



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
en Celaya

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO EN CELAYA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



**TESIS MAESTRIA**

**“Metabolismo de óxido nítrico en *Mucor circinelloides*”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN  
INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

PRESENTA

**Ing. Diego Ortiz Corza  
No. de control M1803118**

DIRECTOR DE TESIS  
**Dr. Humberto R. Medina**

**Enero/2021 Celaya, Gto., México**



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO  
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Celaya  
Departamento de Ingeniería Bioquímica

Celaya, Gto., 02/Marzo/2021

**POSGRADO DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

OFICIO No. PIBQ-01-12-2021

Asunto: Autorización de Impresión Tesis

**ING. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ**  
**JEFA DEL DEPTO. DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**  
**PRESENTE**

De acuerdo con la convocatoria hecha por la jefatura a su digno cargo, para que en reunión de los miembros del comité tutorial de la tesis avalada por la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica se examinara la tesis titulada:

**"Metabolismo de óxido nítrico en *Mucor circinelloides*"**

Presentada por el alumno: **C. Diego Ortíz Corza** con número de control **M1803118**, Aspirante al Grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Después de intercambiar opiniones, los miembros del comité tutorial, manifestaron **APROBAR y AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**ATENTAMENTE**  
*La técnica por un México mejor ®*  
**EL COMITÉ TUTORIAL**

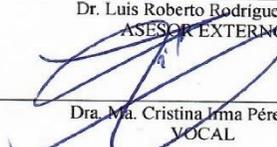
  
Humberto R. Medina

Dr. Humberto Ramírez Medina  
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Luis Roberto Rodríguez Ortiz  
ASESOR EXTERNO

Dr. Lorenzo Guevara Olvera †  
SECRETARIO

  
Dra. Ma. Cristina Irma Pérez Pérez  
VOCAL

COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA  
BIOQUÍMICA

  
Dr. Leopoldo González Cruz

C.c. p. Dr. Gerardo Acosta García. - Presidente del Consejo de Posgrado

LGC/mgg



Av. Antonio García Cubas #600 esq. Av. Tecnológico, Colonia  
Alfredo V. Bonfil, C.P. 38010 Celaya, Gto.  
Tel. 01 (461) 611 75 75  
e-mail: lince@celaya.tecnm.mx  
tecnm.mx | celaya.tecnm.mx





TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO  
en Celaya



MAESTRIA EN CIENCIAS DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Celaya, Gto., 13/Mayo/2021.

Asunto: Carta de Cesión de Derechos.

**C. DR. JOSÉ LÓPEZ MUÑOZ**

**DIRECTOR DEL TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO EN CELAYA**

**PRESENTE**

En la ciudad de Celaya, Guanajuato, México el día 13 del mes de mayo del año 2021, la que suscribe **Diego Ortiz Corza** alumno de la **Maestría en Ciencias de Ingeniería Bioquímica** con número de control **M1803118**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Humberto Ramírez Medina**, y cede los derechos del trabajo “Metabolismo de óxido nítrico en *Mucor circinelloides*” al Instituto Tecnológico de Celaya para su difusión, con fines académicos y de investigación. Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso del autor y directores del trabajo. Este podrá ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones de correo electrónico: [m1803118@itcelaya.edu.mx](mailto:m1803118@itcelaya.edu.mx), [humberto.ramirez@itcelaya.edu.mx](mailto:humberto.ramirez@itcelaya.edu.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Diego Ortiz Corza

Nombre y firma

## Índice General

Índice.....	i
Índice de Tablas.....	ii
Índice de Figuras.....	iii
Resumen.....	1
Introducción.....	2
<b>I ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
1.1 <i>Mucor circinelloides</i> .....	4
1.1.1 Características generales .....	4
1.1.2 Ciclo de vida.....	5
1.1.3 <i>Mucor circinelloides</i> como modelo de estudio .....	6
1.2 Radicales químicos.....	7
1.2.1 Especies reactivas de oxígeno .....	7
1.2.2 Óxido nítrico .....	8
1.2.3 Óxido nítrico en hongos .....	10
1.3 Detección de óxido nítrico intracelular.....	12
1.4 Asimilación de nitrógeno en hongos .....	13
1.5 Rutas de eliminación de óxido nítrico en hongos .....	16
1.6 Trabajo previo .....	18
Justificación .....	20
Hipótesis.....	21
Objetivos .....	22
<b>II MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
2.1 Cepas .....	23
2.2 Medios de cultivo .....	23
2.2.1 Medio YPG.....	23
2.2.2 Medio mínimo con casaminoácidos (MMC).....	23
2.2.3 Medio base de nitrógeno (YNB) .....	24
2.2.4 Medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno.....	24
2.3 Búsqueda de secuencias <i>In silico</i> en <i>M. circinelloides</i> .....	24
2.4 Alineamiento de secuencias múltiple .....	25
2.5 Encontrar dominios dentro de una secuencia.....	25
2.6 Crecimiento y esporulación.....	25
2.7 Detección de óxido nítrico con DAF-FM diacetato .....	26
<b>III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
3.1 Bioinformática .....	27
3.2 Fenotipo, desarrollo y esporulación .....	31
3.3 Cuantificación de óxido nítrico .....	35
3.4 Análisis de la presunta GSNO reductasa encontrada en el genoma de <i>M. circinelloides</i> .....	36
3.5 Fenotipo de las cepas $\Delta muNos\Delta muNr$ y $\Delta muNr$ .....	37
3.6 Cuantificación de óxido nítrico de las mutantes de la nitrato reductasa de <i>M. circinelloides</i> .....	40

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>42</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> -Clasificación taxonómica de <i>Mucor circinelloides</i> . .....	4
<b>Tabla 2.</b> - Distribución y función de enzimas tipo Nox, en animales, plantas y hongos.....	8
<b>Tabla 3.</b> -Enzimas que participan en la eliminación de NO reportadas en hongos. ....	16
<b>Tabla 4.</b> - Cepas de <i>M. circinelloides</i> utilizadas durante esta investigación .....	23
<b>Tabla 5.</b> - Promedio de la señal fluorescente calculado con el programa Image J. ....	36

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.-</b> Desarrollo de <i>Mucor circinelloides</i> sobre medio MMC.....	5
<b>Figura 2.-</b> Ciclos de vida de <i>Mucor circinelloides</i> .....	5
<b>Figura 3.-</b> Producción de NO en respuesta a un estímulo.. .....	9
<b>Figura 4.-</b> Efecto del NO en el desarrollo de <i>Neurospora crassa</i> .. .....	11
<b>Figura 5.-</b> Cuantificación de NO en <i>Aspergillus nidulans</i> . .....	12
<b>Figura 6 .-</b> Detección de NO con DAF-FM diacetato. ....	13
<b>Figura 7.-</b> Metabolismo central de nitrógeno.. .....	14
<b>Figura 8.-</b> Monitero del crecimiento de <i>Fusarium fujikuroi</i> y sus mutantes sobre diferentes fuentes de nitrógeno.....	15
<b>Figura 9.-</b> Detección de NO en mutantes de genes tipo NOS o niaD en <i>Mucor circinelloides</i> . .....	19
<b>Figura 10.-</b> Metabolismo de NO.....	27
<b>Figura 11.-</b> Dominios conservados de enzimas que participan en el metabolismo del NO. ....	28
<b>Figura 12.-</b> Dendrograma de GSNO reductasas realizado con el programa Geneious prime 2019. ....	29
<b>Figura 13.-</b> Alineamiento de secuencias múltiple de las GSNO reductasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Phycomyces blakesleeanus</i> y <i>Mucor circinelloides</i> .....	30
<b>Figura 14.-</b> Cepas de <i>Mucor circinelloides</i> creciendo en MMC bajo luz u oscuridad.....	31
<b>Figura 15.-</b> Cepas de <i>Mucor circinelloides</i> creciendo en medio mínimo de NO <sub>3</sub> .....	32
<b>Figura 16.-</b> Esporulación de las cepas tipo control y mutante de la nitrato reductasa de <i>Mucor circinelloides</i> en diferentes medios.....	33
<b>Figura 17.-</b> Esporulación de la cepas tipo silvestre y $\Delta$ MuNos $\Delta$ MuNr de <i>M. circinelloides</i> creciendo en medio mínimo con glutamina o glutamina y ClO <sub>3</sub> .....	34
<b>Figura 18.-</b> Cepas tipo silvestre y $\Delta$ MuNos $\Delta$ MuNr de <i>M. circinelloides</i> creciendo en medio mínimo con NO <sub>3</sub> y ClO <sub>3</sub> . ....	34
<b>Figura 19.-</b> Cuantificación de NO en micelio las cepas silvestre, MU402 y $\Delta$ MuNos $\Delta$ MuNr de <i>Mucor circinelloides</i> . ....	35
<b>Figura 20.-</b> Alineamiento de secuencias múltiple de GSNO reductasa.....	37
<b>Figura 21.-</b> Desarrollo de <i>Mucor circinelloides</i> en medio MMC y mínimo de NO <sub>3</sub> .....	38
<b>Figura 22.-</b> Comparación entre los fenotipos de una línea mutante de la nitrato reductasa	39

## Resumen

El óxido nítrico (NO) es un radical diatómico que ha demostrado participar en procesos de importancia biológica en diversos organismos vivos. Sin embargo, en hongos los detalles sobre su biosíntesis y eventos que regula no son conocidos, pero la evidencia vincula al NO con el crecimiento de hifas, patogénesis y producción de esporas.

Un estudio previo permitió identificar en el genoma de *M. circinelloides*, posibles homólogos para los genes de la nitrato reductasa (NiaD) de *Aspergillus niger* y la óxido nítrico sintasa (NOS) de animales, involucrados en la asimilación de nitrógeno y producción de NO, respectivamente. El marco de lectura abierto de dichos genes se interrumpió y se obtuvieron las mutantes  $\Delta\text{Munr}$  y  $\Delta\text{MuNos}\Delta\text{Munr}$ .

Este trabajo dio continuidad a la anterior investigación para entender el metabolismo y función de NO en *M. circinelloides*.

Se ha identificado mediante bioinformática, una secuencia cuya proteína predicha podría tratarse de GSNO reductasa, que participa en el proceso de eliminación de NO. Se llevó a cabo la caracterización morfológica de las cepas  $\Delta\text{Munr}$  y  $\Delta\text{MuNos}\Delta\text{MuNr}$  haciendo énfasis en los procesos que presumiblemente son regulados por el NO. Se ha corroborado la producción de NO mediante el reactivo DAF-FM diacetato, que reacciona específicamente con este radical y produce una señal fluorescente.

## Introducción

Las especies reactivas incluyen iones, radicales libres y peróxidos orgánicos e inorgánicos, comúnmente son subproductos del metabolismo y deben su toxicidad a la presencia de electrones sin aparearse que les permite reaccionar rápidamente con otros compuestos. Es por ello, que en etapas de estrés celular pueden acumularse y generar daños a nivel ADN, proteína o membrana celular. No obstante, el papel de las especies reactivas en procesos de diferenciación celular y protección ha sido reportado, por ejemplo, en animales existe una familia de enzimas conocida como NADPH oxidasas las cuales sintetizan el ion  $O_2^-$ , a partir de  $O_2$  y NADP(H), cuya función, entre otras, es proteger al organismo ante la invasión de algún agente patógeno mediante el ataque con radicales libres. Otra especie reactiva que ha demostrado ser de importancia biológica es el NO, que participa en el desarrollo de diversos organismos vivos, en miembros del reino animal es sintetizado por las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) a partir del aminoácido arginina, NADP(H) y  $O_2$ , y en ellos este radical participa en los procesos de vasodilatación, neurotransmisión y protección.

El moho mucilaginoso *Physarum polycephalum* permanece como el único miembro del reino fungi en el que se ha confirmado y clonado un gen que codifica para una NOS. La biosíntesis de NO en demás hongos podría estar sujeta a la actividad de una nitrato reductasa como se demostró en *Aspergillus nidulans*.

La presencia de NO puede ser corroborada mediante reacciones de luminiscencia, como las producidas con el reactivo DAF-FM diacetato que reacciona selectivamente con este radical y da lugar a una señal fluorescente que puede ser cuantificada mediante programas informáticos.

*Mucor circinelloides*, un hongo que pertenece a la división Zygomycota, es un organismo modelo para determinar el papel y ruta de biosíntesis del NO, pues su genoma se encuentra completamente secuenciado y se dispone de un sistema de transformación estable, que permite investigar la función de genes y proteínas.

En 2018, se identificó en el genoma de *M. circinelloides* tres genes cuyas proteínas predichas podrían codificar para una nitrato reductasa MuNr, parecida a la de *A. nidulans*, y dos NOS, MuNos y MuNos2, parecidas a las de animales y *Arabidopsis thaliana*, respectivamente. A partir de la cepa MU402 de este mucoral, un doble auxótrofo para la leucina y el uracilo, se generaron mutantes simples para los genes de las posibles nitrato reductasa y NOS,  $\Delta MuNr$ ,  $\Delta MuNos$ ,  $\Delta MuNos2$  así como una doble mutante  $\Delta MuNos\Delta MuNr$ . La prueba de luminiscencia llevada a cabo con el reactivo DAF-FM diacetato permitió observar que la señal fluorescente únicamente se veía disminuida, en comparación con la línea silvestre, en aquellas líneas donde el gen la nitrato reductasa se encontraba interrumpido.

## I ANTECEDENTES

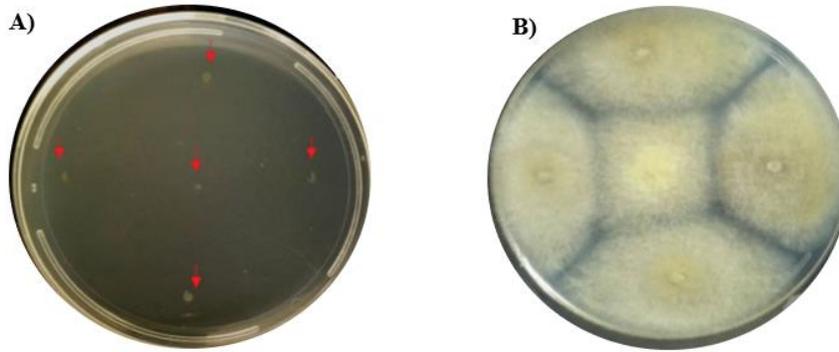
### 1.1 *Mucor circinelloides*

#### 1.1.1 Características generales

*M. circinelloides* (Figura 1) es un hongo dimórfico, crece en forma de levadura en condiciones anaerobias y como micelio en condiciones aerobias. Pertenece al filo Zygomycota que se caracteriza por tener una reproducción sexual por fusión de gametangios durante el cual se producen zigosporas y crecer a manera de hifas cenocíticas, lo que quiere decir que carecen de septo (White *et al.*, 2006). Se incluye dentro del orden de los Mucorales porque las esporas vegetativas que produce se desarrollan de forma endógena dentro de estructuras conocidas como esporangios, y en la familia Mucoraceae porque el esporangio se separa del resto del esporangióforo por un septo llamado columela, el género *Mucor* presenta esporangióforos ramificados en forma de racimos y esporangios globosos (Gooday, 1973). Se trata de un patógeno causante de mucormicosis, una infección de los senos paranasales, cerebro y pulmones, que es mortal en pacientes inmunocomprometidos, se encuentra distribuido en el suelo, estiércol y otros sustratos orgánicos en descomposición (Lee, 2011; Ocampo, 2012), en la Tabla 1, se muestra la clasificación taxonómica de *M. circinelloides*.

