*

En un matraz estéril con 100 mL de medio PMMY se inocularon  $1 \times 10^8$  esporas del hongo durante una noche a 28°C, 250 rpm.

### 6.4.2.2 Lisis celular

Se recuperó la biomasa formada filtrándola, utilizando un embudo con membrana de Nyltal y se lavó con NaCl 0.9%. El exceso de humedad se quitó exprimiendo con una espátula estéril. De inmediato se congeló la biomasa en un mortero con N<sub>2</sub> líquido y se maceró hasta obtener un polvo fino. Se colocó el polvo en un microtubo de 1.5 mL hasta cubrir la marca de 0.5 mL. Se adicionaron 800 µL de BE y se incubó a 68°C por 30 min.

### 6.4.2.3 Extracción y Purificación de DNA genómico

Se centrifugó a 14000 rpm a temperatura ambiente por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se agregaron 100 µL de Acetato de Potasio 2.5M pH 4.2, se mezcló bien y se colocó en hielo durante 30 min. Se centrifugó a 14000 rpm a temperatura ambiente por 5 min. Del sobrenadante se tomaron 600 µL, se transfirieron a un tubo nuevo y se adicionaron 700 µL de isopropanol. Se dejó precipitar toda la noche.

Se centrifugó a 14000 rpm a temperatura ambiente por 5 min y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 400 µL de TE pH 8, 40 µL de acetato de sodio 3M pH 7. La mezcla se calentó durante una hora a 68°C a 300 rpm. Se le adicionó 1 mL de etanol 95% frío y se centrifugó 5 min a 1500 rpm. Se desechó el sobrenadante.

Se agregarán 800 µL de etanol al 70%, se centrifugó 1 min o a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante. Este paso se realizó dos veces.

El pellet se resuspendió en 100 µL de TE pH8 con 1 µL de RNAsa (stock 10 mg/mL). Se incubó durante una hora a 37°C. Se le adicionaron pasado el tiempo de incubación 300 µL de TE pH 8 y 300 µL de CIA, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min.

Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionaron 60 µL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 700 µL de etanol absoluto frío. Se centrifugó a 14000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y se



adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% Frío, se centrifugó 14000 rpm a 4 °C por 10 min. Se desechó el sobrenadante. Se dejó secar y se resuspendió el pellet en 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.

#### 6.4.3 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó siguiendo el protocolo de Trizol Reagent (Invitrogen, Catálogo: 15596018). Para la ruptura celular se siguieron los mismos pasos establecidos para la extracción de DNA genómico.

#### 6.4.4 Síntesis de cDNA

Se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del protocolo del producto SuperScript™ IV Reverse Transcriptase. (Invitrogen, Catálogo: 18090050)

#### 6.4.5 TENS-Mini Prep (Zhou et al., 1990)

Se tomó una colonia bacteriana proveniente de una placa de agar LB con ampicilina con 12-16h de crecimiento y se sembró en una placa nueva de agar LB ampicilina, la cual se dejó crecer a 37°C durante una noche. Con un asa bacteriológica se recogió la película bacteriana formada en la placa (no en su totalidad) y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril a la que se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de Amortiguador TENS y se resuspendió perfectamente con un vórtex de 2 – 5 s. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3.0 M, pH 5.2, y se resuspendió perfectamente con un vórtex de 2 – 5 s. Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min y el sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 mL. Se le adicionaron 900  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 2 min y se retiró el sobrenadante. El botón se lavó 2 veces con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó durante 2 min y se retiró el sobrenadante. Se secó al aire durante 10 min y resuspendió con 100  $\mu\text{L}$  de agua estéril. Se analizaron 2  $\mu\text{L}$  de la muestra en un gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente la construcción se comprobó de manera rápida con una digestión utilizando *NcoI*.

#### 6.4.6 Megaprep (Zhou et al., 1990)

Una vez que se observó que la construcción se realizó adecuadamente se sembró nuevamente en una placa utilizando la película bacteriana formada que se reservó en la placa anterior para el miniprep y se dejó incubando una noche. Se tomó la película bacteriana con ayuda de un asa bacteriológica, se resuspendió el botón celular en 100  $\mu\text{L}$  de agua estéril y 350  $\mu\text{L}$  de TENS. Se agregó RNAsa a una concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$  seguida de 100  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio. Se centrifugó a 14000 rpm por 4 min. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 mL limpio y estéril. Se agregaron 600

μL de isopropanol frío y se mezcló por inversión. Se ayudó a la precipitación de ácidos nucleicos dejando de 20 – 30 min a -20°C. Pasado el tiempo se centrifugó a 14000 rpm por 4 min, se retiró el sobrenadante y se hicieron dos lavados con 1 mL de etanol al 70% frío, centrifugando durante 2 m y retirando el sobrenadante entre cada lavado. Se dejó secar el botón de DNA durante 10 min o hasta no observar alcohol residual. Finalmente, se resuspendió con 100 μL de agua estéril. Se analizaron 2 μL de la muestra en un gel de agarosa al 0.8%.

#### 6.4.7 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron adquiridos de la Unidad de Servicio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. En la tabla siguiente se describen los oligonucleótidos que serán utilizados y sus respectivas funciones.

<b>Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo</b>		
<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Función</b>
<b>Pc16g10400 F new</b>	5'-TAACCATGGAGGCGATCAAACCTCTATCG- 3'	PCR
<b>Pc16g10400 R new</b>	5'-TACCATGGTAGGTCTGGGCGAATAA- 3'	
<b>Pki1(gpd1)F</b>	5'-TCTCTCTTCTCTCGCTCAC- 3'	Confirmación de construcción del vector de silenciamiento y transformantes
<b>Gpd1(pki1)R</b>	5'-TACTCCATCCTTCCCATCC- 3'	
<b>Conf-pcbAB-1F</b>	5'-GATGCCATTGCTGGGTTTGAT- 3'	Confirmación de cepa de las transformantes
<b>Conf-pcbC-1R</b>	5'-GCAACCTTCATCTTCTCCTCCATATT- 3'	
<b>Conf-pcbC-1F</b>	5'-CCAATCTCGTACGGCGACTATCT- 3'	
<b>Conf-penDE-1R</b>	5'-ACCTGCATTACCCTCGGATTTG- 3'	
<b>Actina-F</b>	5'-AGAAGTTGCTGCTCTCGTCA-3'	qPCR
<b>Actina-R</b>	5'-CGACAATGGAAGGGAAAACA-3'	
<b>Snt2-F</b>	5' – GGAAGCTCCACCGATTGTT – 3'	qPCR
<b>Snt2-R</b>	5' – GCAATCCCGACACGAAAGA – 3'	

#### 6.4.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Este método se usó para la amplificación de secuencias genómicas.

##### 6.4.8.1 Obtención del amplicón del gen *PcSnt*

Para obtener el amplicón de 501 pb del gen *PcSnt* se usó la enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase, (Invitrogen™, Catálogo: 10966034). Las condiciones de reacción se muestran en la tabla 4. La mezcla de reacción se muestra en la tabla 3.

Componente	Volumen ( $\mu$ L)
Agua libre de nucleasas	c.b.p 25 $\mu$ L
10X Amortiguador Taq Platinum, - Mg	2.5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0.75
10 mM dNTP mix	0.5
10mM Pc16g10400 F new	0.7
10mM Pc16g10400 R new	0.7
DNA genómico	30 ng
Platinum™ Taq DNA Polymerase, (Invitrogen™).	0.1

	Etapa	Temperatura	Tiempo
1 ciclo largo	Desnaturalización inicial	94°C	5 m
	Desnaturalización	94°C	1 m
	Hibridación	63°C	5 m
	Extensión	72°C	5 m
30 ciclos	Desnaturalización	94°C	30s
	Hibridación	63°C	30s
	Extensión	72°C	1m
	Extensión Final	72°C	5m
	Infinity Hold	12°C	$\infty$

**Tabla 4. Perfil de temperaturas programado en el termociclador para la reacción de PCR.**

#### 6.4.8.2 Confirmación de la construcción del vector pGpdPpki-RNAi-PcSnt

Para la confirmación de la construcción del vector se partió de DNA plasmídico y se utilizó como control el vector vacío. Ver tablas 5 y 6.

<b>Tabla 5 . Reacción de PCR. Confirmación de construcción</b>	
<b>Componente</b>	<b>Volumen ( <math>\mu</math>L)</b>
<b>Agua libre de nucleasas</b>	c.b.p 15 $\mu$ L
<b>10X Amortiguador Taq Platinum, - Mg</b>	9.7
<b>50 mM MgCl<sub>2</sub></b>	0.3
<b>10 mM dNTP mix</b>	0.3
<b>10mM Pki1(gpdl)F</b>	1
<b>10mM Gpd1(pki1)R</b>	1
<b>DNA plasmídico</b>	30 ng
<b>Taq DNA Polymerase, (Invitrogen™).</b>	0.2

**Tabla 5. El DNA plasmídico empleado correspondía a vector pGpdPpki-RNAi y al vector más el amplicón ligado -pGpdPpki-RNAi-PcSnt**

<b>Tabla 6. Condiciones de reacción (PCR). Confirmación de construcción</b>			
	<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>30 ciclos</b>	<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	3 m
	<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 s
	<b>Hibridación</b>	60°C	30 s
	<b>Extensión</b>	72°C	1 m
	<b>Extensión Final</b>	72°C	5 m
	<b>Infinity Hold</b>	12°C	$\infty$

**Tabla 6. Perfil de temperaturas programado en el termociclador para la reacción de PCR.**

#### 6.4.8.3 PCR de confirmación de integración del vector en el genoma del hongo.

Se realizó una extracción de DNA genómico de las mutantes silenciadas y como cepas de control la Wis 54-1255 y una cepa transformante con el vector vacío integrado en el genoma.

Para ello se empleó la Taq DNA Polymerase, recombinant (life technologies, catálogo: MAN0000814). Ver tablas 7 y 8.

<b>Tabla 7. Reacción de PCR. Confirmación de integración del vector</b>	
<b>Componente</b>	<b>Volumen (µL)</b>
<b>Agua libre de nucleasas</b>	c.b.p 15µL
<b>10X Amortiguador Taq, - Mg</b>	1.5
<b>50 mM MgCl<sub>2</sub></b>	0.5
<b>10 mM dNTP mix</b>	0.5
<b>10mM Pki1(gpd1)F</b>	0.5
<b>10mM Gpd1(pki1)R</b>	0.5
<b>DNA genómico</b>	30 ng
<b>Taq DNA Polymerase, recombinant (life technologies, catálogo: MAN0000814)</b>	0.3

**Tabla 7. El DNA genómico empleado correspondió a la cepa Wis 54-1255 y una transformante con el vector de silenciamiento vacío como controles. El gDNA restante correspondió a las transformantes.**

<b>Tabla 8. Condiciones de reacción (PCR). Confirmación de integración del vector</b>			
	<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
	<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	5 m
<b>30</b>	<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 s
	<b>Hibridación</b>	62.5°C	1 m
	<b>Extensión</b>	72°C	45 s
	<b>Extensión Final</b>	72°C	10 m
	<b>Infinity Hold</b>	4°C	∞

**Tabla 8. Perfil de temperaturas programado en el termociclador para la reacción de PCR.**

#### 6.4.9 Digestiones enzimáticas

Las digestiones se realizaron con el fin de obtener fragmentos específicos de DNA para poder comprobar que los amplicones obtenidos a partir de la PCR lograron incorporarse al sitio de clonación

del vector, para obtener los extremos romos en el amplicón y el vector para la ligación, finalmente para linealizar el vector de silenciamiento. Las digestiones se llevaron a cabo siguiendo las especificaciones del protocolo establecido para *NcoI* 500 u/μL (Invitrogen, Catálogo: ER0571).

#### 6.4.10 Desfosforilación del vector de silenciamiento

Una vez digerido el vector y purificado, este se desfosforiló de acuerdo con las especificaciones del protocolo de FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific, Catálogo: EF0651). Terminada la fosforilación se purificó nuevamente.

#### 6.4.11 Ligación de Amplicón y Vectores

La ligación de fragmentos de DNA provenientes de productos de PCR (amplicones) y de vectores se realizó con T4 DNA ligasa (Thermo Scientific, Catálogo: EL0014) siguiendo las especificaciones del proveedor.

#### 6.4.12 Purificación

Para la purificación de productos de PCR y el vector de silenciamiento se siguieron las especificaciones del protocolo del Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Catálogo: A9282).

### 6.5 Transformación de bacterias

#### 6.5.1 Obtención de Células ultra competentes (*E. coli* DH5α)

Una célula ultra competente es aquella que se encuentra en un estado inducido en el cual fácilmente introduce material genético del exterior, sin embargo, este proceso ocurre también de manera natural. El proceso de transformación de una bacteria fue de mostrado por Griffith en *Streptococcus pneumonia* (Chan, Verma, y Gan, 2013).

El método será tomado de Zuñiga Leon, E. (2010) y está basado en los protocolos desarrollados por Inoue y otros (1990); y Hengen (1996).

Para elaborar el preinóculo se inocularon 25 mL de medio LB con 10-12 colonias de *E. coli* Dh5α, se incubaron a 37°C durante 8-10 h. Se inocularán 250 mL de LB con 2.5 mL del preinóculo y se dejó en agitación constante a 215 rpm y 18 °C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O) de 0.5-0.6 a 600 nm. Una vez alcanzada la D.O se transfirió a un baño de hielo por 10 min. Se centrifugó el medio a

4000-5000 rpm por 10 min a 4°C. El botón celular se resuspendió en 80 mL de amortiguador TB frío y se mantuvo en hielo por 10 min. Se centrifugó a 4000-5000 rpm por 10 min a 4°C. El botón celular se resuspendió en 20 mL de TB más 1.4 mL de DMSO y se mantuvo en hielo durante 10 min. El volumen final se repartió en alícuotas de 100 µL en microtubos de 1.5 mL, los cuales se sumergieron en nitrógeno líquido inmediatamente. Se almacenaron a -70°C.

#### 6.5.2 Transformación por choque térmico de *E. coli* DH5α

Se descongelaron las células ultra competentes (*E. coli*) en hielo y se agregaron 10 µL de ligación en los tubos que las contienen. (Todo se realizó en hielo). Una vez agregada la ligación se mantuvo por 35 min en hielo; transcurrido este tiempo se pasó a 42°C por 1 min y se regresaron al hielo por 2 min. Posteriormente se adicionó 1 mL de medio Líquido LB y se incubó durante 1 hora a 37°C. Al terminar la incubación se distribuyó el volumen de los tubos en placas de LB + ampicilina (placa por ligación). Se incubó 1 noche a 37°C.

#### 6.6 Transformación de *P. chrysogenum* por protoplastos

##### 6.6.1 Obtención de Protoplastos

Se inoculó una cuenta de conidios de  $5 \times 10^8$  de *P. chrysogenum* Wis 54-1255 en medio PMMY hasta que el tubo germinativo alcance una longitud media equivalente a unas 10-15 veces el diámetro de una conidia.

El micelio se recuperó por filtración a través de un embudo estéril con un filtro nytal de 30 µm de diámetro de poro y se lavó con 200 mL de NaCl 0.9% para eliminar restos de medio de cultivo. 2 g de biomasa húmeda recuperada se resuspendieron hasta un volumen final de 10 mL en amortiguador TPP. Por separado se preparó una solución de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich, Catálogo: L1412) disueltas en amortiguador TPP a una concentración de 20 mg/mL (la solución se esterilizó por filtración con jeringa utilizando una membrana millipore de nitrocelulosa de 0.22 µm de diámetro de poro. La solución de enzimas líticas y la biomasa que fue resuspendida se mezclaron en un matraz estéril de 250 mL, se incubó a 28°C y 80 rpm por 2 h. La liberación de protoplastos se monitoreó cada hora.

Una vez que los protoplastos fueron liberados en su mayoría, estos se filtraron a través de un embudo con filtro nytal estéril de 30 µm de diámetro de poro. El volumen filtrado se distribuyó en 4 tubos estériles de 10 mL y se centrifugó a 4°C a 2500 rpm durante 5 m. El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en 1 mL de amortiguador KCM. Las fracciones se recuperaron en un tubo y se llevaron

a un volumen final de 5 mL con amortiguador KCM. Para posteriormente ser centrifugados a 2500 rpm por 5 m y se resuspendidos en el volumen de KCM necesario para obtener  $2.5 \times 10^8$  protoplastos/mL, considerando que debe contener 10% de PCM. Para la cuenta necesaria de protoplastos por mililitro se utilizó un microscopio óptico y una cámara de Neubauer, se realizó una dilución 1:10 de la solución de protoplastos que junta las 4 fracciones y se llevó a 5 mL de KCM.

#### 6.6.2 Transformación

De la suspensión final de protoplastos se tomaron 100  $\mu$ L y se mezclaron con 10  $\mu$ g de DNA en tubos de 15 mL (este DNA corresponde a los vectores de silenciamiento vacíos y los vectores de silenciamiento con el amplicón de 500 pb integrado en el sitio de clonación). Se tomó en cuenta un control, que consistió en determinar la regeneración de los protoplastos y la aparición de colonias revertientes.

Las mezclas de protoplastos y DNA se incubaron en hielo por 20 m, pasado este tiempo se añadieron 500  $\mu$ L de amortiguador PCM (mezclando suavemente) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente mezclando ocasionalmente. Con el fin de disolver el polietilenglicol del amortiguador PCM se diluyó con 600  $\mu$ L de KCM, homogeneizando la mezcla y dejándola a temperatura ambiente hasta el momento de plaqueo.

#### 6.6.3 Plaqueo

Se prepararon las bases de las placas con 10 mL de medio Czapek/ Sorbitol 1M que con fleomicina a una concentración final de 30  $\mu$ g/mL en cajas Petri de 60 mm de diámetro. La mezcla de protoplastos y DNA fueron añadidas a 10 mL de medio Czapek/Sorbitol 1 M con 30  $\mu$ g/mL de fleomicina, se mezclaron cuidadosamente y se vertieron en las bases previamente preparadas. Se incubaron a 27°C por 7 días. Los controles positivo y negativo se plaquearon 100  $\mu$ L de la suspensión de protoplastos en medio 10 mL de medio Czapek/Sorbitol 1 M con 30  $\mu$ g/mL de fleomicina y sin fleomicina, respectivamente.

#### 6.6.4 Selección de clonas

Para la selección de clonas/transformantes se realizaron resiembras en diferentes medios de cultivo incrementado también la concentración del marcador de selección (fleomicina) con el fin de descartar falsos positivos. Los pasos de selección se describen a continuación:



6.6.4.1 Primer pase. Una vez que se observaron transformantes se tomaron las colonias se colocaron en placas con Czapek/Sorbitol 1 M más 45 µg/mL de fleomicina. Se incubaron a 27°C por 5 días. Cuando se tomaron las colonias se hizo con la menor cantidad de agar posible.

6.6.4.2 Segundo pase. De las colonias que mostraron crecimiento se tomó un trozo del centro de la colonia y se sembró nuevamente, pero esta vez en medio power con fleomicina 50 µg/mL. Se incubó durante 7 días a 27°C esperando observar conidiación en las transformantes.

6.6.4.3 Tercer pase. Con ayuda de solución salina 0.9% más 0.005% de Tween 80 y una varilla de vidrio se colectaron esporas para después ser sembradas nuevamente por estría en placas de medio power más 50 µg/mL. Este paso se realizó para el aislamiento de colonias homocariotes.

6.6.4.4 Cuarto pase. Las colonias que lograron ser aisladas se tomaron y se sembraron en una placa con medio power sin fleomicina. Se incubaron a 27°C hasta que se obtuvieron conidios maduros.

6.6.4.5 Quinto pase. Se colectaron nuevamente los conidios de la colonia y se sembraron nuevamente en placas de medio power sin fleomicina. La siembra se realizó en masivo.

## 7. Análisis Fenotípico

### 7.1 Extensión Radial

Se inocularon placas Petri de 30mm con medio PDA con una cuenta de 50 000 conidios/ mL. Se marcó la circunferencia de la colonia diariamente por 6 días. La incubación se llevó a cabo a 27°C. Se hizo un triplicado biológico de cada una de las muestras dejando un tamaño de unidades experimentales de 27 placas Petri. Los diámetros fueron medidos utilizando el software Image J tomando como referencia los pixeles equivalentes a 1 mm con una fotografía de referencia.

### 7.2 Cinética de conidiación

Se inocularon por triplicado biológico cajas de Petri de 30mm con medio Power. Se tomaron tres porciones del agar de la placa por muestreo. Las porciones tomadas se denominan plugs y se tomaron con un sacabocados con un diámetro interno de 0.8mm, se resuspendieron en 4 mL de NaCl 0.9% con triton 100x al 0.5% para poder desprender los conidios utilizando un vórtex. Una vez desprendidos los conidios estos se contaron utilizando una cámara de Neubauer. La cuenta se realizó considerando el cuadro central de la cámara (cinco cuadros) y considerando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{conidios}}{\text{mL}} = \frac{\text{Cuenta}}{\text{VCC}}$$

Donde, VCC, es el volumen total equivalente al volumen de los cinco cuadros considerados para la cuenta. La cuenta se multiplicó por el volumen de solución y se dividió entre el área de los plugs para expresarlo en conidios por  $\text{cm}^2$ .

### 7.3 Microcultivos

Los microcultivos se realizaron en tres tipos de medio diferentes: medio Czapek, medio PDA y Medio Power. Se cortaron cubos de cada uno de los medios con una superficie de  $1 \text{ cm}^2$ . En una placa Petri vacía y estéril de 50 mm, se colocó un portaobjetos estéril y limpio, sobre este se distribuyeron 3 cubos de medio previamente cortados (un cubo por medio). Se inocularon los cubos en las esquinas y la parte central, después se colocaron cubre objetos en cada uno de ellos. En la caja también se colocó una pequeña torunda estéril y húmeda, para mantener la humedad en la caja. La caja se cerró y se incubó a  $25^\circ\text{C}$  durante 7 días. Terminado el tiempo de incubación se desprendió el cubreobjetos y se colocó sobre un portaobjetos. Los microcultivos se observaron en un microscopio óptico a 40X.

### 8. Análisis de la Expresión génica q-PCR

Para este experimento se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de 209 pb en el exón dos del gen PcSnt, con una distancia de aproximadamente 200 pb corriente arriba respecto al fragmento que fue utilizado para silenciar el gen. Se consideró llevar a cabo esta técnica utilizando al fluoróforo Syber Green y en dos pasos. El primer paso, la retrotranscripción para la síntesis de cDNA (ver punto 6.4.4) y después la reacción en tiempo real, de acuerdo con las especificaciones del kit Sso Advanced™ Universal IT SYBR<sup>R</sup> Green Supermix (BioRad Catálogo# 172-5016) . El gen de referencia que se empleó fue el gen de actina.

Debido a la situación sanitaria que se vive a nivel Mundial por la pandemia causada por coronavirus (COVID 19), fue imposible llevar a cabo la reacción de qPCR, se presentan los geles de las extracciones de RNA y las PCRs de punto final que se llevaron a cabo para probar que los oligonucleótidos que se emplearían funcionaban anillando y amplificando un fragmento de tamaño dado siguiendo las especificaciones Taq DNA Polymerase, recombinant (invitrogen, Catálogo 10342-053). Los perfiles empleados en las PCR's de punto final se encuentran en el Anexo1.

## 9. Análisis Bioinformático

Dada la naturaleza de los dominios de la proteína y las publicaciones que existen con relación a sus ortólogos, un análisis de las regiones reguladoras de los genes a los que se puede unir esta proteína se vuelve evidente y necesario.

En un trabajo conjunto con el Maestro en Biotecnología Eduardo Zúñiga León, se desarrolló un pipeline a través de un entorno interactivo (Jupyter notebook) utilizando python como lenguaje de programación (versión 3.8), que tiene como objeto identificar regiones reguladoras de los genes a los que se puede unir una proteína a partir de una secuencia (patrones), y, además, permite diferenciar si los patrones se encuentran en regiones intergénicas o fuera de ellas. Hasta el momento no existe una herramienta que pueda implementar esta acción, ya que sólo realizan cortes corrientes arriba del gen dado un tamaño (longitud), sin considerar los límites de los genes. A este pipeline, se le llamó Fbox.

Dicho pipeline se divide de manera general en cinco pasos. (1) Búsqueda bibliográfica y recopilación de datos; (2) Procesamiento de datos para la obtención de las secuencias intergénicas (archivo .txt generado con las secuencias de las zonas intergénicas, más las pares de bases corriente arriba de la zona intergénica que puedan desear adicionarse para el posterior análisis ya que muchos de los genes son regulados de manera distal (enhancers). (3) Búsqueda del patrón al que podría unirse la proteína de interés (PcSnt, en nuestro caso); (4) Obtención de frecuencias y gráficos para visualizar los datos obtenidos. (output del paso anterior, Dataframe y Gráficos); (5) Ontología Genética de los genes cuyo identificador resulta de la búsqueda de la secuencia buscada. Este último paso es crucial para la búsqueda debido a que permite analizar los procesos que puede estar regulando una proteína a partir de la transcripción o no transcripción de un gen. Los módulos de Python utilizados para desarrollar

el script se enlistan en el Anexo3 con su versión correspondiente Para la obtención del archivo .txt, debió fragmentarse en contigs el genoma del hongo, los cuales fueron guardados cada uno en un archivo en formato fasta, con el fin de hacer una correspondencia con el número “Pc” (número de identificación de cada uno de los genes). Posteriormente se asignaron las localizaciones de los genes, la orientación del gen (hebra sentido y antisentido) y el tipo de producto génico al que codifica cada gen del hongo. Los archivos que contenían los contig se tomaron y se ordenaron para que utilizando la ubicación de cada uno de los genes tomar la zona intergénica, asignando como zona intergénica del gen la secuencia que se encuentra corriente arriba del límite inicial del gen, la cual, termina una vez que se encuentre con el límite del siguiente gen. Calculando los tamaños de las zonas intergénicas y gracias a que se ha fragmentado y guardado el genoma en archivos .fasta, es posible añadir corriente arriba del límite distal al sitio de inicio de la secuencia codificante de un gen pb adicionales. (Ver

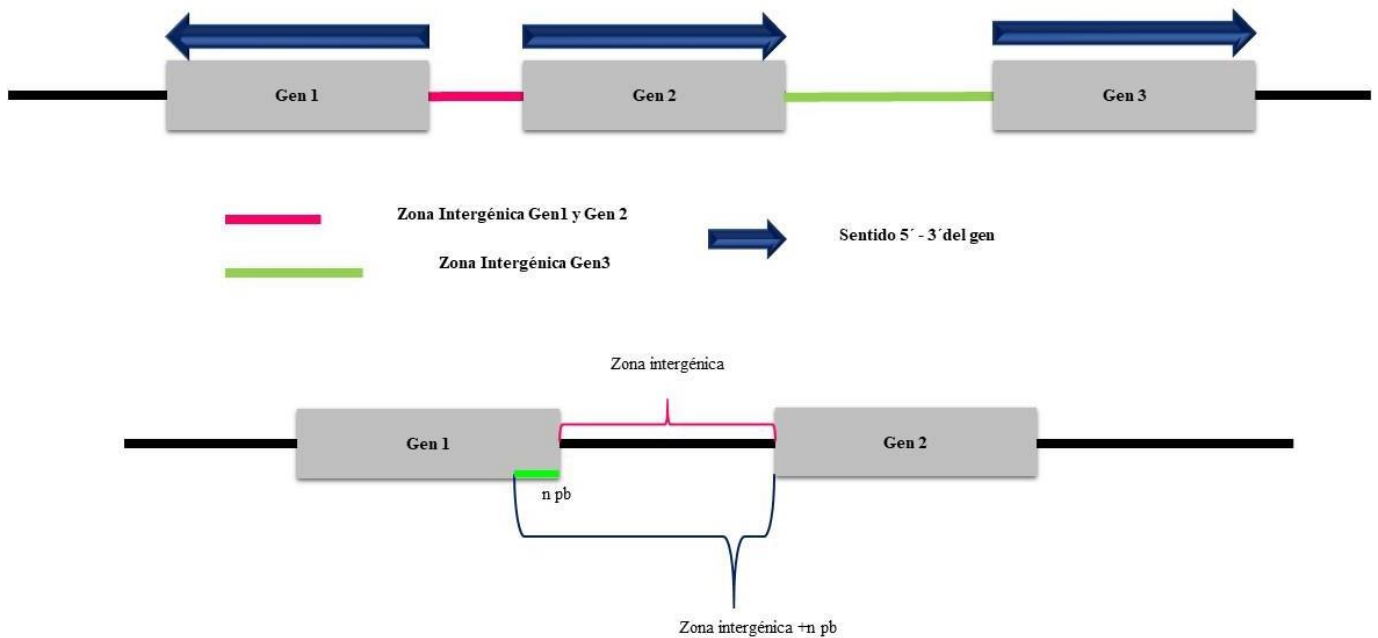


Figura8. Representación de cómo fueron consideradas las zonas intergénicas y la adición de pb corriente arriba a la zona intergénica ya delimitada.

La búsqueda de patrones dentro de la secuencia necesita de ingresarse el patrón que se pretende buscar, y el archivo .txt ya generado. Cuando no se está seguro sobre la base en una posición dada, se encierra entre corchetes las posibles bases de esa posición en el patrón que se introducirá para buscar. La función que se ejecuta en este punto busca a lo largo de cada una de las secuencias el patrón de búsqueda, que se ha introducido considerando las variantes que se especifican entre corchetes al introducir el patrón. Para cada gen en cuya zona intergénica encontró un patrón, se obtiene el número de identificación del gen al que pertenece la zona intergénica, la longitud de la secuencia en la que se buscó y la longitud de la zona intergénica, el patrón que identificó, las posiciones de inicio y fin de la caja dentro de la secuencia en que se buscó y si el patrón se encontró dentro o fuera de la zona intergénica. También es posible obtener el tipo de producto génico, (mRNA, rRNA, tRNA y misc\_RNA (producto génico que no se ha identificado como alguno de los anteriores)

A partir de este punto se calculan las frecuencias con que aparecen los patrones de las cajas que fueron buscadas, la frecuencia de los productos génicos y el número de genes en que la caja se encontró en la zona intergénica o fuera de ella. La frecuencia de los patrones de las cajas se representa también en un gráfico de pastel con los patrones y el porcentaje asociado a su frecuencia, un gráfico de pastel que representa la cantidad de genes dentro y fuera de la zona intergénica, finalmente se construye un gráfico de red, cuyos nodos corresponden a los patrones de las cajas encontradas, el tamaño del nodo está relacionado con la frecuencia con la que se encontró, los puntos negros que los rodean, representan a los genes asociados a esa caja. Y las relaciones entre cajas y genes se representan con líneas. Se recuperan los números “Pc” y se realiza su ontología genética de acuerdo con cada una de las tres categorías (proceso biológico, función molecular y componente celular), esto último se realiza con la finalidad de brindar más información sobre lo que la proteína regula. La ontología genética se representa en gráficos de red. El pipeline que se sigue se encuentra ilustrado en la Figura 9.

Para dar continuidad al análisis bioinformático se consideraron un par de aspectos más, la obtención del interactoma de la proteína PcSnt a partir del servidor STRING y la búsqueda de sitios de fosforilación en la proteína utilizando el servidor Netphos 3.1.

# "Fbox, pipeline"

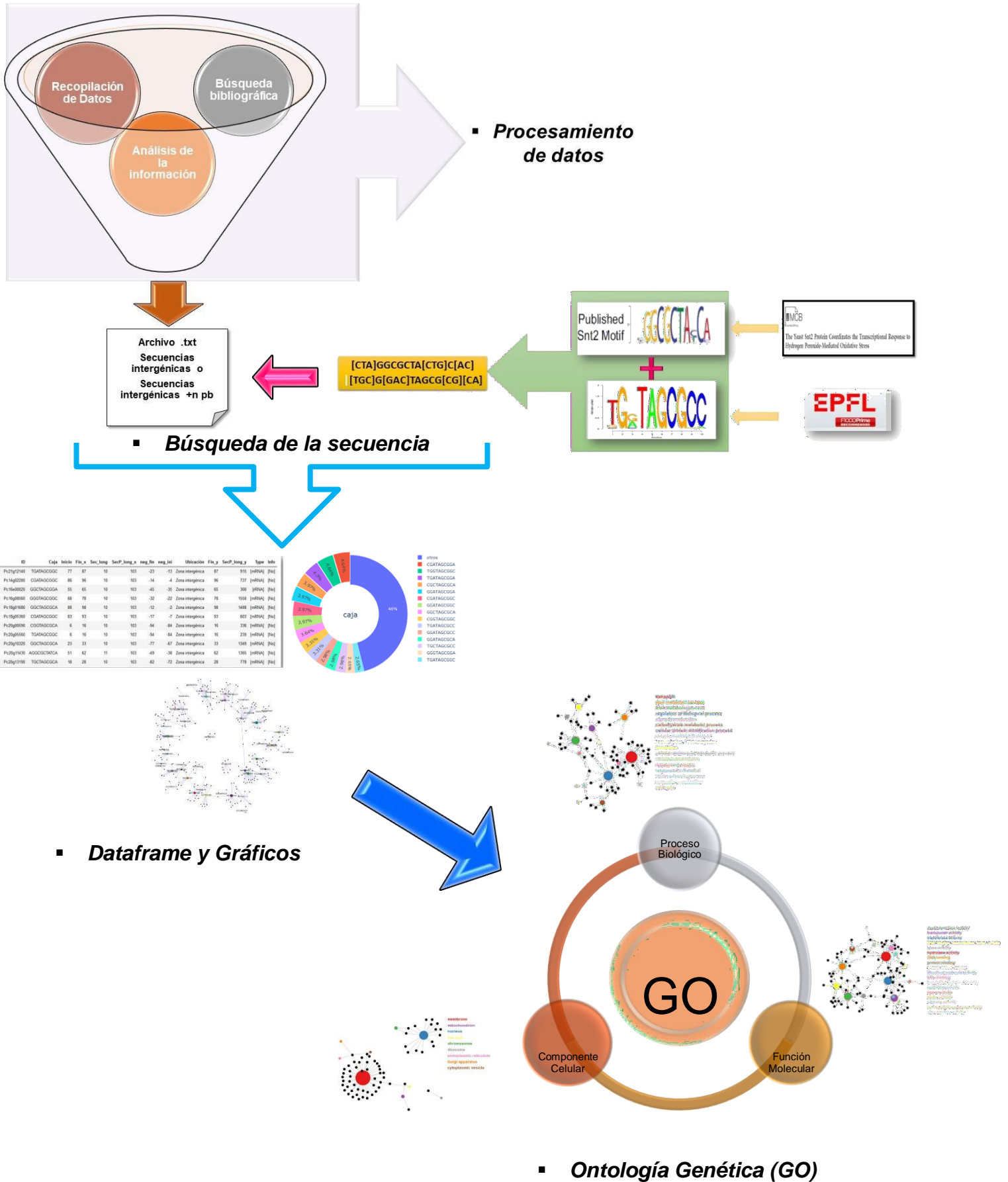


Figura 9. Representación gráfica del pipeline seguido para la realización de análisis bioinformático

## 10. Resultados y Discusión

### 10.1 Obtención, purificación y digestión del Amplicón

El amplicón correspondiente a 501 pb de bases en la región cercana al extremo 3' del gen *PcSnt*, logró amplificarse de acuerdo con las especificaciones redactadas en la metodología. Dicho fragmento fue posteriormente digerido con la enzima *NcoI* y purificado para así favorecer la ligación con el vector de silenciamiento pGpdPpKi-RNAi. Vector y amplicón con extremos cohesivos compatibles. Ver Figura 10

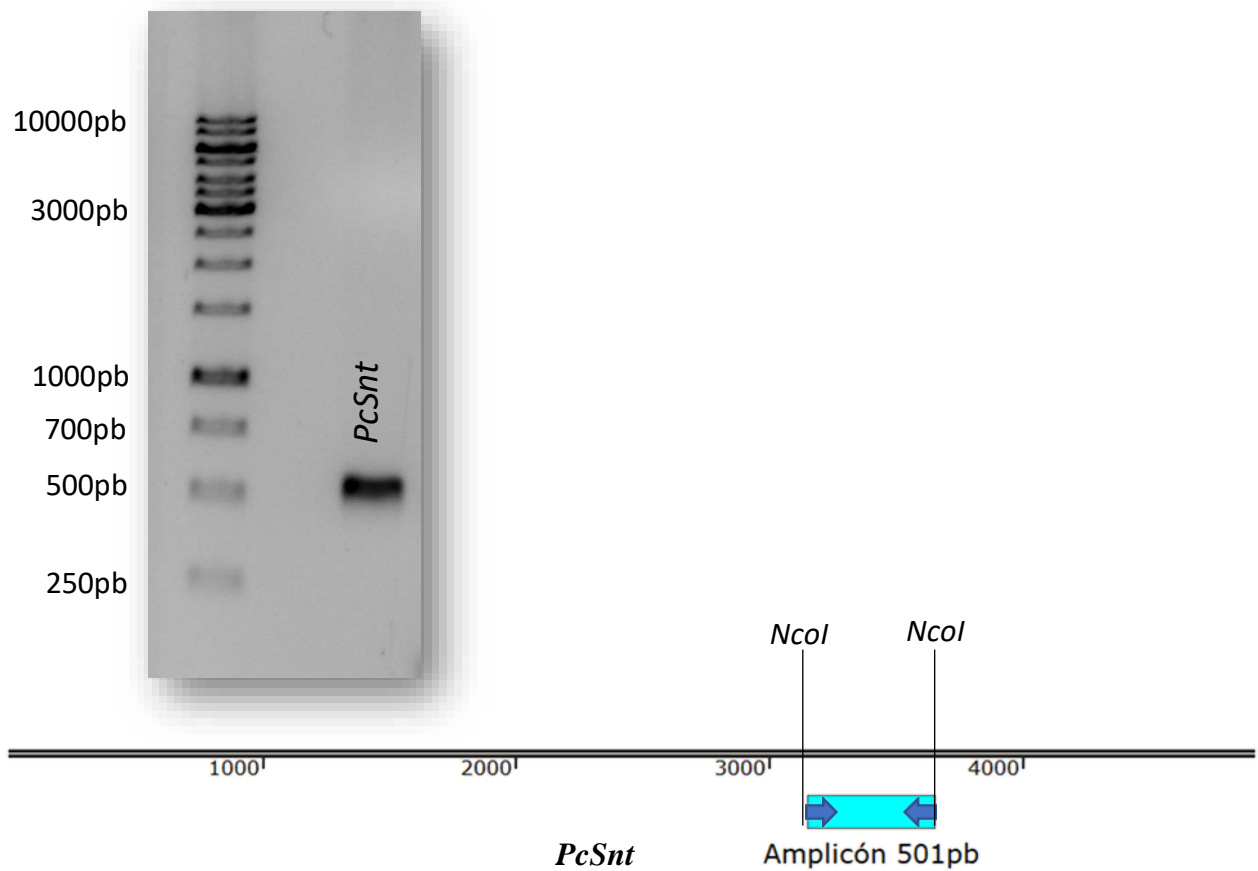


Figura 10. En la figura se muestra el amplicón correspondiente a 501pb del gen *PcSnt*. El amplicón fue digerido con la enzima *NcoI* 500 u/ $\mu$ L y. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa 0.8%.