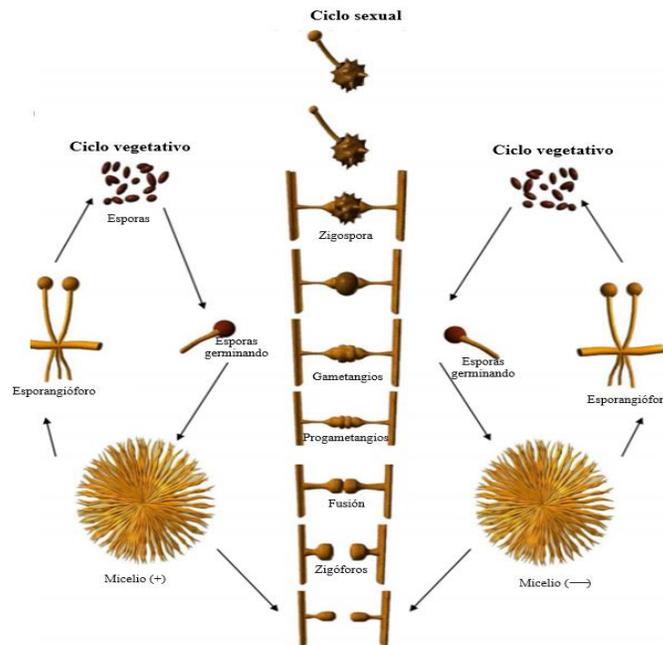
Tabla 1.-Clasificación taxonómica de *Mucor circinelloides* (Gooday, 1973).

<b>Clasificación taxonómica</b>	
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Orden</b>	Mucorales
<b>Familia</b>	Mucuroaceae
<b>Genero</b>	<i>Mucor</i>
<b>Especie</b>	<i>M. circinelloides</i>



**Figura 1.-** Desarrollo de *Mucor circinelloides* sobre medio MMC, pH 4.5. A) día 0, las flechas rojas indican el lugar donde las esporas fueron inoculadas, y B) día 4, el micelio ha colonizado la placa de Petri y ha esporulado (Vellanki *et al.*, 2018)

### 1.1.2 Ciclo de vida



**Figura 2.-** Ciclos de vida de *Mucor circinelloides*. La reproducción sexual implica producción de esporas haploides contenidas en los esporangios, sostenidos en los esporangióforos. La reproducción sexual comienza con el acercamiento de micelios con signo sexual diferente(+,—), cada uno de ellos formará un zigóforo, la fusión nuclear de estos dará paso al progametangio y gametangio desde el cual se desarrollará la zigospora

Las especies del género *Mucor* son heterocatalíticas, es decir existen dos tipos sexuales (+, —), morfológicamente idénticos a excepción del tamaño de las esporas asexuales, donde las producidas por el tipo “—” son de mayor tamaño (Li *et al.*, 2011). Presenta dos ciclos de vida diferentes asexual o vegetativo y sexual, como se ilustra en la Figura 2.

El ciclo de vida asexual permite la rápida propagación de esporas que se forman y distribuyen desde estructuras denominadas esporangios. Por otra parte, la etapa sexual permite asegurar la variabilidad genética y requiere el acercamiento de dos micelios de signo sexual diferente que secretan e intercambian feromonas que inducen la formación de hifas sexuales, los zigóforos, éstos se fusionan y mezclan en el contenido citoplasmático (plasmogamia), el resto de la pared se engrosa y se forma la zigospora, donde se fusionan los núcleos (cariogamia) y tras un periodo de latencia la zigospora germina y se forma el germoesporangio, que contiene los productos de la meiosis las germosporas (Gooday, 1973).

### **1.1.3 *Mucor circinelloides* como modelo de estudio**

*M. circinelloides* se ha utilizado para estudiar la biosíntesis de lípidos, la producción de biodiesel (Xia *et al.*, 2011), carotenoides (Papp *et al.*, 2013), antioxidantes para su uso en la industria alimenticia (Hameed *et al.*, 2020) y fenómenos como dimorfismo (Mcintyre *et al.*, 2002), silenciamiento génico (de Haro *et al.*, 2009) y transducción de señales (Moriwaki-Takano *et al.*, 2020).

Las principales ventajas de utilizar a *M. circinelloides* como modelo de estudio es que crece de manera sencilla en condiciones de laboratorio, su genoma se encuentra secuenciado y disponible, tiene un tamaño de alrededor de 36.6 mega bases, donde se incluyen aproximadamente 11 719 genes (Corrochano *et al.*, 2016) (JGI, Energy Department, EE UU), así como la existencia de protocolos de transformación estables que facilitan la introducción de ADN exógeno en posiciones específicas que permiten estudiar el papel de un gen dentro del desarrollo del hongo o completar mutaciones auxotróficas presentes en distintas líneas de *Mucor* como la cepa MU402, un mutante de los genes *pyrG* y *LeuA* que codifican para una

descarboxilasa esencial en la síntesis *de novo* de uracilo y una deshidratasa esencial para la síntesis de leucina (Nicolás *et al.*, 2007).

La primera técnica de transformación en ser establecida fue la descrita por van Heeswijck y Roncero (1984) que consiste en la generación de protoplastos que son incubados en la presencia de ADN recombinante, iones de calcio y polietilenglicol, este último dirige la integración del material genético de interés al genoma del hongo, después las transformantes resultantes son separadas utilizando medios de selección, este protocolo les permitió completar la auxotrofia a la leucina de una línea de *M. circinelloides*. En el 2011 Gutierrez *et al.*, establecieron los parámetros para obtener un mayor porcentaje de transformantes, que consiste en la aplicación de un pulso de alto voltaje sobre la célula desprovista de la pared celular para generar poros en la membrana plasmática que permiten que sea más permeable y acepte el ADN recombinante con mayor facilidad, comparado con el protocolo desarrollado por van Heeswijck y Roncero. Por otro lado, el descubrimiento del fenómeno de silenciamiento génico en *M. circinelloides* ha abierto la posibilidad de estudiar la función de genes sin necesidad de la generación de líneas mutantes, por ejemplo el estudio de la ruta de biosíntesis de carotenoides (Nicolás *et al.*, 2003). También existe un método de transformación para *Mucor* mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Nyilasi *et al.*, 2005) pero solo ha sido utilizado ocasionalmente, por ejemplo Papp *et al.*, (2012) generó una cepa de *Mucor* capaz de producir astaxantina, un carotenoide valioso en la industria alimenticia, al integrar en su genoma el gen de la b-caroteno cetolasa.

## **1.2 Radicales químicos**

### **1.2.1 Especies reactivas de oxígeno**

Los radicales son especies químicas, tanto orgánicas como inorgánicas, se caracterizan por tener electrones sin aparearse lo que les permite reaccionar fácilmente, por su carácter reactivo pueden generar daños en el material genético y conducir la oxidación de lípidos y proteínas. El rol que tienen en condiciones como la diabetes, isquemia y otras implicaciones médicas ha sido ampliamente descrito (Halliwell *et al.*, 2015).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen al ion superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y el peróxido ( $H_2O_2$ ), pueden producirse como subproductos del metabolismo aerobio o pueden ser sintetizadas a través de reacciones mediadas por las enzimas como las NADPH oxidasas (Nox) que producen  $O_2^-$  a partir de  $O_2$  y NADP(H) éstas se encuentran conservadas entre animales, hongos y plantas (Lambeth 2004). En la Tabla 2 se resume la función de diferentes enzimas del tipo Nox en animales, plantas y hongos.

**Tabla 2.-** Distribución y función de enzimas tipo Nox, en animales, plantas y hongos

<b>Organismo</b>	<b>Enzima</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
<b>Animales</b>	Nox 1-5, Duox2	Protección, síntesis de hormonas	Lambeth 2004
<b>Plantas</b>	Rboh	Protección, supervivencia, expansión de las raíces	Liu <i>et al.</i> , 2016
<b>Hongos</b>	NoxA, NoxB, NoxC	Protección, producción de cuerpos fructíferos, germinación de ascosporas, patogénesis	Takemoto <i>et al.</i> , 2007; Scott <i>et al.</i> , 2008

Quizás la función más estudiada de esta familia de enzimas es la respuesta de defensa frente a agentes patógenos conocida como “estallido oxidativo” donde las células del organismo huésped sintetizan y liberan ROS para atacar a la posible fuente de la amenaza (Aguirre *et al.*, 2005).

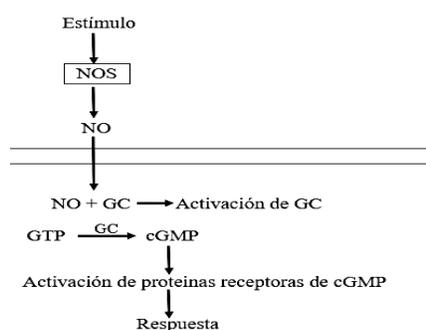
### 1.2.2 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical diatómico, liposoluble, reactivo y difusible, que se produce mediante oxidación de compuestos nitrogenados o reducción de óxidos de nitrógeno (McCleverty, 2004). En las últimas tres décadas el NO ha ganado protagonismo como molécula de importancia biológica. Los primeros antecedentes que establecen la importancia del NO en procesos celulares se remontan al siglo XX, cuando se descubre que burbujear NO a través de un preparado de músculo liso producía la relajación del mismo por sus

aportaciones al descubrimiento del NO como molécula de señalización en el sistema cardiovascular los investigadores Robert Francis Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad compartieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 1998 (Raju 2000).

De manera similar que sucede con las ROS, también existe una familia de enzimas que sintetizan NO, se trata de las óxido nítrico sintasas (NOS), las NOS y sus isoformas neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS) únicamente han sido reportadas en miembros del reino animal, donde la principal función del NO es la de desencadenar un conjunto de señales que tendrá diferentes respuestas según el tejido donde sea sintetizado, entre las que se pueden destacar vasodilatación, neurotransmisión y protección (Carvajal *et al.*, 2000; Alderton *et al.*, 2001). En la Figura 3 se muestra un ejemplo de la ruta que sigue el NO para mediar una respuesta.

En miembros del reino vegetal se ha confirmado la existencia de una ruta enzimática de síntesis de NO, pero en ningún caso presentan homología con las NOS de mamíferos (Guo *et al.*, 2003; Zemojtel *et al.*, 2006; Crawford *et al.* 2006; Prochazkova *et al.*, 2014). Los integrantes de este reino podrían sintetizar NO desde  $\text{NO}_3$ , en una reacción catalizada por la nitrato reductasa en condiciones de saturación de nitrito y de exceso de NADPH, esta molécula interviene en respuestas hormonales y de defensa, (Wilson *et al.*, 2008).

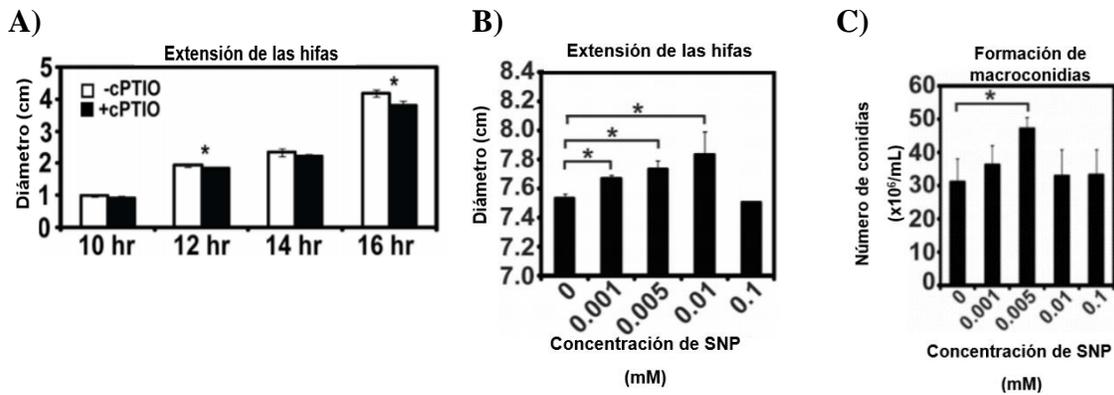


**Figura 3.-** Producción de NO en respuesta a un estímulo. El radical es permeable a través de la membrana celular y activa a la enzima guanilato ciclasa (GC) que cataliza la reacción de GTP a cGMP este último metabolito tiene diferentes proteínas dianas, y por lo tanto genera diferentes respuestas (editado de Carvajal *et al.*, 2000).

La figura 3 se puede utilizar para esquematizar la vasodilatación mediada por NO, la contracción del músculo se logra a través de la interacción entre la actina y miosina, y es dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  el NO sintetizado en el endotelio llega hasta los miocitos y activa a la guanilato ciclasa soluble (sGC) que desencadena una serie de respuestas donde el resultado final es la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la disminución de este catión, en respuesta a este cambio la actina esconde los sitios de unión a la miosina, por ende el músculo liso se relaja y aumenta el radio de los vasos sanguíneos

### 1.2.3 Óxido nítrico en hongos

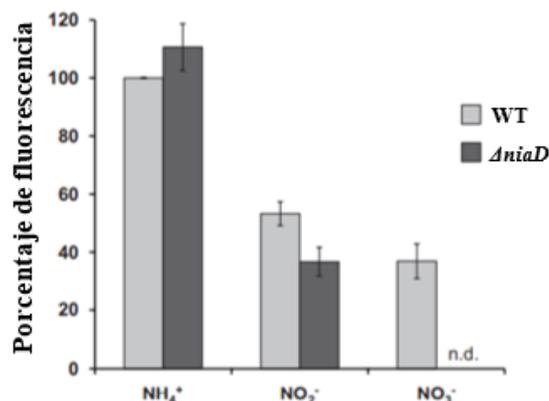
Aún no se conocen, en su totalidad, los genes y enzimas que participan en la biosíntesis de NO en hongos, los trabajos relacionados al tema se enfocan en evidenciar la producción de NO durante su ciclo de vida, mediante reacciones que dan lugar a una señal fluorescente, o determinar su función, de manera indirecta, al aumentar y disminuir la concentración de NO mediante el uso de agentes donadores o eliminadores para observar un fenotipo similar al que se podría esperar de las cepas mutantes (Gong *et al.*, 2007; Pengkit *et al.*, 2016). Por ejemplo, Maier *et al.*, (2001) utilizando nitroprusiato de sodio, SNP, un donador de NO, encontró que la presencia de este radical promueve la formación de macroesporangióforos en *Phycomyces blakesleeanus* de la misma manera que lo hace la luz. Prats *et al.*, (2008) utilizando cPTIO, un eliminador de NO, encontró que dicha molécula participa en la formación del apesporio en *Blumeria graminis*. Más recientemente, Pengkit *et al.*, (2016), evidenció la participación del NO en el desarrollo de micelio y formación de esporas en *Neurospora crassa*, como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.-**Efecto del NO en el desarrollo de *Neurospora crassa*. A) Monitoreo del desarrollo de *N. crassa* en medio VM sólido, incubado con o sin cPTIO, un eliminador de NO; B) Monitoreo del desarrollo de *N. crassa* creciendo sobre medio VM sólido incubado con nitroprusiato de sodio (SNP), donador de radicales de NO, a diferentes concentraciones y C) Monitoreo de la formación de macroconidias en medio VM sólido incubado con nitroprusiato de sodio a diferentes concentraciones. Los asteriscos (\*) indican diferencia estadísticamente significativa (Pengkit *et al.*, 2016).

Observando las figuras 4A y 4B y 4C se aprecia que mientras que eliminar el NO del medio de crecimiento reduce el tamaño de las hifas agregarlo aumenta el tamaño de éstas y a su vez incrementa el número de esporas.

*Physarum polycephalum*, permanece como el único miembro del reino fungi, donde se ha reportado y confirmado la presencia de un gen que codifica para una enzima NOS funcional, *PHYSNOSA*, se expresa bajo condiciones de inanición y se inhibe en presencia de glucosa, su actividad fue corroborada por su rendimiento en catalizar la reacción de arginina a citrulina (Golderer *et al.*, 2001). En otros miembros del reino fungi la producción total de NO podría estar sujeta a la actividad de una nitrato reductasa como demostró Marcos *et al.*, (2016) en *A. nidulans*, utilizando una cepa mutante de esta enzima, *ΔniaD*, como se muestra en la Figura 5.

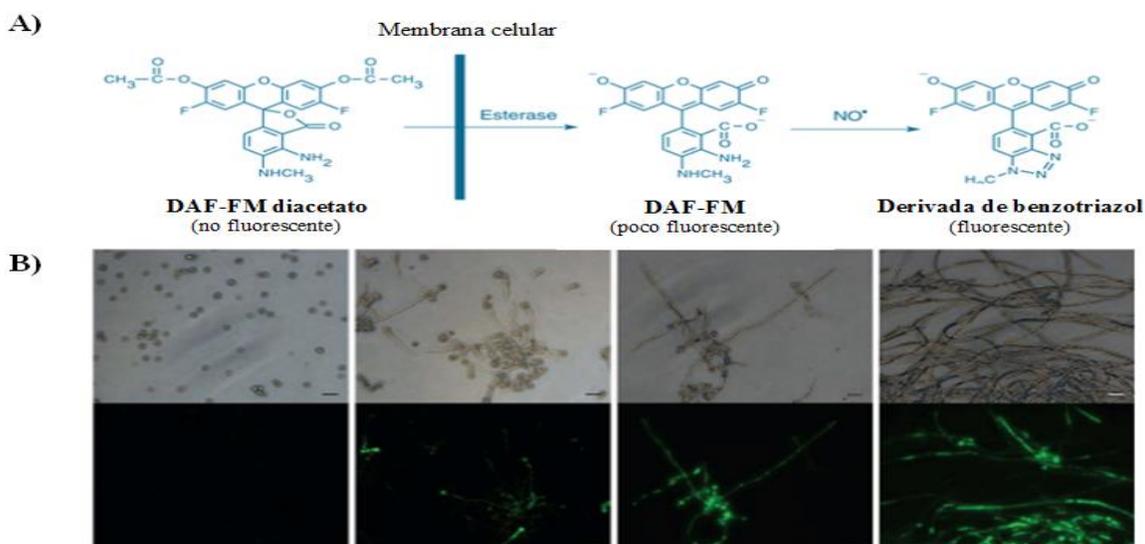


**Figura 5.-** Cuantificación de NO en *Aspergillus nidulans*. WT, cepa silvestre (barras grises) y  $\Delta niaD$ , mutante de la nitrato reductasa (barras negras). Las cepas fueron cultivadas en medio líquido que únicamente contenía amonio ( $NH_4$ ), nitrito ( $NO_2$ ) o nitrato ( $NO_3$ ) como fuente de nitrógeno. n.d. indica que no hay crecimiento en las condiciones especificadas (Marcos *et al.*, 2016).

Como se observa en la Figura 5,  $\Delta niaD$  produce aproximadamente un 30 % menos de NO respecto a la cepa silvestre cuando ambas se hacen crecer en medio líquido donde la única fuente de nitrógeno es el  $NO_2$ , esto indica que parte de la producción total de este radical, está sujeta a la actividad de la enzima nitrato reductasa, que podría estar utilizando nitratos y nitritos como sustratos.

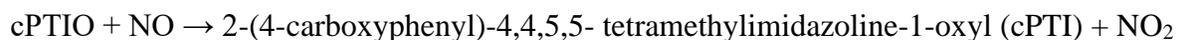
### 1.3 Detección de óxido nítrico intracelular

Kojima *et al.*, (1998), desarrolló un protocolo capaz de detectar el NO en células vivas, se basa en la fácil difusibilidad del indicador fluorescente “amino-5-metilamino-2',7'-difluoroscein diacetato” (DAF-FM) a través de la membrana celular y su posterior reacción con el NO celular para dar lugar al benzotriazol, esta especie puede ser detectada en un microscopio usando un filtro de excitación de 465-495 nm, como se muestra en la Figura 6, la intensidad de dicha señal es proporcional a la concentración de NO en el momento de la reacción. Las imágenes, una vez capturadas, pueden ser procesadas utilizando paquetes informáticos como ImageJ que promedia la intensidad de la señal y le asigna un valor numérico (Prats *et al.*, 2008).



**Figura 6 .-** Detección de NO con DAF-FM diacetato. A) El DAF-FM diacetato es permeable a través de la célula, las esterasas hidrolizan el enlace éster, para dar lugar al DAF-FM este último reacciona con el NO para formar el benzotriazol, especie que es fluorescente bajo un filtro de excitación de 465-495 nm (Kojima *et al.*, 1998). B) Detección de NO intracelular utilizando DAF-FM diacetato en *Neurospora crassa* a 0, 4, 8, 16 h en medio VM sólido (Pengkit *et al.*, 2016).

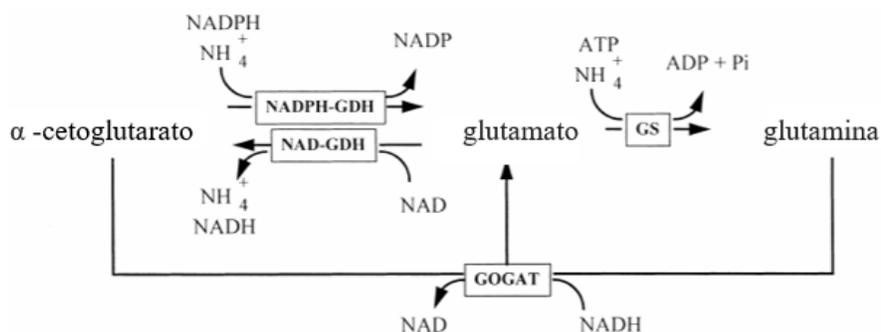
EL DAF-FM diacetato también puede reaccionar con el ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico dando lugar a una señal fluorescente, sin embargo, la posibilidad de un falso positivo puede ser excluida utilizando un eliminador de NO. Si la señal fluorescente disminuye a medida que se aumenta la concentración de cPTIO hasta llegar a 0, indica que dicha respuesta es producto de la reacción entre el DAF-FM y el NO y no otro compuesto (Marcos *et al.*, 2016). La reacción entre el NO y el cPTIO se presenta a continuación:



#### 1.4 Asimilación de nitrógeno en hongos

En su hábitat los hongos encuentran diversas formas de nitrógeno que pueden ser utilizadas para sintetizar aminoácidos, ácidos nucleicos y otros compuestos nitrogenados. Pero no todas las formas disponibles de este elemento favorecen su desarrollo de la misma manera, entonces se pueden clasificar como buenas o malas fuentes de nitrógeno dependiendo del número de pasos metabólicos que se requieren en orden para ser aprovechadas. Cualquier

compuesto de nitrógeno que sea utilizado como sustrato por el hongo debe ser catalizado hasta la forma de glutamato y glutamina, que son los donadores de nitrógeno para formar los demás compuestos nitrogenados del contenido celular (Wiame *et al.*, 1985). Estos dos aminoácidos pueden ser sintetizados desde  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio ( $\text{NH}_4$ ), la interconversión entre los aminoácidos glutamato, glutamina y  $\text{NH}_4$  se le conoce como metabolismo central del nitrógeno (Ter Schure *et al.*, 2000), proceso que se encuentra esquematizado en la Figura 7.



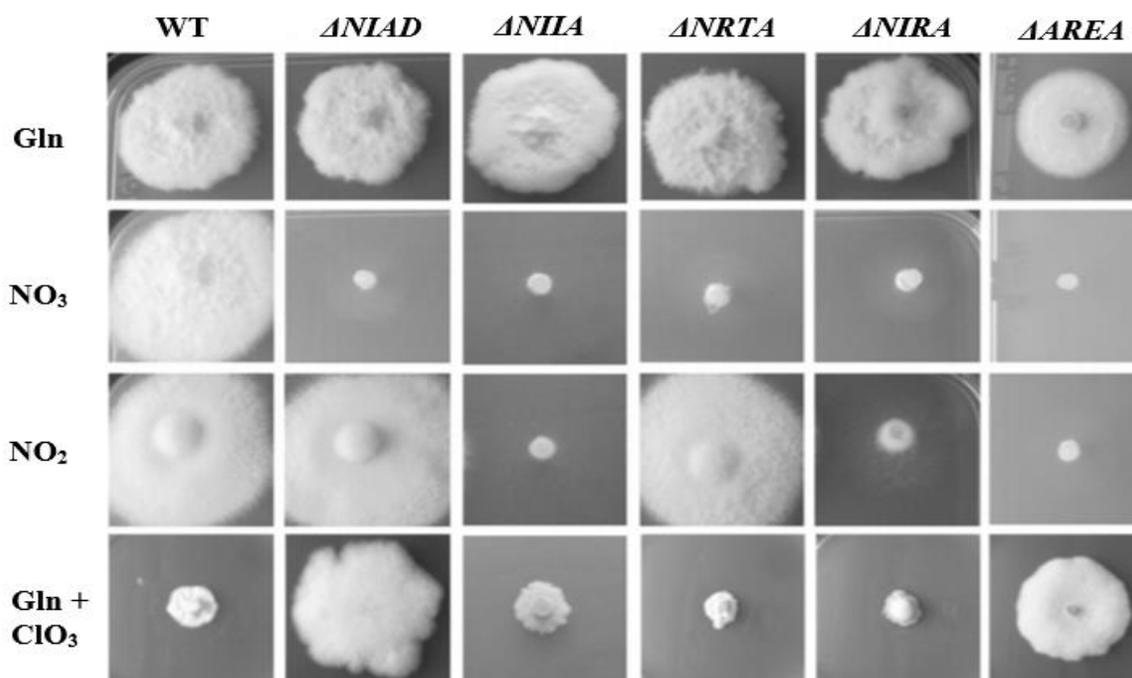
**Figura 7.-**Metabolismo central de nitrógeno. Los aminoácidos glutamato y glutamina pueden ingresar a la célula por transportadores específicos o bien ser sintetizados a partir de  $\text{NH}_4$  a través de las enzimas glutamato deshidrogenasa (GDH) o glutamina sintasa (GS) (Ter Schure *et al.*, 2000).

Los hongos también pueden utilizar otros compuestos, como los nitratos ( $\text{NO}_3$ ) y nitritos ( $\text{NO}_2$ ), para incorporar el nitrógeno a su metabolismo, pero deben de existir bajas o nulas concentraciones de las fuentes más fácilmente asimilables de nitrógeno y presencia de  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  (Ter Schure *et al.*, 2000; Pfanmüller *et al.*, 2017).

Este trabajo pretende estudiar cómo cambia la producción de  $\text{NO}$  en *M. circinelloides* cuando las únicas especies nitrogenadas disponibles son  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  o glutamato, por lo que a continuación se describirá el metabolismo de los dos primeros.

El primer paso de la asimilación de  $\text{NO}_3$  es su incorporación a través de los transportadores de nitrato, NrtA y NrtB y dos reducciones catalizadas por las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR) para llevar el  $\text{NO}_3$  hasta la forma de  $\text{NH}_4$  (Cove, 1979). La expresión

de estos transportadores y reductasas está regulada bajo la actividad de los factores de transcripción NirA (regulador específico de la asimilación de  $\text{NO}_3$ ) y AreA (regulador global dependiente de nitrógeno) (Berger *et al.*, 2006; 2008). La importancia de cada una de las anteriores proteínas durante la asimilación de nitrato ha sido demostrada generando líneas mutantes incapaces de expresarlas, en modelos de estudio fúngicos como *Aspergillus nidulans* (Schinko *et al.*, 2013) y recientemente en *Fusarium fujikuroi* (Pfanmüller *et al.*, 2017), como se presenta en la Figura 8.



**Figura 8.-** Monitero del crecimiento de *Fusarium fujikuroi* y sus mutantes sobre diferentes fuentes de nitrógeno. Wt, línea silvestre;  $\Delta NIAD$ , mutante del gen de la nitrato reductasa;  $\Delta NIIA$ , mutante del gen de la nitrito reductasa;  $\Delta NRTA$ , mutante del gen de la permeasa de  $\text{NO}_3$ ;  $\Delta NIRA$ , mutante del gen del factor de transcripción NirA y  $\Delta AREA$ , mutante del gen del factor de transcripción AreA. Las cepas fueron cultivadas en medio mínimo suplementado con glutamina al 6 mM (Gln), nitrato de sodio 12 mM ( $\text{NO}_3$ ), nitrito de sodio 12 mM ( $\text{NO}_2$ ) o glutamina 6 mM y clorato de potasio 30 mM (Gln +  $\text{ClO}_3$ ) a 28° C durante 4 días (Pfanmüller *et al.*, 2017)

En la anterior figura se observa que todas las cepas crecen sobre glutamina puesto que ninguna está afectada en la ruta de asimilación de este aminoácido. Sobre  $\text{NO}_3$ , ninguna de las mutantes es capaz de desarrollarse porque no contienen la información necesaria para transportarlo a su interior o bien de metabolizarlo. Cuando se hacen crecer sobre  $\text{NO}_2$  crecen

*ΔNRTA*, lo que indica que el NO<sub>3</sub> y NO<sub>2</sub> son transportados por diferentes permeasas y *ΔNIAD*, porque ya se encuentra disponible como sustrato el producto de esta enzima.

El ion clorato (ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>) puede ser utilizado como sustrato por la nitrato reductasa para dar lugar al clorito (ClO<sub>2</sub>) una especie altamente nociva (Cove, 1976), es por ello que *ΔNIAD* puede crecer en medio suplementado con ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> más glutamina, porque no contiene la información necesaria para reducirlo a diferencia de las demás cepas que si expresan la nitrato reductasa.

### 1.5 Rutas de eliminación de óxido nítrico en hongos

El NO es un radical y su acumulación puede provocar condiciones de estrés biológico que conducen a daño de ADN, lípidos y cambios conformacionales en proteínas como lo es la nitrosilación en grupos tiol (Liu *et al.*, 2000). Es por ello que es necesario que los hongos cuenten con algún mecanismo que les permita transformar el NO cuando se encuentra en concentraciones mayores a las requeridas, en alguna forma más estable. Cánovas (2016) presenta las principales rutas que podrían estar operando con este fin y se encuentran resumidas en la Tabla 3.

**Tabla 3.-**Enzimas que participan en la eliminación de NO reportadas en hongos.

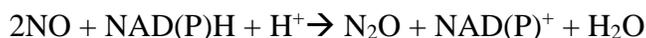
<b>Enzima</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Producto</b>	<b>Referencia</b>
<b>Flavoheemoglobina</b>	NO	NO <sub>3</sub> , NO <sub>2</sub>	Takaya <i>et al.</i> , 1997; Bonamore <i>et al.</i> , 2007
<b>P450 NO reductasa</b>	NO	N <sub>2</sub> O	Črešnar <i>et al.</i> , 2011; Shoun <i>et al.</i> , 2012
<b>GSNO reductasa</b>	Glutation-NO (GSNO)	NH <sub>3</sub>	Fernández <i>et al.</i> , 2003; Wilson <i>et al.</i> , 2008; Chaki <i>et al.</i> , 2010.

Las flavohemoglobinas son proteínas, con actividad dioxigenasa que están involucradas en la homeostasis del NO, tanto endógeno como exógeno, catalizan la reacción del radical hasta NO<sub>3</sub>. Están constituidas por 3 dominios: globina, donde se une el Fe (N-terminal) y es donde se lleva a cabo la catálisis de NO a NO<sub>3</sub> y los dominios de unión a las coenzimas FAD (flavín adenín dinocleotido en su forma oxidada) y NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenín dinocleotido en su forma oxidada) (C-terminal) (Takaya *et al.*, 1997; Bonamore *et al.*, 2007.). La reacción se lleva a cabo como se describe a continuación:



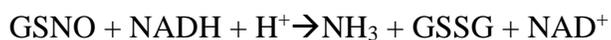
En condiciones de baja concentración de oxígeno, la actividad de la enzima puede cambiar a monoxigenasa de manera que el radical de nitrógeno solo será oxidado hasta nitrito (NO<sub>2</sub>) (Gardner *et al.*, 1998).