## 10.2 Digestión, Desfosforilación y purificación del vector de silenciamiento

El vector de silenciamiento fue digerido con *NcoI* y purificado, el resultado puede observarse en la Figura 11. Esta digestión tuvo la finalidad de llevar al vector de su conformación circular a una lineal para dejar el sitio de clonación listo para ligar con el amplicón. Sin embargo, la presencia de los extremos 5' fosfato en el DNA plasmídico favorecen la recircularización del vector- plásmido-, más que la ligación del vector con el inserto debido a la termodinámica de las moléculas y de la reacción. La finalidad de desfosforilar el vector de silenciamiento previo a la ligación con el amplicón es la de eliminar los extremos 5'fosfato, favoreciendo la ligación del vector con el inserto y evitando la recircularización del mismo. (J.W y P.J., 1984)

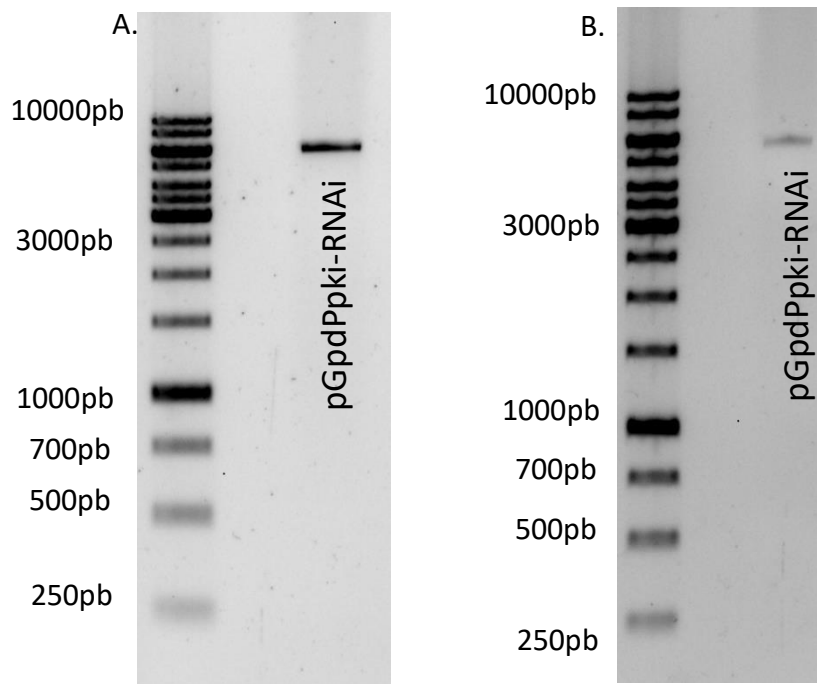


Figura 11. A. Vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi digerido con *NcoI* y purificado. B. Vector de silenciamiento pGpdPki-RNAi desfosforilado y purificado por el mismo Kit. La desfosforilación del vector se realizó empleando al vector digerido y purificado que se muestra en A.



### 10.3 Minipreps

Para analizar las clonas de bacterias obtenidas, se llevó a cabo una mini preparación, la cual, permitió la extracción rápida de DNA plasmídico. En la figura se pueden observar los geles de agarosa de la electroforesis para comprobar la integridad del DNA plasmídico, ver Figura 12.

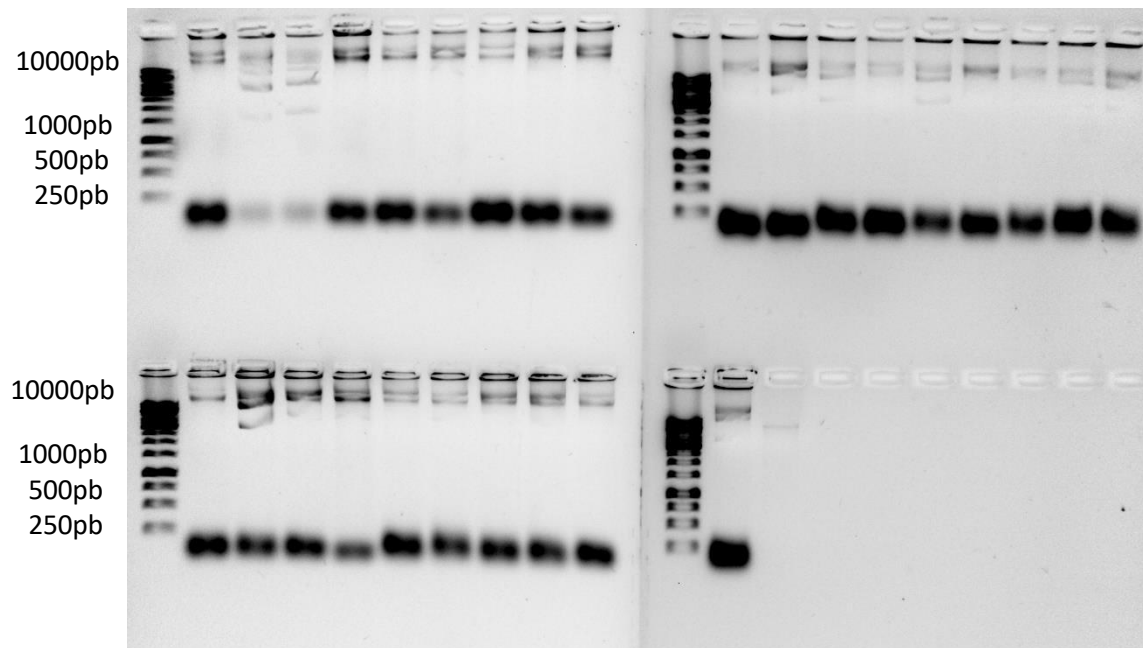


Figura 12. En la imagen se muestra el DNA plasmídico que se obtuvo después llevar a cabo la técnica de miniprep. Para realizar las digestiones de prueba se seleccionaron aquellos que lucían con mayor integridad. La electroforesis se llevó a cabo a 90V por 50 min. Debido al tiempo no es posible apreciar el marcador separado por completo. Las bandas intensas que se observan en la parte inferior corresponden a restos de fragmentos cortos de DNA que no corresponden al DNA plasmídico, son observables debido a que al ser la miniprep una extracción rápida, no se llevan a cabo muchos pasos de purificación. Las bandas superiores corresponden al DNA plasmídico.

#### 10.4 Digestiones Minipreps

El DNA plasmídico obtenido de la miniprep y seleccionado fue digerido con *NcoI* para confirmar la construcción del vector pGpdPpki-RNAi-*PcSnt*. Puede observarse el amplicón de 501 pb que fue insertado en el vector, ya que una banda corresponde al tamaño del amplicón y bandas superiores que corresponden al vector en los carriles marcados (figura 13). En la figura 14 se muestra el mapa de la construcción del vector pGpdPpki-RNAi-*PcSnt*.

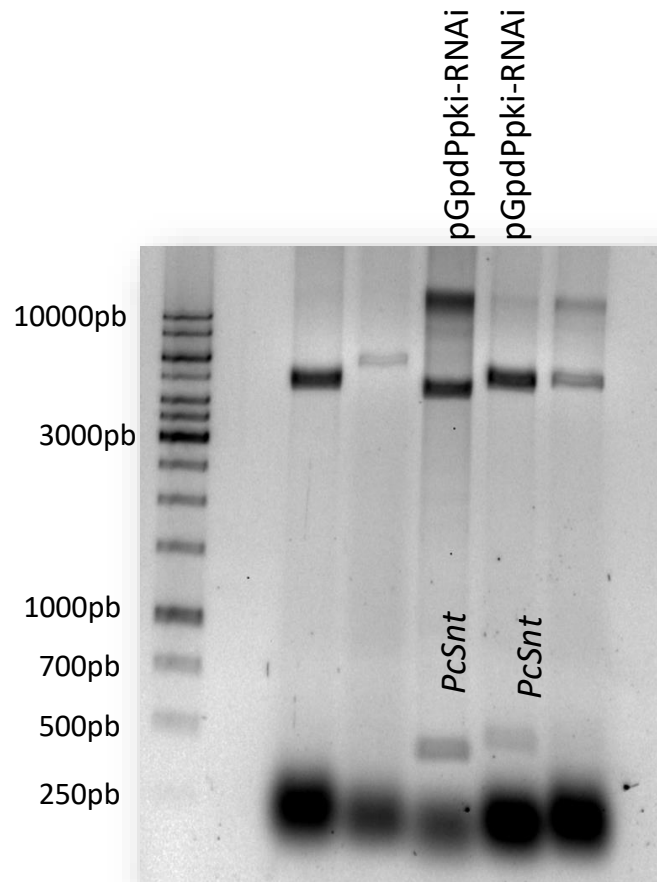


Figura 13. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 1 hora y 30 min en un gel de agarosa 0.8%. Se observan los fragmentos que corresponden al amplicón y digestiones parciales.

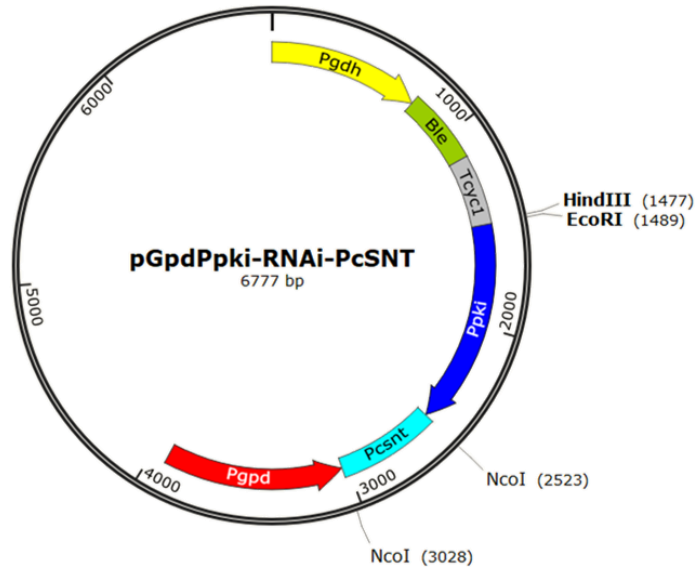


Figura 14. Construcción del vector pGpdPpki-RNAi-PcSnt.

### 10.5 Megapreps

Una vez Comprobadas las colonias de bacterias que contienen la construcción pGpdPpKi-RNAi-PcSnt, estas fueron resembradas -cultivo más grande- para extraer DNA plasmídico en mayor cantidad. A continuación, en la figura 15 se muestra el gel que muestra la integridad del DNA plasmídico después de la megaprep.

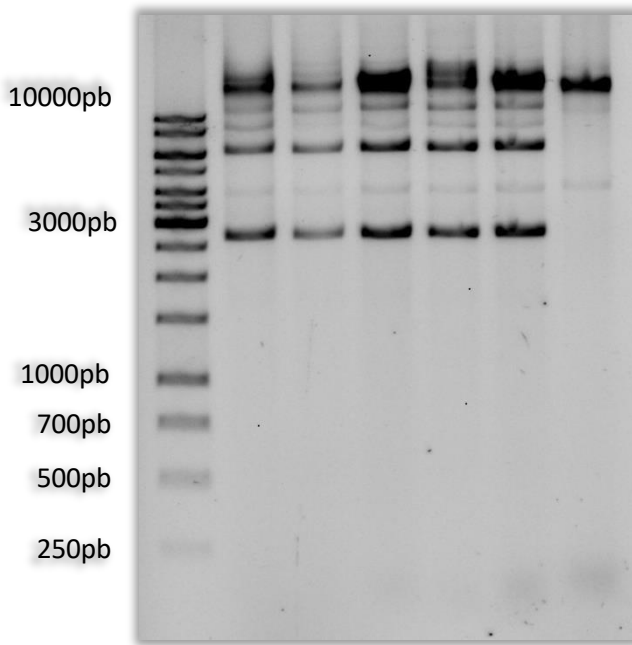


Figura 15. Se muestra el gel obtenido después de la electroforesis, la cual se llevó a cabo a 90 V durante 1 hora y 30 min. Se observa la integridad y limpieza del DNA plasmídico obtenido después de la megaprep. En algunos casos se observa una banda y en otros más de una banda, esto se debe a que la concentración de DNA plasmídico interfiere en la migración, así como también las condiciones de superenrollamiento que puede tener el DNA.

## 10.6 Confirmación de la construcción por PCR

Para la confirmación de la construcción se emplearon un par de oligonucleótidos que anillan en los promotores que flanquean el sitio de clonación -Ppki y Pgpd-. Como resultado, si el promotor se encuentra vacío se amplifica una banda de 255pb -control-, si el vector se encuentra ya construido se verá una banda de 501 pb -tamaño del amplicón- más las 255 correspondientes a los promotores, dando como tamaño 756 pb. Ver Figuras 16 y 17.

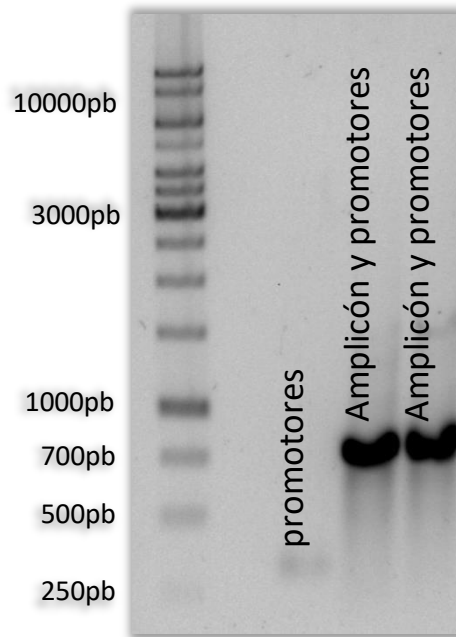


Figura 16. La imagen muestra que para el control -vector vacío- se logró amplificar una banda que ronda las 250 pb, en los carriles siguientes se observa que se amplifica una banda que ronda las 700pb, dichas bandas muestran un tamaño cercano al esperado.

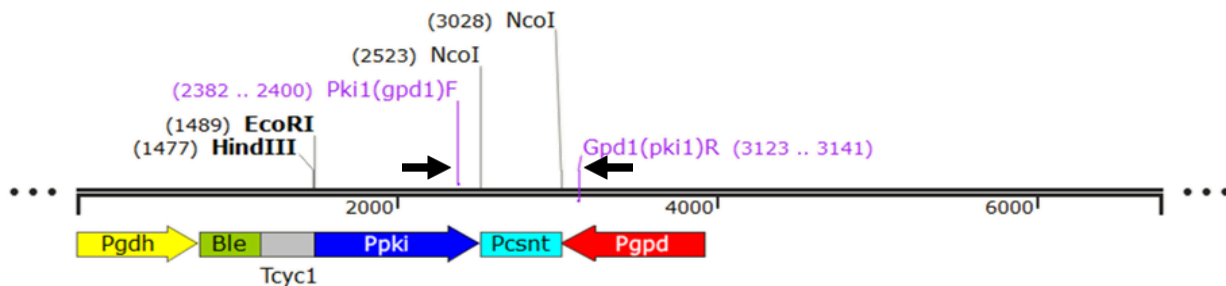
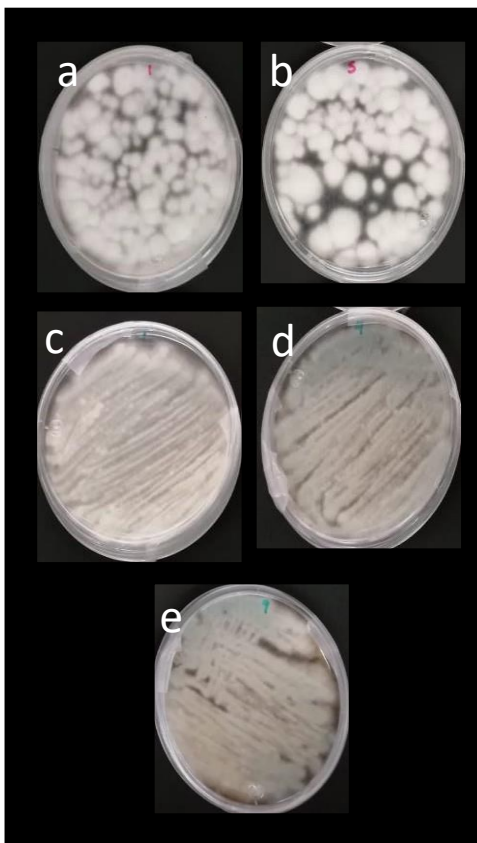


Figura 17. El esquema representa el sitio de anillamiento de los oligonucleótidos en los promotores Ppki y Pgpd.

### 10.7 Obtención de transformantes

Las posibles transformantes obtenidas, mostraron dos fenotipos muy diferentes entre sí. Uno de ellos consiste en colonias blancas que forman micelio aéreo algodonoso y que aparentemente no conidian, a este fenotipo se le denomina “fluffy” (Fisher y KÜres, 2003) y otras que forman micelio aéreo que conidia. Cabe señalar que lo reportado en la literatura con relación a cepas delecionadas del gen *SntB* en otros hongos filamentosos como lo son *F. oxysporum* y *N. crassa*, presentan como características la baja tasa de conidiación, el incremento de septación en la hifas, crecimiento radial más lento y baja producción de biomasa cuando crecen en medio líquido. (Denisov, Freeman, y Yarden, 2011) En la figura 18 se muestran las mutantes obtenidas.



Fotografía	Transformantes
a	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt(1)
b	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt(2)
c	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt(3)
d	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt(4)
e	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt(5)

Figura 18. Transformantes obtenidas, crecidas en medio PW durante 6 días. Es posible observar que se tienen dos fenotipos. Los incisos a y b corresponden a las transformantes que de manera aparente no conidian; c, d y e corresponden a las transformantes que conidian.

## 10.8 Extracción de DNA genómico de las transformantes

Para la extracción de DNA genómico de las posibles transformantes se siguió el protocolo antes descrito. En la figura 19, se observa la integridad de DNA genómico que se extrajo de cada posible transformante y de los controles que corresponden a la cepa Wis 54-1255 y un control que corresponde al vector sin inserto.

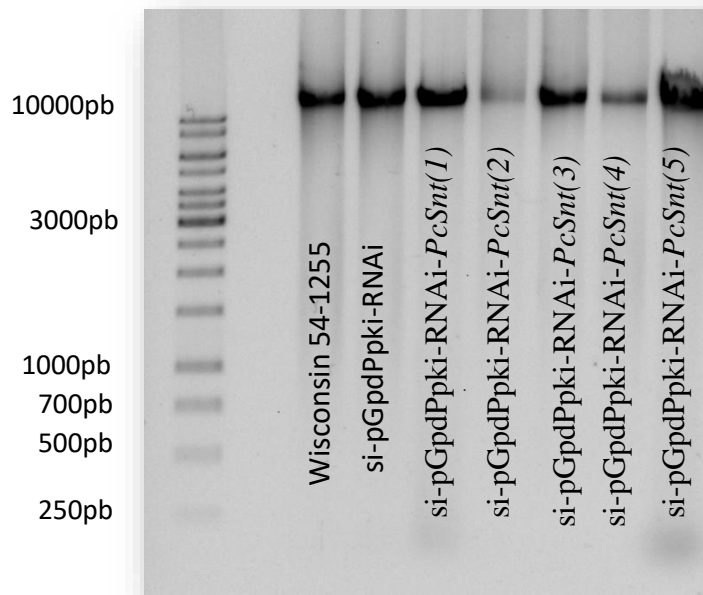


Figura 19. DNA genómico de las cepas Wis 54-1255, la cepa transformada con el vector vacío y las transformantes silenciadas en el gen *PcSnt* (si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt*(1), si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt*(2), si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt*(3), si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt*(4) y si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt*(5)).

## 10.9 Comprobación de la integración del vector pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* en el genoma de Wis 54-1255

Para esta confirmación se emplearon los oligonucleótidos empleados para confirmar la construcción del vector, los cuales anillan en los promotores que flanquean el sitio de clonación, el tamaño esperado de las bandas es 756pb tal en la prueba que confirma que la construcción del vector pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* se hizo correctamente. Los productos de PCR se muestran en la Figura 20.

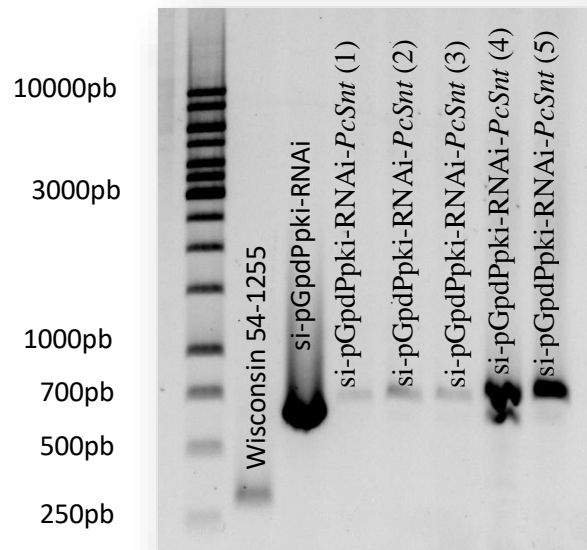


Figura 20. La figura muestra las PCR's de confirmación de integración del vector de las transformantes y dos controles, en primer lugar, la cepa Wis 54-1255, la cual es la cepa de referencia y la empleada en la transformación, seguida de una transformante con el vector vacío. Finalmente, las posibles transformantes.

#### 10.10 Análisis de la Expresión

El análisis de la expresión pretende abordarse mediante la técnica de qPCR, la cual se llevará a cabo de manera relativa, como gen de referencia se ha tomado el gen de actina. Se realizará en dos fases, para ello es necesario extraer RNA de las mutantes y las cepas control. El cultivo se realizó a las 72 horas. (Ver figura 21). Como medida preventiva de falsos positivos durante la qPCR debidas a la presencia de DNA genómico, se trató el ARN con DNAsa libre de ARNasa previo a la síntesis de cDNA. En la figura 22, se muestra un esquema general de los oligonucleótidos que se emplearon para la qPCR.

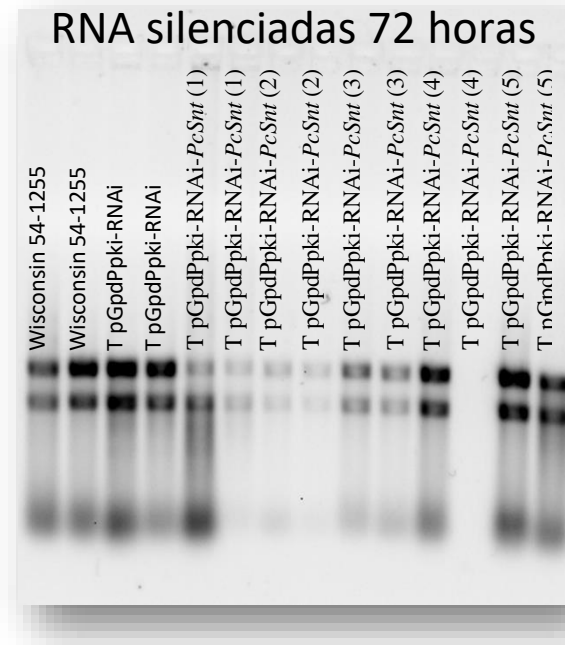


Figura 21. Extracción de RNA de las transformantes silenciadas y cepas control a las 72 horas

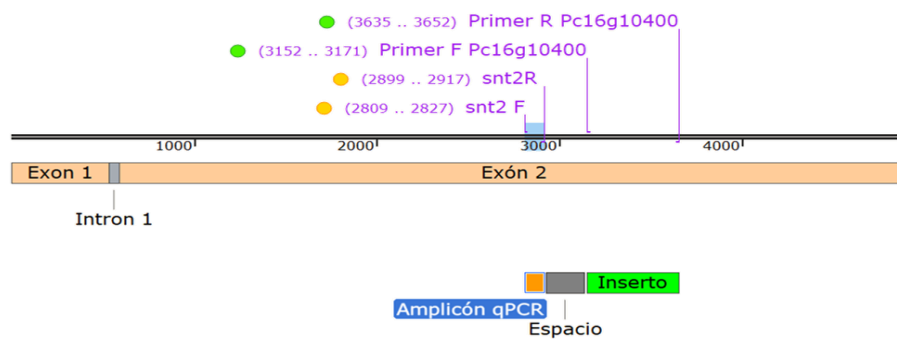


Figura 22. Mapa de los amplicones del gen *PcSnt* empleados para la qPCR y el inserto utilizado para construir el vector de silenciamiento.

Los oligonucleótidos que se emplearon para la qPCR fueron previamente probados con un gradiente de temperatura utilizando DNA genómico y cDNA de la Wis 54-1255. Se probaron cinco temperaturas diferentes. Finalmente la temperatura seleccionada para utilizar los oligonucleótidos fue de 55°C ya que en esta temperatura se obtuvo un fragmento amplificado del tamaño deseado para el gen de *actina* (gen control) y el gen *PcSnt* (gen del cual querían medirse los niveles de expresión en



las cepas silenciadas). Los gels correspondientes a dichas PCR de punto final con gradiente de cinco temperaturas se muestran en las figuras 23 y 24. Las secuencias de oligonucleótidos fueron tomadas de Domínguez-Santos et al., 2012.

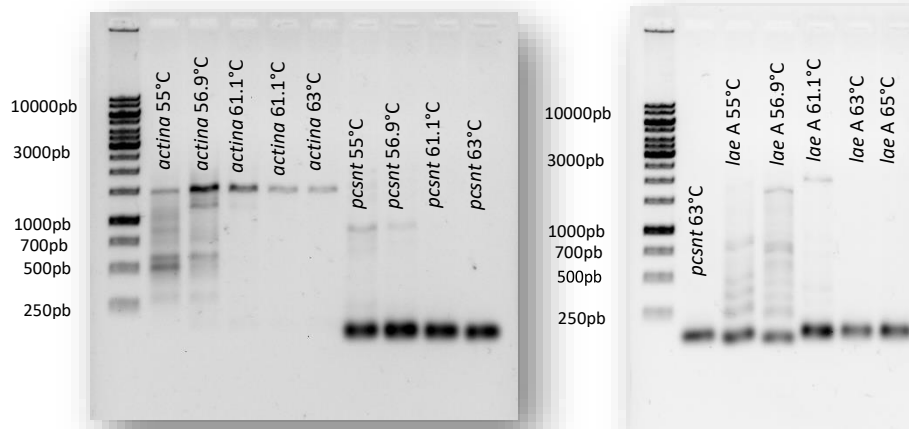


Figura23. Gel de agarosa 0.8% de la PCR Punto final con las parejas de oligonucleótidos empleados para la qPCR, Se empleó DNA genómico de Wis 54-1255 de molde.



Figura24. Gel de agarosa 0.8% de la PCR Punto final con las parejas de oligonucleótidos empleados para la qPCR, Se empleó cDNA de Wis 54-1255 de molde. La temperatura (Tm) seleccionada para continuar las pruebas de los oligonucleótidos de actina con todos los cDNAs sintetizados fue de 55°C. (Figura A1, Anexo1).

## 10.11 caracterización fenotípica

Para caracterizar fenotípicamente a las transformantes, se llevaron a cabo experimentos de cinética de conidiación, crecimiento radial y microcultivos.

### 10.11.1 Microcultivos

La estructura característica que los hongos filamentosos forman al crecer son las hifas, las cuales se generan a partir de una espora que germina seguida de una constante deposición de material de pared celular en la punta, permitiendo su extensión. Un hongo filamentosos es un organismo eucariota multicelular y multinucleado. La estructura que separa y permite la compartimentalización de las células que conforman al hongo, es el septo. Sin embargo, esta estructura no sólo marca dónde inicia y termina una célula a lo largo de una hifa, sino que también permite la comunicación entre ellas. La septación es resultado de la deposición polarizada de material de pared celular en sitios internos. (Plamann, 1996)

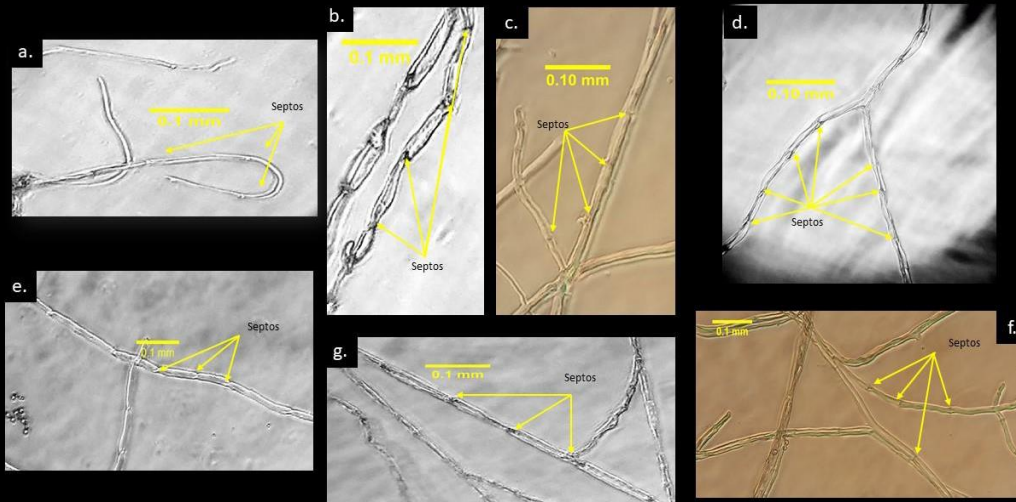
Al igual que las células de animales y plantas, las células de un hongo presentan un ciclo celular. Este ciclo está compuesto por dos fases: Interfase (G1, S, G2 y Go) y Fase M (mitosis y citocinesis). En hongos filamentosos el ciclo celular se conoce como duplicación celular ya que no existe una separación celular como tal. (Harris, Mitosis in Filamentous Fungi, 2006)

En partes previas al trabajo se ha mencionado, que esta proteína cuenta con un dominio relacionado con la septación de las hifas del hongo. En *Aspergillus nidulans* se ha descrito que su ortólogo, SntB, tiene la función de inhibir la septación. (Kraus y Harris, 2001) Los microcultivos realizados en tres diferentes medios (Czapek, PDA y Power), fueron observados en un microscopio óptico Olympus CH 40 con el objetivo de 40X. De acuerdo con Charles Krebs (Krebs, 2007). Ver figura 25. El cálculo del aumento se realiza considerando el foto-ocular y los lentes de la cámara como una unidad de magnificación más el objetivo del ocular que se está usando, dejando los cálculos de la siguiente manera:

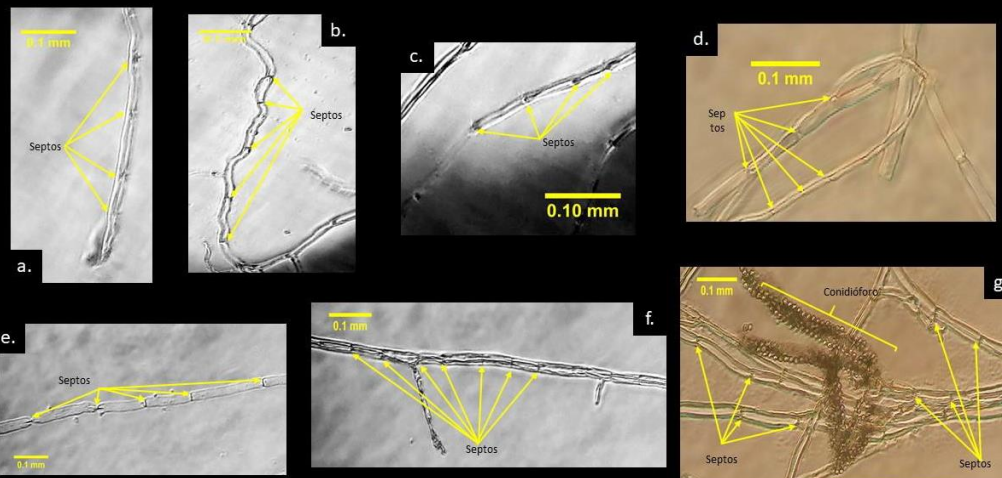
$$\text{Unidad de Magnificación} = \frac{\text{Distancia Focal}}{250} (\text{aumento del foto - ocular})$$

$$\text{Aumento} = (\text{Aumento del objetivo})(\text{Unidad de magnificación})$$

## MEDIO CZAPEK



## MEDIO PDA



## MEDIO PW

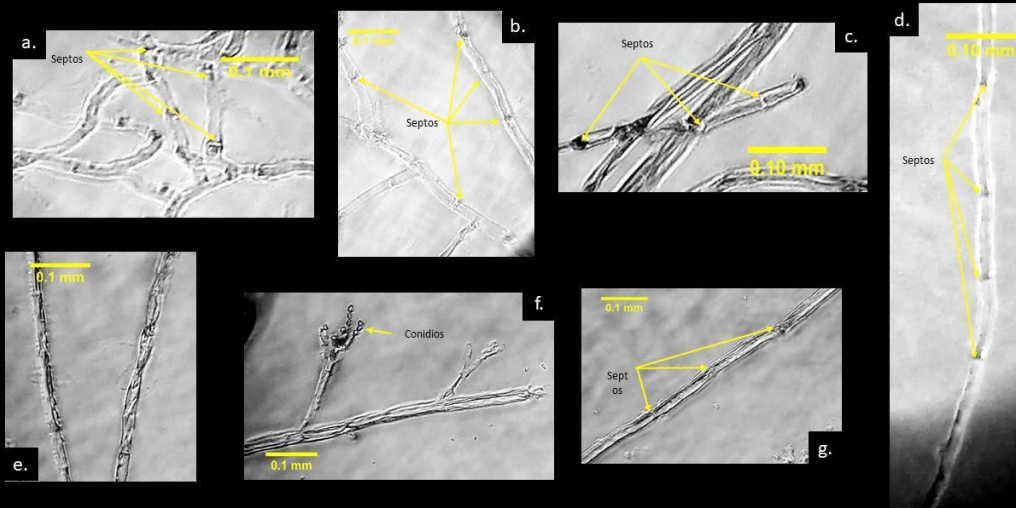


Figura 25. En la imagen se muestran las micrográficas realizadas a 85.01X, excepto Medio Czapek (d.), ésta tiene un aumento de 50.16X. 8 No se utilizó ninguna tinción, las micrográficas sólo se realizaron utilizando contraste de fases. En las micrográficas se presentan 7 cepas distintas, a y b

corresponden a las cepas de referencia, Wis 54-1255 y si-pGpdPpki-RNAi (transformante con el plásmido vacío) respectivamente; c y d corresponden a si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (1) y (2) ; y e, f y g corresponden a si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (3), (4) y (5). Los septos fueron señalados con flechas de color amarillo. . Las fotos presentadas en la figura 26 se realizaron utilizando el foto-ocular 3.3X y el objetivo de 40X.

En estas micrografías fue posible contrastar la morfología de las hifas que cada una de las cepas presenta como un primer acercamiento a la posible función del gen *PcSnt*. En la figura 25 se nota que las cepas silenciadas tienen hifas más delgadas respecto a las cepas de referencia Wis 54-1255 (control) y de si-pGpdPpki-RNAi (control). Cabe resaltar que en las cepas silenciadas también se observa una mayor cantidad de septos por hifa.

Para este experimento se consideraron tres medios distintos, uno específico (medio Power), uno complejo (PDA) y finalmente el medio que se emplea para dar mantenimiento al hongo (Czapek sin sorbitol, específico también). Utilizando el software ImageJ se registraron de cada una de las cepas en los diferentes medios las diferentes distancias que se presentaban entre cada uno de los septos de las hifas en mm. Los datos se analizaron con una prueba de Brown-Forsythe con un  $\alpha=0.05$  para cada medio, ya que no se cumplía con el supuesto de igualdad de varianza de los datos, además de que se contaba con un diseño desbalanceado, pues la cantidad de datos recabados estuvo en función de las micrografías tomadas; La hipótesis nula Brown-Forsythe, consiste en decir que las medias de la distancia entre septos, entre cepas son iguales.

Para los medios Czapek y PDA se rechazó la hipótesis nula, para averiguar las cepas que difirieron de otras se realizó una prueba post-hoc (Games-Howell  $\alpha = 0.05$ ). Para el caso del medio Czapek se observó que las transformantes silenciadas en el gen *PcSnt* difieren entre sí. si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (1) y si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (2), difieren significativamente de si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (4), sin embargo, sólo si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (1) difiere significativamente de Wis 54-1255 y de si-pGpdPpki-RNAi; En el caso del medio PDA se observó que si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (1) y si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (2), difieren significativamente de si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (5), pero no entre ellas y tampoco de los controles. Los medios utilizados tienen en su composición una cantidad diferente de glucosa. Para el caso del medio Power se tiene una concentración de 25 g/L, además de que se adiciona lactosa 5 g/L (disacárido) y sólidos de maceración de maíz, siendo el maíz un cereal rico en almidones; el medio PDA es un medio cuya concentración de glucosa ronda los 20 g/L más 4 g/L de extracto de papa (tubérculo rico en almidones); finalmente el medio Czapek tiene una concentración de 30 g/L.

En *A. nidulans* se ha encontrado que una fuente de carbono como la glucosa puede estar regulando una vía de transducción de señal que regula también la septación. (Kraus y Harris, 2001) En este experimento el medio cuyas medias de distancia entre septos presentó una mayor y significativa variación fue el medio con menor fuente de carbono (cZapek), seguido del que podría tener una concentración intermedia (PDA) y finalmente el que tiene mayor cantidad de fuentes de carbono (Power), lo que concuerda con lo encontrado en *A. nidulans*. Ver Figuras 26, 27 y 28. Esto sugiere que la septación en *P. chrysogenum* (Wis 54-1255) se está regulando de una manera similar. Ver Figura 29

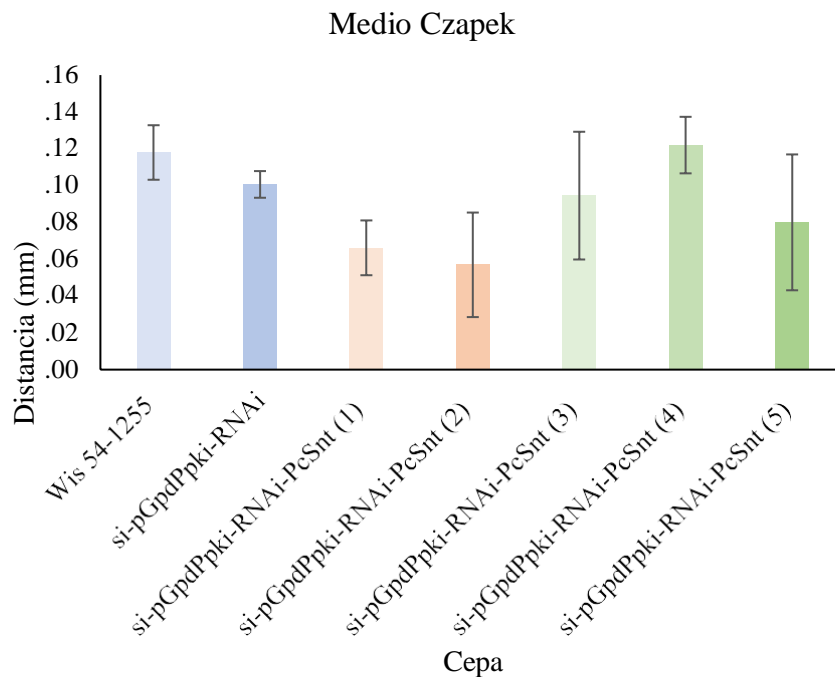


Figura 26. Gráfico de medias de distancia entre septos en mm de los microcultivos realizados en medio Czapek.

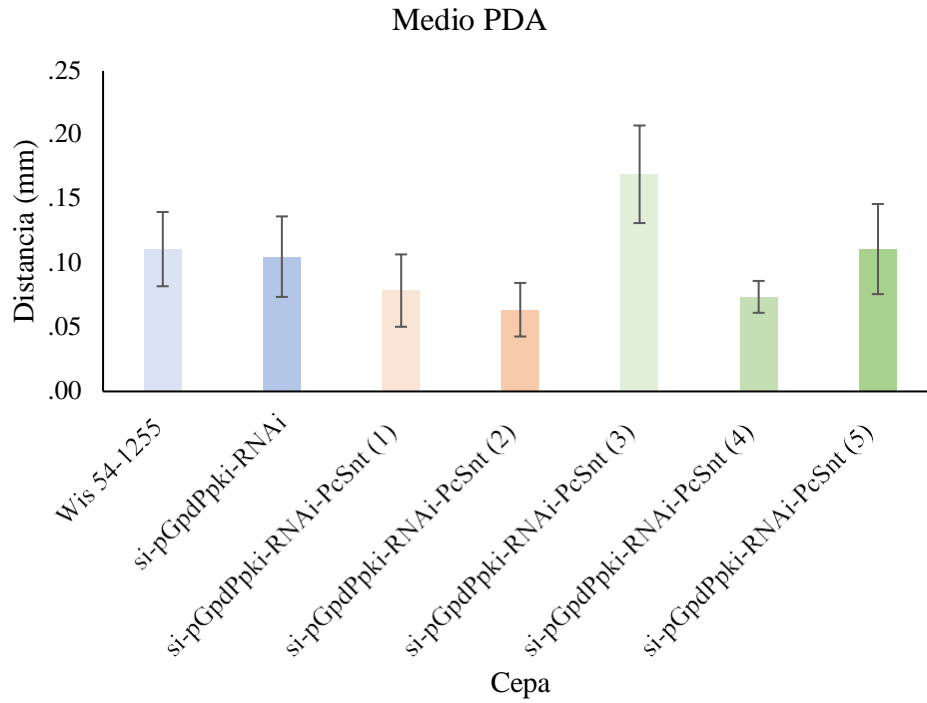


Figura 27. Gráfico de medias de distancia entre septos en mm de los microcultivos realizados en medio PDA.