La enzima citocromo P450 óxido nítrico reductasa (P450 NO reductasa), es parte del sistema desnitrificante presente en algunos hongos y levaduras, se trata de una hemoproteína que utiliza NADPH para reducir el NO hasta N<sub>2</sub>O (Črešnar *et al.*, 2011) de la siguiente manera:



La anterior reacción se lleva a cabo en el dominio p450, conservado en la superfamilia de enzimas citocromo P450. (Shoun *et al.*, 2012).

El glutatión, un tripéptido no proteico (conformado de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina), es uno de los principales antioxidantes de las células, puede existir en forma reducida (GSH) u oxidada (GSSG), el grupo tiol (SH), presente en la cisteína del glutatión tiene la capacidad de reaccionar con el NO para formar glutatión S-nitrosilado (GSNO), este último puede ser metabolizado por la enzima GSNO reductasa de la siguiente manera:



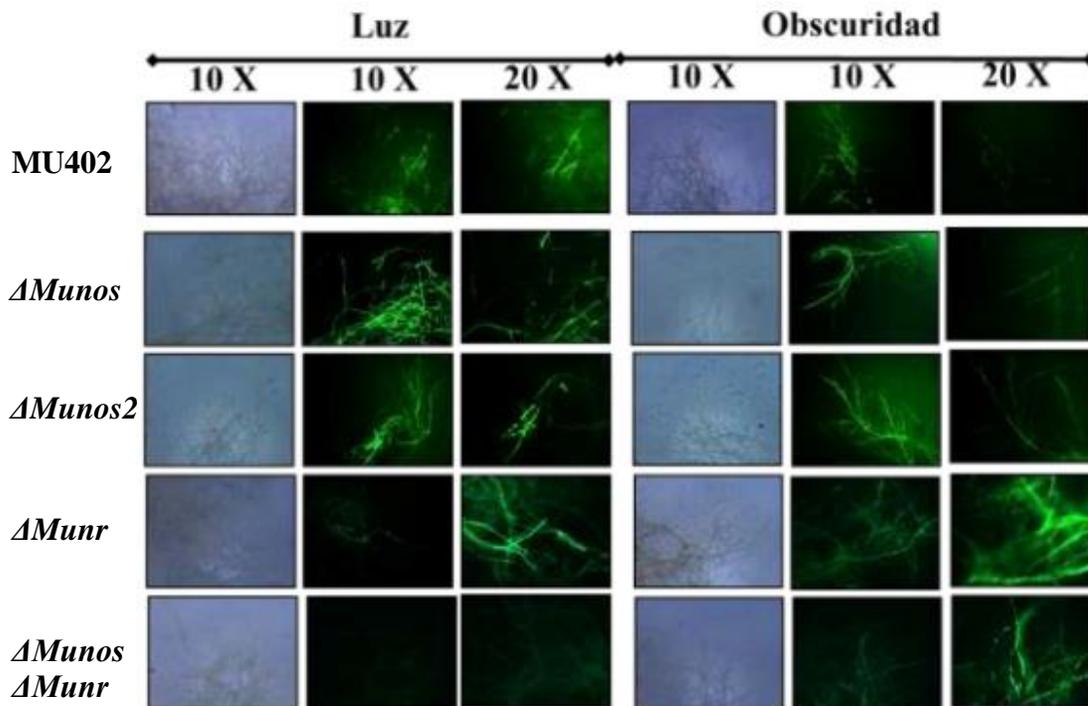
Las GSNO reductasas son enzimas con actividad de alcohol deshidrogenasas dependientes de glutatión, que contienen un átomo de zinc en su sitio activo cuyos dominios conservados son el dominio catalítico donde se lleva a cabo la oxidación del aldehído y el dominio de unión a zinc (Wilson *et al.*, 2008; Chaki *et al.*, 2010, Fernandez *et al.*, 2003)

## 1.6 Trabajo previo

En 2018, J.M. Tinajero identificó en *M. circinelloides*, tres genes cuyas proteínas predichas guardan homología con la óxido nítrico sintasa de *P. polycephalum*, MuNOS (Golderer *et al.*, 2001), y *A. thaliana* MuNOS2 (Guo *et al.*, 2003), así como la nitrato reductasa de *A. nidulans*, MuNR (Cove 1966).

Una vez encontrados *In silico* dichos genes, se obtuvieron las transformantes, utilizando a MU402 como línea silvestre.  $\Delta MuNOS$ ,  $\Delta MuNOS2$ ,  $\Delta MuNR$  se obtuvieron reemplazando el marco abierto de lectura de los genes objetivo por el marco abierto de lectura de *LeuA*. También se obtuvo la doble mutante  $\Delta MuNOS\Delta MuNR$  a partir de  $\Delta MuNOS$  sustituyendo el marco abierto de lectura de la nitrato reductasa por el marco abierto de lectura de *pyrG*.

Se cuantificó la producción de NO de MU402 y sus mutantes utilizando el reactivo DAF-FM diacetato para determinar si alguno de los genes interrumpidos estaba involucrado en la síntesis de este radical, los resultados se presentan en la Figura 9.



**Figura 9.**-Detección de NO en mutantes de genes tipo NOS o *niaD* en *Mucor circinelloides*. Detección intracelular de NO utilizando DAF-FM diacetato. Campo claro y campo fluorescente, respectivamente. Tomado de Tinajero-Rodríguez (2018).

Respecto a los resultados presentados en la figura 9 se observa que únicamente parece haber una disminución de la señal fluorescente en las mutantes del gen de la nitrato reductasa. Es importante resaltar que los resultados presentados coinciden con lo reportado en la literatura, Pengkit *et al.*, (2016) generó cuatro mutantes de genes con posible actividad de NOS en *N.crassa* y no observó ningún cambio aparente en la producción de NO, mientras que Marcos *et al.*, (2016) observó una disminución de aproximadamente el 30 % de NO en la mutante de la nitrato reductasa de *A. nidulans*, de manera similar que se observa con  $\Delta$ Munos $\Delta$ Munr en la figura 9.

## **Justificación**

La producción de óxido nítrico depende de la asimilación de nitrógeno y este radical se ha detectado en organismos diversos. Sin embargo, los detalles de su biosíntesis y eventos que regula en hongos no han sido del todo esclarecidos. Por ello, es necesario identificar secuencias de genes que codifiquen para enzimas involucradas en el metabolismo de dicho radical en el hongo *Mucor circinelloides*.

## **Hipótesis**

El metabolismo del óxido nítrico en *Mucor circinelloides* está sujeto a la actividad de enzimas del tipo reductasas, que no han sido identificadas en su genoma.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la producción de óxido nítrico en *Mucor circinelloides* mediante el análisis de cepas silvestre y mutantes de la nitrato reductasa.

### **Objetivos específicos**

- Identificar *In silico* secuencias parecidas a las de las enzimas involucradas en la homeostasis de NO.
- Caracterizar morfológicamente las cepas silvestre, MU402 y mutantes de la nitrato reductasa.
- Corroborar la producción de NO en la cepa silvestre, MU402 y mutantes de la nitrato reductasa utilizando DAF-FM diacetato.

## II MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Cepas

En la Tabla 4, se presentan las cepas de *M. circinelloides* utilizadas para el desarrollo de este trabajo.

**Tabla 4.-** Cepas de *M. circinelloides* utilizadas durante esta investigación

Nombre	Genotipo	Fenotipo	Referencia
Tipo silvestre (wt)			Universidad de Murcia
MU402	<i>LeuA<sup>-</sup>, pyrG<sup>-</sup></i>	Leu <sup>-</sup> , Ura <sup>-</sup>	Nicolás <i>et al.</i> , 2007
$\Delta$ MuNR	<i>LeuA<sup>-</sup>, pyrG<sup>+</sup></i>	Leu <sup>-</sup> , Ura <sup>+</sup> , niaD <sup>-</sup>	Tinajero <i>et al.</i> , 2018
$\Delta$ MuNOS $\Delta$ MuNR	<i>LeuA<sup>+</sup>, pyrG<sup>+</sup></i>	Leu <sup>-</sup> , Ura <sup>+</sup> , nos <sup>-</sup> ,niaD <sup>-</sup>	Tinajero <i>et al.</i> , 2018

### 2.2 Medios de cultivo

#### 2.2.1 Medio YPG

Mezclar 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura en 0.5 L de agua destilada. En un segundo matraz añadir 20 g de agar en 0.5 L de agua destilada. Esterilizar por calor húmedo en autoclave a 121 °C y 15 psi. Mezclar el contenido de ambos matraces. El pH se debe ajustar a 4 - 4.5 utilizando HCl o NaOH 1 M según sea el caso una vez que el medio sea palpable. Agregar uridina [200 mg/L] o leucina [20 µg/L] cuando sea necesario. Vertir en placas de Petri (25 mL/placa), esperar a que solidifique y almacenar a 5° C.

#### 2.2.2 Medio mínimo con casaminoácidos (MMC)

Mezclar 10 g de casaminoácidos, 0.5 g de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos, 20 g de glucosa en 0.5 L de agua. En un segundo matraz disolver 15 g de agar en 0.5 L de agua. Esterilizar por calor húmedo en autoclave a 121 °C y 15 psi. Mezclar el contenido de ambos matraces. Esperar a que la temperatura del medio sea palpable para agregar niacina y tiamina [1 mg/mL]. El pH se debe ajustar a 4 – 4.5 utilizando HCl o NaOH 1 M según sea el caso. Agregar uridina [200 mg/L] o leucina [20 µg/L] cuando sea necesario. Vaciar en cajas de Petri, esperar a que solidifique y almacenar a 5° C.

### **2.2.3 Medio base de nitrógeno (YNB)**

Mezclar 1.5 g de (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 1.5 g de ácido glutámico, 0.5 g de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos, 10 g de glucosa en 0.5 L de agua destilada. En un segundo matraz agregar 20 g de agar. Esterilizar por calor húmedo en autoclave a 121°C y 15 psi. Mezclar el contenido de ambos matraces. Esperar a que la temperatura del medio sea palpable para agregar niacina y tiamina [1 mg/mL]. El pH se debe ajustar a 4 – 4.5 utilizando HCl o NaOH 1 M según sea el caso. Agregar uridina [200 mg/L] o leucina [20 µg/L] cuando sea necesario. Vaciar en cajas de Petri esperar a que solidifique y almacenar a 5° C.

### **2.2.4 Medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno**

Mezclar 5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.24 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 mg, 10 g de glucosa, 0.423 g de fuente de nitrógeno (Glu, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>) en 0.5 L de agua destilada. Ajustar pH 4-4.5. Mezclar 20 g de agar en 0.5 L de agua destilada. Esterilizar por calor húmedo en autoclave a 121 °C y 15 psi. El pH se debe ajustar a 4 – 4.5 utilizando HCl o NaOH 1 M según sea el caso. Agregar uridina [200 mg/L] o leucina [20 µg/L] cuando sea necesario. Vaciar en cajas de Petri esperar a que solidifique y almacenar a 5° C.

### **2.3 Búsqueda de secuencias *In silico* en *M. circinelloides***

Buscar homólogos reportados para la proteína de interés o el gen que la codifica en otros organismos, preferentemente en aquellos que evolutivamente sean cercanos al modelo de estudio, las secuencias se pueden encontrar en artículos científicos o en bases de datos como UniProt (<https://www.uniprot.org/>) o NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias obtenidas se descargan en formato FASTA (nombre + > + secuencia de aminoácidos o nucleótidos), para realizar una comparación contra aquellas disponibles en la página del genoma de *Mucor* ([https://mycocosm.jgi.doe.gov/Muccir1\\_3/Muccir1\\_3.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/Muccir1_3/Muccir1_3.home.html)) se selecciona la opción Blast, en el primer recuadro disponible se coloca la secuencia reportada como funcional, en la opción del criterio de búsqueda debe especificarse que se está comparando y que se están buscando (nucleótidos vs nucleótidos o proteína vs proteína), una vez alimentados estos datos se corre el programa con la opción “run blast”, en la nueva ventana aparecerán todas las secuencias que conservan similitud con aquella introducida en el criterio de búsqueda, aparecerá su nombre seguido de un diagrama de colores relacionado a la similitud entre ambas cadenas. Al seleccionar sobre el nombre de la nueva secuencia, se

abrirá una nueva ventana que te permitirá descargarla en formato FASTA. El anterior proceso debe ser repetido utilizando las demás cadenas de aminoácidos o nucleótidos encontrados en la literatura. El objetivo es encontrar dentro de la base de datos de Mucor aquellas secuencias que se repitan más veces como resultado de esta comparación para su futuro análisis.

#### **2.4 Alineamiento de secuencias múltiple**

Abrir en el navegador la página de Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), en cualquiera de sus versiones, en el primer recuadro se debe especificar si se está comparando ADN, ARN o proteínas, en el segundo recuadro se introducen en formato FASTA todas las secuencias que se desean alinear, separadas por una línea de espacio, la tercera opción de esta página permite ordenar al programa en que formato se desea obtener el alineamiento, la opción predeterminada entrega el alineamiento indicando en la parte inferior si existe una identidad, con un asterisco (\*) o una sustitución con dos puntos (:). Se puede seleccionar otras opciones para que el alineamiento sea entregado en otros formatos, por ejemplo, FASTA que permite procesar el alineamiento utilizando otros programas como BoxShade que sombrea de negro aquellos caracteres donde encuentra identidad y de gris donde encuentra una sustitución.

#### **2.5 Encontrar dominios dentro de una secuencia**

Abrir en el navegador el programa Smart-Embl (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), colocar en el segundo recuadro disponible la secuencia que se desea analizar en formato FASTA y seleccionar la opción dominios PFAM, correr el programa. El software analizará la cadena contra la base de datos y se obtendrá una predicción de los dominios conservados dentro de su arquitectura.

#### **2.6 Crecimiento y esporulación**

Inocular alícuotas de  $4 \times 10^3$  esporas por cada 10 mL de medio de cada cepa e incubar. Al tercer día el micelio se lava con 3 mL de Tween 80 (0.002 %) haciendo pasar un asa estéril delicadamente sobre este. El sobrenadante se separa en tubos Eppendorf (2 por cada placa de Petri) y se homogeniza en Vortex a 8000 rpm. Se mezclan ambas pastillas en un solo tubo Eppendorf y se resuspenden en 1 mL de Tween 80 (0.002 %). Para determinar el número de esporas, se homogeniza el tubo Eppendorf con las esporas con Vortex (5 min) y se cuentan

alícuotas de 8  $\mu\text{L}$  (por cada retícula) en cámara de Neubauer. De ser necesario se pueden realizar diluciones de la muestra original.