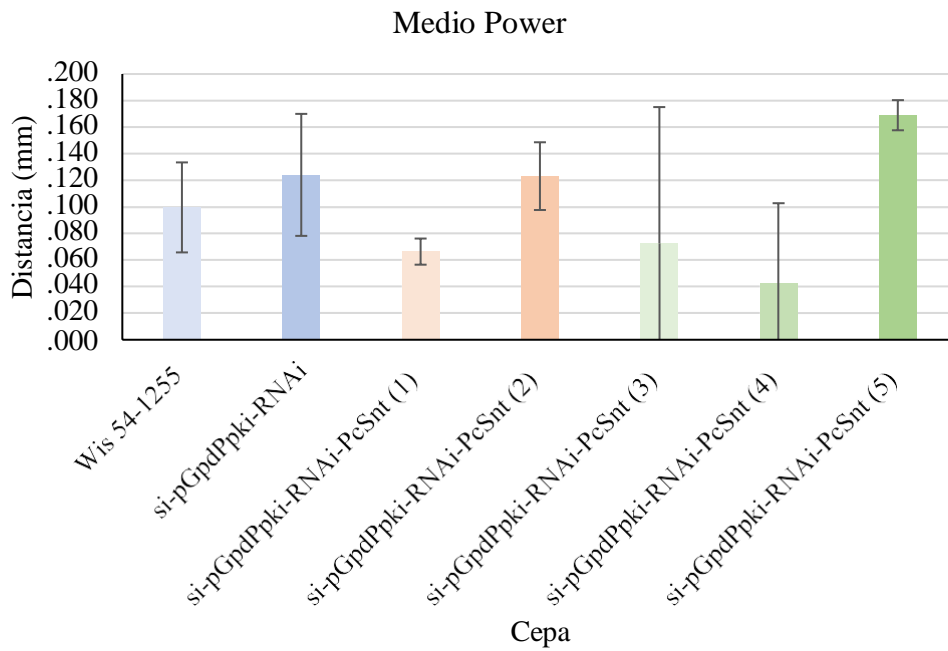


Figura 28. Gráfico de medias de distancia entre septos en mm de los microcultivos realizados en medio Power.

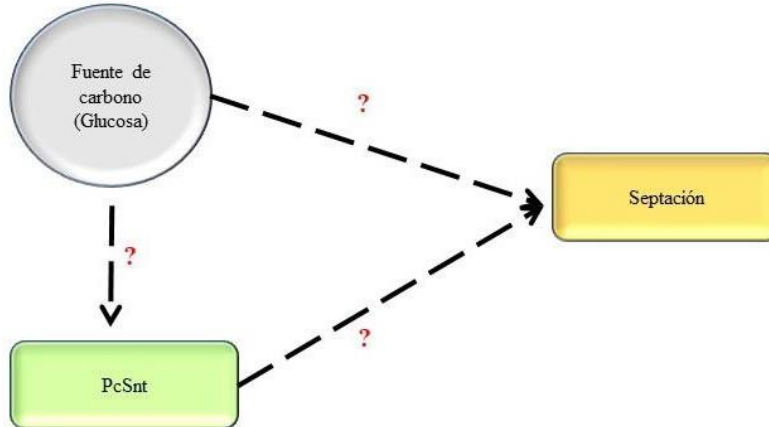


Figura 29. Esquema de probable regulación por fuente de carbono

#### 10.11.2 Extensión Radial

El crecimiento de un hongo filamentoso depende de la extensión y ramificación de sus hifas. Bajo una prueba de Brown-Forsythe con un  $\alpha=0.05$ , se obtuvo que existe diferencia significativa en las medias de la extensión radial de las cepas, se realizó una prueba de Games-Howell  $\alpha = 0.05$ , en dicha prueba se encontró que las cepas que difieren de Wis 54-1255, considerada la cepa control, son la transformante si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (1) y si-pGpdPpki-RNAi, la cual, es el control adicional en el experimento, esta última difiere de todas las cepas exceptuando a si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (1). Sin embargo, a pesar de las diferencias significativas encontradas, al observar el gráfico la tendencia de la extensión de las cepas es muy clara, mostrando una pendiente mayormente pronunciada para las cepas: Wis 54-1255, si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (3), si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (4) y si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (5) y una pendiente menos pronunciada para las cepas: si-pGpdPpki-RNAi, si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (1) y si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (2) (Ver Anexo2). Entiéndase la pendiente como la tasa de extensión radial, siendo las cepas con pendiente más pronunciada aquellas cuyas medias son más altas con respecto de las otras. Esto sugiere que el ritmo en las transformantes silenciadas se ha visto poco afectada, según la estadística. Ver Figura 30

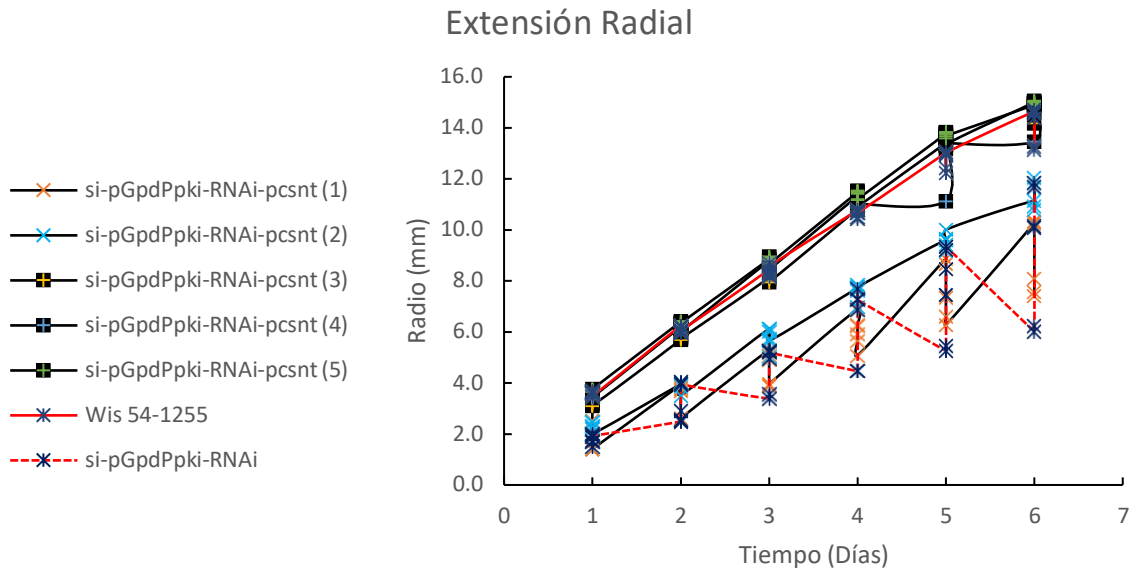


Figura30. Gráfico de extensión radial. En el eje y, se grafica el radio en las cepas en mm y en el eje x el tiempo en días. Los valores de desviación estándar se encuentran en el Anexo1.

### 10.11 .3Conidiación

Los conidios se colectaron como se describió previamente y se analizaron los resultados con una prueba de Brown-Forysthe con un  $\alpha=0.05$  se obtuvo que existe diferencia significativa en las medias de la cuenta de los conidios. Sin embargo, al llevarse a cabo la prueba de Games-Howell  $\alpha = 0.05$ , sólo una cepa difiere significativamente de las demás.

Debido a la situación sanitaria que se vive a nivel Mundial por la pandemia causada por coronavirus (COVID 19), fue complicado ingresar al laboratorio y como consecuencia poder trabajar bajo las condiciones regulares, es por lo que debe resaltarse que, al llevarse a cabo este experimento, fue difícil mantener variables de control importantes como lo fueron temperatura y humedad. Dado esto no es de sorprenderse que las cepas se encontraran bajo ciertos niveles de estrés y su comportamiento fuera tan variable, explicando así también las desviaciones estándar tan grandes que en la figura 31 se observan. En este experimento esperaba encontrarse diferencias significativas de dos mutantes (si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (1) y si-pGpdPpki-RNAi-*PcSnt* (2)) con respecto de los controles, ya que son las transformantes cuya conidiación al crecerlas se vio mayormente afectada, por ejemplo, forman micelio aéreo con casi nula pigmentación y llegan a conidiar pasados los 8 días de crecimiento.



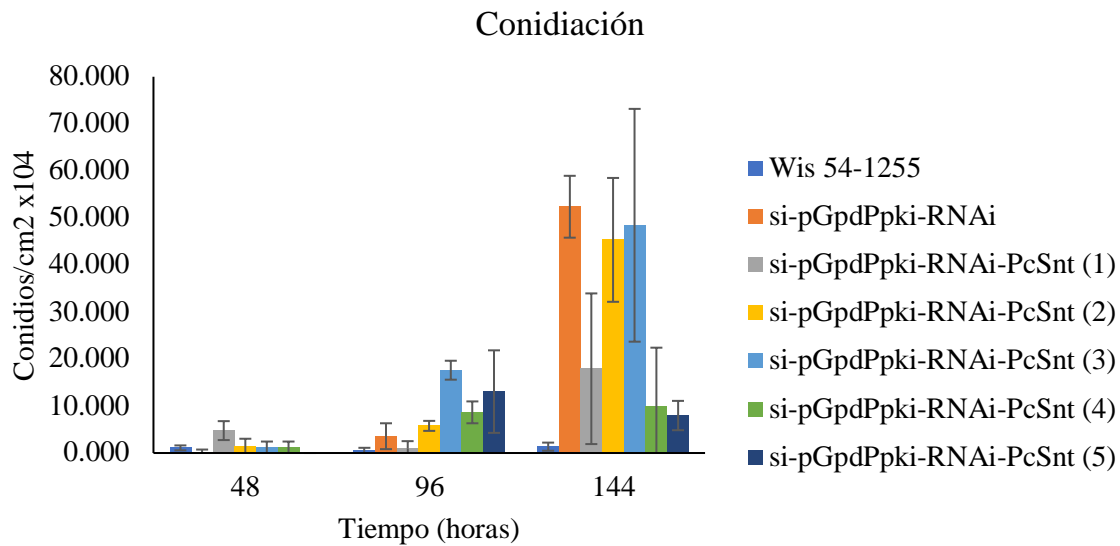


Figura 31. Gráfico de medias y desviaciones estándar correspondientes a cada una de las cepas en diferentes tiempos 48, 96 y 144 horas.

## 10.12 Análisis bioinformático

### Proteína PcSnt de *P. chrysogenum*

El gen clasificado como Pc16g10400 de 4909 pb con 2 exones de 535 pb y 4319 pb respectivamente codifica a una proteína con una longitud de 1617 aminoácidos. El número con el cual fue clasificado se debe a que cuando el genoma fue secuenciado los ORF's -Open Reading Frames- fueron nombrados con un código alfa numérico en el que las dos primeras letras Pc hacen referencia al organismo -*P. chrysogenum*-, seguidas de un número de dos dígitos que hacen referencia al número de supercontigs, seguidos de una g que significa gene, seguida de un código de cinco dígitos que coincide con el orden de los ORF's en los contig. (Van de Berg, Marco A, et al., 2008). Debido a la similitud con una proteína de *Saccharomyces cerevisiae* (YGL131C) se sugiere el nombre hipotético de PcSnt.

#### 10.12.1 Dominios

Un dominio proteico es una región en la proteína que evoluciona de manera independiente al resto de la misma – son considerados unidades de evolución-; se pliega de manera independiente y puede otorgar funcionalidad; también son regiones cortas y recurrentes que cuando varios tipos en una

proteína están presentes se le denomina a ésta multi dominio. Los dominios son las bases de clasificación de las proteínas.

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool), es un servidor que clasifica dominios proteicos según filogenia, clases funcionales, estructuras terciarias y residuos funcionales importantes. (Schultz, Milpetz, Bork, & Ponting, 1998). En el siguiente diagrama (figura 32) se muestran los dominios estructurales de PcSNT, de acuerdo con el diagrama esta proteína cuenta con un dominio bromo adyacente (BAH); tres dominios (PHD); y un dominio de unión a DNA, SANT, por; Switching-defective protein 3 -swi3-, Adaptor 2 -Ada2-, nuclear receptor co-repressor -N-CoR- y el factor de transcripción TFIIIB.

El dominio SANT, fue identificado como un fragmento de 50 aminoácidos aproximadamente, presente en subunidades de complejos remodeladores de la cromatina. (Boyer, Latek, y Peterson, 2004)



Figura32. Diagrama de los Dominios de la proteína PcSNT, SMART, 2019\_(<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Los dominios PHD, Plant Homeodomain -ya que fueron encontrados en plantas por vez primera-, se caracterizan por tener motivos de unión a DNA y por necesitar de átomos de zinc para mantener su estructura 3D interaccionando con residuos de cisteína e histidina para exponer los motivos de unión con los que cuentan, los cuales suelen tener estructura de  $\alpha$  hélices que normalmente interacciona con el surco mayor del DNA. La clasificación de los dedos de zinc está en función de cómo el zinc interacciona con los residuos de la proteína. Estos dominios es común encontrarlos en factores de transcripción. (MacPherson, Larochelle, & Turcotte, 2006) y estos dominios se caracterizan por reconocer las modificaciones de las histonas (H3 y H3K4) (Lu et al., 2019).

Finalmente, los dominios BAH, Bromo Adjacent Homology fueron encontrados por vez primera mientras se analizaban los dominios estructurales de la proteína polibromo de pollo. Se encontraron como dos secuencias adyacentes repetidas, de las cuales no se tenía conocimiento. En la actualidad

estos dominios están relacionados con interacción proteína a proteína y con remodelar la cromatina. (Yang y Xu, 2013)

Aunque SMART, tiene una base de datos muy completa, no es el único servidor que hace alineamientos para conocer los posibles dominios que integran a una proteína, algunos de estos ejemplos son: NCBI, pfam y Uniprot. Encontrar diferencias en los dominios funcionales entre cada servidor puede deberse a los modelos empleados para llevar a cabo los alineamientos, su actualización, filtros que cada una establece etc. En la figura 33 que se presenta a continuación se muestran los dominios reportados para diferentes bases de datos.



Figura 33. En este diagrama los dominios en cada base de datos se agrupan por color, siendo el color verde el correspondiente a la base de datos de NCBI, en color azul los correspondientes a pfam, en rojo los de SMART y en naranja Interpro. Los recuadros que representan a cada uno de los dominios fueron ordenados de mayor tamaño a menor tamaño, siendo los de mayor tamaño los que se encuentran sobre la línea central horizontal que representa a la proteína y hacia abajo los dominios de longitud más corta. La longitud de los dominios tiene una variación mínima sólo de algunos residuos. (Ver anexo1)

### 10.12.2 Búsqueda de patrones reguladores en zonas intergénicas de *P. chrysogenum*

En el año 2013 Lindsey A. Baker y colaboradores realizaron un experimento de Chip-seq en el cual, determinaron un patrón putativo de unión de SNT2 a DNA (ortólogo PcSnt, en *S. cerevisiae*). Se encontró también un segundo patrón en el servidor de EPFL (École polytechnique fédérale de Lausanne), cuyo patrón se obtuvo mediante la herramienta PWM (Position Weight Matrices). (Figura 34)

[CTA]GGCGCTA[CTG]C[AC]



[TGC]G[GAC]TAGCG[CG][C]

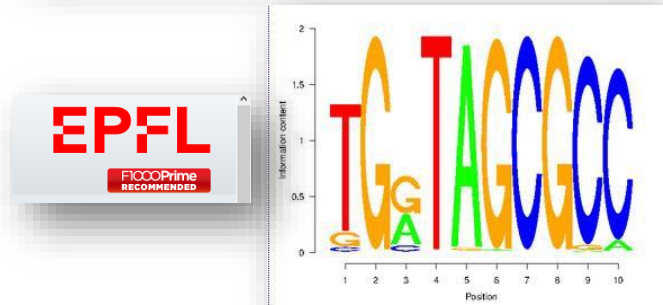


Figura 34. Secuencias que se emplearon para la búsqueda de genes que pueden estar regulados por PcSnt.

Se generaron cuatro archivos .txt diferentes. El primero, fue de zonas intergénicas; el segundo de zonas intergénicas +100 pb; el tercero de zonas intergénicas +500 pb; y el cuarto de zonas intergénicas +1000 pb. Los patrones de secuencia buscados estuvieron basados en los ya publicados para Snt2. Los patrones finalmente buscados fueron: [CTA]GGCGCTA[CTG]C[AC] y [TGC]G[GAC]TAGCG[CG][CA]. Esta forma de buscarlos incluye todas las posibles combinaciones ya que en ambos casos para algunas posiciones la base no es clara. Si la búsqueda se hace de manera única, es decir que se busque cada patrón por separado los resultados concluyen que para la primera secuencia 10 son los genes en los que se encuentra la caja, mientras que para la segunda son 214 genes (no únicos); cuando se buscan las dos cajas al mismo tiempo se obtienen 231 genes (no únicos) como resultado. También fueron analizados inputs de zonas intergénicas +100pb y zonas intergénicas +500pb, los resultados obtenidos de número de genes y cantidad de secuencias únicas encontradas se resumen en la Tabla 9. Es posible observar que los patrones encontrados entre un archivo y otro son poco variables, mientras que el número de genes encontrados incrementa conforme incrementa la longitud de las secuencias analizadas, siendo el input zonas intergénicas +1000pb el archivo en el que se encontró el mayor número de genes. En la tabla 9 también se compara la búsqueda de los patrones

de manera individual. Para el primer patrón la cantidad de genes encontrados fue menor siempre. El input que se empleará para continuar con el análisis será el input de zonas intergénicas +1000pb.

**Tabla 9. Genes y secuencias únicas según input**

Secuencia (patrones)	[CTA]GGCGCTA[CTG]C[AC]	[TGC]G[GAC]TAGCG[CG][CA]	[CTA]GGCGCTA[CTG]C[AC]	[TGC]G[GAC]TAGCG[CG][CA]	[CTA]GGCGCTA[CTG]C[AC]	[TGC]G[GAC]TAGCG[CG][CA]
Input	Número de genes	Número de Secuencias únicas	Número de genes	Número de Secuencias únicas	Número de genes	Número de Secuencias únicas
Zonas intergénicas	19	15	206	36	225	51
Zonas intergénicas + 100pb	24	15	240	36	264	51
Zonas intergénicas + 500pb	41	15	356	36	397	51
Zonas intergénicas +1000pb	64	15	531	36	595	51

**Tabla 8. Comparación de los distintos inputs empleados para la búsqueda de probables genes regulados por PcSnt. El número de genes no representa un número de genes únicos, los genes se encuentran duplicados**

Para el archivo procesado de regiones intergénicas + 1000 pb corriente arriba se obtuvieron un total de 54 secuencias únicas y de 572 genes. En la figura 35, observa el Top 20 de patrones únicos encontrados (los patrones de acuerdo con los considerados con los previamente reportados, para *S. cerevisiae*), la frecuencia de los patrones se reporta como porcentaje.

### Top 20 de Frecuencia de patrones de Secuencias Encontrados

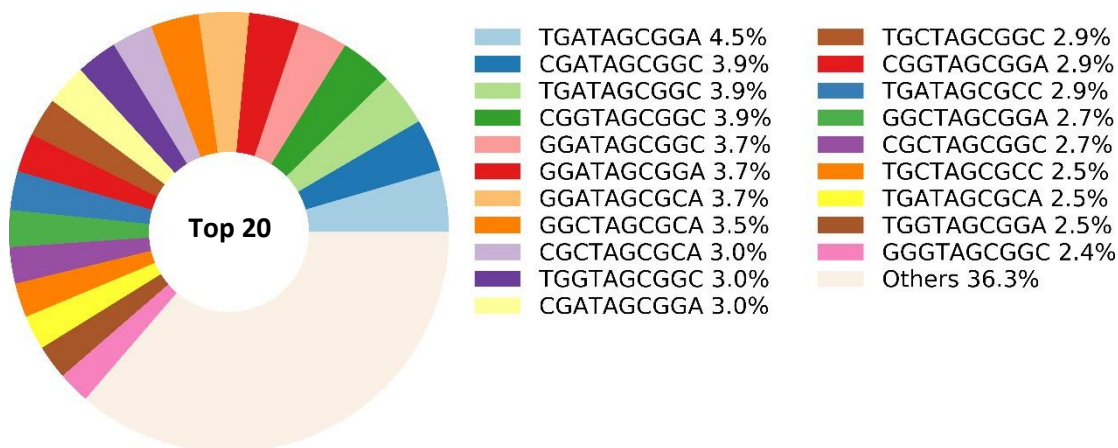


Figura 35. Gráfico de pastel que representa la frecuencia en porcentaje con la que una caja fue encontrada en todas las secuencias reguladoras.

La representación gráfica de red contiene las secuencias únicas (patrones putativos de unión) encontradas como nodos, el tamaño del nodo está relacionado con la frecuencia con la que fue encontrado el patrón, también se observa la cantidad de genes que fueron encontrados para cada uno de los patrones, en forma de puntos negros. Para algunos genes fue posible encontrar más de un patrón putativo de unión (46 genes). Los genes para los que esto ocurrió se observan unidos mediante una línea negra con los patrones que fueron encontrados. (Ver Figura 35) No debe olvidarse que los patrones buscados están descritos para *S. cerevisiae* basados en experimentos de chip-seq. No se ha logrado describir el patrón de unión real al cual se unen los ortólogos de PcSnt, sin embargo, no deja de ser un buen acercamiento para análisis posteriores. Por otro lado, podría enriquecerse esto considerando analizar los patrones putativos que fueron encontrados con una frecuencia elevada y sólo una vez por gen (especificidad), sin olvidar que las variantes en los patrones de unión puedan deberse a algún tipo de modificación postraduccional haciendo selectiva la regulación.

De los 572 genes, 369 se encontraron fuera de la región intergénica, 225 dentro de la región y sólo 1 en el borde de la región intergénica, es decir en el borde a partir del cual se agregan las 1000 pb a la secuencia; respecto a los tipos de producto génico a los cuales codifican, 583 son mRNA, 5 tRNA, 5 misc\_RNA y 2 rRNA; y finalmente la 303 de esos genes se encuentran en la hebra sentido y 292 en la antisentido. Esta información se describe en las Tablas 10, 11 y 12.



<b>Tabla 11. Tipo de producto Génico</b>	
<b>Tipo</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>mRNA</b>	583
<b>tRNA</b>	5
<b>misc_RNA</b>	5
<b>rRNA</b>	2

**Tabla 11. La tabla describe la frecuencia con la que se encontraron los diferentes tipos de productos génicos.**

<b>Tabla 12. Hebra que contiene la secuencia del gen</b>	
<b>Orientación</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>Hebra sentido</b>	303
<b>Hebra antisentido</b>	292
<b>Total</b>	595

**Tabla12. La tabla muestra la frecuencia con la que se encontraron los genes resultantes sentido o antisentido.**

Existen servidores que permiten descargar secuencias corrientes arriba del sitio de inicio de un gen, tal es el caso de RSAT, sin embargo, sólo permiten asignar una longitud igual para todos los casos y no delimitan la longitud de las zonas intergénicas, lo que no permite tener un conocimiento de si la regulación se encuentra dentro de la región intergénica o fuera de esta. Los potenciadores o enhancers y los silenciadores son secuencias que se encuentran de manera distal al sitio de inicio de la transcripción de un gen, sin embargo, son elementos que contribuyen a la regulación de la expresión de un gen.

A continuación, se presenta una comparación de la cantidad de patrones de secuencias encontradas utilizando como input un archivo de secuencias reguladoras proveniente de RSAT, en el que todas las secuencias tienen 1000pb y un archivo con las zonas intergénicas más 1000 pb corriente arriba de esta. Como resultado se observó que la cantidad de genes encontrados en RSAT están contenidos en los encontrados utilizando Fbox, y en número representan casi el 50% del total de genes de Fbox, es decir, se pierde información generando el input a partir de RSAT. (Ver Figura 36)



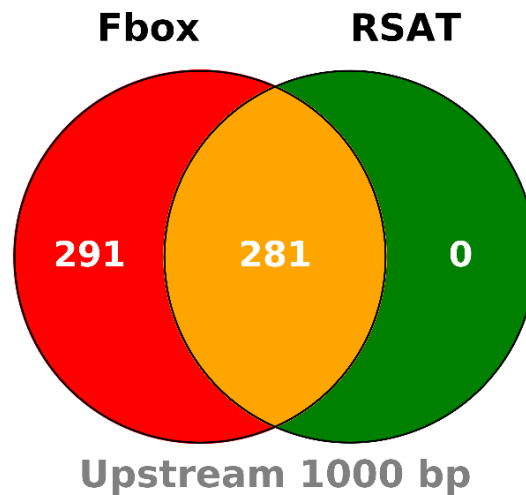


Figura 36. Diagrama de Venn que representa la cantidad de genes probablemente regulados por PcSnt, utilizando el input que genera RSAT y el que se genera con el pipeline que se propone en este trabajo (Fbox)

De acuerdo con la ontología genética de los genes que se obtuvieron como resultado de la búsqueda de los patrones de las secuencias de unión tomadas como referencia se puede observar que los procesos biológicos (Figura 37) en los que participan son varios y dentro de ellos destacan proteínas de unión a DNA. Lo que nos lleva a pensar que además de que PcSnt tiene la posibilidad de unirse a una parte de DNA dado el dominio SANT que presenta y que se le describe anteriormente, controla también la transcripción de otras proteínas que pueden estar mediando la transcripción de otros genes. Se encuentra también estrés oxidante, se ha visto que en *S. cerevisiae*, *S. pombe* SNT2 (ortólogo en estos organismos de PcSnt), participa en dos complejos distintos, siendo el primero RPD3 $\mu$ , cuyos componentes son Rpd3 (HDAC), Ecm5 y Snt2, dicho complejo se encuentra enriquecido en promotores de genes involucrados en la respuesta a estrés (McDaniel et al., 2013).

SNT2, es clasificada como una E3 ubiquitin ligasa, la ubiquitinación es una modificación postraduccional que consiste en marcar a una proteína agregando una ubiquitina, la cual servirá como señal de degradación, **esto es que ninguna proteína en la célula permanece de manera constante, lo que favorece que se lleven a cabo procesos en un determinado momento y que la célula responda a los factores ambientales.** La ubiquitinación involucra una cascada de enzimas E1, E2 y E3. La última, cataliza la formación de enlaces entre los residuos de lisina y el grupo carboxilo de la ubiquitina. En levaduras, se ha identificado el complejo Lid2 el cual, tiene como función regular la cantidad de histonas en la cromatina, a través de la ubiquitinación, siendo SNT2 partícipe de este complejo. (Singh et al., 2012)

PcSnt, parece estar involucrada en el ciclo celular. Este proceso, está compuesto por dos fases: Interfase (G1, S, G2 y Go) y Fase M (mitosis y citocinesis). En hongos filamentosos la Fase M, no siempre concluye en citocinesis, esta es la razón de que se le llame al ciclo celular, duplicación celular como en líneas previas ya se ha mencionado. Concluida la mitosis a lo largo de las hifas debe continuar un tránsito continuo de material celular, promoviendo que la formación de los septos deba estar sumamente regulada. La entrada al ciclo mitótico y demás partes del ciclo celular, así como en otras eucariotas superiores, en los hongos filamentosos está regulado por cinasas dependientes de ciclinas y fosfatasa, las cuales permiten un mayor control de la célula para cada uno de los pasos. La entrada a mitosis es controlada por la actividad de NimX, cuya actividad está a su vez controlada por NimT (Harris, 2006).

Los procesos metabólicos en los que el DNA es el punto central tienen como fin proteger la integridad de la información genética para el desarrollo y supervivencia de la célula. Así bien se ha visto que cuando existe daño en la molécula de DNA y éste no es posible repararse, entonces la célula se manda a apoptosis (muerte celular), dicho proceso puede desencadenarse también por estrés oxidante. Una vez que un conidio germina, en la célula se intercalan constantemente dos procesos, la duplicación del material genético y la formación de septos. En *A. nidulans* se ha visto que la formación de septos es un proceso relacionado con el daño del DNA. Esta relación indica que, en presencia de daño en el DNA, AnkA fosforila a NimX previniendo la entrada a mitosis y la formación de septos. NimX recuperará su forma activa gracias a NimT, una fosfatasa que remueve el grupo fosfato que AnkA le ha colocado. SntB, media la interacción entre los complejos proteicos que median la reparación del daño en el DNA y la actividad de NimX y NimT (Semighini et al., 2005).

Hasta este punto se observa que los resultados obtenidos sobre los procesos biológicos que regula PcSnt a partir de su unión a patrones específicos en el DNA concuerdan de manera directa e indirecta con lo que se ha descrito previamente en la literatura referente a otros hongos filamentosos y levaduras respecto a su ortólogo. Los productos génicos de los genes identificados después de la búsqueda del patrón de unión tomado, de acuerdo con la ontología genética según componente celular, se encuentran en su mayoría ubicados en la membrana celular, seguidos del núcleo y la mitocondria, otros componentes celulares fueron identificados para más información ver Figura 39. La ontología genética por Función molecular ilustra las funciones de los productos génicos, nuevamente el tamaño del nodo está relacionado con la frecuencia. Ver Figura 38.

## Ontología Genética. Procesos Biológicos

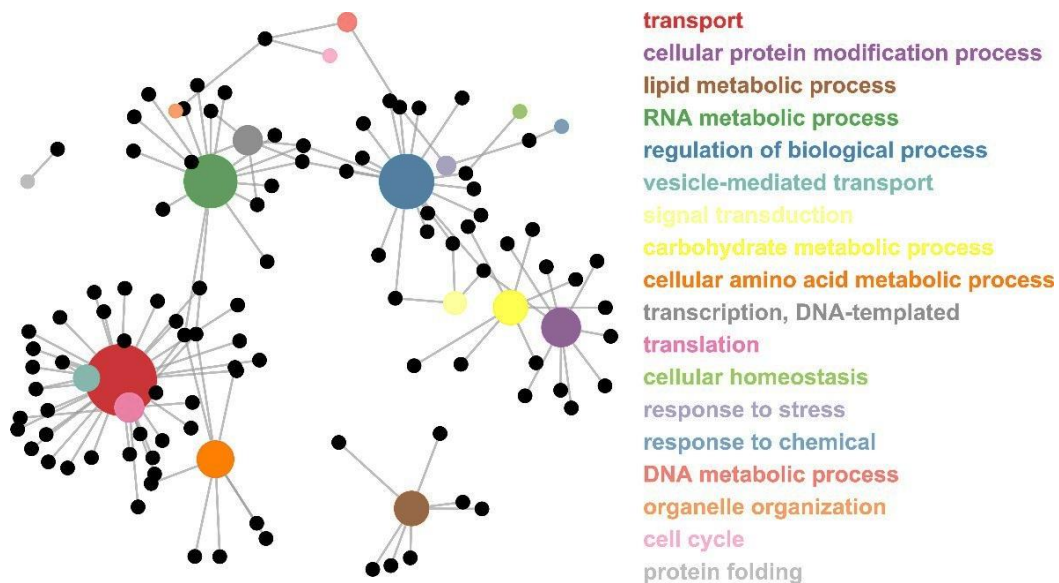


Figura 37. Red de Ontología Genética de los procesos biológicos en los que participan los genes probablemente regulados por PcSnt.

## Ontología Genética. Función Molecular

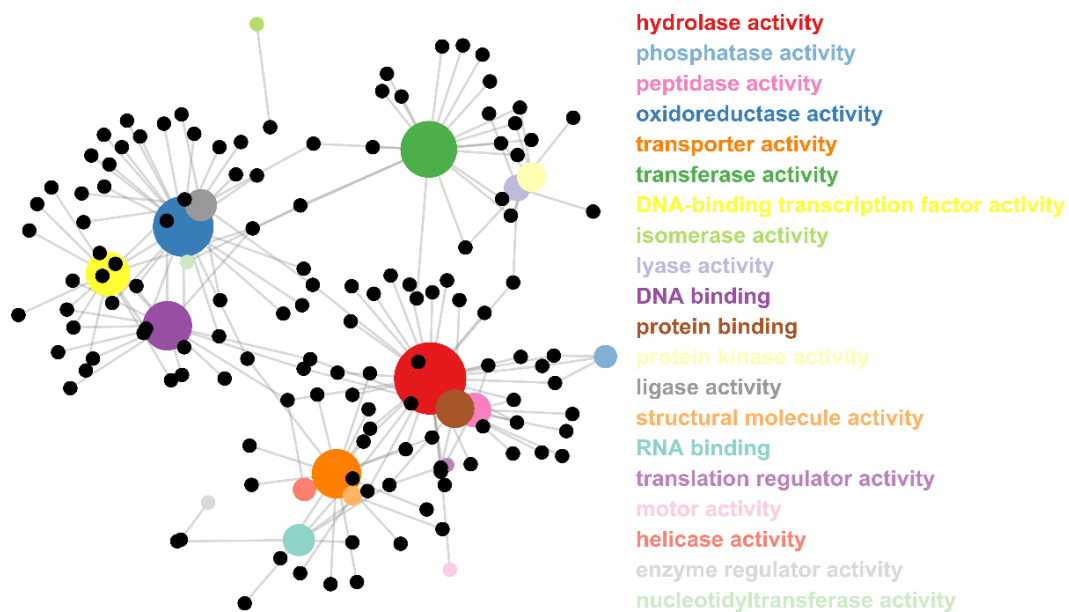


Figura 38. Ontología genética, de acuerdo con la función molecular.

## Ontología Genética. Componente Celular

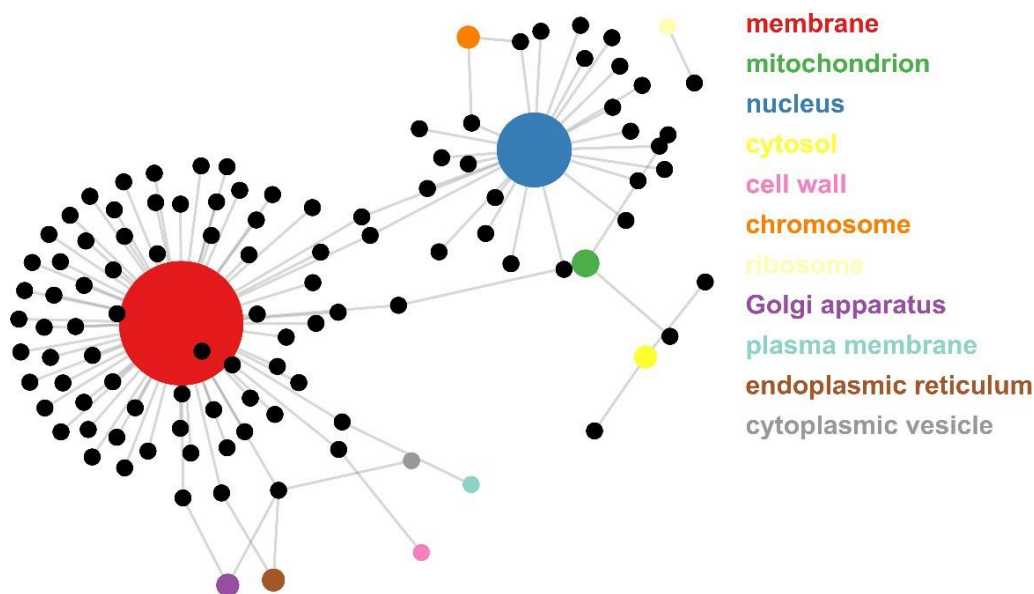


Figura 39. En el gráfico de redes se muestran los resultados obtenidos después de realizar la ontología genética según componente celular. Como nodos se resaltan los diferentes componentes celulares, el tamaño de nodos está directamente relacionado con la cantidad de genes, cuyos productos génicos se encuentran en ese componente.

### 10.12.3 Interactoma

Dada la participación de los ortólogos de PcSnt en complejos con otros organismos se llevó a cabo un interactoma utilizando el servidor de STRING versión 11.0. Se obtuvo como resultado la Figura 41 En hongos filamentosos y levaduras, se ha descrito un complejo llamado NuA4, una de sus unidades catalíticas es una Histona acetil transferasa, conocida en *A. nidulans* como Esa1. La razón de mencionar este complejo se debe a que algunas de sus unidades son Histonas acetil transferasas, se ha descrito previamente que Snt 2, pertenece a un complejo llamado Rpd3 $\mu$  y Lid2, en el cual se encuentra Rpd3, una Histona desacetilasa. El complejo Rpd3L, ayuda a mantener el estado de acetilación de histonas, las cuales, fueron acetiladas previamente por Esa1, se le conoce al complejo Rpd3L como un complejo supresor de Esa1. Observar que SntB tiene interacción con la HDAC Rpd3 (no se muestra en el interactoma) y con la HAT Esa1, muestra claramente que podría formar parte de un complejo similar a NuA4 en *P. chrysogenum*. En la figura, se muestra que representa el equilibrio en la acetilación de histonas que entre Rpd3 y Esa1 se genera. (figura 40)

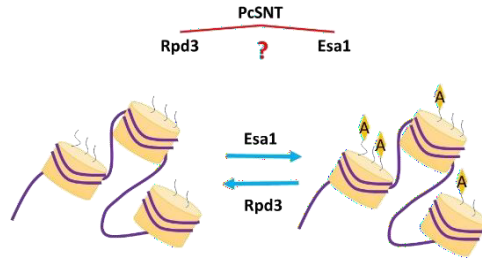


Figura 40. Esa1 y Rpd3, acetilación y desacetilación

En la tabla 13 que se presenta a continuación se enlistan los número de acceso de Uniprot de cada una de las proteínas obtenidas con sus respectivo ortólogos en *A. nidulans*. El resto de las proteínas resultantes del interactoma se enlistan en la tabla 14.

<b>Tabla 13. Interactoma</b>		
<i>P. chrysogenum</i>	<i>A. nidulans</i>	<b>Función</b>
<b>B6H981 (Pc16g10400)</b> <b>PcSnt</b>	Q5AQB3 SntB	E3 Ubiquitin ligasa
<b>B6HTJ4 (Pc22g09070)</b>	C8V3H4	Esa1. Histona acetil transferasa (Complejo NuA4)
<b>B6HQ72 (Pc22g06860)</b>	Q5B1EO	Histona acetil transferasa (Complejo NuA4)
<b>B6HEY9 (Pc20g08590)</b>	PO8844	Histona H2A
<b>B6HAB8</b> <b>(Pc16g12270)</b>	P23753	Histona H3
<b>B6HAB7</b> <b>(Pc16g12260)</b>	P23750	Histona H4
<b>B6GYM8 (Pc12g12440)</b>	P23751	Histona H4
<b>B6GYE6 (Pc12g15930)</b>	Q5B8Q9	Histona acetil transferasa (Complejo NuA4)

**En la tabla 13 se muestran las proteínas que se encontraron en el interactoma hecho con su respectivo ortólogo en *A. nidulans*, la función que llevan a cabo y si forman parte del complejo NuA4.**

<b>Tabla 14</b>	
<i>P. chrysogenum</i>	<b>Función</b>
<b>B6HNU8 (Pc21g18210)</b>	Homoserina O-acetiltransferasa
<b>B6HH83 (Pc20g06770)</b>	Histona acetil transferasa
<b>B6HGA8 (Pc20g11740)</b>	Histona H3

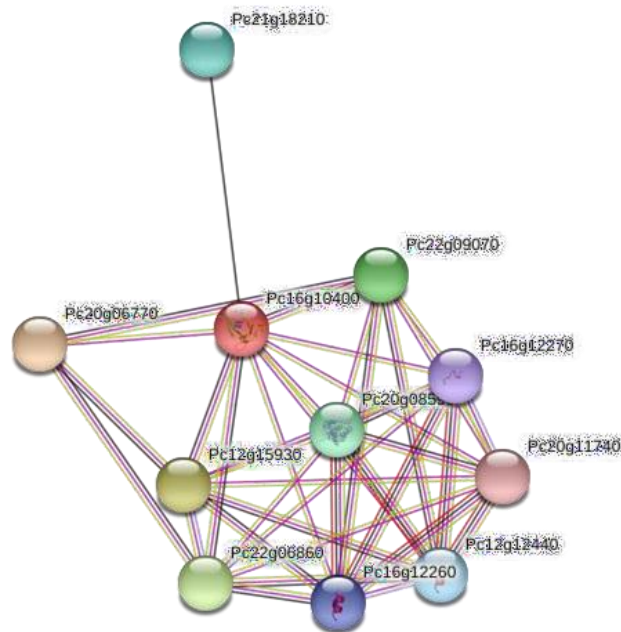


Figura 41. En color rojo se muestra en rojo a Pc16g10400, número que corresponde con PcSnt, el resto de las proteínas son aquellas que según el servidor STRIG 11.0 tienen relación con ella.