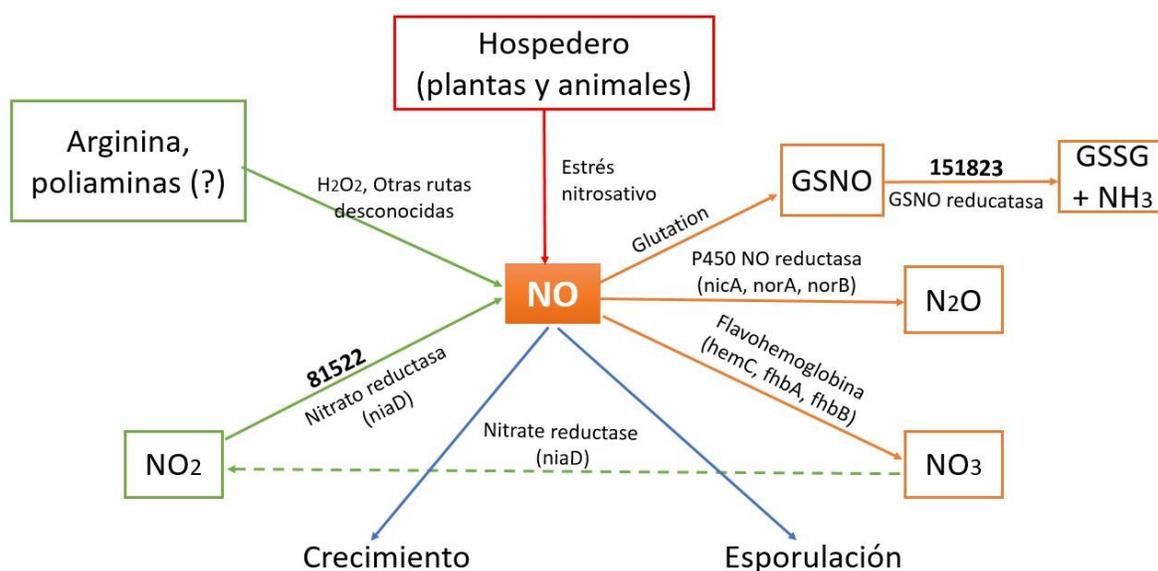
### **2.7 Detección de óxido nítrico con DAF-FM diacetato**

Inocular  $4 \times 10^3$  esporas en 10 mL de medio mínimo líquido, utilizando glutamina,  $\text{NO}_3$  o  $\text{NO}_2$ , como fuente de nitrógeno según se desee analizar, incubar en agitación a 180 rpm durante 20 h. Terminado el tiempo de incubación separar el micelio del caldo de cultivo con ayuda de una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  y un filtro de jeringa, lavar la pastilla con solución PBS 1x y resuspender el micelio en 1 mL de PBS 1x. A la muestra problema agregar DAF-FM diacetato hasta una concentración de 20  $\mu\text{M}$ . Incubar durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Durante este periodo ocurre la reacción entre el DAF-FM diacetato y el NO disponible. Para preparar las muestras para ser observadas a través del microscopio de fluorescencia, primero se centrifugan a 10 000 rpm durante 5 min y se desecha el sobrenadante, la pastilla se lava con PBS 1x (dos veces) con ayuda de una pipeta, para eliminar DAF-FM diacetato remanente, resuspender la biomasa en 1 mL de PBS 1x y homogenizar en Vortex durante 30 s, tomar alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  y preparar para su observación (utilizando un portaobjetos y un cubreobjetos). El microscopio de fluorescencia Leica DM500B, debe de estar encendido una hora antes de poder utilizarlo, porque la fuente de poder necesita calentar. Para evitar ruido o reacciones secundarias se trabaja en oscuridad, se coloca la muestra sobre la platina y se enfoca utilizando el objetivo de 10x, seleccionar el filtro de 465-495 nm dentro del software del microscopio y registrar imágenes bajo los objetivos de 10x y 20x. Las imágenes quedan guardadas dentro del ordenador adaptado al microscopio y deben ser guardadas dentro de un disco virgen.

### III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

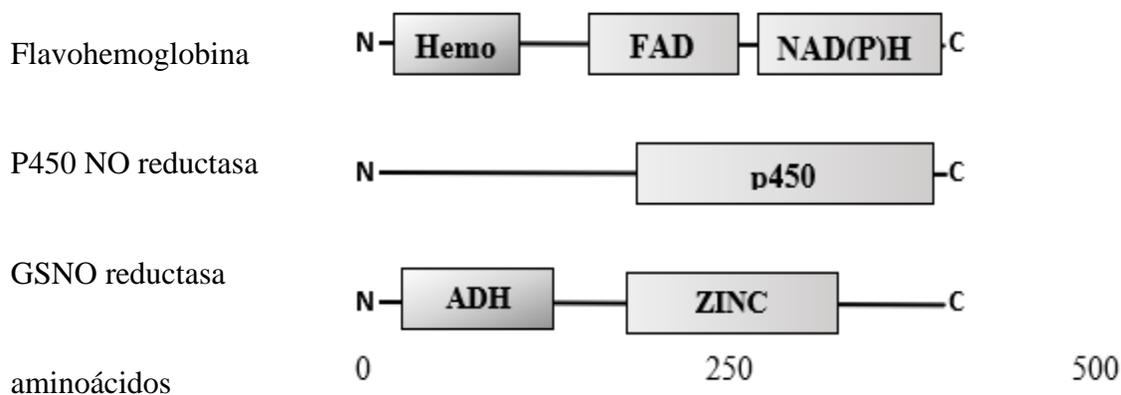
#### 3.1 Bioinformática

El objetivo de este capítulo es identificar *In silico* secuencias de genes involucrados en el metabolismo de NO en *M. circinelloides*. Se ha propuesto que el NO puede producirse a partir de oxidación de poliaminas o aminoácidos como la L-arginina, en un proceso que podría involucrar a especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, estas rutas metabólicas no han sido reportadas en hongos. El NO también puede encontrar su origen de manera exógena, por ejemplo, si se trata de algún hongo patógeno y el hospedero utilice los radicales de nitrógeno (NO, NOO<sup>-</sup>) como parte de su mecanismo de defensa. Para catálisis de NO a una especie no dañina, se han reportado enzimas del tipo flavohemoglobinas, P450 NO reductasa y GSNO reductasa, que lo convierten a NO<sub>3</sub>, óxido nitroso y amoniaco (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), respectivamente (Canovas *et al.*, 2016). Dichas rutas se encuentran resumidas en la Figura 10.



**Figura 10.-** Metabolismo de NO. En verde, posibles rutas de biosíntesis; en rojo, NO exógeno (hospederos); en naranja, rutas de eliminación; y en azul, procesos en los que presuntamente participa el NO. En negrita, número de acceso de dicha proteína en el genoma de *Mucor circinelloides* (modificado de Cánovas *et al.*, 2016).

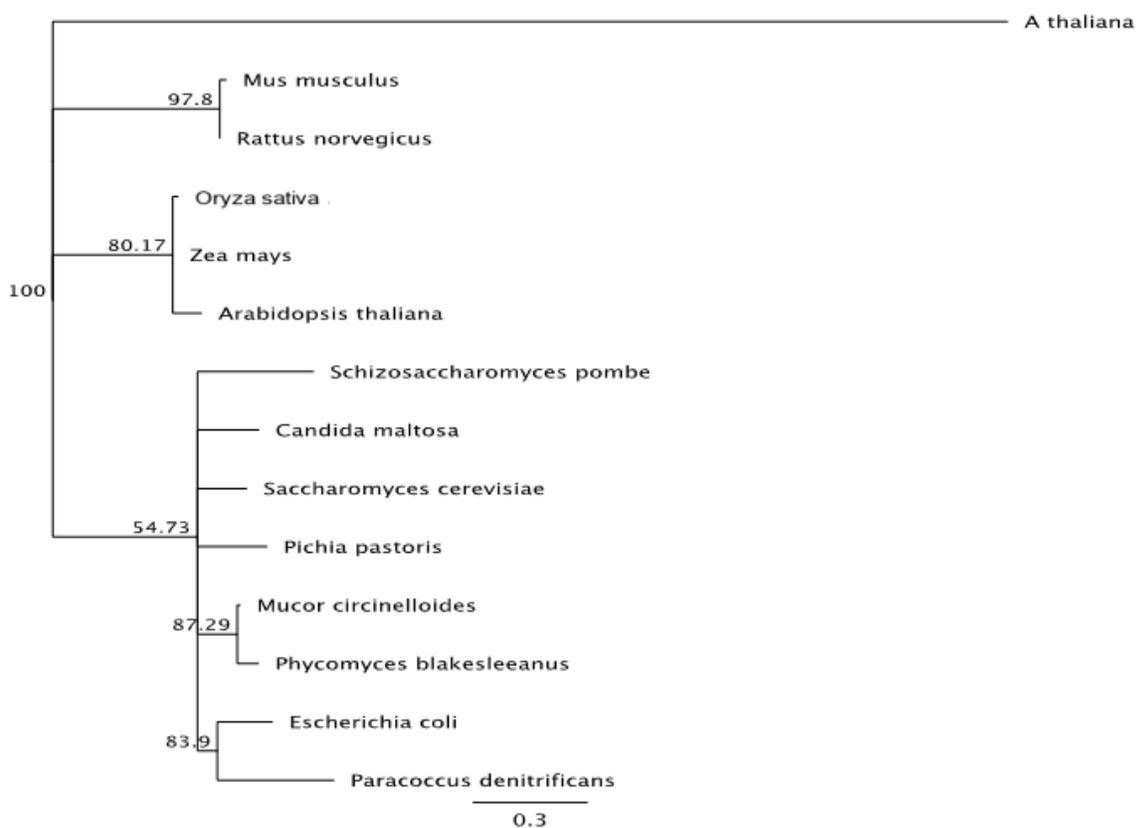
Se llevó a cabo la búsqueda dentro de la literatura de secuencias reportadas como funcionales y con actividad de flavohemoglobina (Biesebeck *et al.*, 2012), p450 óxido nítrico reductasa (Shoun *et al.*, 2012) y GSNO reductasa y se utilizaron para encontrar homólogos dentro de la base de datos de tres hongos Mucorales, *M. circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus* y *Rhizopus delemar*. Para realizar la búsqueda se utilizó tanto la cadena de aminoácidos completa, así como aquellos aminoácidos que conforman los dominios altamente conservados. Se utilizó el programa Smart-embl (Schultz *et al.*, 1998, 2000; Ponting *et al.*, 1999; Copley *et al.*, 1999; Letunik *et al.*, 2002, 2004, 2006, 2009, 2012, 2014, 2017) para encontrar los dominios (predichos) conservados en las enzimas reportadas.



**Figura 11.-** Dominios conservados de enzimas que participan en el metabolismo del NO. Se utilizó el programa Pfam (Smart-EMLB) para la predicción de dominios. Se utilizaron las secuencias reportadas por Biesebeck *et al.* (2012) para FVH, Shounet *al.* (2012) para P450 y las reportadas en el NCBI para GSNO reductasa. Los números indican la longitud de las secuencias (aa). N, amino terminal, y C, carboxilo terminal.

No se encontró ninguna secuencia candidato para flavohemoglobina o para P450 NO reductasa en las bases de datos de *M. circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus* y *Rhizopus delemar*. Por lo que respecta a una GSNO reductasa, se encontraron las secuencias 151823 y 28972 de *M. circinelloides* y *P. Blakesleeanus*, respectivamente, como los mejores candidatos a dicha enzima.

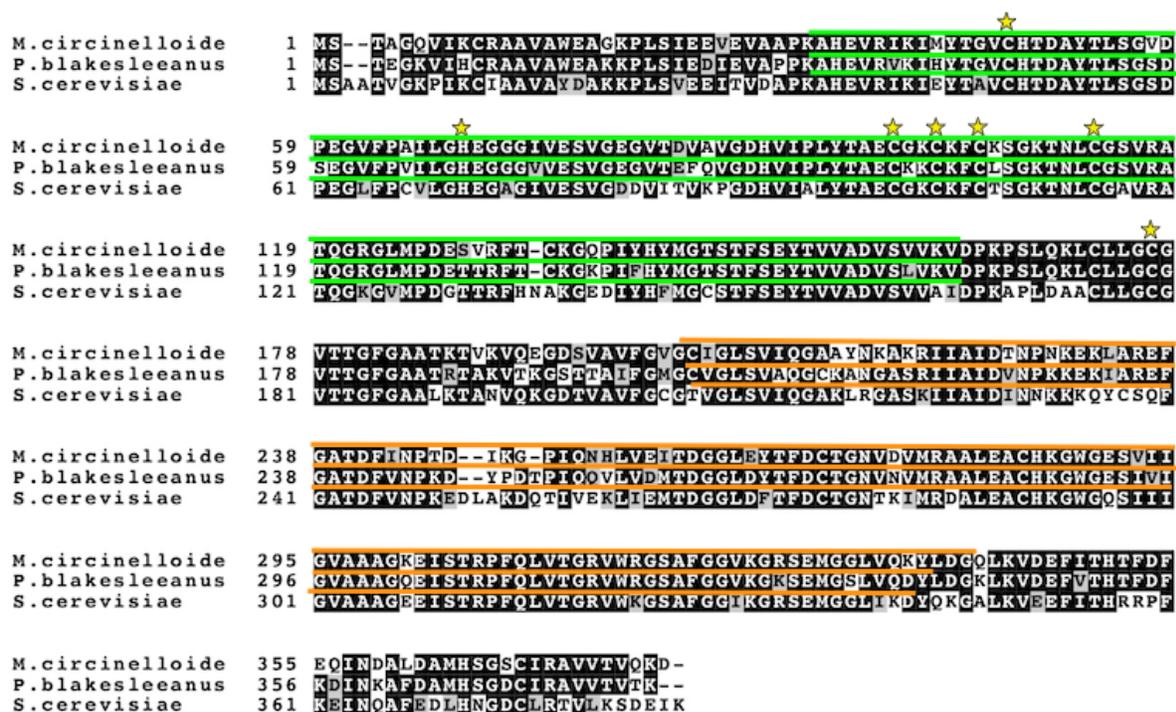
Se utilizaron las secuencias reportadas como funcionales de GSNO reductasa de animales, plantas, hongos y bacterias para generar un dendrograma que permite observar las proteínas utilizadas para realizar la búsqueda, y la cercanía que existe entre ellas. Se utilizó el programa Geneious prime 2019, mediante el método neighbor joining con un aproximado de 10 000 iteraciones y se utilizó la secuencia de actina de *A. thaliana* como la secuencia fuera de grupo, el dendrograma generado se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.-** Dendrograma de GSNO reductasas realizado con el programa Geneious prime 2019. La secuencia que queda fuera de grupo es la de la actina de *Arabidopsis thaliana*. *Mus musculus* (P28474), *Rattus norvegicus* (P12711), *Oryza sativa* (Q0DWH1), *Zea mays* (P93629), *Arabidopsis thaliana* (Q96533), *Schizosaccharomyces pombe* (P78870), *Candida maltosa* (Q06099), *Saccharomyces cerevisiae* (P32771), *Pichia pastoris* (O74685), *Mucor circinelloides* (151823), *Phycomyces blakesleeanus* (28972), *Escherichia coli* (P25437) y *Paracoccus denitrificans* (P45382). El grado de divergencia está representado como una escala al fondo de la imagen.

Mientras que las secuencias provenientes de animales y plantas se agrupan en una sola rama, las de hongos y bacterias aparecen enlistadas en el mismo grupo, lo que indica que son más cercanas entre sí respecto a las demás secuencias.

Para analizar la homología entre las secuencias y sus dominios se realizó un alineamiento múltiple, utilizando los programas CLUSTAL-W (Madeira *et al.*, 2019) y BOX-SHADE, entre la secuencia de la GSNO reductasa de *S. cerevisiae*, reportada como funcional (Liu *et al.*, 2001), y aquellas candidatas de *M. circinelloides* y *P. Blakesleeanus*, como se muestra en la Figura 13.

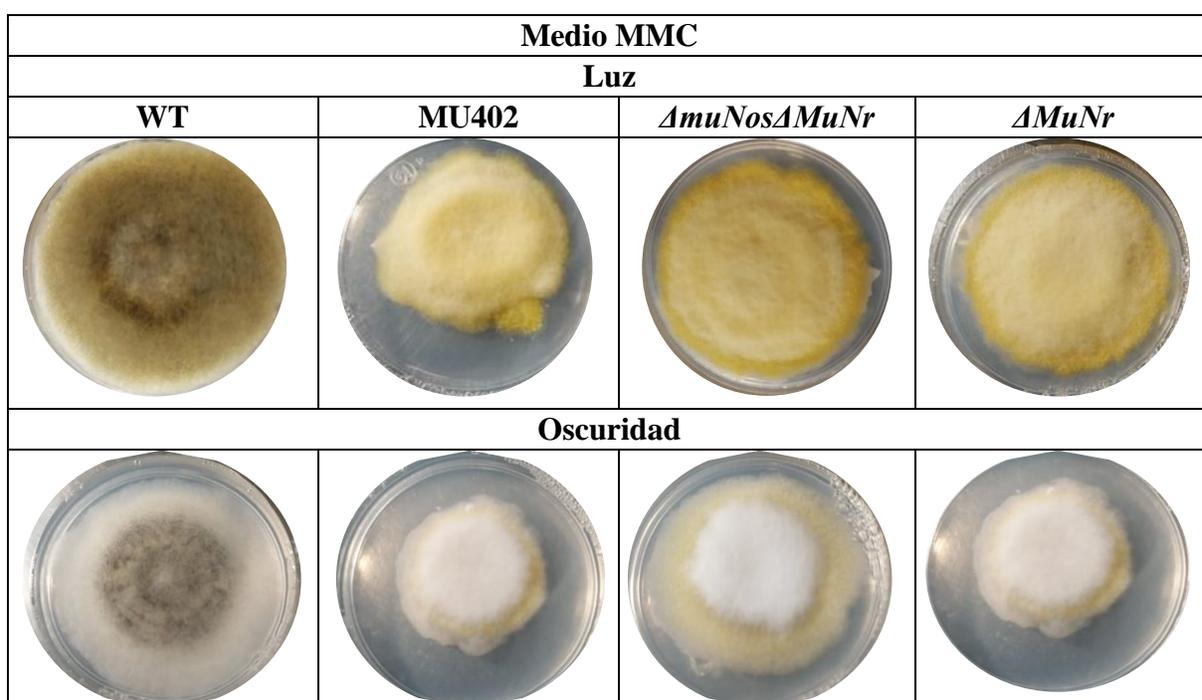


**Figura 13.-** Alineamiento de secuencias múltiple de las GSNO reductasa de *Saccharomyces cerevisiae*, *Phycomyces blakesleeanus* y *Mucor circinelloides*. Los aminoácidos que se presentan en negro indican identidad y en gris sustitución. En verde los aminoácidos que conforman el dominio alcohol deshidrogenasa y en naranja el dominio de unión a zinc. Las estrellas indican la posición de los aminoácidos del sitio activo en la secuencia de *S. cerevisiae*.

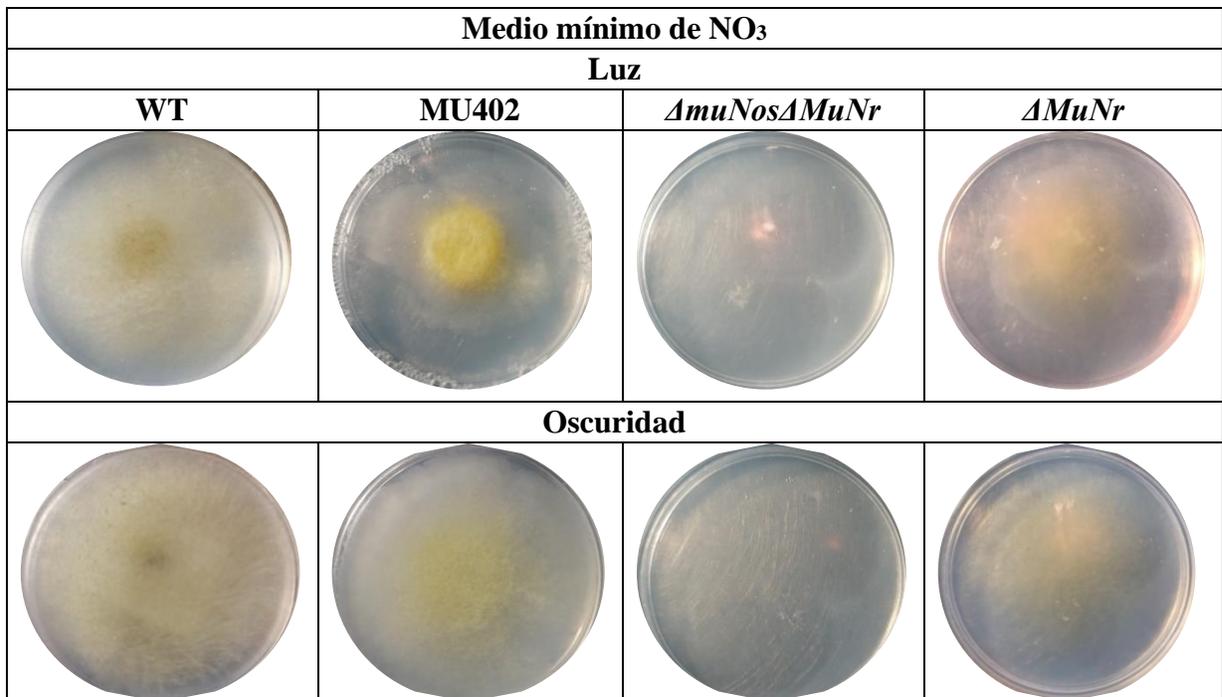
Los residuos de cisteína en la posición 49, 101, 104, 107, 115, 179, así como histidina en la posición 71, conforman el sitio activo en la secuencia de la GSNO reductasa de *S. cerevisiae*. Estos se encuentran conservados, así como los dominios en las tres secuencias.

### 3.2 Fenotipo, desarrollo y esporulación

Se cultivaron aproximadamente  $4 \times 10^3$  esporas de las cepas tipo silvestre, control y mutantes de la nitrato reductasa de *M. circinelloides*, en luz u oscuridad, en 10 mL de medio MMC o medio mínimo cuya única fuente de nitrógeno es el  $\text{NO}_3$  durante 3 días, finalizado este periodo se tomaron las fotografías, presentadas en las Figuras 14 y 15, y se recolectaron las esporas.



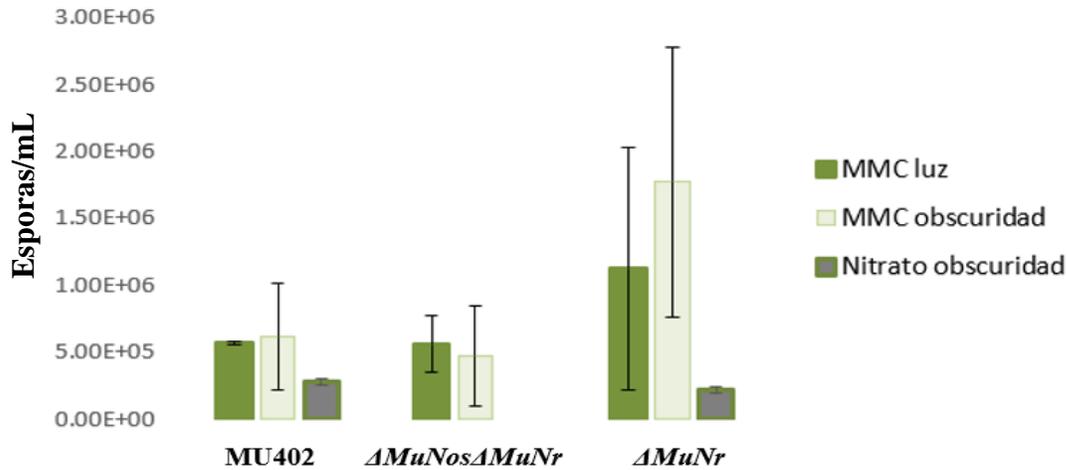
**Figura 14.-** Cepas de *Mucor circinelloides* creciendo en MMC bajo luz u oscuridad. Se cultivaron aproximadamente  $4 \times 10^3$  esporas de la línea silvestre (WT), control (MU402) y mutantes de la nitrato reductasa ( $\Delta MuNr$  y  $\Delta MuNos\Delta MuNr$ ) en 10 mL de medio y se tomaron las fotografías al 3er día.



**Figura 15.-** Cepas de *Mucor circinelloides* creciendo en medio mínimo de NO<sub>3</sub> (Mehrotra 1967) bajo luz u oscuridad. Se cultivaron aproximadamente  $4 \times 10^3$  esporas de la línea silvestre (WT), control (MU402) y mutantes de la nitrato reductasa ( $\Delta$ MuNr y  $\Delta$ MuNos $\Delta$ MuNr) en 10 mL de medio y se tomaron las fotografías al tercer día.

El medio MMC permitió el desarrollo de las cuatro cepas, mientras que en el medio mínimo de NO<sub>3</sub> no se desarrolló la cepa *ΔmuNosΔMuNr* y *ΔMuNr* parece encontrar su desarrollo comprometido, esto se observa al comparar el fenotipo de *ΔMuNr* y MU402, mientras que en las condiciones control (Figura 14) el crecimiento de ambas fue similar, en las condiciones de experimentación (Figura 15) el aislado *ΔMuNr* se encontró en desventaja.

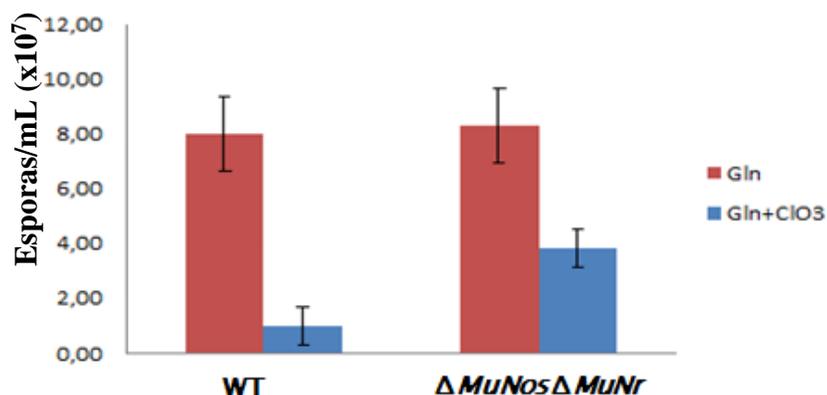
Como se ha revisado el NO parece estar involucrado en la formación de esporas, y presuntamente dos de las cepas objeto de estudio (*ΔMunr* y *ΔMuNosΔMuNr*) producen menos NO que las tipo silvestre (WT) y control (MU402) por ello se cuantificaron las esporas producidas por cada línea de *Mucor* durante tres días en medio MMC y medio mínimo de NO<sub>3</sub> en luz u oscuridad, en la Figura 16 se presentan los resultados de dicho conteo, (se omitieron los datos obtenidos de la cepa tipo silvestre, puesto que alcanzó rangos en un orden de magnitud mayor en MMC  $1.45 \times 10^8$  y  $1.28 \times 10^8$  esporas/mL en luz y oscuridad, respectivamente; en NO<sub>3</sub>  $1.11 \times 10^8$  en oscuridad).



**Figura 16.** - Esporulación de las cepas tipo control y mutante de la nitrato reductasa de *Mucor circinelloides* en diferentes medios. Barras verde fuerte medio MMC en luz, barras verde claro medio MMC obscuridad, barras grises medio mínimo de NO<sub>3</sub> en oscuridad. Se contaron las esporas producidas en 3 días por las cepa control (MU402) y mutantes de la nitrato reductasa ( $\Delta MuNos\Delta MuNr$ ,  $\Delta MuNr$ ).

En medio MMC, la cepa silvestre esporuló en mayor cantidad seguida de  $\Delta MuNr$ , MU402 y finalmente  $\Delta MuNos\Delta MuNr$ . En el medio mínimo de NO<sub>3</sub> nuevamente la cepa silvestre esporuló en mayor cantidad, mientras que la cantidad de esporas producida por  $\Delta MuNr$  y MU402 son similares,  $\Delta muNos\Delta MuNr$  no fue capaz de desarrollarse en dichas condiciones. Cuando la única fuente de nitrógeno es el NO<sub>3</sub> las mutantes de la nitrato reductasa parecen estar afectadas respecto a su desarrollo y esporulación. No existe una diferencia apreciable entre la esporulación en condiciones de luz y oscuridad.

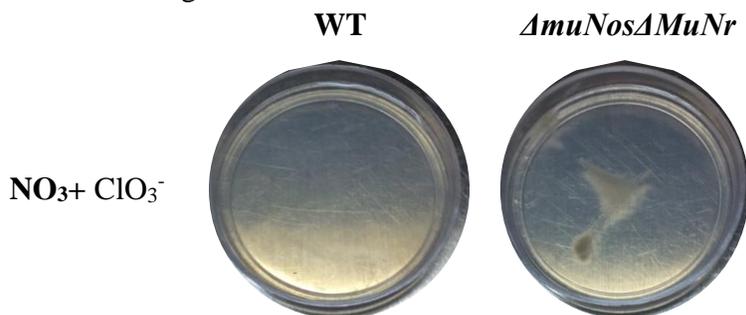
El anión clorato (ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>) es una especie reactiva que resulta tóxica para cualquier organismo que tenga la capacidad de reducirlo e incorporarlo a su metabolismo, de igual manera que el NO<sub>3</sub> el ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> puede ser utilizado como sustrato por la nitrato reductasa. Por ello, se cultivó a  $\Delta muNos\Delta MuNr$  y la cepa silvestre en medios mínimos donde la única fuente nitrogenada fuera la glutamina a una concentración de 3 mM y se añadió KClO<sub>3</sub> al medio hasta una concentración de 30 mM, después de tres días de crecimiento las esporas fueron recolectadas y contadas, los resultados del anterior experimento se encuentran en la Figura 17.



**Figura 17.-** Esporulaci3n de la cepas tipo silvestre y  $\Delta MuNos\Delta MuNr$  de *M. circinelloides* creciendo en medio m3nimo con glutamina o glutamina y ClO<sub>3</sub>.

La Figura 17 hace evidente que la adici3n del ion ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> al medio donde se encuentra creciendo la cepa silvestre disminuye la concentraci3n de esporas en 85% , casi un orden de magnitud (de  $8 \times 10^7$  a  $1.01 \times 10^7$  esporas/mL), mientras que en  $\Delta MuNos\Delta MuNr$  la concentraci3n de esporas se reduce un 60.62% (de  $8.33 \times 10^7$  a  $3.82 \times 10^7$  esporas/mL).  $\Delta MuNos\Delta MuNr$  parece ser m3s tolerante al ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> que la cepa silvestre.

Tambi3n se cultivaron las cepas silvestre y  $\Delta muNos\Delta MuNr$  en un medio tal que 3nicamente se expresara la nitrato reductasa y que dicha expresi3n fuera nociva para el microorganismo. Este fue medio m3nimo con NO<sub>3</sub>, preparado como se indica en materiales y metodos pero a3nadiendo KClO<sub>3</sub> hasta una concentraci3n de 30 mM. Las im3genes de dicho experimento se encuentran reportadas en la Figura 18.

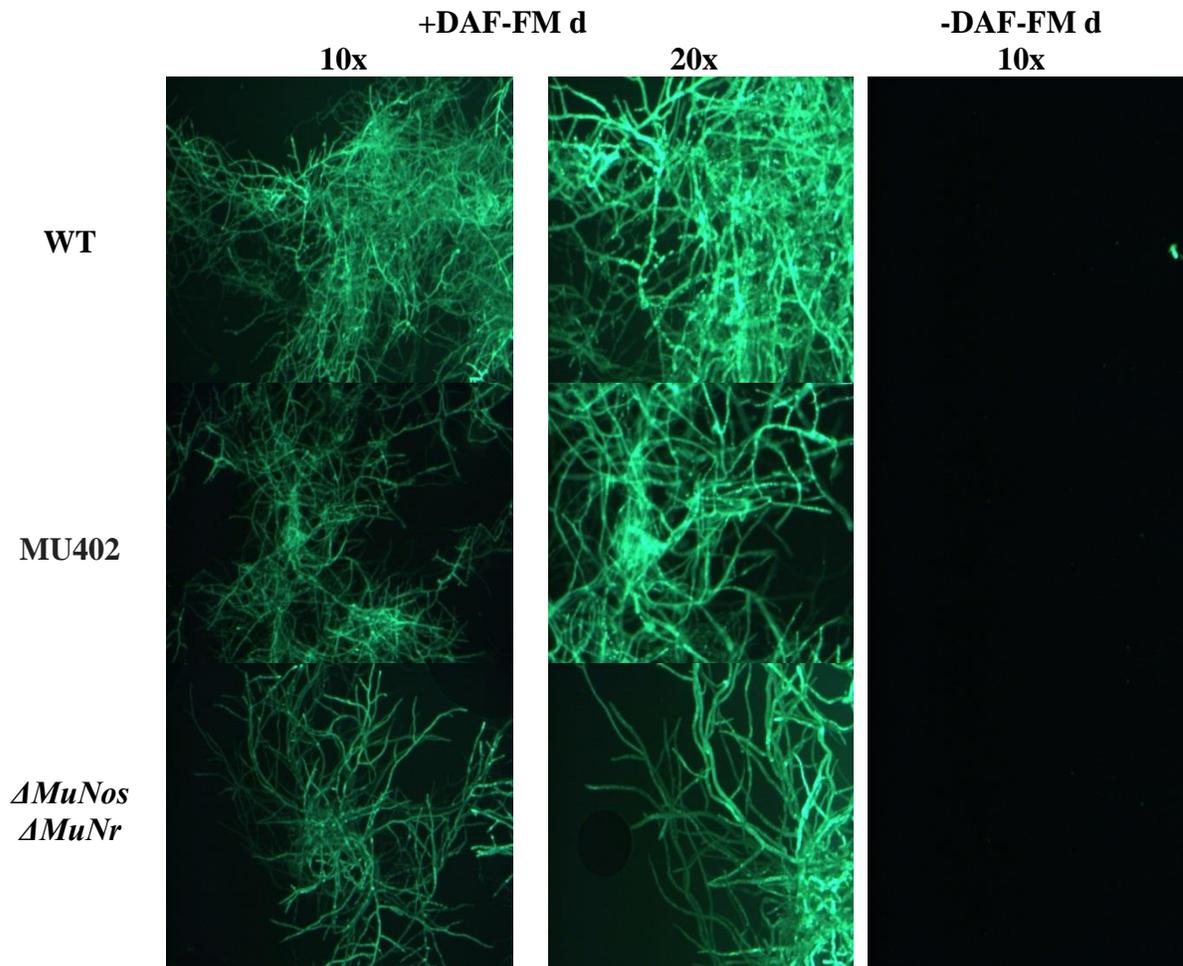


**Figura 18.-** Cepas tipo silvestre y  $\Delta MuNos\Delta MuNr$  de *M. circinelloides* creciendo en medio m3nimo con NO<sub>3</sub> y ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

En lo que comprende la cepa silvestre es l3gico que no crezca, puesto que expresa la nitrato reductasa para reducir el NO<sub>3</sub> presente en el medio pero en este proceso tambi3n reduce al

$\text{ClO}_3^-$  e impide su desarrollo.  $\Delta muNos\Delta muNr$  no debería crecer porque presuntamente no contiene la información genética necesaria para asimilar el nitrato, contrario a este supuesto si se puede desarrollar en estas condiciones.

### 3.3 Cuantificación de óxido nítrico



**Figura 19.-** Cuantificación de NO en micelio las cepas silvestre, MU402 y  $\Delta MuNos\Delta MuNr$  de *Mucor circinelloides*. En la primer columna se encuentra la cepa a la que pertenecen las imágenes. + DAF-FM d, indica que se la imagen se capturo en el micelio tratado con DAF-FM diacetato. -DAF-FM d, indica que la imagen fue capturada en ausencia del reactivo DAF-FM diacetato. 10x, 20x, son los objetivos bajo los que se observaron las muestras.

El NO al ser un compuesto nitrado su producción debe estar forzosamente relacionada con la asimilación de nitrógeno. La vía de asimilación de  $\text{NO}_3$  involucra la reducción de esta molécula hasta  $\text{NH}_4$  y este último se incorpora al  $\alpha$ -cetoglutarato (Ter Schure *et al.*, 2000).

Se cultivaron  $4 \times 10^3$  esporas de las cepas silvestre, MU402, y  $\Delta MuNos\Delta MuNr$ , en medio mínimo con glutamina como la única fuente de nitrógeno, el micelio total fue cosechado a las 24 h y se cuantificó el NO utilizando el reactivo DAF-FM diacetato, como se muestra en la Figura 19.

No sería correcto basarse únicamente en la observación para determinar si existe un cambio de la señal fluorescente entre las cepas. Las imágenes obtenidas pueden ser procesadas utilizando paquetes informáticos que le asignen un valor a dicha señal. Como es el caso del programa ImageJ, este le asigna un valor a cada uno de los píxeles que conforman a la fotografía, que va desde el 0 hasta el 255, promedia los valores y este último dato es el que se toma como el total de la señal fluorescente. En la Tabla 5, se presentan los valores del promedio de la señal fluorescente de las fotografías presentadas en la Figura 19.

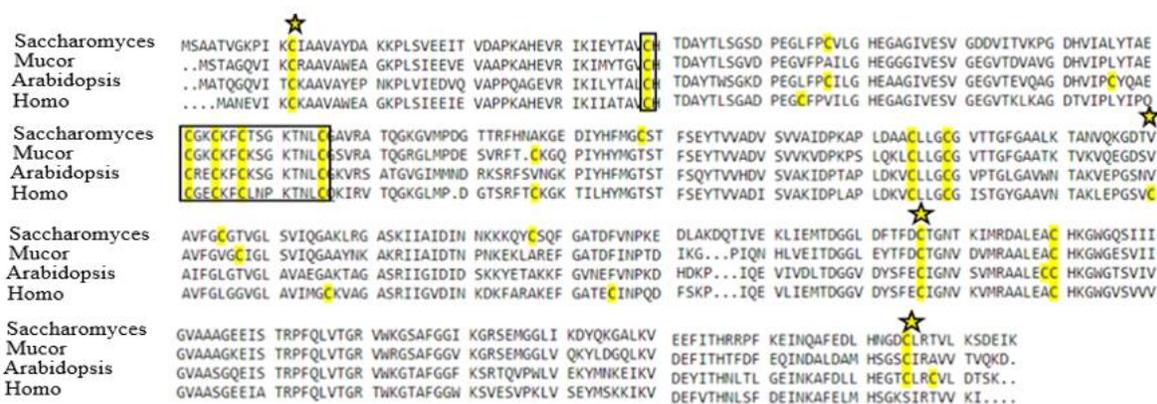
**Tabla 5.-** Promedio de la señal fluorescente calculado con el programa Image J. + DAF-FM diacetato, en presencia del reactivo. -DAF-FM diacetato en ausencia del reactivo, control negativo.

<b>Cepa</b>	<b>+ DAF-FM diacetato</b>	<b>-DAF-FM diacetato</b>
<b>WT</b>	45.06	6.09
<b>MU402</b>	24.28	5.84
<b><math>\Delta MuNos \Delta MuNr</math></b>	25.56	5.05

### **3.4 Análisis de la presunta GSNO reductasa encontrada en el genoma de *M. circinelloides***

Como se mostró en el primer apartado de los resultados de esta tesis la secuencia con número de acceso 151823, en la página del genoma de *M. circinelloides*, conserva los aminoácidos que conforman el sitio activo en la secuencia de la GSNO reductasa de *S. cerevisiae*, así como los dominios necesarios para su función. La evidencia apunta a que dicha proteína se trate de una GSNO reductasa.

Además de lo anterior se reportó (Guerra *et al.*, 2016) que los residuos de cisteína en las GSNO reductasas, además de estar altamente conservados, también son sitios susceptibles a ser nitrosilados y que dicha reacción regula su actividad y estabilidad, como fue demostrado utilizando las secuencias de GSNO reductasas de *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* y *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación, en la Figura 20, se muestra el alineamiento de secuencias múltiple, producto de su investigación donde resaltan como los residuos de cisteína se encuentran altamente conservados y aquellos que son susceptibles a ser nitrosilados y que por tanto están relacionados a su estabilidad y actividad enzimática, en esta figura también se utilizó para alinear la secuencia encontrada como candidato a una GSNO reductasa de *M. circinelloides*.



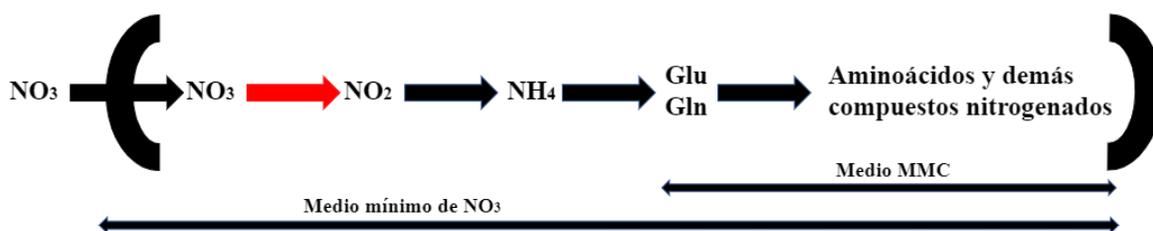
**Figura 20.-** Alineamiento de secuencias múltiple de GSNO reductasa. *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*. *Mucor*, *Mucor circinelloides*. *Arabidopsis*, *Arabidopsis thaliana*. *Homo*, *Homo sapiens*. En amarillo aparecen resaltados las cisteínas presentes en las secuencias. Las cisteínas marcadas con una estrella representan aquellos residuos susceptibles a ser nitrosilados. Aparecen dentro de un cuadro negro aquellos relacionados al acoplamiento del zinc a la estructura de la enzima.

Los residuos de cisteína que regulan la actividad se encuentran conservados, lo que convierte a la secuencia de *M. circinelloides* en un mejor candidato para ser estudiado en su participación con el metabolismo del NO.

### 3.5 Fenotipo de las cepas $\Delta muNos\Delta muNr$ y $\Delta muNr$

El medio MMC contiene diversas fuentes de nitrógeno, contrario al mínimo de  $NO_3$  donde únicamente se encuentra el  $NO_3$  como compuesto nitrogenado de manera que para poder

crecer en el *M. circinelloides* debe expresar las enzimas necesarias para poder utilizarlo. Como se muestra en la Figura 21, es de esperarse que todas las cepas crezcan en medio MMC porque ninguna está afectada en la ruta de asimilación de alguno de los compuestos que contiene, contrario a lo que se espera de las mutantes de la nitrato reductasa que no deberían crecer en un medio donde la única fuente de nitrógeno es el  $\text{NO}_3$ .



**Figura 21.-** Desarrollo de *Mucor circinelloides* en medio MMC y mínimo de  $\text{NO}_3$ . La flecha roja indica el paso que es catalizado por la nitrato reductasa de la cual las líneas  $\Delta\text{MuNr}$  y  $\Delta\text{muNos}\Delta\text{MuNR}$  son mutantes

Contrario a lo que se esperaba  $\Delta\text{MuNr}$  fue capaz de crecer en el medio mínimo de  $\text{NO}_3$ . Ésto se puede explicar de la siguiente manera, *M. circinelloides* es un organismo pluricelular y pueden coexistir dentro de su estructura núcleos que contengan la información silvestre y aquellos donde el gen que codifica para la nitrato reductasa se encuentre interrumpido, por ello es probable que  $\Delta\text{muNos}\Delta\text{MuNr}$  y  $\Delta\text{MuNr}$  se traten de organismos heterocariontes. Este supuesto es nuevamente corroborado en el ensayo de crecimiento en medio de  $\text{NO}_3 + \text{ClO}_3^-$  donde  $\Delta\text{muNos}\Delta\text{MuNr}$  fue capaz de crecer a diferencia de la línea silvestre, aquellos núcleos con la información original serían los que estarían reduciendo el  $\text{NO}_3$  a  $\text{NO}_2$  y únicamente estarían proliferando aquellos que no reducen el  $\text{ClO}_3^-$ .

El fenotipo mutante de la nitrato reductasa obtenido durante esta investigación es parecido al reportado por Pfannmüller *et al.*, (2017), como se muestra en la Figura 22.

	WT <i>M. circinelloides</i>	WT <i>F. fujikuroi</i>	$\Delta muNos\Delta muNr$ <i>M. circinelloides</i>	$\Delta NIAD$ <i>F. fujikuroi</i>
Gln				
Gln + ClO <sub>3</sub>				

**Figura 22.-** Comparación entre los fenotipos de una línea mutante de la nitrato reductasa reportados por Pfannmüller et al., (2017) y los obtenidos en esta investigación. Gln, medio suplementado con glutamina 6 mM. Gln + ClO<sub>3</sub>, medio suplementado con glutamina 6 mM más ClO<sub>3</sub> 30 mM. WT, línea silvestre.  $\Delta muNos\Delta muNr$ , mutante de la nitrato reductasa de *M. circinelloides*.  $\Delta NIAD$ , mutante de la nitrato reductasa de *F. fujikuroi*

En ambos casos en las condiciones control (Gln 6 mM) todas las cepas crecen de manera similar porque ninguna está afectada en alguna enzima involucrada en la asimilación de este aminoácido, por otra parte en las condiciones de experimentación (Gln 6 mM + KClO<sub>3</sub> 30 mM) la línea silvestre cesa su crecimiento al poco tiempo de su desarrollo, asimila la glutamina presente y una vez que hay escasas del recurso expresa las enzimas necesarias para utilizar fuentes alternas de nitrógeno, entre las que se encuentra la nitrato reductasa que reduce el ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> a ClO<sub>2</sub><sup>-</sup> y por alta reactividad de este compuesto el organismo parece, mientras que las mutantes de la nitrato reductasa crecen de manera similar que en las condiciones control.

También es importante resaltar que durante la experimentación todas las líneas de *M. circinelloides* pasaron por repetidos periodos de cultivo, donde es probable que se pudiera haber perdido la mutación presente en  $\Delta muNr$  y  $\Delta muNos\Delta muNr$  por las condiciones sobre las que se desarrollaron.

### **3.6 Cuantificación de óxido nítrico de las mutantes de la nitrato reductasa de *M. circinelloides***

En contraste con lo reportado por Tinajero (2018) no se aprecia una diferencia significativa respecto a la señal fluorescente entre MU402 y  $\Delta MuNos\Delta MuNr$ . Es importante indicar que los medios de cultivo que se utilizaron en ambos experimentos son diferentes, el utilizado para cuantificar la señal fluorescente en el 2018 fue medio MMC y no fue a partir de una concentración conocida de esporas, mientras que el medio utilizado en el presente experimento fue medio mínimo con glutamina como única fuente de nitrógeno y se utilizaron  $4 \times 10^3$  esporas por cada 10 mL de caldo de cultivo. También se debe resaltar que las mutantes que las cepas que se utilizaron para obtener estos resultados ya habían pasado por varios ciclos de vida y es probable que el linaje mutante fuese perdido en el proceso.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante esta investigación han permitido obtener las siguientes conclusiones:

La secuencia con número de acceso 151823 disponible en la página del genoma de *M. circinelloides* es un buen candidato para ser estudiada como una GSNO reductasa y su papel en el metabolismo de NO.

Se determinó el fenotipo de las cepas  $\Delta MuNos\Delta MuNr$  y  $\Delta MuNr$  en medio mínimo conteniendo únicamente glutamato o NO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno. Ambas transformantes contienen núcleos donde el gen que expresa la nitrato reductasa se encuentra interrumpido y aquellos con la información silvestre.

El genotipo de  $\Delta MuNos\Delta MuNr$  y  $\Delta MuNr$  debe de ser comprobado utilizando el ADN genómico de ambas cepas para realizar una PCR empleando oligonucleótidos específicos (sentido y antisentido) para los genes de la nitrato reductasa, *LeuA* y *pyrG*, utilizando a MU402 como cepa control.

Las cepas  $\Delta MuNos\Delta MuNr$  y  $\Delta MuNr$  deben de ser manipuladas de manera que no se favorezca el desarrollo de los núcleos con genotipo silvestre.

No se encontró un cambio respecto a la media de la señal fluorescente, obtenida mediante la prueba con el reactivo DAF-FM diacetato, en las cepas MU402 y mutantes de la nitrato reductasa.

## REFERENCIAS

- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in microbiology* 13, 111-118.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical journal*, 357(3), 593-615.
- Berger, H., Basheer, A., Böck, S., Reyes-Dominguez, Y., Dalik, T., Altmann, F., Strauss, J. (2008). Dissecting individual steps of nitrogen transcription factor cooperation in the *Aspergillus nidulans* nitrate cluster. *Molecular microbiology*, 69(6), 1385-1398.
- Berger, H., Pachlinger, R., Morozov, I., Goller, S., Narendja, F., Caddick, M., Strauss, J. (2006). The GATA factor AreA regulates localization and in vivo binding site occupancy of the nitrate activator NirA. *Molecular microbiology*, 59(2), 433-446.
- Bonamore, A., Boffi, A. (2007). Flavohemoglobin: structure and reactivity. *IUBMB life*, 60(1), 19-28.
- Cánovas, D., Marcos, J. F., Marcos, A. T., Strauss, J. (2016). Nitric oxide in fungi: is there NO light at the end of the tunnel?. *Current genetics*, 62, 513-518.
- Carvajal, J. A., Germain, A. M., Huidobro-Toro, J. P., Weiner, C. P. (2000). Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *Journal of cellular physiology*, 184(3), 409-420.
- Cerdá-Olmedo, E. (2001). Phycomyces and the biology of light and color. *FEMS microbiology reviews*, 25(5), 503-512.
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A. M., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M. V., Pedrajas, J. R., Corpas, F. J. (2010). Mechanical wounding induces a nitrosative stress

by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of experimental botany*, 62(6), 1803-1813.

Cooper, T. G., Sumrada, R. A. (1983). What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyce scerevisiae*? *Journal of bacteriology*, 155(2), 623-627.

Copley, R. R., Schultz, J., Ponting, C. P., Bork, P. (1999). Protein families in multicellular organisms. *Current opinion in structural biology*, 9(3), 408-415.

Corrochano LM, Kuo A, Marcet-Houben M, Polaino S, Salamov A, Villalobos-Escobedo JM, Grimwood J, Álvarez MI, Avalos J, Bauer D, Benito EP, Benoit I, Burger G, Camino LP, Cánovas D, Cerdá-Olmedo E, Cheng JF, Domínguez A, Eliáš M, Eslava AP, Glaser F, Gutiérrez G, Heitman J, Henrissat B, Iturriaga EA, Lang BF, Lavín JL, Lee SC, Li W, Lindquist E, López-García S, Luque EM, Marcos AT, Martin J, McCluskey K, Medina HR, Miralles-Durán A, Miyazaki A, Muñoz-Torres E, Oguiza JA, Ohm RA, Olmedo M, Orejas M, Ortiz-Castellanos L, Pisabarro AG, Rodríguez-Romero J, Ruiz-Herrera J, Ruiz-Vázquez R, Sanz C, Schackwitz W, Shahriari M, Shelest E, Silva-Franco F, Soanes D, Syed K, Tagua VG, Talbot NJ, Thon MR, Tice H, de Vries RP, Wiebenga A, Yadav JS, Braun EL, Baker SE, Garre V, Schmutz J, Horwitz BA, Torres-Martínez S, Idnurm A, Herrera-Estrella A, Gabaldón T, Grigoriev IV Expansion of Signal Transduction Pathways in Fungi by Extensive Genome Duplication *Curr Biol.* 2016 Jun 20;26(12):1577-1584. doi: 10.1016/j.cub.2016.04.038

Cove, D. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, 113(1), 51-56.

Cove, D. J. (1976). Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterisation of chlorate resistant mutants. *Heredity*, 36(2), 191-203.

- Cove, D. J. (1979). Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biological Reviews*, 54(3), 291-327.
- Crawford, N. M., Galli, M., Tischner, R., Heimer, Y. M., Okamoto, M., Mack, A. (2006). Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends in Plant Science*, 11(11), 526-527.
- Črešnar, B., Petrič, Š. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814(1), 29-35.
- Dahlberg, K., Etten, J. (1982). Physiology and biochemistry of fungal sporulation. *Annual review of phytopathology*, 20(1), 281-301.
- Davis, M., Wong, K. (2010). Nitrogen metabolism in filamentous fungi. In Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi (pp. 325-338). American Society of Microbiology.
- de Haro, J. P., Calo, S., Cervantes, M., Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M. (2009). A single dicer gene is required for efficient gene silencing associated with two classes of small antisense RNAs in *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic cell*, 8(10), 1486-1497.
- Degtyarenko, K. (1995). Structural domains of P450-containing monooxygenase systems. *Protein Engineering, Design and Selection*, 8(8), 737-747.
- Denisov, I., Makris, T., Sligar, S., Schlichting, I. (2005). Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical reviews*, 105(6), 2253-2278.

- Fernández, M. R., Biosca, J. A., Parés, X. (2003). S-nitrosoglutathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(5), 1013-1018.
- Gardner, P., Gardner, A., Martin, A., Salzman, L. (1998). Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10378-10383.
- Golderer, G., Werner, E. R., Leitner, S., Gröbner, P., Werner-Felmayer, G. (2001). Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*. *Genes Development*, 15(10), 1299-1309.
- Gong, X., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Yi, X., Peng, Y. (2007). L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genetics and Biology*, 44(12), 1368-1379.
- Gooday, G.W. (1973). Differentiation in the Mucorales. Symposium of the Society of General Microbiology, 23, 269-293.
- Gorren, A. C., Mayer, B. (2007). Nitric-oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(3), 432-445.
- Granger, D., Kviety, R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox biology*, 6, 524-551.
- Guo, F. Q., Okamoto, M., Crawford, N. M. (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302(5642), 100-103.
- Gutiérrez, A., López-García, S., Garre, V. (2011). High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *Journal of microbiological methods*, 84(3), 442-446.

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hameed, A., Hussain, S. A., Nosheen, S., Muhammad, Z., Wu, Y., Ullah, S., ... Song, Y. (2020). Microencapsulation of microbial antioxidants from *Mucor circinelloides*, their physico-chemical characterization, in vitro digestion and releasing behaviors in food. *Applied Biological Chemistry*, 63(1), 1-17.
- Ivica Letunic, Peer Bork, 20 years of the SMART protein domain annotation resource, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue D1, 4 January 2018, Pages D493–D496,
- Knowles, R., Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, 298(Pt 2), 249.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Nagano, T. (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical chemistry*, 70(13), 2446-2453.
- Kojima, H., Sakurai, K., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Nagano, T. (1998). Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 46(2), 373-375.
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181-189.
- Letunic, I., Bork, P. (2017). 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic acids research*, 46(D1), D493-D496.

- Letunic, I., Copley, R. R., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J., Bork, P. (2006). SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic acids research*, 34(suppl\_1), D257-D260.
- Letunic, I., Copley, R. R., Schmidt, S., Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Schultz, J., Bork, P. (2004). SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic acids research*, 32(suppl\_1), D142-D144.
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. (2009). SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic acids research*, 37(suppl\_1), D229-D232.
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic acids research*, 40(D1), D302-D305.
- Letunic, I., Goodstadt, L., Dickens, N. J., Doerks, T., Schultz, J., Mott, R., Bork, P. (2002). Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic acids research*, 30(1), 242-244.
- Li, C., Cervantes, M., Springer, D., Boekhout, T., Ruiz-Vazquez, R., Torres-Martinez, S., Lee, C. (2011). Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS pathogens*, 7(6), e1002086.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., Stamler, J. S. (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature*, 410(6827), 490.
- Liu, L., Zeng, M., Hausladen, A., Heitman, J., Stamler, J. S. (2000). Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4672-4676.
- Liu, Y., He, C. (2016). Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Reports*, 35(5), 995-1007.

- Long, A., Song, B., Fridey, K., Silva, A. (2015). Detection and diversity of copper containing nitrite reductase genes (nirK) in prokaryotic and fungal communities of agricultural soils. *FEMS Microbiol Ecol*, 91, 1-9.
- Luke, R., Sharpe, N., Coxon, R. (1987). Transdermal nitroglycerin in angina pectoris: efficacy of intermittent application. *Journal of the American College of Cardiology*, 10(3), 642-646.
- Madeira, F., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*.
- Maier, J., Hecker, R., Rockel, P., Ninnemann, H. (2001). Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in *Phycomyces blakesleeanus*. *Plant physiology*, 126(3), 1323-1330.
- Marcos, A., Ramos, M., Marcos, F., Carmona, J., Strauss, J., Cánovas, D. (2016). Nitric oxide synthesis by nitrate reductase is regulated during development in *Aspergillus*. *Molecular microbiology*, 99(1), 15-33.
- Marzluf, A. (1981). Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiological Reviews*, 45(3), 437.
- McCleverty, J. A. (2004). Chemistry of nitric oxide relevant to biology. *Chemical reviews*, 104(2), 403-418.
- Mcintyre, M., Breum, J., Arnau, J., Nielsen, J. (2002). Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*) during submerged batch cultivation. *Applied microbiology and biotechnology*, 58(4), 495-502.

- Mehrotra, B. R. (1967). Nitrogen Nutrition of two species of mucor. *Flora oder Allgemeine botanische Zeitung. Abt. A, Physiologie und Biochemie*, 158(6), 560-568.
- Moriwaki-Takano, M., Iwakura, R., Hoshino, K. (2020). Dimorphic Mechanism on cAMP Mediated Signal Pathway in *Mucor circinelloides*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Nabors, M. W., & González-Barreda, P. (2006). Introducción a la Botánica (No. QK47. N32 2006.). Pearson/Addison Wesley.
- Nagase, S., Takemura, K., Ueda, A., Hirayama, A., Aoyagi, K., Kondoh, M., Koyama, A. (1997). A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D-or L-arginine. *Biochemical and biophysical research communications*, 233(1), 150-153.
- Nicolás, E., Calo, S., Murcia-Flores, L., Garre, V., Ruiz-Vázquez, R. M., Torres-Martínez, S. (2008). A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. *FEMS microbiology letters*, 280(1), 81-88.
- Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M. (2003). Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *The EMBO journal*, 22(15), 3983-3991.
- Nyilasi, I., Ács, K., Papp, T., Nagy, E., Vágvölgyi, C. (2005). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia microbiologica*, 50(5), 415.
- Ocampo, J., McCormack, B., Navarro, E., Moreno, S., Garre, V., Rossi, S. (2012). Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4. *Eukaryotic cell*, 11(8), 989-1002.

- Papp, T., Csernetics, Á., Nagy, G., Bencsik, O., Iturriaga, E. A., Eslava, A. P., Vágvölgyi, C. (2013). Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(11), 4937-4950.
- Papp, T., Csernetics, Á., Nyilasi, I., Vágvölgyi, C., Iturriaga, E. A. Integration of a Bacterial b-Carotene Ketolase Gene into the *Mucor circinelloides* Genome by the *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation Method. *Series Editor John M. Walker School of Life Sciences University of Hertfordshire Hatfield, Hertfordshire, AL10 9AB, UK*, 123.
- Parker, J. O., Fung, H. L. (1984). Transdermal nitroglycerin in angina pectoris. *The American journal of cardiology*, 54(6), 471-476.
- Pengkit, A., Jeon, S. S., Son, S. J., Shin, J. H., Baik, K. Y., Choi, E. H., Park, G. (2016). Identification and functional analysis of endogenous nitric oxide in a filamentous fungus. *Scientific reports*, 6, 30037.
- Pfannmüller, A., Boysen, J. M., Tudzynski, B. (2017). Nitrate Assimilation in *Fusarium fujikuroi* is controlled by multiple levels of regulation. *Frontiers in microbiology*, 8, 381.
- Ponting, C. P., Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. (1999). SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic acids research*, 27(1), 229-232.
- Prats, E., Carver, T. L., Mur, L. A. (2008). Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeriagraminis*. *Research in Microbiology*, 159(6), 476-480.
- Prochazkova, D., Haisel, D., Pavlikova, D. (2014). Nitric oxide biosynthesis in plants-the short overview. *Plant, Soil and Environment*, 60(3), 129-134.

- Raju, T. N. (2000). The Nobel chronicles. 1998: Robert Francis Furchgott (b 1911), Louis J Ignarro (b 1941), and Ferid Murad (b 1936).
- Rojas, L., Portal, O., Jiménez, E. (2011). Extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos. *Biotecnología vegetal*, 11(4).
- Schinko, T., Gallmetzer, A., Amillis, S., Strauss, J. (2013). Pseudo-constitutivity of nitrate-responsive genes in nitrate reductase mutants. *Fungalgenetics and biology*, 54, 34-41.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P., Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic acids research*, 28(1), 231-234.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 5857-5864.
- Scott, B., Eaton, C. J. (2008). Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Currentopinion in microbiology*, 11(6), 488-493.
- Shimizu, H., Park, S. Y., Shiro, Y., Adachi, S. I. (2002). X-ray structure of nitric oxide reductase (cytochrome P450nor) at atomic resolution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(1), 81-89.
- Shoun, H., Fushinobu, S., Jiang, L., Kim, S. W., Wakagi, T. (2012). Fungal denitrification and nitric oxide reductase cytochrome P450nor. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1593), 1186-1194.
- Springer, M. L. (1993). Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Bioessays*, 15(6), 365-374.

- Takaya, N., Suzuki, S., Matsuo, M., Shoun, H. (1997). Purification and characterization of a flavohemoglobin from the denitrifying fungus *Fusarium oxysporum*. *FEBS letters*, 414(3), 545-548.
- Takemoto, D., Tanaka, A., Scott, B. (2007). NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genetics and Biology*, 44(11), 1065-1076.
- teBiesebeke, R., Levasseur, A., Boussier, A., Record, E., Van den Hondel, C. A., Punt, P. J. (2010). Phylogeny of fungal hemoglobins and expression analysis of the *Aspergillus oryzae* flavohemoglobin gene *fhbA* during hyphal growth. *Fungal biology*, 114(2-3), 135-143.
- terSchure, E. G., van Riel, N. A., Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiologyreviews*, 24(1), 67-83.
- Tomura, D., Obika, E., Fukamizu, K., Shoun, I. (1994). Nitric oxide reductase cytochrome P-450 gene, CYP 55, of the fungus *Fusarium oxysporum* containing a potential binding-site for FNR, the transcription factor involved in the regulation of anaerobic growth of *Escherichia coli*. *The Journal of Biochemistry*, 116(1), 88-94.
- Tudzynski, B., Mende, K., Weltring, K. M., Kinghorn, J. R., Unkles, S. E. (1996). The *Gibberella fujikuroi niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. *Microbiology*, 142(3), 533-539.
- Turrion-Gomez, J. L., Eslava, A. P., Benito, E. P. (2010). The flavohemoglobin BCFHG1 is the main NO detoxification system and confers protection against nitrosative conditions but is not a virulence factor in the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(5), 484-496.

- van Heeswijck, R., Roncero, M. I. G. (1984). High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg research communications*, 49(7), 691.
- Vellanki, S., Navarro-Mendoza, M. I., Garcia, A., Murcia, L., Perez-Arques, C., Garre, V., Lee, S. C. (2018). *Mucor circinelloides*: Growth, maintenance, and genetic manipulation. *Current protocols in microbiology*, 49(1), e53.
- Wang, J., Higgins, V. J. (2005). Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(4), 284-292.
- White, M. M., James, T. Y., O'Donnell, K., Cafaro, M. J., Tanabe, Y., Sugiyama, J. (2006). Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, 98(6), 872-884.
- Wiame, J. M., Grenson, M., Ars Jr, H. N. (1985). Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 26, pp. 1-88). Academic Press.
- Wilson, I. D., Neill, S. J., Hancock, J. T. (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell Environment*, 31(5), 622-631.
- Xia, C., Zhang, J., Zhang, W., Hu, B. (2011). A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. *Biotechnology for biofuels*, 4(1), 15.
- Zemojtel, T., Fröhlich, A., Palmieri, M. C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L. S., ... Durner, J. (2006). Plant nitric oxide synthase: a never-ending story?. *Trends in plant science*, 11(11), 524-525.

Zhou, S., Fushinobu, S., Kim, S. W., Nakanishi, Y., Maruyama, J. I., Kitamoto, K., Shoun, H. (2011). Functional analysis and subcellular location of two flavohemoglobins from *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(2), 200-207.