#### 10.12.4 Fosforilación

La fosforilación es una modificación postraduccional de vital importancia en la transducción de señales. Dado que se ha visto en estudios previos que PcSnt ha resultado fosforilada bajo condiciones específicas (Carrasco-Navarro, y otros, 2016), se utilizó el servidor NetPhos versión 3.1, el cual predice los sitios de fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Los dos sitios de fosforilación diferencial que resultaron de interés fueron la S738 y la S742. Esta última fosforilación únicamente presente en *Δpgal*. Ambos sitios resultaron presuntamente fosforiladas por CKII y PKC respectivamente, esta última se encuentra involucrada en la integridad de la pared celular, metabolismo de lípidos y ciclo celular, procesos que concuerdan con el perfil de procesos biológicos obtenidos para los genes que podría regular transcripcionalmente PcSnt.

## 11 Conclusiones

- Se logró amplificar por PCR un fragmento de la secuencia codificante del gen *PcSnt*.
- Una vez obtenido el fragmento de la secuencia codificante del gen *PcSnt*, se ligó con el plásmido de silenciamiento pGpdPki-RNAi
- Se obtuvieron cinco cepas silenciadas en la expresión de *PcSnt* mediante RNAi de *P. chrysogenum*. Dichas cepas mostraron dos fenotipos muy distintos entre sí. Por un lado uno que mostraba micelio poco pigmentado y baja conidiación y por el otro lado una cepa cuya conidiación era mayor, pese a los intentos no se logró realizar un estudio detallado sobre la conidiación. Dichos fenotipos pudieran deberse a efectos pleiotrópicos.
- En cuanto a la extensión radial 3 de las cepas silenciadas (si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3), si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4) y si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)), no mostraron diferencias significativas respecto al crecimiento que presenta la cepa control Wis 54-1255. Mientras que las cepas si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1) y si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2) mostraron una extensión radial más lenta con respecto de la cepa Wis 54-1255, pero no con la cepa que contiene el vector vacío (si-pGpdPpki-RNAi).
- En cuanto, a la morfología observada en las micrografías tomadas las cepas silenciadas mostraron hifas más delgadas y dos de ellas (si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1) y si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)) tuvieron una distancia entre septos significativamente menor con respecto a los controles en medio Czapek, el cual, contenía menor cantidad de glucosa respecto de los otros dos medios empleados (PDA y Power).
- *PcSnt*, puede estar regulado por glucosa y este regula a su vez la septación.
- *PcSnt* es una proteína multidominio con dominios de unión a DNA, que puede considerarse un lector epigenético.
- Mediante un análisis bioinformático empleando un pipeline (Fbox), se encontraron genes con una regulación putativa a nivel transcripcional, los cuales, están involucrados en vías de transducción de señal, estrés oxidante, ciclo celular, etc.
- *PcSnt*, puede encontrarse implicado en la vía de transducción de señal mediada por PgaI, ya que los procesos que regula están involucrados en los procesos de desarrollo del hongo (ciclo celular).

## 12 . Referencias

- Aguirre, J. s., Ri'os-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *TRENDS in Microbiology*, 13(3), 111-118. doi:10.1016/j.tim.2005.01.007
- Alberti, F., Foster, G. D., & Bailey, A. M. (2017). Natural Products from filamentous fungi and production by heterologous expression. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2(101), 493-500. doi:10.1007/s00253-016-8034-2
- Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic. *Nature Reviews, Epigenetics*, 17, 487-500. doi:10.1038/nrg.2016.59
- ARDITO, F., GIULIANI, M., PERRONE, D., TROIANO, G., & MUZIO, L. L. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*, 40, 271-280. doi:10.3892/ijmm.2017.3036
- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Muhammad, M. K., & Rasool, H. (2017). Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2), 182-196. doi:https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167
- B. Diez, E. A. (1987). Selection and characterization of pyrG mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5"-phosphate decarboxylase and complementation by the pyr4 gene of *Neurospora crassa*. *Curr Genet*, 12, 277-282. doi:10.1007/BF00435290
- Barreiro, C., & García-Estrada, J. F. (2012). Proteomics Shows New Faces for the Old Penicillin Producer *Penicillium Chrysogenum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-15. doi:DOI: 10.1155/2012/105109
- Bayat, A. (2002). Bioinformatics. *Science, medicine, and the future*, 324((7344)), 1018–1022. doi:10.1136/bmj.324.7344.1018
- Bölker, M. (1998). Sex and Crime: Heterotrimeric G Proteins in Fungal Mating and Pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 25(3), 143-156. doi:https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1102
- Böhm J, Hoff B, O’Gorman CM, Wolfers S, Klix V, Binger D, et al. Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(4):1476–81.
- Boyer, L. A., Latek, R. R., & Peterson, C. L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *NATURE REVIEWS Molecular Cell Biology*, 4, 1-6. doi:10.1038/nrm1314
- Carrasco-Navarro, U., Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Zúñiga-León, E., Reyes-Vivas, H., Fernández, F. J., & Fierro, F. (2016). Proteomic analysis of the signaling pathway mediated by the heterotrimeric G $\alpha$  protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum*. *Microbial Cell Factories*, 15(173), 1-17. doi:DOI 10.1186/s12934-016-0564-x
- Cole., G. T. (1996). Chapter 73. Basic Biology of Fungi. En *Medical Microbiology* (4th ed.). The University of Texas Medical Branch at Galveston.



- Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., & Liu, Y. (2011). RNA interference in Fungi: Pathways, Functions and Applications. *EUKARYOTIC CELL*, 10, 1148-1155. doi:10.1128/EC.05109-11
- Denisov, Y., Freeman, S., & Yarden, O. (2011). Inactivation of Snt2, a BAH/PHD-containing transcription factor. *Molecular Plant Pathology*, 5(12), 449-461. doi:10.1111/J.1364-3703.2010.00683.X
- Domínguez-Santos, R., Martín, J.-F., Kosalková, K., Prieto, C., Ullán, R. V., & García-Estrada, C. (2012). The regulatory factor PcRFX1 controls the expression of the three genes. *Fungal Genetics and Biology*(49), 866-881. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.08.002
- Fischer, M. S., & Glass, N. L. (2019). Communicate and Fuse: How Filamentous Fungi Establish and Maintain an Interconnected Mycelial Network. *Front Microbiol.*, 10(619), 1-20. doi: 10.3389/fmicb.2019.00619
- Fisher, R., & KÜres, U. (2003). Developmental Processes in Filamentous Fungi. En *Genomics of Plants and Fungi* (págs. 41-118).
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., & Samali, A. (2010). Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*, 1-24. doi::10.1155/2010/214074
- García-Rico, JF, M., & F., F. (2007). The pga1 gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. *Res Microbiol.* 2007, 158(5), 437-446. doi:10.1016/j.resmic.2007.03.001
- García-Rico, R. O., Martín, J. F., & Fierro, F. (2010). Heterotrimeric Ga 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. doi:10.1016/j.fgb.2010.11.013
- Harris, S. (2006). Mitosis in Folamentous Fungi. En *Growth, Differentiation and Sexuality. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)* (Vol. 1). Springer, Berlin, Heidelberg. doi:https://doi.org/10.1007/3-540-28135-28135-
- Heatley NG (1990) Early work at Oxford on penicillin. *Biochemist* 12:4–7
- Henk DA, Eagle CE, Brown K, Van Den Berg MA, Dyer PS, Peterson SW, Fisher MC (2011) Speciation despite globally overlapping distributions in *Penicillium chrysogenum*: The population genetics of Alexander Fleming’s lucky fungus. *Mol Ecol* 20:4288–4301.
- Hoff B, Pöggeler S, Kück U. Eighty years after its discovery, Fleming’s *Penicillium* strain discloses the secret of its sex. *Eukaryot Cell*. 2008;7(3):465–70.
- HuanHuang. (2011). Chapter 15 - Signal Transduction in *Trypanosoma cruzi*. En *Advances in Parasitology* (Vols. 75, 2011, págs. 325-344). Bronx, New York, USA: Department of Pathology, Albert Einstein College of Medicine. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00015-0
- J.W, D., & P.J., G. (1984). The Use of Alkaline Phosphatase to Prevent Vector Regeneration. En *Nucleic Acids. Methods in Molecular Biology* (Vol. 2). Walker J.M. (eds). doi:https://doi.org/10.1385/0-89603-064-4:231

- Jami, M.-S., Barreiro, C., García-Estrada, C., & Martín, J.-F. (2010). Proteome Analysis of the Penicillin Producer *Penicillium chrysogenum*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(6), 1182-1198. doi:<https://doi.org/10.1074/mcp.M900327-MCP200>
- Koseska, A., & Bastiaens, P. I. (2017). Cell signaling as a cognitive process. *The EMBO Journal*, 36, 568-582. doi:10.15252/embj.201695383
- Kraus, P. R., & Harris, S. D. (2001). The *Aspergillus nidulans* snt Genes Are Required for the Regulation of Septum Formation and Cell Cycle Checkpoints. *Genetics*, 159(2), 557-569.
- Krebs, C. (16 de febrero de 2007). *Two Basic Methods for Photomicrography*. Obtenido de Krebsmicro Home: <http://www.krebsmicro.com/photomic1/photomic1.pdf>
- Leach, M. D., & Brown, A. J. (2012). Posttranslational Modifications of Proteins in Pathobiology of Medically Relevant Fungi. *Eukaryotic Cell*, 11(2), 98-108. doi:10.1128/EC.05238-11
- Li, L., Wright, S., & Svetlana Krystofova. (2007). Heterotrimeric G Protein Signaling in Filamentous Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.*(63), 423-452. doi:10.1146/annurev.micro.61.080706.093432
- Life technologies, c. (2012). *Real time-PCR handbook*.
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., . . . Dachuan Zhang, C. (2019). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res*, 48(48). doi:10.1093/nar/gkz991
- MacPherson, S., Larochelle, M., & Turcotte, B. (2006). A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 70(3), 583-604. doi:10.1128/MMBR.00015-06
- Mayya, V., & Han, D. K. (2010). Phosphoproteomics by Mass Spectrometry: insights, implications, applications, and limitations. *Expert Rev Proteomics.*, 6(6), 605-618. doi:10.1586/epr.09.84
- McDaniel, S. L., & Brian D. Strahla, b. (2013). Stress-Free with Rpd3: a Unique Chromatin Complex Mediates the Response to Oxidative Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 33(19), 3726-3727. doi:10.1128/MCB.01000-13
- Plamann, M. (1996). Nuclear division, nuclear distribution and cytokinesis. *Journal of Genetics*, 75(3), 351-360.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., & Ponting, C. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *PNAS*(95), 5857-5864.
- Semighini, C. P., Gustavo H., & Goldman, S. D. (2005). Chapter 5. The DNA Damage Response of Filamentous Fungi: Novel Features Associated with a Multicellular Lifestyle. En *Applied Mycology and Biotechnology* (Vol. 5). Elsevier.
- Shaughnessy, A. F. (2010). Penicillin and a series of fortunate events. *Mol Cell Proteomics.*, 1182-98. doi:10.1074/mcp.M900327-MCP200
- Singh, R. K., Gonzalez, M., Miquel, M.-H., & Kabbaj, A. G. (2012). Novel E3 Ubiquitin Ligases That Regulate Histone Protein Levels in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 7(5), e36295. doi:10.1371/journal.pone.0036295

- Ullán, R. V., Godio, R. P., Teijeira, F., Vaca, I., & García-Estrada, C. (2008). RNA-silencing in *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*: Validation. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 209–218. doi:doi:10.1016/j.mimet.2008.06.001
- van den Berg, M., Albang, R., Albermann, K., & al., e. (2008). Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat Biotechnol*(26), 1161–1168. doi: <https://doi.org/10.1038/nbt.1498>
- Yadav, S. P. (2007). The Wholeness in Suffix -omics, -omes, and the Word Om. *J Biomol Tech*, 18(5), 277.
- Yan, G.-R., & He, Q.-Y. (2008). Functional proteomics to identify critical proteins in signal transduction pathways. *Amino Acids*(35), 267–274. doi:10.1007/s00726-007-0594-0
- Yang, N., & Xu, R.-M. (2013). Structure and function of the BAH domain in chromatin biology. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48(3), 211–221. doi:10.3109/10409238.2012.742035
- Yu, J.-H., & Keller, N. (2005). Regulation of Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. *Ann. Rev. Phytophatol.*, 43, 437-458.

Anexo 1

InterPro			Pfam			SMART			NCBI		
Dominio	Posición (a.a)	Longitud (a.a)	Dominio	Posición (a.a)	Longitud (a.a)	Dominio	Posición (a.a)	Longitud (a.a)	Dominio	Posición (a.a)	Longitud (a.a)
BAH	173-287	115	BAH	173-290	118	BAH	173-292	120	BAH	164-289	126
PHD	330-378	49	PHD	946-980	35	PHD	330-378	49	PHD	331-377	47
ELM2	475-644	170	PHD	1051-1155	105	SANT	650-698	49	HBS	577-650	74
SANT	650-698	49				PHD	934-980	47	SANT	657-697	41
PHD	934-980	47				PHD	1100-1172	73	PHD	1055-1135	81
PHD	1100-1172	73							minC	1503-1584	82

	Etapa	Temperatura	Tiempo
30 ciclos	<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	5 m
	<b>Desnaturalización</b>	94°C	15 s
	<b>Hibridación</b>	55°C-65°C	1 m
	<b>Extensión</b>	68°C	1 m
	<b>Infinity Hold</b>	4°C	∞

	Etapa	Temperatura	Tiempo
30 ciclos	<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	5 m
	<b>Desnaturalización</b>	94°C	15 s
	<b>Hibridación</b>	55°C	1 m
	<b>Extensión</b>	68°C	1 m
	<b>Infinity Hold</b>	4°C	∞

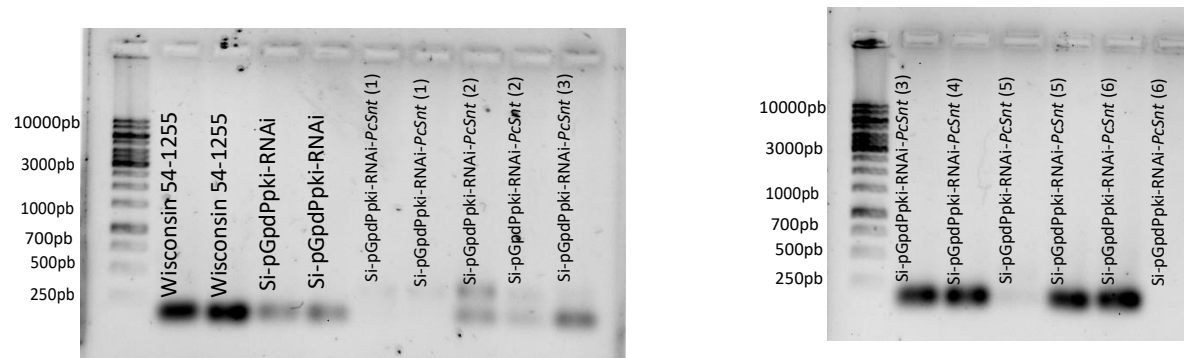


Figura A1. En la Figura A1, se muestran las PCR's de punto final que se hicieron con los oligos del gen control (actina) y los cDNAs sintetizados con cada una de las muestras de RNA que fueron extraídas.

## Anexo 2

### Análisis Estadísticos

#### Distancia entre Septos

Descriptivos. Distancia entre septos en medio Czapek								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Wis 54-1255	3	.11800	.014799	.008544	.08124	.15476	.101	.128
si-pGpdPpki-RNAi	5	.10060	.007232	.003234	.09162	.10958	.090	.110

<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	<b>6</b>	.06617	.014892	.006080	.05054	.08179	.052	.088
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	<b>5</b>	.05700	.028364	.012685	.02178	.09222	.026	.093
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	<b>7</b>	.09457	.034660	.013100	.06252	.12663	.052	.164
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	<b>4</b>	.12200	.015341	.007670	.09759	.14641	.109	.142
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	<b>10</b>	.08000	.036884	.011664	.05361	.10639	.012	.126
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>.08723</b>	<b>.032751</b>	<b>.005178</b>	<b>.07675</b>	<b>.09770</b>	<b>.012</b>	<b>.164</b>

**Pruebas de Normalidad. Distancia entre septos en medio  
Czapek  $\alpha=0.05$**

	Test	10% Critical	5% Critical
<b>Wis 54-1255</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2496037	0.383	0.415
<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.1699959	1.957019	4.768394
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.208291	0.297	0.323
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.1837662	0.319	0.343

<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2667521	0.28	0.304
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2633291	0.346	0.376
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.133546	0.241	0.262

<b>Prueba de homogeneidad de varianzas. Distancia entre septos en medio cZapek <math>\alpha=0.05</math></b>			
<b>Estadístico de Levene</b>	<b>gl1</b>	<b>gl2</b>	<b>Sig.</b>
<b>2.251</b>	6	33	<b>.063</b>

<b>Prueba de Brown-Forsythe. Medio cZapek <math>\alpha=0.05</math></b>			
<b>Estadístico</b>	<b>gl1</b>	<b>gl2</b>	<b>Sig.</b>
<b>4.965</b>	6	25.352	<b>.002</b>

**Comparaciones múltiples**

**Variable dependiente: Distancia entre septos. Medio cZapek**

**Games-Howell**

<b>Cepa</b>		<b>Diferencia de medias (I-J)</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Sig.</b>	<b>Intervalo de confianza al 95%</b>	
					<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>
<b>Wis 54-1255</b>	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	.017400	.009136	<b>.586</b>	-.04435	.07915
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	<b>.051833*</b>	<b>.010486</b>	<b>.049</b>	<b>.00033</b>	<b>.10333</b>
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.061000	.015294	<b>.060</b>	-.00280	.12480

	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	.023429	.015640	.740	-.03648	.08333
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.004000	.011482	1.000	-.05762	.04962
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	.038000	.014458	.220	-.01527	.09127
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.017400	.009136	.586	-.07915	.04435
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	.034433*	.006886	.013	.00766	.06121
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.043600	.013090	.155	-.01775	.10495
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	.006029	.013493	.999	-.04814	.06020
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.021400	.008324	.322	-.06255	.01975
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	.020600	.012104	.629	-.02299	.06419
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.051833*	.010486	.049	-.10333	-.00033
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	-.034433*	.006886	.013	-.06121	-.00766
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.009167	.014066	.991	-.05018	.06851
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-.028405	.014442	.493	-.08286	.02606
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.055833*	.009787	.010	-.09568	-.01599
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.013833	.013153	.932	-.05935	.03168
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.061000	.015294	.060	-.12480	.00280
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	-.043600	.013090	.155	-.10495	.01775
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	-.009167	.014066	.991	-.06851	.05018
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-.037571	.018235	.439	-.10405	.02890
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.065000*	.014823	.037	-.12566	-.00434
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.023000	.017232	.822	-.08501	.03901
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.023429	.015640	.740	-.08333	.03648
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	-.006029	.013493	.999	-.06020	.04814
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	.028405	.014442	.493	-.02606	.08286
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.037571	.018235	.439	-.02890	.10405
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.027429	.015180	.575	-.08408	.02922
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	.014571	.017540	.977	-.04559	.07473



si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)	Wis 54-1255	.004000	.011482	1.000	-.04962	.05762
	T pGpdPpki-RNAi	.021400	.008324	.322	-.01975	.06255
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)	.055833*	.009787	.010	.01599	.09568
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)	.065000*	.014823	.037	.00434	.12566
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)	.027429	.015180	.575	-.02922	.08408
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)	.042000	.013960	.112	-.00698	.09098
si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)	Wis 54-1255	-.038000	.014458	.220	-.09127	.01527
	T pGpdPpki-RNAi	-.020600	.012104	.629	-.06419	.02299
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)	.013833	.013153	.932	-.03168	.05935
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)	.023000	.017232	.822	-.03901	.08501
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)	-.014571	.017540	.977	-.07473	.04559
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)	-.042000	.013960	.112	-.09098	.00698

La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

#### Descriptivos. Distancia entre septos en medio PDA

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Wis 54-1255	3	.12067	.026388	.015235	.05511	.18622	.103	.151
si-pGpdPpki-RNAi	7	.11057	.029608	.011191	.08319	.13795	.068	.141
si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)	3	.06600	.014731	.008505	.02941	.10259	.050	.079
si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)	5	.06380	.020897	.009346	.03785	.08975	.043	.089
si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)	4	.16950	.038039	.019020	.10897	.23003	.134	.209
si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)	6	.07383	.012416	.005069	.06080	.08686	.059	.092

<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	8	.11113	.035126	.012419	.08176	.14049	.062	.149
<b>Total</b>	36	.10175	.041049	.006841	.08786	.11564	.043	.209

**Pruebas de Normalidad. Distancia entre septos en medio PDA**  
 $\alpha=0.05$

	Test	10% Critical	5% Critical
Wis 54-1255			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.3510579	0.383	0.415
<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.1893838	0.28	0.304
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.1946272	0.383	0.415
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2455198	0.319	0.343
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.280981	0.346	0.376
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2253589	0.297	0.323
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.140459	0.265	0.288

Prueba de homogeneidad de varianzas. Distancia entre septos en medio PDA $\alpha=0.05$			
Estadístico	gl1	gl2	Sig.
2.997	6	29	.021

Prueba de Brown-Forsythe. Medio PDA $\alpha=0.05$			
Estadístico de	gl1	gl2	Sig.
8	6.000	17.929	1.87E-04

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Distancia entre septos. MedioPDA						
Games-Howell						
Cepa		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Wis 54-1255	si-pGpdPpki-RNAi	.010095	.018904	.996	-.08045	.10064
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (1)	.054667	.017448	.239	-.04661	.15594
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (2)	.056867	.017873	.212	-.03888	.15261
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (3)	-.048833	.024369	.503	-.15792	.06026
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (4)	.046833	.016056	.317	-.06699	.16065
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (5)	.009542	.019656	.998	-.07905	.09813
si-pGpdPpki-RNAi	Wis 54-1255	-.010095	.018904	.996	-.10064	.08045
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (1)	.044571	.014056	.122	-.01011	.09926
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (2)	.046771	.014580	.093	-.00606	.09960
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (3)	-.058929	.022068	.267	-.15664	.03878

	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	.036738	.012285	.143	-.00973	.08320
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.000554	.016717	1.000	-.05830	.05719
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.054667	.017448	.239	-.15594	.04661
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	-.044571	.014056	.122	-.09926	.01011
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.002200	.012636	1.000	-.05169	.05609
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-.103500*	.020835	.049	-.20636	-.00064
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.007833	.009901	.972	-.06126	.04559
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.045125	.015052	.139	-.10165	.01140
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.056867	.017873	.212	-.15261	.03888
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	-.046771	.014580	.093	-.09960	.00606
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	-.002200	.012636	1.000	-.05609	.05169
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-.105700*	.021192	.041	-.20596	-.00544
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.010033	.010632	.951	-.05369	.03363
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.047325	.015543	.111	-.10259	.00794
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	.048833	.024369	.503	-.06026	.15792
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	.058929	.022068	.267	-.03878	.15664
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	.103500*	.020835	.049	.00064	.20636
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.105700*	.021192	.041	.00544	.20596
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	.095667	.019684	.071	-.01184	.20318
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	.058375	.022715	.284	-.03834	.15509
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.046833	.016056	.317	-.16065	.06699
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	-.036738	.012285	.143	-.08320	.00973
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	.007833	.009901	.972	-.04559	.06126
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.010033	.010632	.951	-.03363	.05369
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-.095667	.019684	.071	-.20318	.01184
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.037292	.013414	.180	-.08682	.01224
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.009542	.019656	.998	-.09813	.07905
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	.000554	.016717	1.000	-.05719	.05830

<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	.045125	.015052	<b>.139</b>	-.01140	.10165
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.047325	.015543	<b>.111</b>	-.00794	.10259
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-.058375	.022715	<b>.284</b>	-.15509	.03834
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	.037292	.013414	<b>.180</b>	-.01224	.08682
<b>La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.</b>					

<b>Descriptivos. Distancia entre septos en medio Power</b>								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<b>Wis 54-1255</b>	3	.11600	.009165	.005292	.09323	.13877	.106	.124
<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	4	.13725	.040525	.020262	.07277	.20173	.103	.196
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	4	.06625	.009845	.004922	.05059	.08191	.055	.075
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	3	.08200	.008718	.005033	.06034	.10366	.076	.092
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	2	.10250	.060104	.042500	-.43751	.64251	.060	.145
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	2	.10900	.033941	.024000	-.19595	.41395	.085	.133
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	2	.16900	.011314	.008000	.06735	.27065	.161	.177
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>.10845</b>	<b>.040095</b>	<b>.008966</b>	<b>.08968</b>	<b>.12722</b>	<b>.055</b>	<b>.196</b>

<b>Pruebas de Normalidad. Distancia entre septos en medio Power</b>		
Test	10% Critical	5% Critical

<b>Wis 54-1255</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.1957166	0.383	0.415
<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.3593436	0.346	0.376
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2030821	0.346	0.376
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.3434891	0.383	0.415
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2602499	0.437	0.472
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2602499	0.437	0.472
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2602499	0.437	0.472

**Prueba de homogeneidad de varianzas. Distancia entre septos  
en medio Power  $\alpha=0.05$**

<b>Estadístico de Levene</b>	<b>gl1</b>	<b>gl2</b>	<b>Sig.</b>
<b>4.370</b>	6	13	<b>.012</b>

Prueba de Brown-Forsythe. Medio Power

<b>Estadístico</b>	<b>gl1</b>	<b>gl2</b>	<b>Sig.</b>
<b>3.392</b>	6	2.873	<b>.179</b>

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Distancia entre septos. Medio Power						
Games-Howell						
Cepa		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Wis 54-1255	si-pGpdPpki-RNAi	-.021250	.020942	.923	-.13632	.09382
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (1)	.049750*	.007227	.010	.01631	.08319
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (2)	.034000	.007303	.063	-.00247	.07047
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (3)	.013500	.042828	.999	-1.19423	1.22123
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (4)	.007000	.024576	1.000	-.58800	.60200
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (5)	-.053000	.009592	.131	-.14359	.03759
T pGpdPpki-RNAi	Wis 54-1255	.021250	.020942	.923	-.09382	.13632
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (1)	.071000	.020852	.188	-.04461	.18661
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (2)	.055250	.020878	.328	-.06029	.17079
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (3)	.034750	.047083	.969	-.59664	.66614
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (4)	.028250	.031410	.947	-.19002	.24652
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (5)	-.031750	.021784	.759	-.14467	.08117
si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (1)	Wis 54-1255	-.049750*	.007227	.010	-.08319	-.01631
	si-pGpdPpki-RNAi	-.071000	.020852	.188	-.18661	.04461

	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	-.015750	.007040	.412	-.04797	.01647
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-.036250	.042784	.941	-1.25508	1.18258
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.042750	.024500	.695	-.65274	.56724
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.102750*	.009393	.042	-.19603	-.00947
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.034000	.007303	.063	-.07047	.00247
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	-.055250	.020878	.328	-.17079	.06029
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	.015750	.007040	.412	-.01647	.04797
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-.020500	.042797	.994	-1.23612	1.19512
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.027000	.024522	.878	-.63282	.57882
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.087000	.009452	.058	-.18134	.00734
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.013500	.042828	.999	-1.22123	1.19423
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	-.034750	.047083	.969	-.66614	.59664
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	.036250	.042784	.941	-1.18258	1.25508
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.020500	.042797	.994	-1.19512	1.23612
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.006500	.048808	1.000	-.59717	.58417
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.066500	.043246	.752	-1.17825	1.04525
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	-.007000	.024576	1.000	-.60200	.58800
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	-.028250	.031410	.947	-.24652	.19002
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	.042750	.024500	.695	-.56724	.65274
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.027000	.024522	.878	-.57882	.63282
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	.006500	.048808	1.000	-.58417	.59717
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.060000	.025298	.537	-.54653	.42653
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	.053000	.009592	.131	-.03759	.14359
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	.031750	.021784	.759	-.08117	.14467
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	.102750*	.009393	.042	.00947	.19603
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	.087000	.009452	.058	-.00734	.18134



<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	.066500	.043246	<b>.752</b>	-1.04525	1.17825
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	.060000	.025298	<b>.537</b>	-.42653	.54653
<b>La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.</b>					

Extensión Radial

	Descriptivos.Radio (mm)							
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<b>Wis 54-1255</b>	<b>36</b>	9.26683	3.728250	.621375	8.00537	10.52829	3.480	14.714
<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	<b>36</b>	5.44097	2.962577	.493763	4.43858	6.44336	1.489	11.824
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	<b>34</b>	5.30288	2.367731	.406063	4.47674	6.12902	1.398	10.342
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	<b>34</b>	6.90632	3.217624	.551818	5.78364	8.02901	1.989	12.021
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	<b>36</b>	9.36553	4.123882	.687314	7.97021	10.76085	3.101	15.013
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	<b>36</b>	9.63622	4.065407	.677568	8.26069	11.01176	3.416	14.977
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	<b>36</b>	9.83406	4.036377	.672729	8.46834	11.19977	3.644	15.063
<b>Total</b>	<b>248</b>	<b>7.99469</b>	<b>3.989044</b>	<b>.253305</b>	<b>7.49578</b>	<b>8.49360</b>	<b>1.398</b>	<b>15.063</b>

Pruebas de Normalidad. Radio(mm)  $\alpha=0.05$

	Test	10% Critical	5% Critical
<b>Wis 54-1255</b>			
Kolmogorov-Smirnov	0.1252063	0.134	0.146
<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>			
Kolmogorov-Smirnov	0.1109727	0.134	0.146
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>			
Kolmogorov-Smirnov	0.1270355	0.137	0.15
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>			
Kolmogorov-Smirnov	0.1090189	0.137	0.15
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>			
Kolmogorov-Smirnov	0.1303179	0.134	0.146
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>			
Kolmogorov-Smirnov	0.1345493	0.134	0.146
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>			
Kolmogorov-Smirnov	0.1340923	0.134	0.146

**Prueba de homogeneidad de varianzas. Radio(mm).  $\alpha=0.05$**

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
5.220	6	241	4.51E-05

**Prueba de Brown-Forsythe  $\alpha=0.05$**

Estadístico	gl1	gl2	Sig.
11.434	6	220	4.00E-11

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Radio (mm)

Games-Howell

Cepa		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)	-1.603441	.685120	.242	-3.69269	.48581
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)	-4.062645*	.798303	8.44E-05	-6.50321	-1.62208
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)	-4.333340*	.789927	1.98E-05	-6.74758	-1.91909
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)	-4.531173*	.785781	6.96E-06	-6.93239	-2.12996
	Wis 54-1255	-3.963951*	.742290	3.03E-05	-6.22871	-1.69920
	si-pGpdPpki-RNAi	-.138090	.639288	1.000	-2.08203	1.80585
si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)	1.603441	.685120	.242	-.48581	3.69269
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)	-2.459204	.881421	.093	-5.14007	.22166
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)	-2.729899*	.873843	.040	-5.38732	-.07247
	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)	-2.927732*	.870097	.021	-5.57358	-.28189
	Wis 54-1255	-2.360510	.831029	.082	-4.88605	.16504
	si-pGpdPpki-RNAi	1.465351	.740476	.437	-.78579	3.71650
si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)	si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)	4.062645*	.798303	8.44E-05	1.62208	6.50321

	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	2.459204	.881421	.093	-.22166	5.14007
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.270694	.965142	1.000	-3.20061	2.65922
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.468528	.961751	.999	-3.38818	2.45112
	<b>Wis 54-1255</b>	.098694	.926557	1.000	-2.71491	2.91229
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	3.924556*	.846287	3.49E-04	1.34780	6.50132
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	4.333340*	.789927	1.98E-05	1.91909	6.74758
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	2.729899*	.873843	.040	.07247	5.38732
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	.270694	.965142	1.000	-2.65922	3.20061
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.197833	.954810	1.000	-3.09638	2.70071
	<b>Wis 54-1255</b>	.369389	.919350	1.000	-2.42211	3.16089
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	4.195250*	.838391	9.21E-05	1.64313	6.74737
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	4.531173*	.785781	6.96E-06	2.12996	6.93239
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	2.927732*	.870097	.021	.28189	5.57358
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	.468528	.961751	.999	-2.45112	3.38818
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	.197833	.954810	1.000	-2.70071	3.09638
	<b>Wis 54-1255 (control)</b>	.567222	.915790	.996	-2.21337	3.34782
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	4.393083*	.834486	3.47E-05	1.85315	6.93302
<b>Wis 54-1255</b>	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	3.963951*	.742290	3.03E-05	1.69920	6.22871
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	2.360510	.831029	.082	-.16504	4.88605
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-.098694	.926557	1.000	-2.91229	2.71491
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-.369389	.919350	1.000	-3.16089	2.42211
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.567222	.915790	.996	-3.34782	2.21337
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	3.825861*	.793668	1.70E-04	1.41291	6.23882
<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	.138090	.639288	1.000	-1.80585	2.08203
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	-1.465351	.740476	.437	-3.71650	.78579
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-3.924556*	.846287	3.49E-04	-6.50132	-1.34780
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-4.195250*	.838391	9.21E-05	-6.74737	-1.64313
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-4.393083*	.834486	3.47E-05	-6.93302	-1.85315

<b>Wis 54-1255 (control)</b>	-3.825861*	.793668	<b>1.70E-04</b>	-6.23882	-1.41291
------------------------------	------------	---------	-----------------	----------	----------

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

### Conidiación

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					Descriptivos. Conidiación			
<b>Wis 54-1255</b>	18	.9444	.76020	.17918	.5664	1.3225	0.00	2.70
<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	14	9.1000	18.56506	4.96172	-1.6191	19.8191	0.00	57.00
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	17	8.0235	11.87511	2.88014	1.9179	14.1291	0.00	39.80
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	18	17.4556	21.58974	5.08875	6.7192	28.1919	0.00	65.00
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	14	19.3286	23.60301	6.30817	5.7006	32.9565	0.00	76.90
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	18	6.5556	7.98603	1.88233	2.5842	10.5269	0.00	26.50
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	18	7.0000	7.48166	1.76345	3.2795	10.7205	0.00	22.50
<b>Total</b>	117	9.4838	15.55464	1.43803	6.6356	12.3320	0.00	76.90

---

**Pruebas de Normalidad. Conidiación**

---

	<b>Test</b>	<b>10% Critical</b>	<b>5% Critical</b>
<b>Wis 54-1255</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2911156	0.185	0.202
<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.3807668	0.208	0.226
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.3712384	0.19	0.207
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.3591181	0.185	0.202
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2541162	0.208	0.226
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.198886	0.185	0.202
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>			
<b>Kolmogorov-Smirnov</b>	0.2141546	0.185	0.202

---

Prueba de homogeneidad de varianzas. Conidiación			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
8.236	6	110	2.28E-07

Prueba de Brown-Forsythe. Conidiación			
Estadístico	gl1	gl2	Sig.
2.919	6	55.356	.015

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: conidios/ cm <sup>2</sup> x10 <sup>4</sup>						
Games-Howell						
C e a		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Wis 54-1255	si-pGpdPpki-RNAi	-8.15556	4.96496	.661	-25.2958	8.9846
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (1)	-7.07908	2.88570	.239	-16.7427	2.5845
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (2)	-16.51111	5.09190	.059	-33.4456	.4234
	si-pGpdPpki-RNAi- <i>PcSnt</i> (3)	-18.38413	6.31071	.124	-40.1736	3.4054

	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	-5.61111	1.89084	.097	-	.6657
					11.8879	
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-6.05556*	1.77252	.041	-	-.1732
					11.9379	
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	8.15556	4.96496	.661	-8.9846	25.2958
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	1.07647	5.73706	1.000	-	19.7029
					17.5499	
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	-8.35556	7.10732	.898	-	14.0980
					30.8092	
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-	8.02569	.857	-	15.4868
		10.22857			35.9439	
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	2.54444	5.30677	.999	-	20.2314
					15.1425	
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	2.10000	5.26578	1.000	-	19.7106
					15.5106	
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	7.07908	2.88570	.239	-2.5845	16.7427
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	-1.07647	5.73706	1.000	-	17.5499
					19.7029	
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	-9.43203	5.84727	.675	-	9.1815
					28.0455	
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-	6.93457	.666	-	11.5613
		11.30504			34.1714	
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	1.46797	3.44069	.999	-9.4518	12.3877
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	1.02353	3.37712	1.000	-9.7271	11.7742
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	16.51111	5.09190	.059	-.4234	33.4456
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	8.35556	7.10732	.898	-	30.8092
					14.0980	
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	9.43203	5.84727	.675	-9.1815	28.0455
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-1.87302	8.10484	1.000	-	23.9242
					27.6703	
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	10.90000	5.42573	.438	-6.6925	28.4925



	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	10.45556	5.38564	.477	-7.0500	27.9611
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	18.38413	6.31071	.124	-3.4054	40.1736
	<b>si-pGpdPpki-RNAi</b>	10.22857	8.02569	.857	-	35.9439 15.4868
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	11.30504	6.93457	.666	-	34.1714 11.5613
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	1.87302	8.10484	1.000	-	27.6703 23.9242
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	12.77302	6.58302	.486	-9.4199	34.9659
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	12.32857	6.55002	.519	-9.8095	34.4666
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (4)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	5.61111	1.89084	.097	-.6657	11.8879
	<b>T pGpdPpki-RNAi</b>	-2.54444	5.30677	.999	-	15.1425 20.2314
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	-1.46797	3.44069	.999	-	9.4518 12.3877
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	-	5.42573	.438	-	6.6925 10.90000 28.4925
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (3)</b>	-	6.58302	.486	-	9.4199 12.77302 34.9659
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	-.44444	2.57932	1.000	-8.5232	7.6343
<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (5)</b>	<b>Wis 54-1255</b>	6.05556*	1.77252	.041	.1732	11.9379
	<b>T pGpdPpki-RNAi</b>	-2.10000	5.26578	1.000	-	15.5106 19.7106
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (1)</b>	-1.02353	3.37712	1.000	-	9.7271 11.7742
	<b>si-pGpdPpki-RNAi-PcSnt (2)</b>	-	5.38564	.477	-	7.0500 10.45556 27.9611

<b>si-pGpdPpki-RNAi-<i>PcSnt</i> (3)</b>	-	6.55002	.519	-	9.8095
	12.32857			34.4666	
<b>si-pGpdPpki-RNAi-<i>PcSnt</i> (4)</b>	.44444	2.57932	1.000	-7.6343	8.5232

**La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.**

Anexo3.

<b>colorama</b>	0.4.4
<b>colorlog</b>	4.4.0
<b>colormap</b>	1.0.2
<b>cycler</b>	0.10.0
<b>matplotlib</b>	3.0.3
<b>matplotlib-venn</b>	0.11.5
<b>networkx</b>	2.2
<b>numpy</b>	1.18.5
<b>pandas</b>	1.0.4
<b>plotly</b>	4.11.0



**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA de la alumna MARIA FERNANDA CERON MORENO, matrícula 2183801669, quien cumplió con los 140 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha dieciocho de noviembre del 2020 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

Caracterización de la función de la proteína PcsNT y su papel en la vía de señalización celular mediada por proteínas G heterotriméricas en *Penicillium chrysogenum*

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 180 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

\_\_\_\_\_  
APROBAR

**JURADO**

**Presidente**

\_\_\_\_\_  
DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

**Secretario**

\_\_\_\_\_  
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

**Vocal**

\_\_\_\_\_  
DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA  
MARTINEZ

**Vocal**

\_\_\_\_\_  
DRA. DULCE MARIA ANDRADE PAVON



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00277

Matricula: 2183801669

Caracterización de la función de la proteína PcSNT y su papel en la vía de señalización celular mediada por proteínas G heterotríméricas en *Penicillium chrysogenum*

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 16:00 horas del día 18 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ  
DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ  
DRA. DULCE MARIA ANDRADE PAVON  
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MARIA FERNANDA CERON MORENO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISO

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL

DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ

VOCAL

DRA. DULCE MARIA ANDRADE PAVON

SECRETARIO

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella