



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Regulación de la expresión de genes endógenos por la maquinaria de silenciamiento génico mediado por RNA en *Mucor circinelloides*.

Ana Vila Martínez

2014

Regulación de la expresión de genes endógenos por la maquinaria de silenciamiento génico mediado por RNA en *Mucor circinelloides*.

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Microbiología (Área de Genética) de la Universidad de Murcia, para optar al grado de Doctor en Biología, por la Licenciada **Ana Vila Martínez**,

Murcia, 11 de Abril de 2014



D. **Francisco José Murillo Araujo**, Catedrático de Universidad del Área de Genética y Director del Departamento de Genética y Microbiología, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Regulación de la expresión de genes endógenos por la maquinaria de silenciamiento génico mediado por RNA en *Mucor circinelloides***”, ha sido realizada por D.^a **Ana Vila Martínez**, bajo la inmediata dirección y supervisión de D.^a **Rosa M^a Ruiz Vázquez**, Catedrática del Área de Genética, y D. **Francisco Esteban Nicolás Molina**, Investigador contratado, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

En Murcia, a 8 de Abril de 2014



D^a. **Rosa M^a Ruiz Vázquez**, Catedrática de Universidad del Área de Genética y D. **Francisco Esteban Nicolás Molina**, Investigador contratado, ambos en el Departamento de Genética y Microbiología, AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Regulación de la expresión de genes endógenos por la maquinaria de silenciamiento génico mediado por RNA en *Mucor circinelloides***”, realizada por D.^a **Ana Vila Martínez**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 8 de Abril de 2014



A mi familia

ÍNDICE DE MATERIAS

I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1. <i>Mucor circinelloides</i>	3
I. 1. 1. Características generales	3
I. 1. 2. Ciclo de vida	3
I. 1. 3. <i>Mucor</i> como modelo de estudio	5
I. 2. Silenciamiento génico mediado por RNA	7
I. 2. 1. Generalidades	8
I. 2. 2. Silenciamiento génico en hongos filamentosos	10
I. 2. 3. Silenciamiento génico mediado por RNA en <i>M. circinelloides</i>.....	14
I. 3. Los pequeños RNAs reguladores	19
I. 3. 1. Pequeños RNAs endógenos en hongos filamentosos	24
I. 3. 2. Pequeños RNAs endógenos en <i>M. circinelloides</i>	27
I. 4. Objetivos de este trabajo	32
II. MATERIALES Y MÉTODOS	35
II. 1. Estirpes y plásmidos utilizados	37
II. 2. Medios y condiciones de crecimiento	40
II. 2. 1. <i>Escherichia coli</i>	40
II. 2. 2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
II. 2. 3. <i>Mucor circinelloides</i>	40
II. 3. Tampones y reactivos	41
II. 4. Transformación de <i>E. coli</i>	45
II. 5. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>.....	46
II. 6. Transformación de <i>M. circinelloides</i>	46
II. 7. Integración de DNA exógeno en el genoma de <i>M. circinelloides</i>	47

II. 8. Manipulación del DNA	48
II. 8. 1. Aislamiento de DNA de <i>M. circinelloides</i>	48
II. 8. 2. Aislamiento de DNA plasmídico	49
II. 8. 3. Tratamiento de DNA con enzimas	49
II. 8. 4. Técnicas electroforéticas	50
II. 8. 5. Amplificación de DNA por PCR	50
II. 8. 6. Marcado de fragmentos de DNA	52
II. 8. 7. Hibridación de DNA fijado a un soporte	52
II. 8. 8. Secuenciación del DNA	53
II. 9. Análisis de secuencias de DNA	53
II. 10. Manipulación del RNA	54
II. 10. 1. Aislamiento de RNA total de <i>M. circinelloides</i>	54
II. 10. 2. Aislamiento de RNA de bajo peso molecular de <i>Mucor</i> <i>circinelloides</i>	55
II. 10. 3. Construcción de librerías de sRNAs.....	55
II. 10. 4. Amplificación de cDNAs.....	57
II. 10. 5. Hibridación de RNA total fijado a un soporte	58
II. 10. 6. Hibridación de RNA de bajo peso molecular fijado a un soporte	59
II. 10. 7. Marcado de ribosondas	60
II. 10. 8. Marcado de oligonucleótidos	61
II. 11. Manipulación de proteínas	61
II. 11. 1. Preparación de extractos de proteínas de <i>M. circinelloides</i>.....	61
II. 11. 2. Fraccionamiento de proteínas mediante cromatografía líquida (FPLC).....	63
II. 11. 3. Electroforesis de proteínas	64
II. 11. 4. Inmunodetección de proteínas.....	64
II. 11. 4. 1. Transferencia de proteínas a membranas.....	64
II. 11. 4. 2. Revelado de las membranas por inmunodetección.....	64
II. 12. Inmunoprecipitación de proteínas	65
II. 13. Construcción de vectores para la expresión de proteínas en el sistema de doble híbrido de levaduras	66

II. 14. Cuantificación de la producción de esporas vegetativas.....	68
II. 15. Cuantificación de la producción de esporas sexuales.....	68
II. 16. Cuantificación del proceso de autólisis.....	68
II. 17. Análisis transcriptómicos.....	69
II. 17. 1. Análisis transcriptómicos mediante micromatrices.....	69
II. 17. 2. Análisis transcriptómicos mediante RNAseq.....	74
III. RESULTADOS	75
III. 1. Caracterización de la maquinaria de silenciamiento	77
III. 1. 1. Identificación y caracterización del gen <i>qip</i> de <i>M. circinelloides</i>.....	78
III. 1. 1. 1. Clonación del gen <i>qip</i>	78
III. 1. 1. 2. Secuencia de aminoácidos de la proteína Qip.....	81
III. 1. 1. 3. Análisis de la expresión del gen.....	83
III. 1. 1. 4. Análisis funcional de gen <i>qip</i>	84
III. 1. 1. 4. 1. Disrupción del gen <i>qip</i> -.....	84
III. 1. 1. 4. 2. Silenciamiento génico en el mutante <i>qip</i> ⁻	90
III. 1. 1. 4. 3. Acumulación de siRNAs en el mutante <i>qip</i> ⁻	92
III. 1. 2. Estudio de la interacción entre proteínas de la ruta de silenciamiento	95
III. 1. 3. Obtención de estirpes <i>rdrp-1</i>/<i>rdrp-2</i>.....	98
III. 1. 3. 1. Generación de un doble mutante <i>rdrp-1</i> / <i>rdrp-2</i>	98
III. 2. Papel de Ago-1 en la producción de pequeños RNAs endógenos (esRNAs).....	103
III. 2. 1. Análisis genómico de los esRNAs en el mutante <i>ago-1</i>.....	104
III. 2. 2. Caracterización de los esRNAs unidos específicamente a Ago-1.....	108
III. 2. 2. 1. Purificación de Ago-1 mediante inmunoprecipitación.....	108
III. 2. 2. 2. Purificación de Ago-1 mediante FPLC.....	111
III. 2. 2. 3. Clonación y análisis de los esRNAs unidos a Ago-1.....	113
III. 3. Análisis global de los mRNA acumulados diferencialmente en mutantes de silenciamiento.....	118

III. 3. 1. Análisis transcriptómico mediante micromatrices.....	118
III. 3. 2. Análisis transcriptómico mediante RNA-seq.....	126
III. 4. Estudio fenotípico de los mutantes en la ruta de silenciamiento.....	136
III. 4. 1. Producción de esporas durante el desarrollo vegetativo.....	136
III.4. 2. Producción de zigosporas durante el desarrollo sexual.....	138
III. 4. 3. Influencia del pH en la tasa de crecimiento.....	140
III. 4. 4. Respuesta a estrés oxidativo.....	142
III. 4. 5. Respuesta a estrés térmico.....	144
III. 4. 6. Cuantificación del proceso de autólisis.....	146
III. 4. 7. Análisis de la virulencia en sistemas heterólogos.....	150
IV. DISCUSIÓN	153
IV. 1. La maquinaria de silenciamiento génico de <i>M. circinelloides</i>	155
IV. 2. Los sRNAs endógenos de <i>M. circinelloides</i>	160
IV. 3. Expresión diferencial en mutantes de la ruta de silenciamiento.....	165
IV.4. Procesos celulares afectados en mutantes de la ruta de silenciamiento.....	174
V. CONCLUSIONES	181
VI. BIBLIOGRAFÍA	187
VII. ANEXOS	209
Tabla S1.....	211
Tabla S2.....	219
Tabla S3.....	227
Tabla S4.....	237

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>M. circinelloides</i>	4
Figura 2. Esquema simplificado de las rutas de silenciamiento mediadas por miRNAs y siRNAs basado en el mecanismo de silenciamiento de <i>D. melanogaster</i>	9
Figura 3. Mecanismos de “quelling” y de silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (MSUD) en <i>N. crassa</i>	11
Figura 4. Ruta de biosíntesis de carotenoides de <i>M. circinelloides</i>	14
Figura 5. Silenciamiento génico mediado por RNA en <i>M. circinelloides</i>	16
Figura 6. Modelo del mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes en <i>M. circinelloides</i>	17
Figura 7. Biogénesis de los miRNAs y de los siRNAs.....	20
Figura 8. Mecanismos de generación de moléculas de dsRNA inductoras de la ruta de los endo-siRNAs	22
Figura 9. Modelo ping-pong para la amplificación de los piRNAs.....	23
Figura 10. Proporción de loci de esRNAs dependientes de <i>dcl-2</i> que requieren además a las proteínas RdRPs para su biogénesis.....	29
Figura 11. Funciones biológicas de los genes regulados por las diferentes clases de ex-siRNAs.....	31
Figura 12. Sistema de doble híbrido de levaduras.....	67
Figura 13. Análisis de los datos brutos extraídos de las micromatrices.....	72
Figura 14. Análisis de los datos normalizados.....	73
Figura 15. Secuencia genómica completa del gen <i>qip</i> y regiones adyacentes.....	79
Figura 16. Plásmido pMAT1501 portador del gen <i>qip</i> completo y regiones adyacentes.....	81
Figura 17. Secuencia de aminoácidos de la proteína Qip de <i>Mucor circinelloides</i>	82
Figura 18. Alineamiento múltiple de proteínas Qip de varios mucorales.....	83
Figura 19. Expresión del gen <i>qip</i> de <i>M. circinelloides</i>	84
Figura 20. Construcción del plásmido pMAT1502, portador del inserto empleado para la disrupción del gen <i>qip</i>	85
Figura 21. Representación esquemática del proceso de generación del mutante nulo <i>qip</i> ⁻	86
Figura 22. Análisis mediante PCR de los transformantes obtenidos en la generación del mutante <i>qip</i> ⁻	88

Figura 23. Disrupción del gen <i>qip</i> de <i>M. circinelloides</i>	89
Figura 24. Estabilidad del silenciamiento en el mutante <i>qip</i> ⁻	91
Figura 25. Análisis de siRNAs en transformantes no silenciados del mutante <i>qip</i> ⁻	93
Figura 26. Producción de siRNAs en transformantes silenciados del mutante <i>qip</i> ⁻	94
Figura 27. Vectores de expresión utilizados en el sistema del doble híbrido de levaduras.....	96
Figura 28. Análisis de la interacción entre proteínas de la maquinaria de silenciamiento mediante el sistema de doble híbrido de levaduras.....	97
Figura 29. Representación esquemática del proceso de generación del doble mutante <i>rdrp-1</i> ⁻ / <i>rdrp-2</i> ⁻	99
Figura 30. Construcción del plásmido pMAT1513, portador del inserto empleado para la disrupción del gen <i>rdrp-1</i>	100
Figura 31. Análisis mediante PCR de los transformantes obtenidos en los experimentos realizados para la generación del doble mutante <i>rdrp-1</i> ⁻ / <i>rdrp-2</i> ⁻	101
Figura 32. Interrupción del gen <i>rdrp-1</i> en la estirpe MU420 (<i>rdrp-2</i> ⁻).....	102
Figura 33. Participación de Ago-1 en la biogénesis de los ex-siRNAs de las clases I y II.....	106
Figura 34. Participación de Ago-1 en la biogénesis de los ex-siRNAs de las clases III y IV.....	108
Figura 35. Especificidad del anticuerpo anti-Ago-1.....	109
Figura 36. Inmunoprecipitación de la proteína Ago-1.....	110
Figura 37. Purificación de Ago-1 mediante FPLC y aislamiento de sRNAs unidos a Ago-1.....	112
Figura 38. Obtención de fracciones enriquecidas en Ago-1 en la estirpe silvestre.....	113
Figura 39. Nucleótidos en el extremo 5' de los ex-siRNAs.....	116
Figura 40. Acumulación de mRNAs en la estirpe silvestre y en los mutantes en genes de silenciamiento.....	117
Figura 41. Esquema de las comparaciones realizadas en el experimento de expresión diferencial mediante micromatrices.....	119
Figura 42. Análisis de genes con expresión diferencial a las 24 horas de crecimiento..	120
Figura 43. Análisis de genes con expresión diferencial a las 48 horas de crecimiento..	121
Figura 44. Análisis de genes con expresión diferencial a las 24 horas de crecimiento..	129

Figura 45. Producción de esporas vegetativas en las estirpes mutantes en la ruta de silenciamiento.....	137
Figura 46. Producción de zigosporas en mutantes de la ruta de silenciamiento.....	139
Figura 47. Caracterización del crecimiento de los mutantes a diferentes pH.....	141
Figura 48. Respuesta a estrés oxidativo de los mutantes <i>rdrp-1</i> y <i>rdrp-2</i>	143
Figura 49. Termotolerancia de la estirpe silvestre R7B y los mutantes <i>rdrp-1</i> y <i>rdrp-2</i> en distintos medios de cultivo.....	145
Figura 50. Tasa de crecimiento de los mutantes <i>rdrp-1</i> y <i>rdrp-2</i> a temperatura restrictiva.....	146
Figura 51. Proceso de autólisis en la estirpe silvestre y en mutantes de la maquinaria de silenciamiento.....	147
Figura 52. Destrucción de las hifas y formación de hifas vacías en cultivos envejecidos de mutantes de silenciamiento.....	148
Figura 53. Cuantificación del proceso de autólisis celular en la estirpe silvestre y mutantes afectados en la maquinaria de silenciamiento.....	149
Figura 54. Estudio <i>in vivo</i> de la virulencia de las estirpes mutantes en genes de silenciamiento.....	151
Figura 55. Alineamiento de las secuencias de los tres motivos característicos de las exonucleasas 3'-5' de la superfamilia DDEDh.....	156
Figura 56. Logos de los ex-siRNAs pertenecientes a la clase III.....	162
Figura 57. Modelo propuesto para la biogénesis de las distintas clases de ex-siRNAs..	164
Figura 58. Representación gráfica de la expresión diferencial de genes seleccionados..	168

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las cuatro clases de ex-siRNAs.....	29
Tabla 2. Estirpes de <i>M. circinelloides</i> utilizadas en este trabajo.....	37
Tabla 3. Estirpes de <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo.....	38
Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	39
Tabla 5. Oligonucleótidos específicos utilizados en los experimentos de PCR, RT-PCR, secuenciación y como marcadores de tamaño	51
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de hibridación tipo Northern para la detección de esRNAs y mRNAs de <i>M. circinelloides</i>	62
Tabla 7. Calidad de las muestras de RNA utilizadas en los experimentos de expresión diferencial mediante micromatrices.....	71
Tabla 8. Número de lecturas y calidad de las mismas en los experimentos de secuenciación de RNA.....	74
Tabla 9. Porcentaje de identidad de la proteína Qip de <i>M. circinelloides</i> con proteínas similares de otros hongos.....	82
Tabla 10. Silenciamiento génico en el mutante <i>qip</i> ⁻	91
Tabla 11. Estabilidad del silenciamiento en el mutante <i>qip</i> ⁻	92
Tabla 12. Estadística de los sRNAs secuenciados de las estirpes R7B y MU413.....	104
Tabla 13. Acumulación de las diferentes clases de ex-siRNAs en el mutante <i>ago-1</i>	105
Tabla 14. Estadística de los sRNAs aislados de fracciones enriquecidas en Ago-1 en las estirpes R7B (silvestre) y MU413.....	114
Tabla 15. Unión de las diferentes clases de ex-siRNAs a la proteína Ago-1.....	115
Tabla 16. Loci con expresión diferencial significativa en los mutantes de silenciamiento respecto al silvestre identificados en los experimentos de micromatrices.....	119
Tabla 17. Valores medios de expresión diferencial en los mutantes de silenciamiento.	122
Tabla 18. Loci con mayores diferencias de expresión en los mutantes de silenciamiento respecto al silvestre.....	122
Tabla 19. Genes diferencialmente expresados en los mutantes <i>dcl-1</i> / <i>dcl-2</i> ⁻ y <i>ago-1</i> ⁻ respecto al silvestre.....	124
Tabla 20. Valores de expresión diferencial en los mutantes de silenciamiento para el locus ID 83353.....	125

Tabla 21. Porcentaje de genes diana de ex-siRNAs con expresión diferencial de mRNA significativa.....	125
Tabla 22. Loci con expresión diferencial significativa en los mutantes de silenciamiento respecto al silvestre en los experimentos de RNA-seq.....	127
Tabla 23. Valores medios de expresión diferencial en los mutantes de silenciamiento a las 24 horas de crecimiento.....	128
Tabla 24. Loci con mayores diferencias de expresión en los mutantes de silenciamiento respecto al silvestre.....	128
Tabla 25. Valores de expresión diferencial de los genes con un mayor nivel de represión en los mutantes de silenciamiento tras 24 horas de crecimiento.....	130
Tabla 26. Valores de expresión diferencial de los genes con una mayor acumulación de transcritos en los mutantes de silenciamiento tras 24 horas de crecimiento.....	131
Tabla 27. Valores de expresión diferencial de los genes con una mayor acumulación de transcritos en los mutantes de silenciamiento tras 48 horas de crecimiento.....	133
Tabla 28. Valores de expresión diferencial de los genes con un mayor nivel de represión en los mutantes de silenciamiento tras 48 horas de crecimiento.....	135
Tabla 29. Expresión diferencial de genes seleccionados a las 24 y 48 horas.....	167
Tabla 30. Proteínas previsiblemente implicadas en los cambios fenotípicos mostrados por los mutantes en genes de silenciamiento, en función de su similitud con proteínas conocidas de otros organismo.....	176

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. *Mucor circinelloides*.

I. 1. 1. Características generales.

Mucor circinelloides es un hongo filamentoso que presenta una amplia distribución, encontrándose en el suelo, sobre estiércol y sobre otros sustratos orgánicos en descomposición. Se ha descrito como un patógeno oportunista humano, agente causal de la mucormicosis, una enfermedad rara pero generalmente letal cuya incidencia ha aumentado en los últimos años (Alvarez *et al.*, 2009). Pertenece al subphylum *Mucoromycotina*, que se caracteriza por tener una reproducción sexual por fusión de gametangios, presentar un micelio generalmente cenocítico (en algunas especies pueden aparecer algunos septos), y producir esporas aflageladas e inmóviles. Se incluye en el orden *Mucorales* porque las esporas vegetativas que produce se desarrollan de forma endógena en estructuras que se conocen como esporangios, y en la familia *Mucoraceae* porque el esporangio aparece separado del resto del esporangióforo por un septo llamado columela. El género *Mucor*, que da nombre al subphylum, la familia y al orden, presenta esporangióforos ramificados en forma de racimos o cimas y esporangios globosos en su extremo.

I. 1. 2. Ciclo de vida.

M. circinelloides es un hongo heterotálico, con dos tipos sexuales (+) y (-), idénticos morfológicamente. Presenta dos ciclos de vida (**Figura 1**):

- Un **ciclo asexual o vegetativo**, que permite una rápida dispersión del organismo. Se inicia con la germinación de una espora vegetativa o esporangiospora, que suele ser multinucleada. Las esporas maduran en el esporangio, situado en el extremo del esporangióforo. Al germinar, las esporas se hinchan y producen uno o varios tubos germinativos, que dan lugar a las hifas que crecen por el ápice y se ramifican abundantemente para formar el micelio. Las hifas jamás se anastomosan y, normalmente, carecen de tabiques transversales, por lo que el micelio es cenocítico. En un momento dado, las hifas que crecen ramificándose sobre el sustrato se hacen aéreas, originando los esporangióforos (Gooday, 1973).

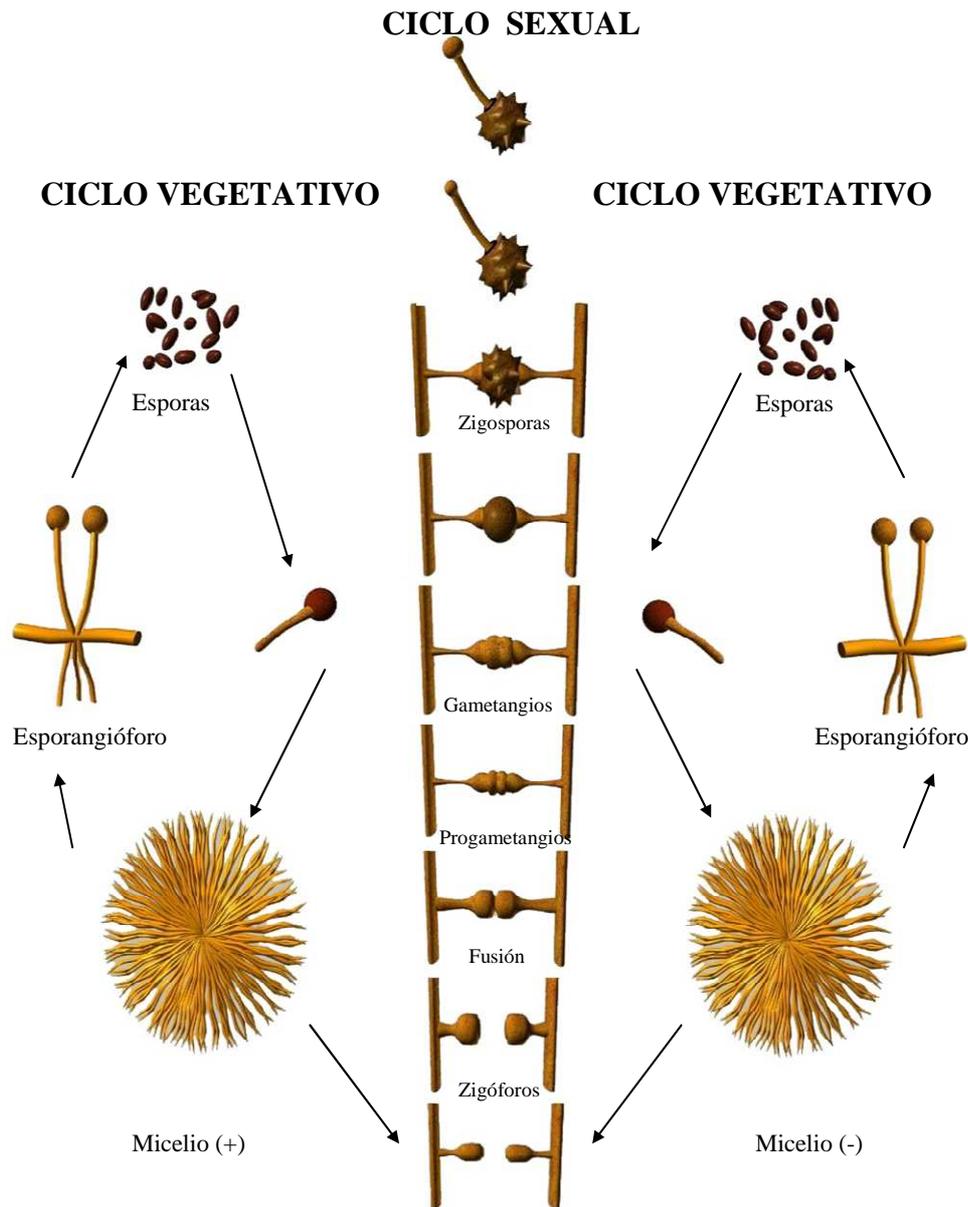


Figura 1. Ciclo de vida de *M. circinelloides*.

- Un **ciclo de vida sexual**, que garantiza la recombinación del material genético de las estirpes que participan en él, asegurándose así la variabilidad genética de la especie. Tiene lugar cuando se encuentran dos micelios de diferente tipo sexual. Esta aproximación inhibe la formación de esporangióforos, induce la acumulación de β -caroteno y la diferenciación de las hifas sexuales, denominadas zigóforos. Los zigóforos se fusionan por pares, normalmente por sus ápices y dan lugar a los progametangios, que presentan un septo subapical que los separa del resto de cada hifa sexual. Los dos gametangios presentan poros en la pared que los separa. Esta pared sigue degenerando y se produce una mezcla de

citoplasma de ambos gametangios por un fenómeno conocido como plasmogamia. Se forma una estructura rodeada por una pared gruesa y ornamentada en la que se depositan compuestos como la esporolenina, un polímero de carotenoides oxidados (Gooday *et al.*, 1973) y melanina, que actúan protegiendo a la zigospora. En ella se produce la fusión de núcleos de distinto tipo sexual o cariogamia. La mayor parte de los núcleos englobados no se fusionan y degeneran. Sólo algunos se fusionan y de los cuatro posibles productos meióticos, sólo uno sobrevive. Tras un período de latencia, variable según la especie, la zigospora germina dando lugar a un germosporangio. Este germosporangio contiene los productos de la meiosis, las germosporas, que pueden iniciar un nuevo ciclo de crecimiento. En el caso de *M. circinelloides*, la interacción sexual y formación de zigosporas se puede llevar a cabo de forma eficaz en el laboratorio, aunque nunca se ha observado la germinación de las zigosporas.

I. 1. 3. *Mucor* como modelo de estudio.

M. circinelloides se ha convertido en un organismo modelo para el estudio de distintos procesos biológicos, como la síntesis de metabolitos secundarios, respuestas a la luz, silenciamiento génico, síntesis de lípidos y dimorfismo. Contiene un genoma pequeño de 36.6 megabases (*M. circinelloides* CBS 277.49; <http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>) que incluye 11.719 genes y ofrece fácil manejo y rápido crecimiento en el laboratorio. Sin embargo, su principal ventaja es la existencia de un sistema eficaz de transformación genética, que permite la introducción de DNA exógeno dentro del hongo (van Heeswijk, 1984; van Heeswijk y Roncero, 1984; Gutiérrez *et al.*, 2011). Con este fin, se han desarrollado distintos vectores que portan, como marcadores seleccionables, genes que complementan mutaciones auxotróficas presentes en distintas estirpes de *M. circinelloides* (Roncero *et al.*, 1989; Anaya y Roncero, 1991; Benito *et al.*, 1995). Dichos vectores son autorreplicativos y requieren presión selectiva para su mantenimiento dentro del hongo. La capacidad de *M. circinelloides* para ser transformado también ha permitido el desarrollo de procedimientos para la integración, por recombinación homóloga, de fragmentos lineales de DNA en sus cromosomas, permitiendo la generación de mutantes nulos por reemplazamiento génico (Navarro *et al.*, 2001). Así mismo, se han desarrollado estrategias para la integración de DNA exógeno en el genoma de *M. circinelloides* basadas en la transferencia de DNA mediada por la bacteria

Agrobacterium tumefaciens (Nyilasi *et al.*, 2005). Finalmente, el descubrimiento del fenómeno de silenciamiento génico en *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003) ha supuesto la incorporación de una nueva herramienta molecular que permite el estudio de la función génica sin necesidad de generar mutantes nulos por reemplazamiento génico (Nicolás *et al.*, 2007).

El conjunto de herramientas moleculares descritas ha convertido a *M. circinelloides* en la especie, dentro del subphylum Mucoromycotina, con el mayor repertorio de recursos para analizar la función génica, a pesar de no haberse establecido las condiciones de laboratorio adecuadas para llevar a cabo cruzamientos genéticos. Esta característica, y sobre todo su posible utilización para la producción de biocarburantes (Vicente *et al.*, 2009; Vicente *et al.*, 2010), fue decisiva para que el Joint Genome Institute, dependiente del Departamento de Energía de Estados Unidos, aprobase en 2007 un proyecto liderado por nuestro grupo de investigación para secuenciar el genoma de *M. circinelloides*. La reciente disponibilidad de la secuencia del genoma ha acelerado las investigaciones en *M. circinelloides*, al simplificar procedimientos experimentales como la clonación de genes, y ha abierto la posibilidad de nuevas aproximaciones experimentales basadas en técnicas de genómica, transcriptómica y proteómica.

Aunque *M. circinelloides* se ha utilizado como modelo de estudio de diversos procesos biológicos, uno de los que más interés ha despertado recientemente es la patogénesis. Como se ha comentado anteriormente, *M. circinelloides* ha sido identificado como un patógeno oportunista humano, agente causal de una enfermedad infecciosa rara pero letal denominada mucormicosis (Alvarez *et al.*, 2009). Datos recientes indican un incremento significativo de la mucormicosis, debido fundamentalmente al aumento en la población de pacientes inmunodeprimidos como consecuencia del SIDA, diabetes mal controlada, enfermedades hematológicas, trasplantes de órganos o de células madre hematopoyéticas, y también con algunos tipos de lesiones. Se han descrito también factores de riesgo que incrementan la susceptibilidad a la mucormicosis, como la presencia de niveles altos de hierro en el suero (Morace y Borghi, 2012). Una de las principales preocupaciones relacionadas con la mucormicosis es la alta tasa de mortalidad, aproximadamente un 50% en general, pero más del 90% en los casos de infecciones diseminadas. El coste económico previsto para los daños causados por mucormicosis por el sistema de salud de EE.UU. se aproxima a los 100.000 \$ por caso. Y sin embargo, sorprendentemente, muy poco es lo que se sabe sobre la genética de la patogénesis de los

Mucorales, comparado con otros hongos patógenos, y ello repercute en la falta de tratamientos farmacológicos efectivos. De hecho, la elevada virulencia y mortalidad de la mucormicosis ha hecho que se centre la atención en *M. circinelloides* para el estudio de nuevas dianas terapéuticas.

Muy recientemente, y utilizando modelos heterólogos (larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella* y ratones), se ha demostrado una correlación entre el tamaño de las esporas de *M. circinelloides* y la virulencia: las esporas más grandes son más virulentas que las pequeñas (Li *et al.*, 2011). Las esporas de mayor tamaño comienzan a formar sus hifas invasivas inmediatamente después de la fagocitosis por las células inmunes del hospedador, escapando así al sistema inmune, mientras que las esporas más pequeñas presentan un prolongado período de crecimiento isotrópico antes de poder germinar, y ello hace que sean neutralizadas por los macrófagos. Esta correlación entre tamaño de las esporas y virulencia explica, en parte, que haya estirpes de *M. circinelloides* patógenas y no patógenas. Ninguna de las estirpes utilizadas rutinariamente en el laboratorio han demostrado ser patógenas en modelos de ratón (Li *et al.*, 2011).

I. 2. Silenciamiento génico mediado por RNA.

El silenciamiento génico mediado por RNA es un complejo mecanismo de regulación génica conservado en el mundo eucariota, con la notable excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunos otros hongos y protozoos parásitos (Nicolás *et al.*, 2013a). Este mecanismo conduce a la supresión específica de la expresión génica mediada por pequeñas moléculas de RNA que inducen la destrucción del mRNA, impiden su traducción o inhiben su transcripción. Inicialmente descrito como un mecanismo de defensa molecular del genoma frente a virus y transposones, en los últimos años se ha demostrado que este mecanismo está también implicado en un gran número de procesos biológicos, como la regulación del desarrollo, la fisiología del organismo y el establecimiento de la arquitectura cromosómica. Además de revelar un nivel de regulación de la expresión génica hasta hace poco desconocido, el silenciamiento génico mediado por RNA se ha convertido en una herramienta fundamental en el estudio de la función de los genes, permitiendo incluso el desarrollo de nuevas disciplinas como la genómica funcional.

I. 2. 1. Generalidades.

El silenciamiento génico mediado por RNA se observó inicialmente en plantas, donde se denominó **cosupresión** o **silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS)**, y en hongos, donde se denominó “**quelling**”. En ambos casos, la introducción de copias transgénicas de un gen con la intención de aumentar la expresión del mismo provocaba el efecto contrario, bloqueándose la expresión tanto de los transgenes como del gen endógeno homólogo (Napoli *et al.*, 1990; Romano y Macino, 1992; Cogoni *et al.*, 1996). En animales, el silenciamiento génico mediado por RNA se describió por primera vez en *Caenorhabditis elegans* y se denominó **interferencia por RNA (RNAi)** (Guo y Kemphues, 1995). En este caso, la supresión de la expresión génica venía mediada por la introducción de moléculas de RNA con sentido y antisentido, sintetizadas *in vitro*, correspondientes a la secuencia de un gen endógeno. Posteriormente se demostró que el verdadero inductor del silenciamiento eran moléculas de **RNA de doble cadena (dsRNA)** generadas mediante la hibridación de las cadenas con sentido y antisentido (Fire *et al.*, 1998). La disección genética y el análisis bioquímico de los fenómenos de cosupresión, “quelling” e interferencia por RNA permitieron establecer que todos estos fenómenos eran manifestaciones del mismo proceso, conocido globalmente como silenciamiento génico mediado por RNA. Posteriormente se demostró que este mecanismo no sólo responde a la introducción de ácidos nucleicos exógenos, sino que también se induce en respuesta a la producción de moléculas de dsRNA de origen endógeno (Ketting *et al.*, 1999; Wu-Scharf *et al.*, 2000; Aravin *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2002).

En el mecanismo de silenciamiento génico las moléculas de dsRNA son procesadas por una enzima con actividad ribonucleasa III (RNasaIII), denominada Dicer, en **pequeños RNAs (sRNAs)** de 21 a 27 nucleótidos, que determinan la especificidad de la respuesta (Hamilton y Baulcombe, 1999; Zamore *et al.*, 2000; Bernstein *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001a). Inicialmente se identificaron dos categorías principales de sRNAs: los **pequeños RNAs interferentes (siRNAs)**, que resultan del procesamiento de largas moléculas de dsRNA exógenas, generadas tras una infección viral o en respuesta a la presencia de transgenes y transposones; y los **microRNAs (miRNAs)**, que se originan por el procesamiento de RNAs endógenos con estructura en horquilla bicatenaria. Los dos tipos de sRNAs actúan regulando la expresión génica al promover la degradación de los mRNAs diana o la represión de su traducción (**Figura 2**).

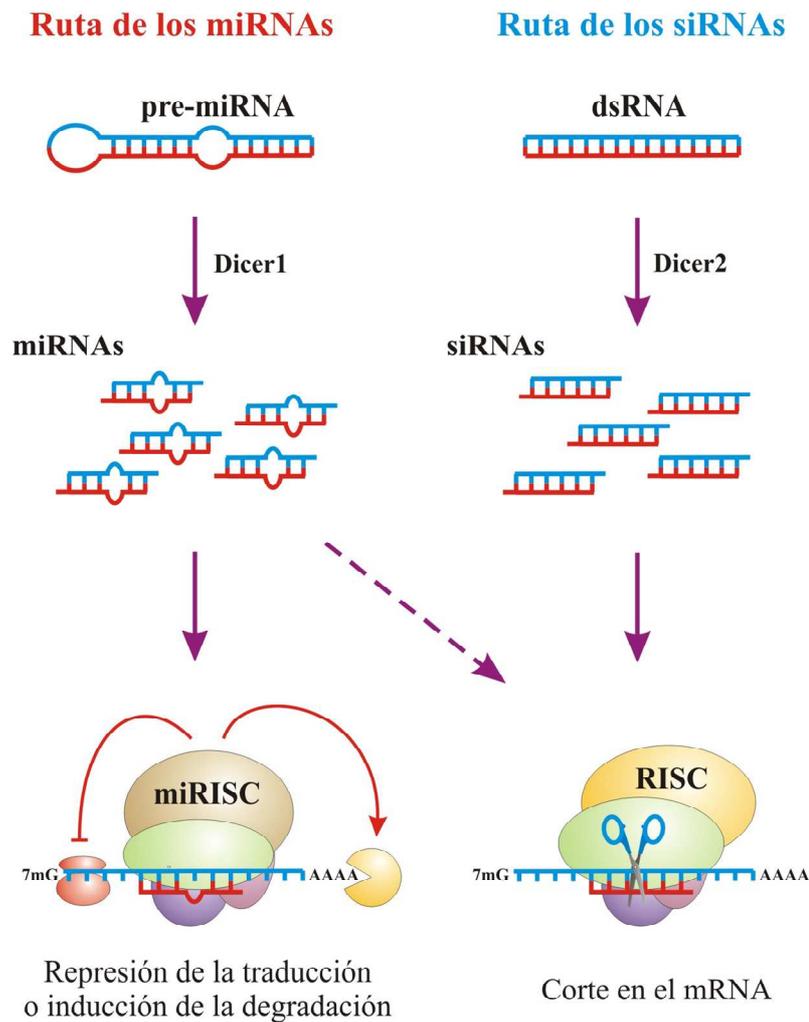


Figura 2. Esquema simplificado de las rutas de silenciamiento mediadas por miRNAs y siRNAs basado en el mecanismo de silenciamiento de *Drosophila melanogaster*.

Los sRNAs generados por Dicer son incorporados al **complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC)**, donde una proteína de la familia Argonauta actúa como componente catalítico. La eliminación de la cadena pasajera del sRNA hace que el complejo RISC se active y utilice la cadena antisentido del sRNA como guía para identificar secuencias complementarias en el mRNA diana. Dependiendo de la naturaleza de la proteína Argonauta presente en el complejo RISC, y del grado de complementariedad entre los sRNAs y la secuencia diana, se diferencian varios modos de regulación: represión de la traducción, degradación de los mRNAs o inhibición de la transcripción mediada por la formación de heterocromatina (revisado en Carthew y Sontheimer, 2009; Ghildiyal y Zamore, 2009). En algunos organismos, incluyendo plantas y hongos, el mecanismo de

silenciamiento requiere la participación de **polimerasas de RNA dependientes de RNA (RdRP)** para generar moléculas de dsRNA a partir de transcritos de cadena sencilla, o para amplificar la señal de silenciamiento. Esta enzima es capaz de utilizar una molécula de RNA de cadena sencilla como molde para sintetizar la cadena complementaria, generando, de esta manera, moléculas de dsRNA (Cogoni y Macino, 1999a; Dalmay *et al.*, 2000). En organismos en los que existen varias proteínas de las familias Dicer, Argonauta y RdRP, miembros específicos de cada familia participan en las distintas rutas de silenciamiento, produciendo las diferentes clases de sRNAs y determinando la forma en la que se suprime la expresión génica (Lee *et al.*, 2004; Okamura *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004).

I. 2. 2. Silenciamiento génico en hongos filamentosos.

El silenciamiento génico mediado por RNA en hongos filamentosos se describió inicialmente en el ascomiceto *Neurospora crassa*, donde se denominó “quelling” (Romano y Macino, 1992). Los estudios llevados a cabo para dilucidar el mecanismo de silenciamiento génico en este hongo permitieron identificar los primeros elementos genéticos implicados en este proceso, los genes *qde* (“quelling defective”) (Cogoni y Macino, 1997). Estos genes se identificaron mediante el análisis genético de mutantes afectados en el silenciamiento y se denominaron *qde1* (Cogoni y Macino, 1999a), que codifica una RdRP, *qde2* (Catalanotto *et al.*, 2000), que cifra una proteína con los dominios Piwi-PAZ característicos de la familia de proteínas Argonauta, y *qde3* (Cogoni y Macino, 1999b), que codifica una helicasa de DNA de la familia RecQ, que interviene en la reparación de daños del DNA en *N. crassa* (Kato *et al.*, 2004). La identificación de genes homólogos en otros organismos, fundamentalmente *C. elegans* y *Arabidopsis thaliana*, apoyó la idea de que la base molecular del silenciamiento génico mediado por RNA es similar en diferentes organismos. Posteriormente, cuando se dispuso de la secuencia genómica de *N. crassa*, se identificaron dos proteínas homólogas a Dicer (DCL1 y DCL2) que tienen funciones parcialmente redundantes en el mecanismo de silenciamiento, siendo necesaria la disrupción simultánea de ambos genes para que se vea afectado dicho mecanismo (Catalanotto *et al.*, 2004). En otro ascomiceto, *Magnaporthe oryzae*, también se identificaron dos genes homólogos a Dicer, pero su inactivación demostró que, a diferencia de lo que ocurría en *N. crassa*, solo el gen *dicer2* es esencial para el mecanismo de silenciamiento (Kadotani *et al.*, 2004).

El estudio del mecanismo de silenciamiento durante el crecimiento vegetativo de *N. crassa* (“quelling”) revela que las proteínas QDE-1 y QDE-3 son esenciales para la inducción del silenciamiento por transgenes “con sentido” (misma orientación que el mRNA) (**Figura 3, derecha**) (revisado en Chang *et al.*, 2012). Recientemente, se ha propuesto que las repeticiones de los transgenes, integrados en tandem en el genoma, promueven la recombinación homóloga y la formación de estructuras aberrantes de intermediarios de recombinación, ya que se ha demostrado que la recombinación homóloga es necesaria para el “quelling” en *N. crassa* (Zhang *et al.*, 2013). Estas estructuras

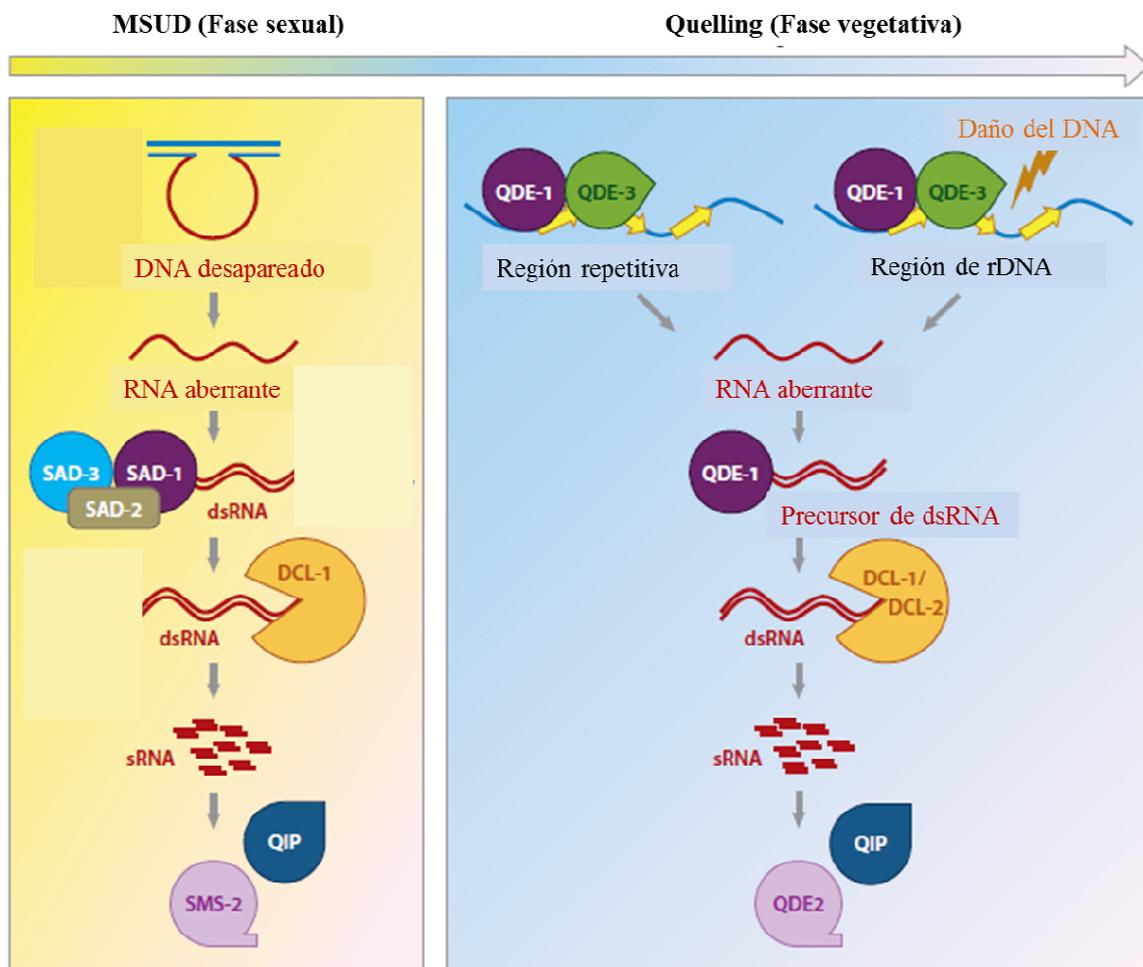


Figura 3. Mecanismos de “quelling” y de silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (MSUD) en *N. crassa* (basado en Chang *et al.*, 2012). QDE-1 y SAD-1 son RdRPs. QDE-2 y SMS-2 son proteínas de la familia Argonauta. Las proteínas que intervienen en el mecanismo de “quelling” participan también en la producción de pequeños RNAs endógenos derivados de DNA ribosómico (qiRNAs) en respuesta a daños en el DNA (ver más adelante).

aberrantes serían reconocidas por la maquinaria de silenciamiento, en concreto por la helicasa QDE-3, que reclutaría a la proteína QDE-1 a estas regiones (Lee *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). La proteína QDE-1, identificada inicialmente como una RdRP, tiene también actividad polimerasa de RNA dependiente de DNA (DdRP) (Lee *et al.*, 2010). Mediante su actividad DdRP, QDE-1 convierte el DNA de cadena sencilla de las estructuras aberrantes de recombinación en moléculas de RNA aberrantes (aRNA) y, posteriormente, en dsRNA, utilizando para ello su actividad RdRP. El dsRNA generado por QDE-1 es procesado mayoritariamente por la enzima DCL-2 en siRNAs de 25 nt (Catalanotto *et al.*, 2004), que son incorporados en el complejo RISC. El componente principal de este complejo es la proteína QDE-2 (Argonauta), que realiza un corte endonucleolítico en la cadena pasajera del siRNA, necesario para que la exorribonucleasa QIP (QDE-2 Interacting Protein) elimine dicha cadena, dando lugar al complejo RISC activo (Maiti, Lee, & Liu, 2007). La proteína QIP, aislada en un escrutinio diseñado para identificar componentes del complejo RISC que interaccionan con QDE-2, es por tanto esencial para la activación de dicho complejo y para que ocurra el silenciamiento génico. En el complejo RISC activo, el siRNA de cadena sencilla sirve de guía para identificar el mRNA diana y promover su degradación. En *Drosophila*, se ha identificado una ribonucleasa (C3PO) que promueve la activación del complejo RISC eliminando la cadena pasajera del siRNA (Liu *et al.*, 2009), lo que indica que la activación de dicho complejo ocurre de forma similar en *Neurospora* y en animales.

Un fenómeno relacionado con el silenciamiento génico mediado por RNA identificado en *N. crassa* es el llamado **silenciamiento meiótico inducido por DNA desapareado (MSUD)** (Shiu *et al.*, 2001) que, a diferencia del “quelling”, ocurre en la fase sexual, en concreto, durante la profase I de la meiosis. Durante el apareamiento de cromosomas homólogos que tiene lugar en la meiosis, el mecanismo de MSUD reprime la expresión de aquellos genes que sólo están presentes en uno de los cromosomas de la pareja y que, por lo tanto, generan una zona de DNA desapareado. El silenciamiento afecta no sólo a la copia del gen desapareado, sino a cualquier copia adicional presente en el genoma, aunque ésta se encuentre apareada (Aramayo y Metzberg, 1996). Los fenómenos de “quelling” y MSUD utilizan diferentes componentes de la maquinaria de silenciamiento (Shiu *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003), manteniendo dos rutas relacionadas pero separadas, de una forma similar a lo que ocurre en *D. melanogaster* con las rutas de los miRNAs y los siRNAs (revisado en Siomi y Siomi, 2009) (**Figura 3, izquierda**). Un

modelo simple del mecanismo de MSUD propone que durante el apareamiento de los cromosomas homólogos en la meiosis, el DNA desapareado es detectado y utilizado como molde para producir transcritos de RNA aberrante por una DdRP aún por identificar. En la region perinuclear estos transcritos son convertidos en dsRNA por SAD-1, una RdRP específicamente requerida para el MSUD, que forma un complejo con la proteína SAD-2 y la helicasa SAD-3, necesarias para la localización perinuclear de SAD-1. El dsRNA generado es seguidamente procesado por la RNasaIII DCL-1, que juega un papel crítico en este mecanismo y que también co-localiza en la región perinuclear con otros componentes del MSUD. Los sRNAs generados son incorporados al complejo RISC, en el que participan la proteína de la familia Argonauta SMS-2 y la exonucleasa QIP, para ejecutar el silenciamiento post-transcripcional de los genes homólogos (revisado en Chang *et al.*, 2012).

Además de *N. crassa*, el silenciamiento génico post-transcripcional inducido por transgenes ha sido descrito en otros hongos filamentosos, como *Cladosporium fulvum* (Hamada y Spanu, 1998), *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003; Nicolás *et al.*, 2007; Nicolás *et al.*, 2009; de Haro *et al.*, 2009; Nicolás *et al.*, 2010; Calo *et al.*, 2012; Cervantes *et al.*, 2013), *M. oryzae* (Kadotani *et al.*, 2003), *Aspergillus nidulans* (Hammond y Keller, 2005) o *Cryphonectria parasitica*, un organismo en el que se ha demostrado que el silenciamiento génico en hongos tiene una función de defensa frente a virus (Segers *et al.*, 2007). En el patógeno humano *Cryptococcus neoformans* se ha descrito una forma especial de silenciamiento que se ha denominado silenciamiento inducido por el sexo (SIS), ya que la frecuencia de silenciamiento de transgenes integrados en tandem en el genoma es 250 veces mayor durante la reproducción sexual que en el crecimiento vegetativo (Wang *et al.*, 2010) La búsqueda en las bases de datos de los componentes típicos de la maquinaria de silenciamiento permite identificar proteínas Dicer, RdRP y Argonauta en un número importante de hongos pertenecientes a los grupos *Ascomycota*, *Basidiomycota* y *Mucoromycotina* (anteriormente, *Zygomycota*) (Nakayashiki *et al.*, 2006). Sin embargo, algunos hongos filamentosos carecen total o parcialmente de la maquinaria de silenciamiento, como es el caso de *Ustilago maydis* o *Cryptococcus gattii*, aunque sí existe en hongos muy próximos evolutivamente a éstos, lo que sugiere que, aunque muy esporádicamente, la pérdida de la maquinaria de silenciamiento ha ocurrido en varios linajes independientes durante la evolución (Nicolás *et al.*, 2013).

I. 2. 3. Silenciamiento génico mediado por RNA en *M. circinelloides*.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la existencia de un mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA en *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003). La facilidad de manipulación de este organismo, la disponibilidad de herramientas moleculares y el hecho de que esté evolutivamente alejado del ascomiceto *N. crassa*, en el que se ha estudiado con más detalle el mecanismo de silenciamiento, han convertido a *M. circinelloides* en un referente dentro del grupo de los hongos filamentosos para estudios de silenciamiento génico. El silenciamiento inducido por transgenes en *M. circinelloides* se ha analizado utilizando como chivato un gen cuya falta de función da lugar a un fenotipo fácilmente identificable. En concreto, se ha empleado el gen *carB*, que cifra la enzima deshidrogenasa de fitoeno, implicada en la síntesis de carotenos coloreados (**Figura 4**).

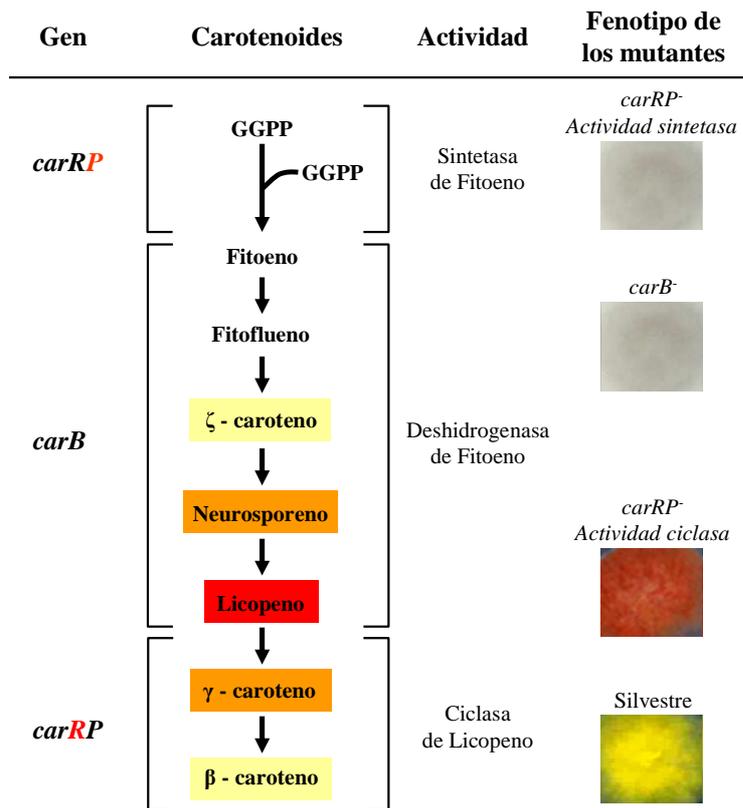


Figura 4. Ruta de biosíntesis de carotenoides en *M. circinelloides*. El gen bifuncional *carRP* es responsable de la actividad sintetasa de fitoeno, que genera el primer caroteno de la ruta a partir de la condensación de dos moléculas de geranylgeranylpirofosfato (GGPP). Las cuatro deshidrogenaciones que convierten el fitoeno en licopeno son llevadas a cabo por el producto del gen *carB*. La síntesis de β-caroteno se completa con el concurso de la actividad ciclasa de licopeno, presente en la enzima bifuncional CarRP. A la derecha se muestra el fenotipo de color de mutantes afectados en las distintas actividades de la ruta de síntesis de β-caroteno.

La síntesis de carotenos en *M. circinelloides* es inducida por la luz. Las estirpes silvestres muestran color amarillo intenso en condiciones de iluminación debido a la acumulación de β -caroteno, mientras que la falta de función del gen *carB* da lugar a un fenotipo albino tanto en oscuridad como en luz, acumulándose en estas estirpes el precursor no coloreado fitoeno. Así, la utilización del gen *carB* como gen chivato permite detectar y analizar el silenciamiento génico en *M. circinelloides* (Nicolás *et al.*, 2003), ya que la degradación del mensajero inducida por la introducción de copias transgénicas del gen *carB* conduce a la aparición del fenotipo albino, fácilmente distinguible del fenotipo silvestre.

Una de las características singulares del silenciamiento génico en *M. circinelloides* es su inducción por transgenes presentes en plásmidos autorreplicativos que, al no integrarse en el genoma, no ven afectada su expresión por efectos de posición o secuencias reguladoras del huésped. Esto ha permitido demostrar que la eficacia y estabilidad del silenciamiento está directamente relacionada con el nivel de expresión de los transgenes. Así, la introducción en la estirpe silvestre de plásmidos autorreplicativos portadores de copias silvestres o truncadas del gen *carB*, controladas por su propio promotor fotoinducible, causa el silenciamiento de dicho gen en el 3-10 % de los transformantes (Nicolás *et al.*, 2003) (**Figura 5A**). Pero esta frecuencia de silenciamiento puede aumentar hasta el 85-90 % cuando se introducen transgenes con repeticiones invertidas dirigidos por promotores constitutivos fuertes, que al transcribirse generan directamente estructuras de RNA en horquilla (de Haro *et al.*, 2009) o se aumenta la expresión de los transgenes “con sentido” por diversos métodos (Nicolás *et al.*, 2009; Calo *et al.*, 2012). El fenotipo albino de los transformantes es resultado de la degradación específica del mRNA maduro del gen *carB*, indicando que el silenciamiento observado tiene lugar a nivel post-transcripcional (Nicolás *et al.*, 2003).

En *M. circinelloides*, los transformantes silenciados por la introducción de transgenes acumulan moléculas de siRNAs correspondientes a secuencias del gen *carB*. En concreto, el silenciamiento génico en *Mucor* está asociado a dos clases distintas de siRNA antisentido, de 21-nt y 25-nt, si bien sólo se detectan siRNAs con sentido de 25-nt (**Figura 5B**). Esto contrasta con otros sistemas, en los que los RNAs con sentido y antisentido presentan el mismo tamaño. Las dos clases de siRNAs antisentido se acumulan diferencialmente durante el crecimiento vegetativo de los transformantes silenciados, lo que constituye la característica más sobresaliente del silenciamiento génico en *Mucor*.

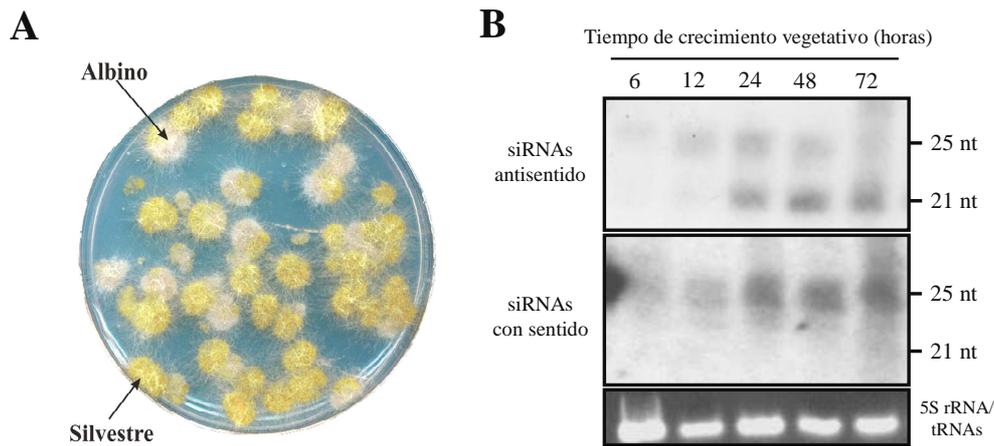


Figura 5. Silenciamiento génico mediado por RNA en *M. circinelloides*. (A) Silenciamiento de la expresión del gen *carB* (fenotipo albino) inducido por la introducción de transgenes con sentido. (B) Acumulación diferencial durante el crecimiento vegetativo de los siRNAs antisentido y con sentido en estirpes silenciadas (Nicolás *et al.*, 2003).

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha dilucidado la ruta de los siRNAs en *M. circinelloides* (**Figura 6**), identificando los genes implicados y generando mutantes en cada uno de ellos. Así, se han caracterizado dos genes *dicer* (*dcl-1* y *dcl-2*) (Nicolás *et al.*, 2007; de Haro *et al.*, 2009), tres genes que cifran RNA polimerasas dependientes de RNA (*rdrp-1*, *rdrp-2* y *rdrp-3*) (Calo *et al.*, 2012; resultados no publicados) y tres genes *argonauta* (*ago-1*, *ago-2* y *ago-3*) (Cervantes *et al.*, 2013). La disrupción del gen *dcl-1* y el análisis posterior de los mutantes mostró que este gen no tiene un papel fundamental en la ruta de silenciamiento génico inducido por transgenes, ni en la producción de las dos clases de siRNAs (Nicolás *et al.*, 2007). Sin embargo, los mutantes *dcl-1* poseen una menor tasa de crecimiento y presentan una morfología anormal de sus hifas, lo que sugiere que pudiera estar implicado en la regulación de funciones endógenas. El gen *dicer* que desempeña el papel principal en la ruta de silenciamiento inducido por transgenes es *dcl-2*, que es fundamental para el eficaz procesamiento del dsRNA en los siRNAs de 21 y 25 nucleótidos asociados al silenciamiento génico en *Mucor* (de Haro *et al.*, 2009). La proteína Dcl-2 requiere para su función la colaboración del producto del gen *r2d2* (Calo, 2010), que cifra una proteína con dos dominios de unión a dsRNA, similar a proteínas de *D. melanogaster* y *C. elegans* que interaccionan con Dicer para el adecuado procesamiento del dsRNA. Aunque Dcl-2 juega el papel principal en el mecanismo de silenciamiento, existe cierta redundancia funcional entre los dos genes *dicer*, de tal forma que sólo en el doble mutante *dcl-1/dcl-2* se anula por completo la capacidad de silenciar. El mutante en el gen *dcl-2* presenta defectos en la esporulación, sugiriendo un posible papel de este gen en la regulación del desarrollo vegetativo (de Haro *et al.*, 2009).

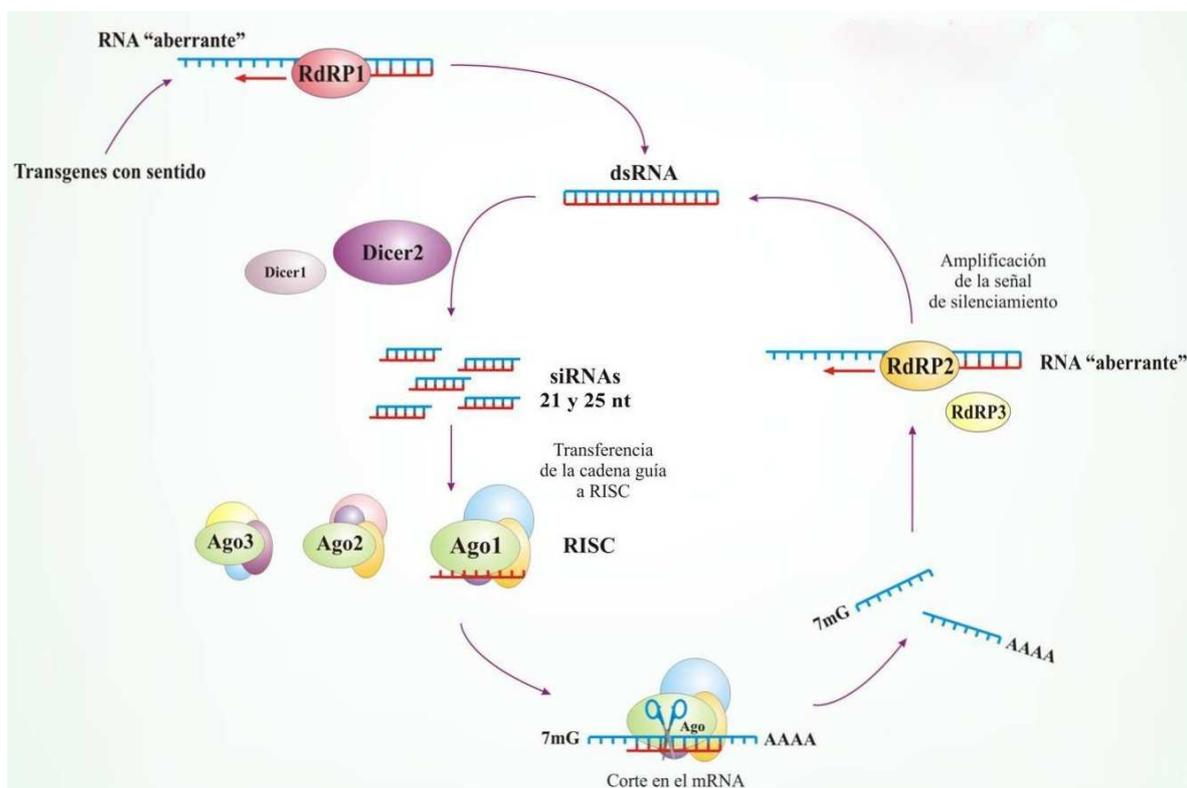


Figura 6. Modelo del mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes en *M. circinelloides*.

También se han identificado en *Mucor* tres genes *argonauta*, de los cuales únicamente *ago-1* está implicado en el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes durante el crecimiento vegetativo, no detectándose en este caso ninguna redundancia funcional con los otros genes *ago* (Cervantes *et al.*, 2013) (**Figura 6**). El gen *ago-2* es probablemente un pseudogen, ya que contiene un codón de parada prematuro que daría lugar a una proteína Argonauta truncada, que carecería del dominio catalítico PIWI, mientras que no se ha encontrado aún una función para el gen *ago-3* en el ciclo vegetativo. Al contrario de lo descrito en otros hongos, como *N. crassa*, la proteína Ago-1 es esencial para la acumulación de las dos clases de siRNAs derivados de los genes silenciados (21-nt y 25-nt). Ello sugiere que esta proteína es necesaria para la biogénesis y/o estabilidad de los siRNAs, probablemente mediante su interacción con otras proteínas de silenciamiento en un complejo multiproteico (Cervantes *et al.*, 2013). Los mutantes *ago-1* muestran también defectos en la producción de esporas, sugiriendo la participación de la ruta canónica de silenciamiento en la regulación de funciones celulares endógenas.

Finalmente, se han identificado tres genes *rdrp* en *M. circinelloides* (**Figura 6**). El análisis de los genes *rdrp-1* y *rdrp-2* puso de manifiesto la diversificación funcional de las proteínas codificadas por ambos genes, ya que actúan en distintos pasos de la misma ruta de silenciamiento. La proteína RdRP-1 es esencial para la inducción del silenciamiento por transgenes “con sentido”, pero es perfectamente dispensable cuando el silenciamiento se induce por dsRNA derivado de transgenes con repeticiones invertidas (Calo *et al.*, 2012). Ello se debe a que RdRP-1 es responsable de la síntesis de dsRNA a partir del RNA de cadena sencilla (ssRNA) derivado del transgen, permitiendo así la inducción del silenciamiento. Por el contrario, la proteína RdRP-2 es esencial para el silenciamiento inducido por transgenes independientemente de la naturaleza de la molécula inductora, siendo necesaria para la eficaz acumulación de los siRNAs secundarios producidos durante el proceso de amplificación (Calo *et al.*, 2012). La amplificación del silenciamiento, llevada a cabo por enzimas RdRPs y descrita en hongos, plantas y algunos animales, permite que pequeñas cantidades de la molécula inductora (dsRNA o directamente siRNAs) activen eficazmente la maquinaria de silenciamiento. Los siRNAs primarios, generados por Dicer directamente a partir de las moléculas inductoras de dsRNA, son dirigidos a sus mRNAs diana mediante el complejo RISC. Utilizando como molde esos mRNA procesados, la enzima RdRP genera nuevas moléculas de dsRNA que dan lugar, por distintos mecanismos, a los llamados siRNAs secundarios, que a diferencia de los siRNAs primarios, pueden corresponder a secuencias del mRNA diana localizadas aguas arriba y aguas abajo de la molécula inductora (revisado en Ghildiyal y Zamore, 2009; Siomi y Siomi, 2009; Fisher, 2010).

La existencia de un proceso de amplificación del silenciamiento en *M. circinelloides* se demostró tras la identificación de siRNAs secundarios correspondientes a secuencias localizadas aguas abajo de la molécula inductora (Nicolás *et al.*, 2003). Las características de estas moléculas de siRNAs secundarios sugieren que las RdRPs implicadas en la amplificación del silenciamiento reconocen como aberrantes los fragmentos de los mRNAs que carecen de la caperuza de 7-metilguanosina, convirtiéndolos en dsRNAs que son procesados por la enzima Dcl-2. La enzima RdRP-2 es la principal responsable de llevar a cabo el proceso de amplificación en *M. circinelloides*, si bien debe existir cierta redundancia funcional entre las RdRPs, ya que los mutantes *rdrp-2*, aunque severamente afectados en su capacidad para silenciar, mantienen un cierto nivel de respuesta a la introducción de transgenes (Calo *et al.*, 2012) (**Figura 6**). Esta actividad

residual en el proceso de amplificación podría ser llevada a cabo por las proteínas RdRP-1 o RdRP-3, aunque aún no se ha identificado ningún papel para el gen *rdrp-3* en el mecanismo de silenciamiento de *M. circinelloides* (nuestros resultados no publicados). La importancia del proceso de amplificación en el mecanismo de silenciamiento de *M. circinelloides* se pone de manifiesto por el hecho de que los siRNAs detectados en los individuos silenciados corresponden, casi exclusivamente, a siRNAs secundarios, tal y como ocurre en *C. elegans* y otros organismos con mecanismos de amplificación eficaces (Pak y Fire, 2007).

Los datos mencionados, obtenidos en el análisis de los genes implicados en el silenciamiento génico inducido por transgenes en *M. circinelloides*, sugieren la existencia de una especialización de los distintos miembros de las familias génicas citadas, que podrían participar en distintas rutas endógenas de silenciamiento, regulando diferentes genes diana y controlando distintas funciones celulares.

I. 3. Los pequeños RNAs reguladores.

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto el creciente protagonismo del mecanismo de regulación génica basado en el silenciamiento génico mediado por pequeñas moléculas de RNA. En eucariotas superiores, además de las dos categorías principales de pequeños RNAs ya mencionadas, los **siRNAs**, implicados en la defensa del genoma y los **miRNAs** reguladores, se han identificado los **RNAs que interaccionan con Piwi (piRNAs)**. Estas tres clases mayoritarias se diferencian en su biogénesis, en el modo de regulación de sus dianas y en las funciones biológicas en las que participan. Sus características comunes son su pequeño tamaño (~20-30 nt) y su asociación con miembros de la familia de proteínas Argonauta, a las que guían para reducir la expresión de sus genes diana.

Los miRNAs regulan, a nivel post-transcripcional, los niveles de proteínas implicadas en una gran variedad de procesos celulares. Son cifrados por el genoma como precursores de RNA no codificante, que adoptan en el núcleo estructuras bicatenarias en forma de horquillas (**Figura 7**). Una vez exportados al citoplasma, estos precursores de dsRNA son procesados por enzimas RNasa III en moléculas de 21-22 nucleótidos, que interaccionan con el mRNA diana portador de secuencias parcialmente complementarias, provocando el bloqueo de su traducción (mayoritariamente en animales) o su degradación

(fundamentalmente en plantas) (**Figura 2**). La mayoría de miRNAs en animales y plantas son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II) (Lee *et al.*, 2004). En moscas y mamíferos, unos pocos miRNAs son casi completamente complementarios al mRNA diana, permitiendo que la proteína Argonauta corte el mRNA en el enlace fosfodiéster entre los nucleótidos apareados con los nucleótidos 10 y 11 del miRNA, contados desde el extremo 5' (Yekta *et al.*, 2004). Esta complementariedad es la norma general en plantas, considerándose el corte de la diana el principal mecanismo de regulación por miRNAs en estos organismos (Llave *et al.*, 2002; Rhoades *et al.*, 2002). Sin embargo, en moscas y mamíferos, la mayoría de los miRNAs únicamente aparean con sus dianas a través de los nucleótidos 2-8 contados desde el extremo 5' del miRNA, lo que impide el corte endonucleolítico por Argonauta, ya que los nucleótidos 10 y 11 no se encuentran apareados. En este caso, los miRNAs se unen preferentemente a la región 3' no traducida (3'UTR) del mRNA diana, reprimiendo su traducción o dirigiendo la deadenilación y degradación de sus dianas (revisado en Filipowicz *et al.*, 2008). Los miRNAs controlan el proceso de desarrollo en plantas y animales, regulan la renovación de las células madre y están implicados en el cáncer, entre otros procesos.

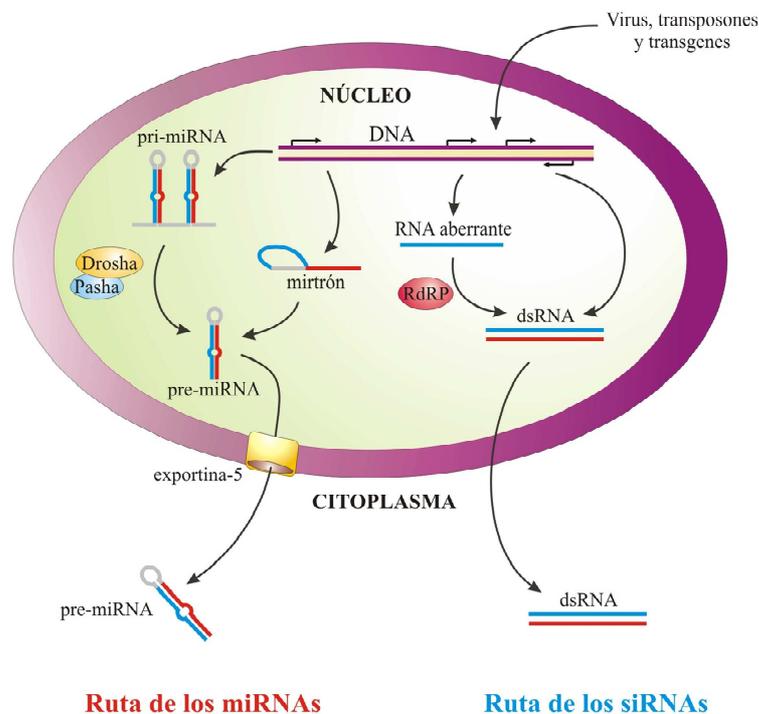


Figura 7. Biogénesis de los miRNAs y siRNAs (esquema basado en las rutas de silenciamiento de *D. melanogaster*). El procesamiento en el núcleo de los precursores de miRNAs (pri-miRNAs) se lleva a cabo por la RNasaIII Droscha. Los pre-miRNAs obtenidos son transportados al citoplasma por la proteína exportina-5, donde son procesados por Dicer en los miRNAs maduros (ver **Figura 2**). En este esquema sólo se considera la producción de siRNAs derivados de ácidos nucleicos exógenos.

Aunque inicialmente se consideró que los siRNAs sólo se generaban en respuesta a la invasión por ácidos nucleicos exógenos (**Figura 7**), los avances en las técnicas de secuenciación han permitido la identificación de **siRNAs endógenos (endo-siRNAs o esRNAs)**, implicados, entre otros procesos, en el silenciamiento de transposones y regiones con repeticiones. Su biogénesis comparte elementos de las rutas de los siRNAs y los miRNAs, hasta el punto de haber sido propuestos como intermediarios evolutivos entre ambos tipos de sRNAs (revisado en Siomi y Siomi, 2009). Los endo-siRNAs han sido detectados en levaduras, hongos filamentosos (discutidos en la **sección I.3.1**), algas, plantas y animales (revisado en Ghildiyal y Zamore, 2009; Drinnenberg *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Nicolás *et al.*, 2010). Derivan de moléculas de dsRNA precursoras que resultan de la transcripción de transposones adyacentes situados en orientaciones opuestas, regiones con transcripción convergente, zonas con transcripción bidireccional, pseudogenes que se transcriben en orientación contraria al gen codificante o *loci* que tienen estructuras cuya transcripción genera directamente una horquilla de dsRNA (**Figura 8**).

En plantas, se han identificado varias subfamilias de endo-siRNAs (revisado en Ghildiyal y Zamore, 2009): los **siRNAs de actuación en cis (casiRNAs)**, que dirigen la heterocromatinización de los *loci* con transposones y elementos repetidos de los que derivan, provocando la metilación del DNA y la modificación de histonas; los **siRNAs de actuación en trans (tasi-RNAs)**, que se originan a partir de transcritos no codificantes, cuyo corte inducido por miRNAs atrae a la RdRP, que genera un dsRNA que es procesado finalmente por Dicer; y los **siRNAs derivados de transcritos antisentido naturales (natsiRNAs)**, que se producen en situaciones de estrés mediante el procesamiento por Dicer de una región de dsRNA, originada en la zona de solapamiento de dos transcritos convergentes. Los distintos tipos de endo-siRNAs requieren para su biogénesis diferentes componentes de la maquinaria de silenciamiento (Dicer, Argonauta y RdRP). En *D. melanogaster* se han detectado endo-siRNAs en células de la línea somática y de la línea germinal (Czech *et al.*, 2008; Ghildiyal *et al.*, 2008), que pueden distinguirse de los miRNAs y otros pequeños RNAs por presentar casi siempre una longitud de 21 nt, encontrarse en orientación con sentido y antisentido, tener un extremo 3' modificado, no presentar tendencia a contener Uracilo en el extremo 5' y requerir la enzima Dicer para su biogénesis. Los endo-siRNAs también se han identificado en oocitos de ratón y, al igual que en *D. melanogaster*, se han relacionado con el silenciamiento de transposones (Watanabe *et al.*, 2006; Czech *et al.*, 2008; Ghildiyal *et al.*, 2008). Estos siRNAs son

generados a partir de dsRNAs derivados de transcritos complementarios que son procesados por Dicer, y no requieren la participación de enzimas RdRPs. En levaduras como *Saccharomyces castellii*, *Kluyveromyces polysporus* y *Candida albicans* también se han identificado endo-siRNAs correspondientes a secuencias repetidas y transposones, que derivan de transcritos solapantes y requieren para su biogénesis a las enzimas Dicer y Argonauta (Drinnenberg *et al.*, 2009). El catálogo de endo-siRNAs continúa aumentando cada año, revelando nuevas rutas de biogénesis y poniendo de manifiesto la relevancia de estas moléculas reguladoras en el control de la expresión génica (Okamura, 2012).

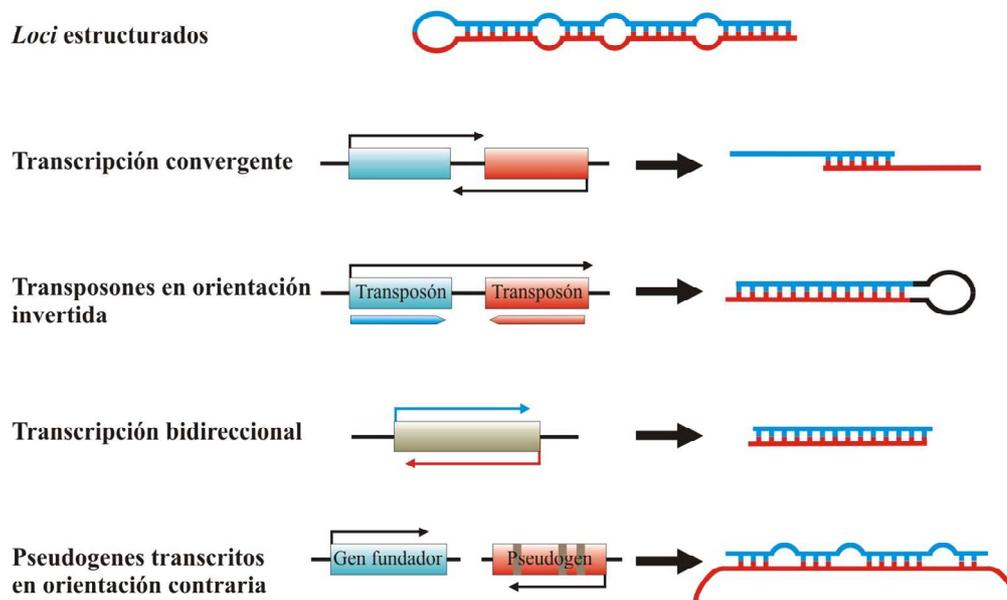


Figura 8. Mecanismos de generación de moléculas de dsRNA inductoras de la ruta de los endo-siRNAs (basado en Ghildiyal y Zamore, 2009). Los rectángulos marrones en el pseudogen indican regiones que presentan variaciones respecto a la secuencia del gen fundador.

La tercera clase de sRNAs, los piRNAs, se ha identificado exclusivamente en la línea germinal de *C. elegans*, *D. melanogaster*, peces y mamíferos, donde participan en el silenciamiento de transposones y elementos repetitivos (Ishizu *et al.*, 2012). Su característica principal es que no tienen como precursores moléculas de dsRNA, por lo que las enzimas Dicer no están implicadas en su biogénesis. El nombre piRNA deriva de la capacidad de estas moléculas para unirse a una subfamilia de proteínas Argonauta, filogenéticamente relacionadas, denominada PIWI. Los piRNAs poseen un tamaño ligeramente superior al de los miRNAs (~24-31 nt), tienden a presentar Uridina en su extremo 5' y están modificados en el extremo 3' por la introducción de un grupo metilo

(2'-O-metilo). Los estudios en moscas sugieren que los piRNAs provienen de RNAs de cadena sencilla y de gran longitud. Actualmente, el modelo que explica su biogénesis, denominado “amplificación ping-pong” (**Figura 9**), supone que proteínas de la familia Piwi unirían piRNAs antisentido, que las guiarían hasta los mRNAs de los transposones. La actividad catalítica de estas proteínas cortarían el mRNA entre los nucleótidos apareados con los nucleótidos 10 y 11 del piRNA, contados desde el extremo 5'. El fragmento 3' del mRNA cortado se uniría, a través de su extremo 5', a una proteína diferente de la familia Piwi, guiando el corte de una molécula de RNA antisentido generada a partir de la transcripción antisentido del transposón (revisado en Ghildiyal y Zamore, 2009). Así, en este ciclo de amplificación, los transcritos de los transposones serían al mismo tiempo iniciadores y dianas del mecanismo. Entre los aspectos no resueltos del modelo se encuentran la generación de los extremos 3' de los piRNAs y el reconocimiento de su orientación por parte de distintas proteínas de la familia Piwi, aunque recientemente se ha sugerido que exonucleasas similares a la proteína QIP (superfamilia DEDDh) podrían estar implicadas en la formación del extremo 3' de los piRNAs (Xue *et al.*, 2012).

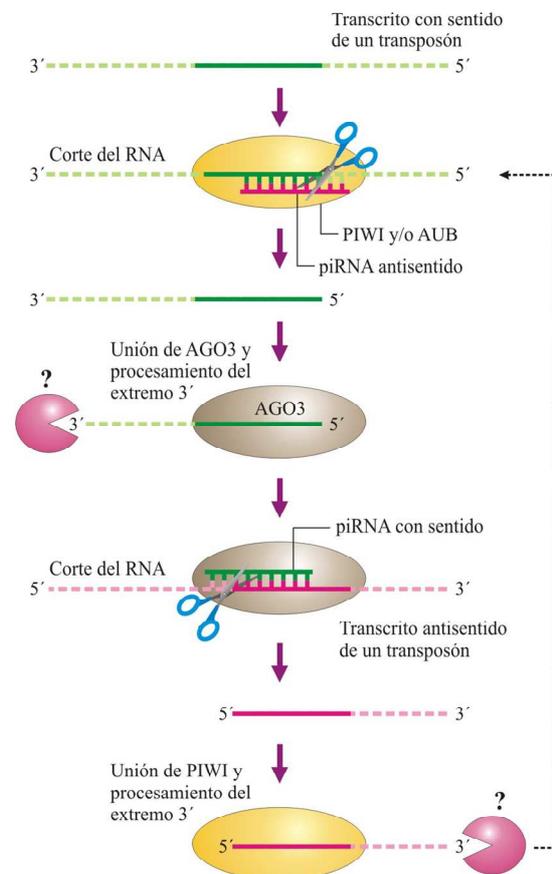


Figura 9. Modelo ping-pong para la amplificación de los piRNAs (basado en Jinek y Doudna, 2009). Piwi, AUB (Aubergine) y AGO3 son distintas proteínas de la familia PIWI.

I. 3. 1. Pequeños RNAs endógenos en hongos filamentosos.

El papel fundamental del silenciamiento génico mediado por RNA en la defensa del genoma frente a la invasión por ácidos nucleicos exógenos también se ha demostrado en hongos filamentosos (Nicolás y Ruiz-Vázquez, 2013). Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de transgenes, transposones o virus induce la producción de siRNAs en los hongos *N. crassa*, *M. circinelloides* y *C. parasitica*, entre otros (Catalanotto *et al.*, 2002, Nicolás *et al.*, 2003, Nolan *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2008). También se han identificado en *N. crassa* y *Gibberella zeae* siRNAs asociados al mecanismo de MSUD (masiRNAs), que protegen al genoma durante la reproducción sexual de los problemas que podrían representar segmentos no apareados de DNA, tales como virus o transposones en movimiento (Shiu *et al.*, 2001; Son *et al.*, 2011). Finalmente, los siRNAs inducidos por el sexo en *C. neoformans* (SIS-siRNAs) han demostrado ser esenciales para reducir la actividad de los transposones durante el ciclo sexual, protegiendo de esta manera el genoma de la descendencia (Wang *et al.*, 2010).

Pero además de estos siRNAs producidos en respuestas a ácidos nucleicos exógenos, las nuevas técnicas de secuenciación han permitido poner de manifiesto la existencia de diversos tipos de siRNAs endógenos en hongos filamentosos (denominados aquí esRNAs) (Nicolás y Ruiz-Vázquez, 2013). Como ocurre en los eucariotas superiores, y a diferencia de los siRNAs producidos en respuesta a virus y otros ácidos nucleicos exógenos, los esRNAs derivan de secuencias endógenas. Estos esRNAs son producidos mediante distintas rutas de biogénesis, en las que participan los distintos componentes del mecanismo canónico de silenciamiento. La mayoría de los esRNAs proceden de precursores de dsRNA que son directamente transcritos del genoma o generados por la acción de enzimas RdRPs. Estos dsRNAs son normalmente procesados por miembros de la familia Dicer y finalmente incorporados en complejos portadores de proteínas Argonata, donde actúan para regular la expresión de genes endógenos.

Durante mucho tiempo se consideró que los miRNAs estaban ausentes en hongos. Sin embargo, en 2010 se identificaron en *N. crassa* al menos 25 loci, correspondientes a regiones intergénicas, que producen **miRNA-like sRNAs (milRNAs)** (Lee *et al.*, 2010). Estos milRNAs fueron aislados tras la secuenciación y caracterización de los esRNAs asociados a la proteína QDE-2 (Argonata) de *N. crassa*. Se denominaron así por presentar similitudes con los miRNAs convencionales de animales y plantas, tales como derivar de precursores capaces de adoptar estructuras en horquillas bicatenarias. Existen evidencias

que sugieren que estos milRNAs podrían regular la expresión génica en *Neurospora* de forma similar a los miRNAs de animales y plantas. Sin embargo, estos milRNAs parecen no cumplir un papel importante en el crecimiento y desarrollo de *N. crassa*, ya que los mutantes afectados en la producción de los milRNAs no muestran ningún fenotipo en condiciones de crecimiento en laboratorio. Se requiere, pues, un estudio más exhaustivo para establecer la función fisiológica que desempeñan. Más recientemente, se han identificado algunos miRNAs en otros hongos, como *C. neoformans* (Jiang *et al.*, 2012), donde se ha sugerido que podrían estar implicados en la regulación de la actividad de los transposones y la expresión de pseudogenes, en el patógeno de plantas *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhou *et al.*, 2012) y en el patógeno humano *Penicillium marneffei* (Lau *et al.*, 2013), donde regulan la expresión de genes diana de función desconocida. Hasta la fecha, el posible papel fisiológico de los miRNAs en hongos filamentosos está por determinar, fundamentalmente por la falta de fenotipos de los mutantes afectados en genes necesarios para su biogénesis.

A diferencia de lo que ocurre en animales y plantas, la biogénesis de los milRNAs en *N. crassa* tiene lugar al menos mediante cuatro rutas diferentes, que utilizan diferentes combinaciones de proteínas de silenciamiento: DCL-1, DCL-2, QDE-2, QIP y MRPL3, una proteína que posee un dominio RNasa III (Lee *et al.*, 2010). La producción de milR-1, la clase mayoritaria de milRNAs en *N. crassa*, requiere la intervención de las proteínas Dicer, QDE-2 (pero no su actividad catalítica) y la exonucleasa QIP. A diferencia de éste, milR-2 es completamente independiente de Dicer, pero requiere una proteína QDE-2 catalíticamente activa. Al igual que ocurre con milR-2, la biogénesis de miR-451 de ratón y pez cebra es independiente de Dicer pero dependiente de Argonauta (Cheloufi *et al.*, 2010; Cifuentes *et al.*, 2010). La biogénesis de milR-3 requiere únicamente la participación de las proteínas Dicer, al igual que ocurre en plantas. La última clase, milR-4, es parcialmente dependiente de Dicer, lo que sugiere la intervención de otras nucleasas en el proceso. La reconstitución *in vitro* de la biogénesis de milR-1 ha revelado el papel del exosoma, un complejo con actividad exonucleasa 3'-5', y de la proteína QIP en la determinación del tamaño del milR-1 maduro, poniendo de manifiesto la importancia del exosoma en el procesamiento de los esRNAs (Xue *et al.*, 2012). Al contrario de lo que ocurre en plantas y animales, donde los miRNAs son mayoritariamente producidos por la RNA polimerasa II (RNA Pol II), los cuatro tipos principales de milRNA en *N. crassa* son transcritos por la RNA polimerasa III, aunque la RNA Pol II se ha encontrado asociada con

algunos loci milR, sugiriendo una colaboración entre las dos polimerasas en la producción de los milRNAs (Yang *et al.*, 2013).

Los **sRNAs que interactúan con QDE-2 (qiRNAs)** (Lee *et al.*, 2009), son un tipo especial de esRNAs, identificados en *N. crassa*, que son generados en respuesta a daños en el DNA. Los qiRNAs se originan, principalmente, a partir del DNA ribosomal (rDNA), la única región altamente repetitiva en el genoma de *Neurospora*, y podrían actuar manteniendo la integridad de esta región genómica, evitando, de alguna forma, la recombinación entre las repeticiones (Cecere y Cogoni, 2009). Los qiRNAs presentan una longitud de ~21–23 nt y generalmente contienen una Uridina en su extremo 5' (revisado en Chang *et al.*, 2012). La producción de los qiRNAs requiere de las proteínas Dicer, QDE-1 (RdRP), QDE-2 (Argonauta) y la helicasa QDE-3, indicando que estos esRNAs son generados por la maquinaria de silenciamiento a partir de RNAs aberrantes, tras un daño en el DNA (Lee *et al.*, 2009). Recientemente, se ha descubierto que para la producción de qiRNAs se requieren también factores que participan directamente en la recombinación homóloga y factores remodeladores de la cromatina (Zhang *et al.*, 2013). Ello ha permitido proponer un modelo para la producción de qiRNAs a partir de secuencias repetidas de rDNA, en respuesta a daños en el DNA (ver **Figura 3, derecha**). En este modelo, *N. crassa* utilizaría la recombinación homóloga, activada por el daño en el DNA, para identificar loci de DNA repetido, fundamentalmente, loci de rDNA. En estos loci se generarían estructuras aberrantes de intermediarios de recombinación, que serían reconocidas por las proteínas QDE-3 y QDE-1 para producir, en primer lugar, RNAs aberrantes a partir de regiones de DNA de cadena sencilla y convertirlos, posteriormente, en dsRNAs (Zhang *et al.*, 2013). Dado que el mecanismo de “quelling” también requiere la recombinación homóloga e implica repeticiones de los transgenes, se ha sugerido que el “quelling” y la producción de qiRNAs comparten un mecanismo común.

M. oryzae es un organismo modelo para el estudio de las interacciones patógeno-hospedador, siendo el principal patógeno de arroz y trigo. Recientemente, se ha descrito en este hongo filamentoso una gran variedad de esRNAs que corresponden a loci de tRNA, rRNA, regiones codificantes, elementos repetitivos y regiones intergénicas, aunque no se han identificado milRNAs (Nunes *et al.*, 2011). Estos esRNAs exhiben diferentes patrones de acumulación en el micelio vegetativo y en las estructuras infectivas. En el micelio vegetativo, los esRNAs provienen principalmente de regiones intergénicas y elementos repetitivos. Sin embargo, en la estructura denominada apresorio, una hifa especializada

implicada en la infección de la célula de la planta, hay un mayor enriquecimiento de esRNAs derivados de loci de tRNAs. Esta acumulación diferencial en diferentes tejidos sugiere una participación de los esRNAs en la regulación del crecimiento y el desarrollo de este patógeno. Así mismo, se ha observado una alteración en los perfiles de esRNAs acumulados en *M. oryzae* en respuesta a distintas condiciones de estrés y durante la infección de la planta. Ello ha permitido la identificación de un reducido grupo de genes regulados por esRNAs en respuesta a distintas situaciones fisiológicas, uno de los cuales podría estar implicado en patogénesis (Raman *et al.*, 2013). También en el hongo del suelo *Trichoderma atroviride*, usado como agente de biocontrol, se han identificado esRNAs que podrían estar implicados en el control del crecimiento vegetativo y el desarrollo (Carreras-Villaseñor *et al.*, 2013). Todo ello pone de manifiesto que, más allá de la protección del genoma, la maquinaria de silenciamiento juega un papel central en la regulación de procesos endógenos en hongos filamentosos.

I. 3. 2. Pequeños RNAs endógenos en *M. circinelloides*.

Las nuevas tecnologías de secuenciación, junto con el conocimiento cada vez mayor de la relevancia funcional de los esRNAs como riboreguladores, llevaron hace unos años a nuestro grupo de investigación a abordar la identificación y caracterización de los esRNAs en *M. circinelloides*. Al contrario de lo que ocurre en *N. crassa*, los mutantes afectados en genes de la maquinaria de silenciamiento muestran alteraciones en procesos de crecimiento y desarrollo, lo que apuntaba a un papel del mecanismo de silenciamiento en la regulación de funciones endógenas. Para alcanzar ese objetivo, se llevó a cabo la secuenciación masiva de los pequeños RNAs acumulados endógenamente en la estirpe silvestre de *Mucor* y en mutantes afectados en los genes *dcl-1*, *dcl-2*, *rdrp-1* y *rdrp-2* (Nicolás *et al.*, 2010). El análisis de las secuencias obtenidas permitió identificar 980 loci productores de esRNA, distribuidos por todo el genoma y correspondientes a secuencias repetidas y transposones, regiones intergénicas y exones. Sorprendentemente, los **esRNAs que derivan de exones (ex-siRNAs)**, fueron los más abundantes (Nicolás *et al.*, 2010), lo que contrastaba con lo descrito hasta ese momento en otros hongos como *S. pombe*, en el que los endo-siRNAs corresponden a repeticiones centroméricas y dirigen la formación de heterocromatina (Grewal y Jia, 2007) y los ya mencionados *S. castelli* y *C. albicans*, donde la mayoría de endo-siRNAs son producidos a partir de secuencias repetidas y transposones (Drinnenberg *et al.*, 2009). A pesar de la redundancia parcial de las proteínas Dcl-1 y Dcl-2

en la ruta de silenciamiento, los datos de secuenciación indicaron que Dcl-2 es la principal proteína Dicer implicada en la producción de todos los tipos de esRNAs en *M. circinelloides*, ya que 828 de los 980 loci productores de esRNAs dependen exclusivamente de la proteína Dcl-2 para su biogénesis. Aunque un número significativo de esRNAs derivan de regiones intergénicas e intrones y son, por tanto, candidatas para producir miRNAs, el análisis de esas regiones puso de manifiesto que no presentaban la característica estructura en horquilla bicatenaria típica de los loci de miRNA, indicando que, al menos en las condiciones estudiadas, *M. circinelloides* no produce miRNAs (Nicolas *et al.*, 2010). La aparente ausencia de miRNAs en este hongo basal y la presencia de esRNAs derivados de transposones y secuencias repetidas en hongos basales, plantas y animales sugiere que la evolución seleccionó los esRNAs para silenciar transposones y que, posteriormente, cada rama de la vida ha utilizado esta maquinaria para silenciar otras dianas.

Los ex-siRNAs de *M. circinelloides* fueron los primeros esRNAs identificados en hongos que regulan la expresión de genes que cifran proteínas mediante la represión de los correspondientes mRNAs. El análisis llevado a cabo en *M. circinelloides* identificó 324 loci productores de ex-siRNAs que corresponden a 276 genes, ya que algunos genes contienen más de un exón productor de ex-siRNAs. Estos ex-siRNAs son funcionales, ya que regulan la expresión de los genes a partir de los que se han producido, dirigiendo la degradación de los mRNA correspondientes. Ello se demuestra por el aumento en la acumulación de mRNA de los genes diana en mutantes incapaces de producir el correspondiente ex-siRNA. La regulación de la expresión génica mediada por ex-siRNAs se lleva a cabo a través del mecanismo de silenciamiento génico, pues estas moléculas precisan de la maquinaria de silenciamiento para su producción (Nicolas *et al.*, 2010).

Los ex-siRNAs se pueden clasificar en cuatro clases atendiendo a sus características estructurales y las proteínas de la maquinaria de silenciamiento requeridas para su biogénesis (**Tabla 1**). Las clases I y II corresponden a aquellos ex-siRNAs que dependen de Dcl-2, pero no Dcl-1, para su producción. Presentan un tamaño definido de 23-24 nt y muestran una fuerte preferencia por Uracilo en la primera posición de la molécula, preferencia compartida por las cadenas guía de los sRNAs unidos a Argonauta en animales, plantas y otros hongos. Los ex-siRNAs pertenecientes a la **clase II** muestran, además, niveles reducidos de acumulación en el mutante *rdrp-1*, indicando que requieren esta proteína para su biogénesis, aunque la mayoría de ellos no requiere la participación de

Clase	Nº de exones	Dependiente de				ex-siRNA (%)	5' U (%)
		<i>dcl-1</i>	<i>dcl-2</i>	<i>rdrp-1</i>	<i>rdrp-2</i>		
I	9	-	+	-	+	13.42	92.18
II	222	-	+	+	-	58.74	92.12
III	88	+	+	+	+	27.36	8.39
IV	5	+	-	+	+	0.48	28.28

Tabla 1. Características de las cuatro clases de ex-siRNAs. Se indica el número de exones pertenecientes a cada clase y los genes necesarios para su biogénesis (marcados con un signo +). El porcentaje de ex-siRNAs se refiere al porcentaje de lecturas redundantes correspondientes a cada clase de ex-siRNA. Se muestra también el porcentaje de lecturas redundantes que presentan Uracilo en el extremo 5' terminal de la molécula (5' U).

RdRP-2. Esta es la clase más numerosa, que incluye ex-siRNAs derivados de 222 exones. La participación de RdRP-1 y Dcl-2 en la biogénesis de esta clase de ex-siRNAs sugiere que el mRNA derivado de estos loci es convertido en dsRNA por la proteína RdRP-1 y posteriormente procesado por Dcl-2. La participación de estas dos proteínas en la biogénesis de la clase mayoritaria de ex-siRNAs puede extenderse a los esRNAs derivados de transposones y regiones intergénicas, ya que la mayoría de los esRNAs dependientes de Dcl-2 generados a partir de estos loci también requieren RdRP-1 (Nicolás *et al.*, 2010) (**Figura 10**).

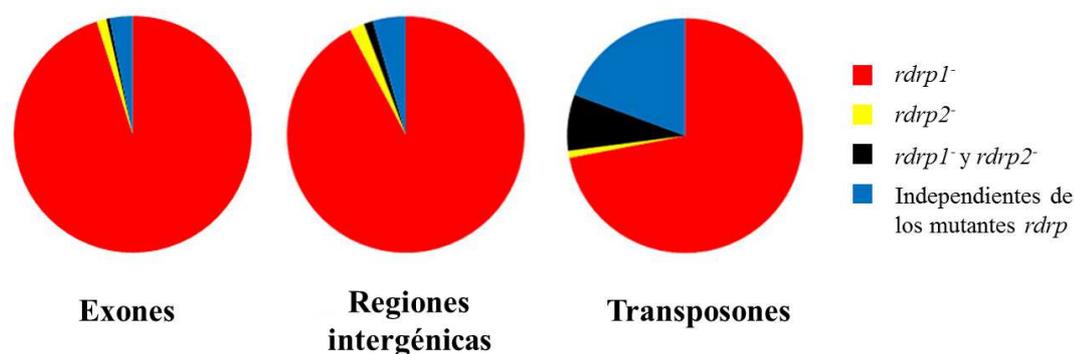


Figura 10. Proporción de loci de esRNAs dependientes de *dcl-2* que requieren además a las proteínas RdRPs para su biogénesis.

Sólo un pequeño grupo de ex-siRNAs dependientes de Dcl-2 para su biogénesis no requiere RdRP-1 para su producción, aunque la mayoría de ellos requieren RdRP-2. Estos ex-siRNAs constituyen la **clase I** (nueve exones) y son los que muestran niveles más bajos de acumulación en el mutante *dcl-2*⁻, sugiriendo un papel importante en la regulación de los mRNA dianas. Se ha realizado un análisis *in silico* de las funciones biológicas de los genes presumiblemente regulados por las clases I y II de ex-siRNAs. Sin embargo, el elevado número de genes que disminuyen los niveles de ex-siRNAs en el mutante *dcl-2*⁻ ha dificultado la identificación de aquellos que podrían ser responsables del fenotipo de dicho mutante. No obstante, es importante señalar que, aunque la mayoría de los ex-siRNAs de estas clases corresponden a genes de función desconocida, muchos de ellos cifran proteínas implicadas en la transducción de señales y en el almacenamiento y procesamiento de la información genética, lo que podría indicar la implicación de estos ex-siRNAs en la regulación de diferentes procesos celulares (Nicolás *et al.*, 2010; nuestros resultados no publicados) (**Figura 11A**).

La **clase III** (88 exones) corresponde a aquellos ex-siRNAs que ven reducida su acumulación en el doble mutante *dcl-1*⁻/*dcl-2*⁻, indicando que pueden ser producidos por cualquiera de las dos proteínas Dicer (**Tabla 1**). Además, ambas proteínas RdRPs, RdRP-1 y RdRP-2, participan en la biogénesis de estos ex-siRNAs, ya que la acumulación de estas moléculas se reduce en ausencia de cualquiera de los dos genes *rdrp*. Además de requerir una combinación distinta de proteínas de la maquinaria de silenciamiento para su biogénesis, los ex-siRNAs de la clase III muestran características estructurales diferenciales respecto a las clases I y II. Así, estos ex-siRNAs muestran una amplia distribución de tamaños y no presentan una preferencia por Uracilo en la posición 5' de la molécula. Además, prácticamente la totalidad de los ex-siRNAs de esta clase tienen la misma orientación del mensajero, como cabría esperar de un proceso de degradación, lo que ha llevado a sugerir que no son generados por una ruta canónica de silenciamiento (Nicolás *et al.*, 2010). En un posible modelo, la actividad secuencial o combinada de las dos RdRPs generaría pequeños tramos de dsRNA a lo largo del mRNA diana. Estas regiones discretas de dsRNA serían procesadas por Dcl-1 o Dcl-2 y, después de este corte inicial, las porciones de cadena sencilla del mRNA, que habrían perdido la caperuza 5' y/o la cola de polyA, serían degradadas por una RNasa aún no identificada. De hecho, la relación entre los mecanismos que controlan la calidad de los mRNAs (exosoma) y la maquinaria de RNAi es cada vez más evidente (Yamanaka *et al.*, 2013). Otra de las

características diferenciales de los ex-siRNAs de la clase III es que los genes de los que derivan suelen estar altamente expresados en las condiciones estándar de crecimiento en el laboratorio. La mayoría de estos genes están relacionados con actividades metabólicas y con procesos celulares básicos, como adhesión, transporte y señalización (**Figura 11B**).

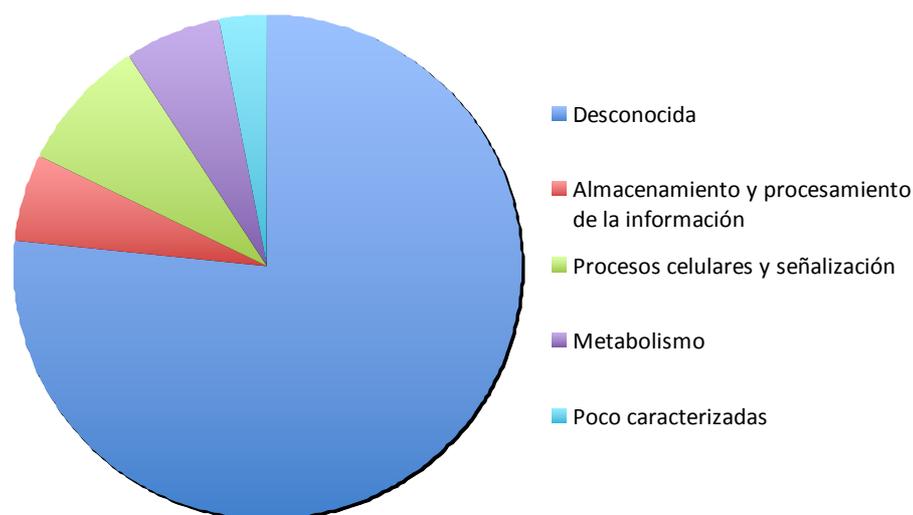
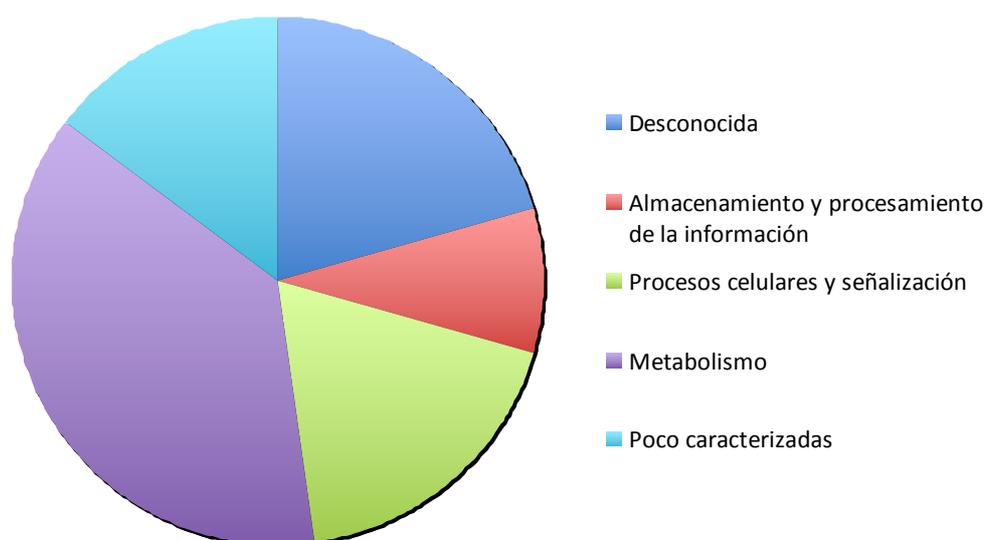
A**B**

Figura 11. Funciones biológicas de los genes regulados por las diferentes clases de ex-siRNAs. (A) Anotación funcional de los genes de las clases I y II de ex-siRNAs. (B) Anotación funcional de los genes de la clase III. Los ex-siRNAs se asignaron a distintas categorías funcionales según la base de datos KOG (EuKaryotic Orthologous Groups).

Finalmente, la **clase IV** corresponde a un pequeño grupo de ex-siRNAs (cinco exones) que requieren Dcl-1, pero no Dcl-2, y las dos RdRPs para su biogénesis (**Tabla 1**). Uno de los exones incluidos en esta clase cifra una proteína conservada en otros hongos, como las levaduras, que co-localiza en sitios de crecimiento polarizado. Esto, junto con el hecho de que otros exones cifran proteínas implicadas en el metabolismo mitocondrial y en la función ribosomal, podría explicar el fenotipo del mutante *dcl-1*, que muestra anomalías en la morfología de las hifas y una disminución en la tasa de crecimiento (Nicolás *et al.*, 2010). Sin embargo, con la excepción de este pequeño grupo de ex-siRNAs, es difícil determinar el papel biológico del mecanismo de silenciamiento en *M. circinelloides*, fundamentalmente debido al gran número de genes presumiblemente regulados. No obstante, dadas las alteraciones fenotípicas que muestran los mutantes afectados en la maquinaria de silenciamiento, es factible suponer que los ex-siRNAs podrían estar implicados en la regulación de diferentes y significativos procesos celulares.

I. 4. Objetivos de este trabajo.

Como se ha comentado anteriormente, nuestro grupo de investigación ha estudiado en profundidad el mecanismo de silenciamiento génico en *M. circinelloides*, identificando muchos de los genes involucrados en la ruta. Entre ellos, los genes *dcl-2* (De Haro *et al.*, 2009), *ago-1* (Cervantes *et al.*, 2013), *rdrp-1* y *rdrp-2* (Calo *et al.*, 2012) son los que desempeñan un papel fundamental en la ruta canónica de silenciamiento inducida por transgenes. Sin embargo, el conocimiento de esta ruta no es completo, quedando algunos aspectos por dilucidar, como el mecanismo que elimina la cadena pasajera de los siRNAs, las posibles interacciones entre proteínas de diversas familias génicas o la posible redundancia funcional entre los genes *rdrp*. Por otro lado, el hecho de que mutantes en algunos de los genes de silenciamiento presenten cambios fenotípicos respecto a la estirpe silvestre hizo sospechar que la maquinaria de silenciamiento génico podría participar en la regulación de diversos procesos celulares endógenos. La identificación en *M. circinelloides* de diversos tipos de sRNAs endógenos que derivan de exones (ex-siRNAs) y que regulan la expresión de sus genes diana (Nicolás *et al.*, 2010) confirmó estas sospechas. Sin embargo, no se tienen datos sobre la participación de proteínas Argonauta en la producción de los diversos tipos de ex-siRNAs, ni se dispone de una visión completa de cuáles son los genes regulados directa- o indirectamente por la maquinaria de silenciamiento y de las posibles funciones alteradas en los mutantes de silenciamiento.

Con estos antecedentes, los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Profundizar en la caracterización de la ruta de silenciamiento génico de *M. circinelloides*, identificando el gen implicado en la eliminación de la cadena pasajera de los siRNAs, estudiando la existencia de interacciones entre las proteínas de la maquinaria de silenciamiento, y comprobando la posible redundancia funcional entre los genes *rdrp-1* y *rdrp-2*.
2. Analizar la participación de Ago-1 en la biogénesis de los distintos tipos de ex-siRNAs de *M. circinelloides*.
3. Determinar los perfiles transcriptómicos de la estirpe silvestre y de mutantes en genes de silenciamiento, para identificar genes regulados por la maquinaria de silenciamiento.
4. Realizar la caracterización fenotípica detallada de los mutantes afectados en la ruta de silenciamiento, para identificar los procesos celulares regulados mediante dicho mecanismo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. 1. Estirpes y plásmidos utilizados.

Las estirpes de *M. circinelloides* utilizadas en este trabajo se muestran en la **Tabla 2**. Todas las estirpes con el prefijo MU han sido obtenidas en la Universidad de Murcia y derivan de la estirpe R7B, silvestre para la carotenogénesis y auxótrofa para la leucina, obtenida mediante mutagénesis química a partir de la estirpe silvestre de sexo (-) CBS 277.49 (*Mucor racemosus* ATCC 1216b; Schipper, 1976).

Estirpes	Genotipo	Fenotipo	Origen o referencia
R7B	<i>leuA⁻</i> , sexo (-)	LeuA ⁻ , Ura ⁺	Roncero, 1984
NRL3631	silvestre, sexo (+)	silvestre	Díaz-Mínguez <i>et al.</i> , 1999
MU241	<i>leuA⁺</i>	LeuA ⁺ , Ura ⁺	Silva <i>et al.</i> , 2006
MU402	<i>leuA⁻ pyrG⁻</i>	LeuA ⁻ , Ura ⁻	Nicolás <i>et al.</i> , 2007
MU406	<i>leuA⁻ dcl-1::pyrG</i>	LeuA ⁻ , Ura ⁺	Nicolás <i>et al.</i> , 2007
MU410	<i>leuA⁻ dcl-2::pyrG</i>	LeuA ⁻ , Ura ⁺	De Haro <i>et al.</i> , 2009
MU411	<i>dcl-1::leuA, dcl-2::pyrG</i>	LeuA ⁺ , Ura ⁺	De Haro <i>et al.</i> , 2009
MU412	<i>leuA⁻ r2d2::pyrG</i>	LeuA ⁻ , Ura ⁺	Calo, 2010
MU413	<i>leuA⁻ ago-1::pyrG</i>	LeuA ⁻ , Ura ⁺	Cervantes <i>et al.</i> , 2013
MU414	<i>leuA⁻ ago-3::pyrG</i>	LeuA ⁻ , Ura ⁺	Cervantes <i>et al.</i> , 2013
MU416	<i>leuA⁻ ago-2::pyrG</i>	LeuA ⁻ , Ura ⁺	Cervantes <i>et al.</i> , 2013
MU419	<i>leuA⁻ rdrp-1::pyrG</i>	LeuA ⁻ , Ura ⁺	Calo <i>et al.</i> , 2012
MU420	<i>leuA⁻ rdrp-2::pyrG</i>	LeuA ⁻ , Ura ⁺	Calo <i>et al.</i> , 2012
MU430	<i>leuA⁻ qip::pyrG</i>	LeuA ⁻ , Ura ⁺	Este trabajo
MU431	<i>rdrp-1::leuA, rdrp-2::pyrG</i>	LeuA ⁺ , Ura ⁺	Este trabajo

Tabla 2. Estirpes de *M. circinelloides* utilizadas en este trabajo. Se indica el fenotipo para los marcadores utilizados en los experimentos de transformación.

La estirpe MU241 se generó por sustitución del gen *leuA* mutado de la estirpe R7B por una copia silvestre de dicho gen. La estirpe MU402 se generó por mutagénesis química a partir de la estirpe R7B. La estirpe MU406 se generó mediante sustitución del

gen *dcl-1* de la estirpe MU402 por una copia silvestre del gen *pyrG* de *M. circinelloides*. La estirpe MU410 se generó por sustitución del gen *dcl-2* de la estirpe MU402 por una copia silvestre del gen *pyrG*. La estirpe MU411 se generó por sustitución del gen *dcl-1* de la estirpe MU410 por una copia silvestre del gen *leuA* de *M. circinelloides*. La estirpe MU412 se generó por sustitución del gen *r2d2* por una copia silvestre del gen *pyrG*. Para la generación de las estirpes MU413, MU414 y MU416 se sustituyeron los genes *ago-1*, *ago-3* y *ago-2*, respectivamente, por una copia silvestre del gen *pyrG*. La estirpe MU419 se generó mediante sustitución del gen *rdrp-1* por una copia silvestre del gen *pyrG*. La estirpe MU420 se generó por sustitución del gen *rdrp-2* por una copia silvestre del gen *pyrG*.

En la **Tabla 3** se muestran las estirpes de *Escherichia coli* y *S. cerevisiae* utilizadas, su genotipo y el origen o referencia.

Estirpes	Genotipo	Origen o referencia
DH5α	F ⁻ , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>lacZ</i> , λ ⁻	Hanahan, 1983
PJ69-4a	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112 ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1-His3</i> , <i>GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
PJ69-4α	<i>MATα</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112 ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1-His3</i> , <i>GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996

Tabla 3. Estirpes de *E. coli* y *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

La estirpe DH5α se utilizó en los experimentos de clonación de plásmidos bacterianos. Entre sus características más significativas destacan: i) que no permite la recombinación debido a la mutación *recA*⁻, lo que favorece la estabilidad de los plásmidos; ii) que porta una mutación *lacZ* que puede ser complementada por una amplia variedad de plásmidos utilizados habitualmente y iii) que puede mantenerse congelada en estado competente durante largos periodos de tiempo.

Las estirpes PJ69-4a y PJ69-4α de *S. cerevisiae* se utilizaron en la búsqueda de interacciones entre proteínas del mecanismo de silenciamiento génico, mediante el ensayo del doble híbrido de levaduras. Estas estirpes presentan tres marcadores de auxotrofia (*trp*⁻, *leu*⁻ y *ura*⁻), que pueden complementarse con plásmidos portadores de los alelos silvestres correspondientes, y tres genes chivatos para detectar interacción (*his3*, *ade2* y *lacZ*).

En la **Tabla 4** se presentan los plásmidos empleados en este trabajo, indicando su procedencia y sus características más sobresalientes.

Plásmidos	Características	Origen o referencia
pGEM-T Easy	Amp ^R (Clonación productos de PCR)	Promega
pBluescript II SK +/-	Amp ^R	Stratagene
pLeu4	Amp ^R , <i>leuA</i>	Roncero <i>et al.</i> , 1989
pEPM1	Amp ^R , <i>pyrG</i>	Benito <i>et al.</i> , 1992
pUC18	Amp ^R	Yanisch- Perron <i>et al.</i> , 1985
pAD-GAL4-2.1	Amp ^R , <i>leu2</i> (Sistema Doble Híbrido de Levaduras)	Stratagene
pBD-GAL4 Cam	Cam ^R , <i>trp1</i> (Sistema Doble Híbrido de Levaduras)	Stratagene
pMAT647	Amp ^R , <i>carB</i> , <i>leuA</i> (gen <i>carB</i> completo)	Nicolás <i>et al.</i> , 2003
pMAT651	Amp ^R , <i>carB</i> (ribosonda específica de RNA con sentido)	Nicolás <i>et al.</i> , 2003
pMAT652	Amp ^R , <i>carB</i> (ribosonda específica de RNA antisentido)	Nicolás <i>et al.</i> , 2003
pMAT1253	Amp ^R , <i>carB</i> , <i>leuA</i> (repeticiones invertidas del gen <i>carB</i>)	Calo <i>et al.</i> , 2012
pMAT1269	Amp ^R , <i>rdp-1</i> (contiene el gen <i>rdp-1</i> completo)	Calo <i>et al.</i> , 2012
pMAT1279	Amp ^R , <i>carB</i> , <i>leuA</i> (fragmento de 1,5 kb del gen <i>carB</i> bajo el control de un promotor constitutivo)	Calo <i>et al.</i> , 2012
pMAT1287	Cam ^R , <i>trp1</i> , <i>dcl-2</i> en pBD-GAL4 (en fase)	Este laboratorio
pMAT1288	Cam ^R , <i>trp1</i> , <i>dcl-1</i> en pBD-GAL4 (en fase)	Este laboratorio
pMAT1332	Amp ^R , <i>leu2</i> , <i>ago-1</i> en pAD-GAL4 (en fase)	Este laboratorio
pMAT1501	Amp ^R , <i>qip</i> (contiene el gen <i>qip</i> completo y secuencias adyacentes.)	Este trabajo
pMAT1502	Amp ^R , <i>qip::pyrG</i> (disrupción del gen <i>qip</i> .)	“
pMAT1504	Amp ^R , cDNA completo <i>qip</i> con una mutación.	“
pMAT1505	Amp ^R , cDNA completo <i>qip</i> con 4 mutaciones.	“
pMAT1508	Cam ^R , <i>trp1</i> , <i>qip</i> (una mutación) en pBD-GAL4 (en fase)	“
pMAT1509	Cam ^R , <i>trp1</i> , <i>qip</i> (4 mutaciones) en pBD-GAL4 (en fase)	“
pMAT1510	Amp ^R , cDNA completo <i>qip</i>	“
pMAT1511	Cam ^R , <i>trp1</i> , <i>qip</i> en pBD-GAL4 (en fase)	“
pMAT1513	Amp ^R , <i>rdp-1::leuA</i> (disrupción del gen <i>rdp-1</i> para obtención del doble mutante <i>rdp-1'2</i> .)	“

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.

II. 2. Medios y condiciones de crecimiento.

II. 2. 1. *Escherichia coli*.

E. coli se cultivó a 37°C con agitación en medio nutritivo Luria (LB) (Miller, 1972). Antes de esterilizar el medio en el autoclave, el pH fue ajustado a 7,2-7,4. Para medios sólidos se añadió 15 g/l de agar. Cuando fue necesario, tras autoclavar, se añadió el antibiótico ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

II. 2. 2. *Saccharomyces cerevisiae*.

S. cerevisiae se cultivó a 30°C con agitación en medio nutritivo YPAD o en medio mínimo SD (Synthetic Defined). Para los experimentos de transformación se preparó el medio SD en el que se eliminaron varios de los componentes específicos: Triptófano (-W), Leucina (-L), Histidina (-H) y Adenina (-A). Siempre que se eliminó la Histidina del medio, se añadió 2.5 mM de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) (antimetabolito de la histidina), ya que el gen *his3* presenta una débil expresión basal en la estirpe PJ69-4, lo que puede permitir un ligero crecimiento de la levadura que se ve reducido por la presencia del aminotriazol. La mezcla de aminoácidos se esterilizó por filtración y se añadió al medio autoclavado. Para medios sólidos se añadieron 20 g/l de agar.

II. 2. 3. *Mucor circinelloides*.

M. circinelloides se cultivó a 26°C en medio mínimo YNB (Lasker y Borgia, 1980) o MMC (Nicolás *et al.*, 2007) o en medio nutritivo YPG (Bartnicki-García y Nickerson, 1962) o YPD (Difco). Cuando fue necesario, después de autoclavar, el medio mínimo YNB se suplementó con leucina (20 µg/ml) y los medios YNB, MMC e YPG con uridina (0,2 mg/ml). En experimentos de transformación se añadió sorbitol a una concentración de 0,5 M para evitar que la diferencia de presión osmótica hiciese estallar los protoplastos. En la preparación de medios sólidos, el agar se autoclavó por separado para evitar que el pH ácido de los medios impidiese la correcta polimerización. El pH fue 4,5 cuando se requirió un crecimiento micelial normal y 2,9-3,2 cuando se necesitó obtener un crecimiento colonial, que permitiera analizar un gran número de individuos por caja.

Para la obtención de esporas, se crecieron micelios en cajas de Petri con el medio de cultivo adecuado, bien a partir de suspensiones de esporas, bien a partir de trocitos de micelio transplantados con pinzas estériles. Los micelios se incubaron durante 2-3 días bajo luz continua antes de recoger las esporas, extendiendo unos 5 ml de agua destilada estéril con ayuda de un asa de siembra también estéril.

Las esporas de las distintas estirpes se conservaron en agua destilada estéril a 4°C cuando su uso fue continuado y a -20°C de forma permanente.

II. 3. Tampones y reactivos.

a) Manipulación del DNA:

TE

• Tris-HCl pH 8,0	10 mM
• EDTA pH 8,0	1 mM

TAE 50x

• Tris	2 M
• Ácido acético	5,71 %
• EDTA	0,05 M

Tampón de carga 10x (electroforesis)

• Azul de bromofenol	0,25 %
• Sacarosa	40 %

b) Manipulación del RNA:

Tampón MOPS

• MOPS pH 7,0	20 mM
• Acetato sódico	5 mM
• EDTA	1 mM

Tampón de ribonucleasas

• Tris-HCl pH 7,5	20 mM
• NaCl	60 mM
• EDTA pH 8	5 mM

Tampón alcalino

• Bicarbonato sódico	80 mM
• Carbonato sódico	120 mM

Los tampones utilizados en los experimentos con RNA se trataron con dietilpircarbonato (DEPC) al 0,1 % durante, al menos, 1 hora a temperatura ambiente para eliminar las ribonucleasas. El DEPC se eliminó posteriormente mediante autoclavado durante 20 minutos. Las soluciones de Tris se prepararon con agua previamente tratada con DEPC.

c) Manipulación de proteínas:

Tampón de extracción de proteínas

• Tris-HCl pH 8,0	10 mM
• NaCl	0,15 M
• Triton X-100	1 %
• Benzamidina	1 mM
• β -mercaptoetanol	5 mM
• PMSF	1 mM
• Cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma)	1:50

Tampón de extracción de proteínas (FPLC)

• Tris-HCl pH 7,5	20 mM
• NaCl	300 mM
• MgCl ₂	5 mM
• DTT	5 mM

Tampón PBS

• NaCl	140 mM
• KCl	3,3 mM
• Na ₂ HPO ₄	10 mM
• KH ₂ PO ₄	1,8 mM

Tampón PBST

- Se obtiene adicionando 0,05 % de Tween-20 al tampón PBS.

Tampón de lisis / Tampón de lavado I (Inmunoprecipitación)

• Tris-HCl	0,05 M
• NaCl	0,15 M
• Nonidet (Sigma)	1%
• Deoxicolato sódico	0,5%

Tampón de lavado II (Inmunoprecipitación)

• Tris-HCl	0,05 M
• NaCl	0,5 M
• Nonidet (Sigma)	1%
• Deoxicolato sódico	0,5%

Tampón de lavado III (Inmunoprecipitación)

• Tris-HCl	0,05 M
• Nonidet (Sigma)	1%
• Deoxicolato sódico	0,5%

d) Transformación de *M. circinelloides*:

Tampón fosfato-sorbitol

• Sorbitol	0,5 M
• Fosfato sódico pH 6,5	10 mM

e) Transferencia de ácidos nucleicos a membranas:

SSC 20x pH 7,0

- NaCl 3 M
- Citrato sódico 300 mM

f) Hibridaciones:

Solución de prehibridación NaCl

- NaCl 0,9 M
- SDS 1 %
- 50 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado.

Solución de hibridación NaCl

Se obtiene adicionando 0,1 g/ml de sulfato de dextrano a la solución de prehibridación.

Solución de prehibridación / hibridación con formamida

- Formamida 40 %
- Denhardt's 1x
- SDS 7 %
- Tampón fosfato pH 7 0,05 M
- NaCl 0,3 M
- 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonificado y desnaturalizado.

Denhardt's 50x

- BSA 1 % (P/V)
- Ficoll 400 1 % (P/V)
- Polivinilpirrolidona (PVP) 1 % (P/V)

g) Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida:

Tampón de carga-formamida 2x

• Formamida desionizada	95 %
• Azul de bromofenol	0,025 %
• Cianol de xileno	0,025 %
• SDS	0,025 %
• EDTA pH 8	18 mM

TBE 10x

• Tris base	0,9 M
• Ácido bórico	0,9 M
• EDTA	20 mM

h) Extracción de DNA de *M. circinelloides*:

Solución de extracción de DNA de *M. circinelloides*

• Tris-HCl pH 8	200 mM
• EDTA pH 8	100 mM
• SDS	1 %

II. 4. Transformación de *E. coli*.

Para introducir DNA desnudo en *E. coli* es necesario que las células se encuentren en un estado especial denominado de competencia. La obtención de células competentes de la estirpe DH5 α se realizó por el procedimiento del cloruro cálcico (Sambrook y Russell, 2001). Para la transformación se utilizó el procedimiento de choque térmico (Sambrook y Russell, 2001).

II. 5. Transformación de *S. cerevisiae*.

La transformación de levaduras para la detección de interacciones mediante el sistema de doble híbrido se realizó siguiendo el protocolo de acetato de litio-PEG3350 descrito previamente por Gietz *et al.* (1995). Una colonia de levaduras crecida en cajas de medio YPAD se inoculó en 2 ml de medio líquido YPAD, incubándose a 30°C y en agitación continua a 250 r.p.m. Después de 24 horas de crecimiento, se añadieron otros 8 ml de YPAD y se prolongó la incubación durante 5 horas más. Las células se precipitaron mediante centrifugación a 2.300 r.p.m durante 5 minutos y posteriormente se resuspendieron en 5 ml de acetato de litio 100 mM. A partir de la mezcla de células se hicieron alícuotas de 1,5 ml en tubos eppendorf, se centrifugaron a 2.300 r.p.m y se resuspendió el pellet en la siguiente mezcla: 230 µl de PEG 3350 (50 %), 35 µl de acetato de litio 1 M, 46 µl de H₂O bidestilada y 9 µl de DNA de salmón. La transformación se realizó en tubos eppendorf de 0,5 ml. A cada tubo se añadió 32 µl de la mezcla de células y 1 µl de plásmido purificado a una concentración de 150-300 ng/µl. La mezcla se sometió a una serie de tratamientos térmicos en un termociclador: 30 min a 30°C, 25 min a 42°C y 1 min a 30°C. Los transformantes se seleccionaron en medio SD-W (si el marcador es *trp1*) o SD-L (si el marcador es *leu2*). Las estirpes diploides con los dos plásmidos híbridos se generaron en cajas de medio YPAD y se seleccionaron en medio SD-LW. El análisis de la interacción entre las proteínas se realizó mediante réplica, usando terciopelo, en cajas de medio SD-LWH+AT (gen chivato *his3*), para seleccionar las interacciones débiles, y SD-LWA, (gen chivato *ade2*) para seleccionar las interacciones fuertes.

II. 6. Transformación de *M. circinelloides*.

La transformación se realizó mediante electroporación de protoplastos (Gutiérrez *et al.*, 2011), generados básicamente según el protocolo descrito por van Heeswijck y Roncero (1984). Los protoplastos, al carecer de pared celular, permiten la incorporación de DNA exógeno, en este caso mediante electroporación.

Para obtener protoplastos transformables se inocularon 10⁷ esporas/ml en 25 ml de medio líquido YPG pH 4,5 suplementado, cuando se requería, con 0,2 mg/ml de uridina. Los cultivos se mantuvieron durante 1 ó 2 horas a temperatura ambiente antes de incubarse toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se incubaron a 26°C con agitación fuerte (250 r.p.m.) durante un período de 3 a 4 horas, suficiente para que la mayoría de las

esporas germinaran. A continuación, las esporas se precipitaron durante 5 minutos a 2.000 r.p.m. en centrífuga Sigma 4-10 y se lavaron dos veces en tampón fosfato-sorbitol, para resuspenderse finalmente en este mismo tampón a razón de 5×10^7 esporas/ml. Para la digestión de las paredes celulares se añadió 1 mg/ml de un preparado comercial de enzimas líticas rico en quitinasa (Lysing Enzymes de *Trichoderma harzianum*, Sigma) y 0,15 mg/ml de quitosanasa comercial (Chitosanase-RD; US Biologicals). Las germínulas se incubaron a 30°C con agitación suave (60 r.p.m.) durante 90 minutos, hasta que se observó al microscopio la pérdida de la envoltura refringente. Para parar la digestión se añadieron 5 ml de sorbitol 0,5 M, se centrifugó durante 5 minutos a 900 r.p.m., resuspendiendo nuevamente en 5 ml de sorbitol 0,5 M y centrifugando en las mismas condiciones. Finalmente, los protoplastos se resuspendieron en un volumen final de 800 µl de sorbitol 0,5 M.

Para la transformación se añadieron 10 µl de DNA (1 µg de DNA circular o 3 µg de DNA lineal) a 100 µl de protoplastos y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm previamente enfriada en hielo. Los pulsos eléctricos se realizaron en el electroporador Bio-Rad Gene Pulser XCell con los siguientes parámetros de electroporación: 0,8 KV, 25 µF de capacitancia y una resistencia constante de 400 Ω. Inmediatamente después de aplicar el pulso eléctrico se añadió 1 ml de YPG pH 4,5 con 0,5 M de sorbitol frío y se transfirió a un tubo eppendorf limpio. Las mezclas de transformación se incubaron durante 1 hora a 26°C con una agitación de 150 r.p.m para permitir la recuperación de los protoplastos. Seguidamente, los protoplastos se centrifugaron durante 5 minutos a 1.100 r.p.m., resuspendiéndose el precipitado en 600 µl de YNB pH 4,5 con 0,5 M de sorbitol. Esta solución se sembró cuidadosamente en cajas del medio adecuado para la selección de los transformantes.

II. 7. Integración de DNA exógeno en el genoma de *M. circinelloides*.

La transformación integrativa en el hongo *M. circinelloides* se realizó transformando protoplastos del hongo por el procedimiento descrito en el apartado anterior, empleando DNA linearizado. Para la integración en el locus *qip*, los protoplastos se sembraron en cajas de medio MMC pH 3,2 con 0,5 M de sorbitol. Para identificar los transformantes que habían integrado el DNA exógeno se determinó el porcentaje de esporas que mantenían el marcador *pyrG* durante cuatro ciclos de crecimiento en medio

selectivo. Para ello, se comparó el número de individuos resultantes de la siembra en medio selectivo (MMC pH 3,2) y no selectivo (MMC pH 3,2 con uridina). Los transformantes con un mayor porcentaje de esporas Ura⁺ se seleccionaron como presuntos portadores del DNA integrado. Para el aislamiento de individuos con el DNA exógeno integrado en todos los núcleos (homocariontes) se realizaron de 5 a 6 pases en medio selectivo.

Para la integración en el locus *rdrp-1* utilizando el marcador *leuA* (en la generación del doble mutante *rdrp-1/rdrp-2*), se substituyó el medio MMC por YNB, suplementándose éste con leucina cuando fue necesario sembrar en medio no selectivo.

II. 8. Manipulación del DNA.

II. 8. 1. Aislamiento de DNA de *M. circinelloides*.

El DNA de *M. circinelloides* se aisló siguiendo básicamente el protocolo descrito por van Heeswijck y Roncero (1984), con ligeras modificaciones. La extracción de DNA se realizó a partir de micelios crecidos en medio sólido a pH 4,5. Para ello, se realizaron transplantes sobre una lámina estéril de papel celofán colocada sobre la superficie del medio sólido, con el fin de facilitar la recogida del micelio.

Los micelios se incubaron durante 2 días a 26°C antes de ser recogidos y triturados en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. El micelio triturado se resuspendió en 800 µl de tampón de extracción de DNA. La mezcla se incubó con 30 µl de proteinasa K (2 mg/ml en TE) y 30 µl de RNasa (10 mg/ml) durante 3 horas a 37°C en un tubo eppendorf.

Tras este período de incubación se procedió a la extracción del DNA mediante un tratamiento con fenol y varios con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), hasta que no quedaron restos de proteínas en la interfase. Finalmente, se lavó con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa resultante se precipitó con un volumen de isopropanol y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 5,2. El precipitado se lavó con etanol al 70 % y, tras secarse a 37°C, se resuspendió en 30-50 µl de agua bidestilada.

En el caso de las PCRs realizadas para comprobar la disrupción de los genes, se utilizó directamente micelio como fuente del DNA molde, según el protocolo rápido de aislamiento de DNA descrito en Nicolás *et al.*, 2007.

II. 8. 2. Aislamiento de DNA plasmídico.

El DNA plasmídico de *E. coli* se aisló por el procedimiento rápido de hervido (Holmes y Quigley, 1981) cuando no se necesitaba gran pureza (digestiones con enzimas de restricción, transformación de *M. circinelloides*, etc.) o mediante columnas comerciales de purificación de plásmido (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche Applied Science o GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) cuando se requería una gran pureza (secuenciación, PCR).

II. 8. 3. Tratamiento de DNA con enzimas.

Los tratamientos enzimáticos más usuales fueron:

Digestión con enzimas de restricción (Amersham Biosciences o Fermentas), que se realizó siguiendo las instrucciones del suministrador.

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

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

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

II. 8. 4. Técnicas electroforéticas.

Para caracterizar plásmidos, separar fragmentos de distinto tamaño generados en las digestiones con restrictasas o verificar los productos obtenidos mediante PCR, el DNA se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa). Se utilizó tampón TAE 1x y las concentraciones de agarosa variaron entre 0,7 % y 1,5 %, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Para visualizar los fragmentos de DNA mediante luz ultravioleta se añadió Bromuro de Etidio a la agarosa a una concentración final de 0,5 µg/ ml.

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

II. 8. 5. Amplificación de DNA por PCR.

El proceso de amplificación de DNA se llevó a cabo utilizando 20 pmoles de cada oligonucleótido y las enzimas ECOTAQ DNA Polymerase (Ecogen), ECOTAQ PLUS DNA Polymerase (Ecogen), PfuUltra™ Hotstart DNA Polymerase (Stratagene), BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline), BIO-X-ACT™ Long DNA Polymerase (Bioline) o KAPA HiFi PCR (Kapa Biosystems), siguiendo en cada caso las indicaciones del suministrador. Las muestras se incubaron durante 3 minutos a 94°C para la desnaturalización del DNA y posteriormente se sometieron a 30 ciclos de desnaturalización (45 segundos a 94°C), alineamiento (1 minuto a la T_m de los cebadores, utilizando la fórmula $T_m = 69,3 + 0,4 (G+C \%) - 650/\text{pb cebador}$) y polimerización (1 minuto por kb de producto a amplificar a 72°C). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de polimerización durante 10 minutos. Dada la riqueza en pares G+C de *M. circinelloides*, en todos los casos se añadió dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final del 5 %. El termociclador utilizado fue Mastercycler® personal de

Eppendorf. Los cebadores utilizados en los experimentos de PCR se muestran en la **Tabla 5**.

Nombre	Secuencia
Qip1	5' GCGGGTCTAG ATAGCGGCTGCTGATGCGCTTCG 3'
Qip2	5' GCGGGGTCGAC ATACGCCATGCAGGCGTGCGCG 3'
Qip 3	5' CCGCCACTAGT CCGTTTCTGTGCCGACTCACCG 3'
Qip 4	5' CCCGCCTGCAG CGCACACTGGAACGATCCCACATCCG 3'
Qip 5	5' ATTACGATACGGTGCTGACC 3'
Qip RACE 3-1	5' AGACAGCGATCTCAAATACTTGGC 3'
Qip RACE 3-2	5' CGCGGATCCTCTATCAATGACTTGAC 3'
Qip ATG	5' GGGGCGAATTC ATGGAAAAGGAGTACTGTCTTGG 3'
Qip STOP	5' GGGCGTCGAC TTAGATGTGCGCAGTGGTCATGGAC 3'
PyrGZ	5' GGCATTGGGATGCTGTTGTC 3'
Rdrp20Apa	5' GGGGGGGGCC CTGACATGGCTGTACCACTGC 3'
Rdrp16	5' GGGGGGGAATTC TCTCGATAAAACAAACGACACAGC 3'
Rdrp3	5' TGCTACCGTGTCATCAGGCG 3'
DisrpXhoIForw	5' GCAGGTCTCGAGCAGCTCTTGGATCG 3'
DisrpRev	5' GGTGATGGACTTTAGGTTCTGCGTAGG 3'
Mut1c	5' ACACACTCTACTATCGCC 3'
LeuAP2	5' GTACGATTCTGGTCAACTCG 3'
carB25	5' CATTCCCTGTGTGGTTCTGGTTGCG 3'
Ribo3	5' CCGAATTC CTGGAGAGATGGCACCTTAGC 3'

Tabla 5. Oligonucleótidos específicos utilizados en los experimentos de PCR, RT-PCR, secuenciación y como marcadores de tamaño. Los nucleótidos marcados en rojo indican sitios de restricción añadidos en el extremo 5' de algunos oligonucleótidos. En negrita, nucleótidos añadidos en el extremo 5' de los sitios de restricción para facilitar la digestión.

II. 8. 6. Marcado de fragmentos de DNA.

El DNA que se utilizó como sonda en los experimentos de hibridación tipo Southern y Northern se marcó mediante la introducción del nucleótido dCTP marcado con fósforo-32 (^{32}P) en la posición α (EasyTides® Deoxycytidine 5'-Triphosphate, [α - ^{32}P], Perkin Elmer) (Feinberg y Vogelstein, 1983; Feinberg y Vogelstein, 1984). El marcado se realizó con el kit Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP) (Amersham), siguiendo las instrucciones del suministrador.

Para detener la reacción de marcado se añadieron 50 μl de agua bidestilada a la reacción. A continuación se pasó toda la solución por una columna de Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade (Amersham Pharmacia), centrifugando durante 3 minutos a 2.000 r.p.m. para eliminar los nucleótidos no incorporados, que quedan retenidos en la columna.

II. 8. 7. Hibridación de DNA fijado a un soporte.

El DNA genómico (1 μg) se digirió con las restrictasas adecuadas y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, el gel se incubó durante 20-25 minutos en una solución de HCl 0,4 N, se lavó con agua bidestilada y se incubó durante 20-25 minutos en una solución de NaOH 0,4 N. Finalmente, el DNA se transfirió a una membrana de nailon (Hybond™-N⁺, Amersham Biosciences) mediante transferencia capilar con una solución de NaOH 0,4 N durante un mínimo de 2 horas (Sambrook y Russell, 2001). Una vez transferido, se secó el filtro a temperatura ambiente.

La hibridación se realizó en todos los casos con sondas marcadas radiactivamente. La prehibridación se llevó a cabo a 65°C un mínimo de 2 horas con 20 ml de solución de prehibridación NaCl y se hibridó a esa misma temperatura toda la noche con 10 ml de solución de hibridación NaCl, a la que se añadió la sonda desnaturalizada por calor (10 minutos a 100°C) y enfriada rápidamente en hielo.

Las condiciones de lavado fueron: un primer lavado con una solución 2x SSC con 0,1 % de SDS a temperatura ambiente durante 1-2 minutos para eliminar el exceso de radiactividad, un segundo lavado de 20 minutos a 65°C con esa misma solución, un tercer lavado de 20 minutos a 65°C con una solución 1x SSC con 0,1 % de SDS y un cuarto lavado de 20 minutos a 65°C con una solución 0,5x SSC con 0,1 % de SDS. Tras este lavado se chequearon las membranas con un contador Geiger para valorar la conveniencia

de aplicar un último lavado de 20 minutos a 65°C con una solución 0,1x SSC con 0,1 % de SDS. Seguidamente, las membranas se pusieron en contacto con películas Kodak® BioMax™ MS Film (alta sensibilidad) y se dejaron exponiendo a -70°C. En algunos casos las membranas se expusieron a pantallas Phosphorimager BAS-MP2040 (Fujifilm) que fueron escaneadas en el lector Molecular Imager FX (BioRad).

II. 8. 8. Secuenciación del DNA.

Los plásmidos portadores de los distintos fragmentos de DNA a secuenciar se purificaron con columnas High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science) o GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). La secuenciación fue llevada a cabo por el Servicio de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia. Los cebadores utilizados en los experimentos de secuenciación se muestran en la **Tabla 5 (ver apartado II. 8. 5)**.

II. 9. Análisis de secuencias de DNA.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas en este trabajo se analizaron en el servidor BCM Search Launcher, utilizando la aplicación “Sequence Utilities” para buscar la presencia de ORFs, secuencias repetidas, puntos de corte con enzimas, etc. Para el análisis de las secuencias de aminoácidos se utilizaron los servidores EMBL-EBI, NCBI y ExPasy. La búsqueda de proteínas homólogas se llevó a cabo mediante el programa blastp del NCBI (Altschul *et al.*, 1997). Las predicciones de dominios conservados se realizaron con los programas “InterProScan” (EMBL-EBI), “Conserve Domain Database” (NCBI) y “Pfam” (Sanger Institute). Los análisis de comparación de secuencias se realizaron mediante el programa ClustalW2 del EMBL-EBI (Larkin *et al.*, 2007). El peso molecular y el punto isoeléctrico de proteínas se determinó con el programa “Compute pI/Mw” (ExPasy) (Gasteiger *et al.*, 2005).

II. 10. Manipulación del RNA.

II. 10. 1. Aislamiento de RNA total de *M. circinelloides*.

Para el aislamiento de RNA de bajo peso molecular y los experimentos de hibridación tipo Northern, las muestras de RNA total se obtuvieron mediante el método rápido del Trizol (Sigma), siguiendo básicamente las instrucciones del suministrador. La extracción se realizó a partir de micelios de las estirpes de interés crecidas en medio sólido (pH 4,5). Se trituraron 100-150 mg de micelio en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, que rápidamente se pasó a un tubo eppendorf en hielo con 1,5 ml de Trizol. La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex, hasta resuspender totalmente el micelio y se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. a 4°C. A continuación se recuperó el sobrenadante y tras un período de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 300 µl de cloroformo. Tras incubar de nuevo durante 3 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C. El sobrenadante se precipitó añadiendo 750 µl de isopropanol, incubando durante 15 minutos a -20°C y centrifugando posteriormente durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C. El precipitado se lavó posteriormente con etanol al 70 % y, tras secar a 37°C, se resuspendió en 50 µl agua bidestilada tratada con DEPC. Las muestras se conservaron congeladas a -70°C.

Para el aislamiento de las muestras de RNA total utilizadas en los experimentos de expresión diferencial (transcriptómica), la extracción se realizó a partir de micelios de las estirpes de interés crecidos en medio MMC sólido pH 4,5 (micromatrices) o YPG sólido pH 4,5 (secuenciación de RNA [RNAseq]). En ambos casos, se sembraron $2,5 \times 10^5$ esporas de cada una de las estirpes y se incubaron durante 24 y 48 horas a 26°C. Los micelios se secaron y se congelaron con nitrógeno líquido. Muestras de 100-150 mg de micelio se trituraron en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, que rápidamente se pasó a un tubo eppendorf. La extracción se realizó mediante el kit de extracción de RNA RNeasy Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del suministrador. Este procedimiento permite obtener muestras de RNA con valores adecuados de integridad, concentración y pureza (valores RIN > 8, concentración > 300 ng/µl, $A_{260}/A_{280} > 2$) para su utilización en los citados experimentos. Las hibridaciones de las micromatrices y el procesamiento de los datos brutos fueron realizados por la empresa BioArray, S.L. (Alicante, España). La secuenciación de RNA fue realizada por la empresa

BaseClear B.V. (Leiden, Holanda) y el procesamiento de los datos brutos por Simon Moxon (University of East Anglia, Reino Unido).

II. 10. 2. Aislamiento de RNA de bajo peso molecular de *M. circinelloides*.

El RNA de bajo peso molecular se aisló a partir de micelios de la estirpe de interés crecidos sobre medio líquido o sólido bajo condiciones de luz continua, siguiendo el protocolo descrito por Nicolás *et al.* (2003) con ligeras modificaciones. Se trituraron micelios congelados (100 mg) en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, aislándose el RNA total por el método rápido del Trizol (Sigma). El precipitado obtenido siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior se lavó con etanol 70% y, tras secar a 37°C durante 15 minutos, se resuspendió en 300 µl de agua bidestilada tratada con DEPC, calentando a 65°C durante 10 minutos. A continuación se añadieron 50 µl de NaCl 4 M y 40 µl de PEG8000 al 50%, se mezcló bien y se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo. Después de centrifugar durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C, los RNAs de bajo peso molecular permanecen en el sobrenadante. El RNA de alto peso molecular, que queda en el precipitado, se resuspendió en 50 µl de formamida al 50 % con el fin de utilizarlo como control del buen estado de las muestras de RNA obtenidas, para lo cual se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se verificó la ausencia de degradación. Los RNAs de bajo peso molecular se precipitaron añadiendo 3 volúmenes de etanol 100 %, manteniéndolos durante al menos 2 horas a -20°C y centrifugando durante 30 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C. El precipitado se lavó con etanol 80% y, tras secar a 37°C durante 15 minutos, se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada tratada con DEPC. Las muestras se conservaron congeladas a -70°C.

II. 10. 3. Construcción de librerías de sRNAs.

El análisis de los sRNAs endógenos de *M. circinelloides* se realizó mediante la construcción de librerías de cDNA procedentes de la población total de sRNAs de la estirpe silvestre y la estirpe mutante *ago-1*. Se utilizó micelio de ambas estirpes crecido en medio sólido YPG pH 4,5 durante 48 horas y posteriormente se procedió a la extracción de sRNAs con Trizol (**apartado II. 10. 2.**). Una vez aislados los sRNAs endógenos, se procedió a la purificación de la fracción comprendida entre 18 y 25 nt a partir de un gel

desnaturalizante de poliacrilamida al 15% (19:1 acrilamida:bisacrilamida), conteniendo urea 8 M y TBE 1x y utilizando como tampón de electroforesis TBE 0,5x. Se empleó el equipo Mini-PROTEAN® 2 (Bio-Rad) para geles de 1,0 mm de grosor. Los sRNAs se separaron durante 2 horas a 100V, tras lo cual se tiñó el gel con BrEt para poder discriminar y purificar los fragmentos de interés con un bisturí, eluyendo el RNA con NaCl 0,3M y agitación durante toda la noche a 4°C. Como marcadores de tamaño se emplearon oligonucleótidos sintéticos de 19, 24 y 63 nt y el marcador Low Range ssRNA Ladder (New England Biolab). El eluido se purificó con una columna Spin-X Cellulose Acetate Filter (Corning Incorporated), precipitando a continuación el RNA con un volumen de isopropanol y 3 µl de glicógeno durante 2 horas a -20°C. Una vez resuspendido en 5,7 µl de agua, el RNA se ligó a un adaptador (5' adapter, Solexa) por su extremo 5' mediante la T4 RNA ligasa, incubando durante 5 horas a 37°C y toda la noche a 4°C, en tampón de ligación de T4 conteniendo 40 unidades de RNA guard (GE Healthcare). Se volvieron a separar las muestras en un gel de poliacrilamida al 15% para eliminar los sRNAs que no se hubieran unido al adaptador, pero esta vez se purificó la fracción entre 40-60 nt. De nuevo se eluyó, purificó y precipitó el RNA antes de unirlo a otro adaptador por su extremo 3' (3' adapter, Solexa). Tras la ligación se aislaron los sRNAs unidos a ambos adaptadores separándolos de nuevo por electroforesis, pero esta vez en un gel de poliacrilamida al 10%. Se purificó la fracción entre 60-80 nt y se repitió el proceso de elución, purificación y precipitación de los sRNAs.

Para la construcción de las genotecas, los sRNAs aislados se convirtieron en cDNA mediante RT-PCR, utilizando 4,5 µl del RNA ligado a los adaptadores al que se le añadieron 50 pmoles del cebador específico (Solexa) complementario a uno de los adaptadores (volumen final 5 µl). La mezcla se calentó 10 minutos a 65°C para desnaturalizar el RNA, se pasó a hielo y se le añadieron 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de Ditiotretitol 100 mM (DTT) (Invitrogen), 0,5 µl de RNA guard (GE Healthcare), 2 µl de tampón Expand RT 5x (Roche) y 1 µl de retrotranscriptasa (Expand Reverse Transcriptase, Roche) (volumen final 10,5 µl). La mezcla se incubó 1 hora a 43°C, tras lo cual se pasó a hielo y se guardó a -20°C. Para la amplificación mediante PCR se utilizaron 0,5 µl de la mezcla de retrotranscripción con el Kit de amplificación de Solexa, sometiendo las muestras a 16 (silvestre) o 18 (mutante *ago-1*) ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 58°C y 20 segundos a 72°C, tras un ciclo inicial de 30 segundos a 98°C y otro final de 10 minutos a 72°C. Los productos obtenidos se purificaron tras ser separados por

electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% durante 1,5 horas a 100V. Tras teñir el gel con BrEt, se recortó la fracción de interés (~90 nt) con un bisturí y se eluyó el RNA con 300 μ l de 1xNEB Buffer 2 (10 mM Tris-HCl pH 7,9, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) manteniéndolo en agitación toda la noche a 4°C. El cDNA eluido se purificó por columna (Spin-X Cellulose Acetate Filter, Corning Incorporated) y se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol, 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 3 μ l de glicógeno. El cDNA se resuspendió en 15 μ l de agua y, tras ser cuantificado en un gel de poliacrilamida al 8%, se enviaron 10 μ l (>10 ng/ μ l) de cada muestra para ser secuenciados mediante la plataforma Illumina (Illumina Genome Analyzer II).

Además, se quiso analizar y secuenciar la población de sRNAs unidos específicamente a Ago-1. Para el aislamiento de los sRNAs asociados a Ago-1, se realizó la extracción de RNA a partir de las fracciones de proteínas obtenidas por FPLC de la estirpe silvestre y la estirpe mutante *ago-1* (utilizada como control negativo) (**apartado II. 11. 2**). Las fracciones proteicas adecuadas se utilizaron para la extracción del RNA mediante la utilización de Trizol (Ambion) por el método descrito anteriormente (**apartado II. 10. 1**), salvo que se añadió glicógeno previamente a la adicción de isopropanol, para favorecer la precipitación del RNA. Una vez purificado el RNA a partir de las diferentes fracciones, se procedió a su separación electroforética y a la purificación a partir del gel de los fragmentos entre 20 y 25 nt. Dichos fragmentos se clonaron ligándolos a adaptadores específicos y convirtiendo el RNA en cDNA mediante la realización de RT-PCR, como se describe más arriba. La secuenciación de las librerías de cDNA se realizó mediante la plataforma Illumina (Illumina Genome Analyzer II α) (Baseclear).

El análisis bioinformático de la secuencia de los sRNAs se llevó a cabo en la Universidad de East Anglia (Simon Moxon).

II. 10. 4. Amplificación de cDNAs.

Esta técnica se utilizó para comprobar la presencia de intrones en la secuencia del gen *qip* y determinar su extremo 3', y para la obtención del cDNA completo de dicho gen y su posterior clonación, en fase, en el vector pBD-GAL4Cam del sistema de doble híbrido de levaduras. Para la síntesis de cDNA se utilizó la retrotranscriptasa Expand Reverse Transcriptase (Roche) y el cebador RACE-T (Roche), que contiene una secuencia de poli(T) en su extremo 3' y una secuencia de 20 nucleótidos en el extremo 5' que coincide

con la secuencia del cebador Race3'. Como molde de la reacción se utilizó 1 µg de RNA al que se le añadieron 50 pmoles del cebador RACE-T en un volumen final de 10 µl. La mezcla se calentó 10 minutos a 65°C para desnaturalizar el RNA, se pasó a hielo y se le añadieron 2 µl de dNTPs 10 mM, 2 µl de Ditiotreit ol 100 mM (DTT) (Roche), 1 µl de RNA guard (Amersham Pharmacia Biotech), 4 µl de tampón Expand RT 5x (Roche) y 1 µl (50 U) de retrotranscriptasa (Expand Reverse Transcriptase, Roche) (volumen final de 20 µl). La mezcla se incubó 1 hora a 43°C, tras lo cual se pasó a hielo y se guardó a 4°C o se amplificó directamente. Para la amplificación mediante PCR del extremo 3' del gen *qip*, se utilizaron 4 µl de la mezcla de retrotranscripción, el cebador específico QIP RACE 3-1, complementario a la secuencia de *qip*, y el cebador Race3'. El producto de dicha reacción se utilizó como molde para una segunda amplificación con un cebador específico aguas abajo del primero, QIP RACE 3-2, y el cebador Race3'. Finalmente, para la obtención del cDNA completo del gen *qip*, se realizó una tercera amplificación a partir del producto de retrotranscripción, con los cebadores específicos de *qip* QIP ATG (que incluye un punto de corte *EcoRI*) y QIP STOP (con punto de corte *Sall*). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo como se describe en el **apartado II. 8. 5**. Los productos generados se clonaron en el vector pGEM-T easy para su posterior secuenciación.

Secuencia de los cebadores RACE-T y Race3':

RaceT: 5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T 3'

Race3': 5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC 3'

Las secuencias de los cebadores específicos de *qip* se muestran en la **Tabla 5 (apartado II. 8. 5)**.

Una vez obtenido y secuenciado el extremo 3' del gen *qip*, así como el cDNA completo, se llevó a cabo la comparación de dicha secuencia con la secuencia genómica de *M. circinelloides*, lo que permitió identificar la secuencia de poliadenilación y comprobar las uniones exón-intrón de los dos intrones predichos.

II. 10. 5. Hibridación de RNA total fijado a un soporte.

Cada muestra de RNA se preparó en un volumen total de 25 µl conteniendo 50 µg de RNA, 2,5 µl de MOPS 10x, 4,4 µl de formaldehído y 12,5 µl de formamida. La mezcla se calentó a 65°C durante 10 minutos para eliminar estructuras secundarias del RNA y

posteriormente se dejó 5 minutos en hielo. Tras adicionar 2,5 μl de tampón de carga, las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1,2 % conteniendo 2,2 M de formaldehído, utilizándose como tampón de electroforesis MOPS 1x con formaldehído 2,2 M. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lavó durante 1,5 horas con agua bidestilada y se transfirió por capilaridad durante toda la noche a una membrana de nailon cargada positivamente (HybondTM-N⁺, Amersham Biosciences) usando como tampón SSC 20x. El RNA se fijó a la membrana mediante radiación ultravioleta (0,120 J/cm²). La hibridación con la sonda de DNA marcada radioactivamente se llevó a cabo como se indica en el **apartado II. 8. 7**, utilizándose las condiciones de lavado especificadas en el mismo apartado. La **Tabla 6 (apartado II. 10. 8)** muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de DNA que se usaron como sonda en los experimentos de hibridación tipo Northern mostrados en la **Figura 40**.

II. 10. 6. Hibridación de RNA de bajo peso molecular fijado a un soporte.

Cada muestra de RNA se preparó en un volumen total de 20 μl conteniendo 50-60 μg de RNA de bajo peso molecular y 10 μl de tampón de carga-formamida 2x. La mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos para eliminar estructuras secundarias del RNA y a continuación se dejó 5 minutos en hielo. Las muestras se cargaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 15% (19:1 acrilamida:bisacrilamida), conteniendo urea 7 M y TBE 0,5x, utilizando como tampón de electroforesis TBE 0,5x. Una vez finalizada la electroforesis, se transfirió el RNA a una membrana de nailon cargada positivamente (HybondTM-N⁺, Amersham Biosciences) mediante electrotransferencia a 3 mA/cm² (Semi-Dry Electroblothing Unit, Sigma) durante 45 minutos, usando como tampón de transferencia TBE 1x. El RNA se fijó a la membrana mediante radiación ultravioleta (0,120 J/cm²). Cuando fue necesario, la fijación del RNA a la membrana (Hybond-NX®, Amersham) se llevó a cabo con 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (Sigma) (EDC-crosslinking), lo que aumenta la sensibilidad de detección de los sRNAs entre 20-50 veces respecto a la fijación con UV. Para ello, se preparó una solución 0,16 M de EDC en 1-metilimidazol 0,13 M a pH 8. La membrana se colocó sobre papel Whatmann saturado con la solución de EDC con la cara con el RNA hacia arriba, se envolvió con papel film transparente y se incubó a 60°C durante 1 ó 2

horas. Finalmente se lavó la membrana con agua bidestilada para eliminar el exceso de EDC antes de la prehibridación.

La hibridación con la ribosonda marcada se realizó con 20 ml de tampón de prehibridación/hibridación con formamida durante toda la noche y tras un periodo de 2-3 horas de prehibridación con el mismo tampón. Tanto la prehibridación como la hibridación se realizaron a 30°C. El lavado de las membranas tras la hibridación se llevó a cabo a 50°C. Se realizaron tres lavados de 20 minutos con una solución SSC 2x con 0,2 % de SDS. Cuando fue necesario eliminar el exceso de sonda unida inespecíficamente a la membrana, ésta se sometió a un lavado durante 1 hora a 37°C con 0,81 kunits/ml de ribonucleasa A de páncreas bovino y 20 U/ml de ribonucleasa T1 de *Aspergillus oryzae* en un volumen de 20 ml de tampón de ribonucleasas. Por último, se eliminaron las ribonucleasas lavando vigorosamente las membranas con 2x SSC y 0,2% de SDS durante 2 ó 3 minutos a temperatura ambiente.

Cuando se utilizaron como sonda oligonucleótidos marcados radiactivamente, la hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a 37°C con 5 ml de tampón ULTRAhyb®-Oligo Buffer (Ambion). La prehibridación se llevó a cabo durante 1 hora a la temperatura de hibridación y con el mismo tampón. El lavado de las membranas tras la hibridación se llevó a cabo con 2x SSC y 0,2% SDS, un primer lavado a temperatura ambiente y otros dos lavados durante 20 minutos a 37°C.

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

II. 10. 7. Marcado de ribosondas.

Las sondas de RNA específicas de *carB*, utilizadas en los experimentos de hibridación de RNA de bajo peso molecular fijado a un soporte, se marcaron mediante la introducción del nucleótido UTP marcado con fósforo-32 (Easytides® Uridine 5'-Triphosphate, [α -³²P], Perkin Elmer). Las ribosondas específicas de RNA con sentido y antisentido se sintetizaron por transcripción *in vitro* de plásmidos portadores de los fragmentos adecuados, utilizando el kit comercial MAXIscript® T7 *in vitro* Transcription Kit (Ambion), siguiendo las recomendaciones del suministrador. Las ribosondas se trataron

con DNasaI libre de RNasas para eliminar el DNA utilizado como molde para la transcripción. Posteriormente, las sondas marcadas se fragmentaron en pequeñas moléculas de aproximadamente 50 nt para facilitar la hibridación con los RNAs de bajo peso molecular. Este proceso se realizó mezclando 20 µl de ribosonda con 300 µl de tampón alcalino, incubando durante 3 horas a 60°C y deteniendo la reacción de hidrólisis con 20 µl de acetato sódico 3M pH 5.0. Para eliminar los nucleótidos libres se pasó toda la solución por una columna de Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade (Amersham Pharmacia), centrifugando durante 5 minutos a 2.000 r.p.m. Como controles de tamaño y polaridad se cargó en el gel 1 pmol de oligonucleótidos correspondientes a secuencias con sentido (carB25) y antisentido (Ribo3) del gen *carB* (ver **Tabla 5**).

II. 10. 8. Marcado de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos de DNA utilizados en los experimentos de hibridación de RNA de bajo peso molecular fijado a un soporte se marcaron en el extremo 5' con ATP (Easytides® Adenosine 5'-Triphosphate, [γ -³²P], Perkin Elmer), utilizando la enzima T4 Polynucleotide Kinase (Promega) siguiendo las instrucciones del suministrador. Los nucleótidos libres se eliminaron haciendo pasar las sondas marcadas por una columna de Sephadex™ G-25 DNA Grade (GE Healthcare), centrifugando durante 5 minutos a 2.000 r.p.m.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como sonda en los experimentos de hibridación mostrados en la **Figura 33** se muestran en la **Tabla 6**. Dicha tabla también incluye la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de DNA que se usaron como sonda en los experimentos de hibridación tipo Northern mostrados en la **Figura 40**.

II. 11. Manipulación de proteínas.

II. 11. 1. Preparación de extractos de proteínas de *M. circinelloides*.

La obtención de extractos de proteínas de *M. circinelloides* se realizó siguiendo el protocolo de extracción con TSA (Murcia-Flores *et al.*, 2007). La extracción se realizó a partir de micelios crecidos en medio sólido, para lo cual se sembraron esporas de las

Nombre	Secuencia	Uso
77050	5' TCTAGCCACTTGTCTCTGGTTCA 3'	Sonda que detecta los esRNAs antisentido del locus 77050
78553	5' AGACGAGCCTATCTTCCTTGCCTTGTA 3'	Sonda que detecta los esRNAs antisentido del locus 78553
80452	5' GTGTCTTCTGACAGTCTCGCAGAGGATGCCTCT 3'	Sonda que detecta los esRNAs antisentido del locus 80452
82372	5' TATCGCCGTCCTACCGTGGATACAA 3'	Sonda que detecta los esRNAs antisentido del locus 86881
86881	5' CGCCAATCTCCCTACAGCCTTCA 3'	Sonda que detecta los esRNAs antisentido del locus 77050
77442 forward	5' CCTCGCGAGAAAGGATTGC 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 77442
77442 reverse	5' GAGAACCAGATTCGGCAG 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 77442
80452 forward	5' CCGAAATCAGTAATGATAAGCC 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 80452
80452 reverse	5' GACGAAATGCTAACCGTACC 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 80452
82372 forward	5' GCATTGTATCCACGGTAGG 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 82372
82372 reverse	5' CATGCTACCCTTAGATCAGG 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 82372
83187 forward	5' CCACTGTCAAGCGTAAGCG 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 83187
83187 reverse	5' CGTATCCAGCAAGGATAGCATC 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 83187
83353 forward	5' GGCTACACTCGTAAGGTTTCG 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 83353
83353 reverse	5' GGCATTGACCAGTTCACG 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 83353
95350 forward	5' GGACAGCATGACTGAAGGTC 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 95350
95350 reverse	5' CAACTCTTTGAAGCGTGGAC 3'	Cebador para la síntesis de la sonda de DNA que detecta el mRNA del locus 95350

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en los experimentos de hibridación tipo Northern para la detección de esRNAs y mRNAs de *M. circinelloides*. En la parte superior de la tabla se muestran los oligonucleótidos utilizados como sondas para la detección de esRNAs. En la parte inferior de la tabla se indican los cebadores utilizados en los experimentos de PCR para la obtención de sondas de DNA para la detección de mRNAs.

estirpes adecuadas sobre una lámina estéril de papel celofán colocada sobre la superficie del medio, lo que facilita posteriormente la recogida del micelio. El micelio recogido se trituró en un mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, que fue traspasado a un tubo eppendorf al que se añadió 500 µl de tampón TSA, 10 µl de coctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y 5 µl de benzamidina 100 mM (Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos antes de centrifugar 30 minutos a

10.000 r.p.m. y 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteína total por el método de Lowry *et al.*, 1951.

II. 11. 2. Fraccionamiento de proteínas mediante cromatografía líquida (FPLC).

La extracción de proteínas para su fraccionamiento mediante cromatografía líquida se realizó mediante un protocolo ligeramente diferente al indicado en el apartado anterior. Se utilizaron micelios de las estirpes adecuadas crecidos en medio rico YPG pH 4,5 durante 48 horas en luz continua. Los extractos de proteínas se prepararon en 500 µl de tampón de extracción de proteínas para FPLC (**ver apartado II. 3**), una vez congelados los micelios con nitrógeno líquido y triturados en un mortero rugoso hasta obtener un polvo fino. Se añadieron 10 µl de cóctel de inhibidores y 5 µl de benzamidina 100 mM y se dejó 30 min en hielo. El material insoluble se eliminó mediante dos ciclos de centrifugación durante 5 minutos a 13.000 r.p.m. y a 4°C. Finalmente, se filtró el sobrenadante usando un filtro Millipore de 0,2 µm, para obtener un extracto clareado.

Una vez filtrados los extractos de proteínas de las estirpes silvestre y mutante *ago-1*, éstos fueron sometidos a fraccionamiento mediante una columna de exclusión molecular (SuperdexTM 200 10/300 GL) que separa las proteínas según su tamaño. Para el equilibrado de la columna se usó el tampón de extracción de proteínas para FPLC (**ver apartado II. 3**). La velocidad de flujo durante la cromatografía fue de 0,25 ml/min, recogiendo fracciones de 3 ml en el primer fraccionamiento, realizado con el fin de establecer las condiciones adecuadas y de 500 µl en el resto de fraccionamientos.

La precipitación de proteínas a partir de las fracciones se llevó a cabo mediante la utilización de ácido tricloroacético (TCA). Se añadieron 125 µl de TCA 100% (w/v) a los 500 µl de la fracción de proteínas y se incubó durante 10 minutos a 4°C. A continuación se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue sometido a dos lavados con acetona. Finalmente, se secó el precipitado a 95°C durante 10 minutos, para eliminar los posibles restos de acetona y se resuspendió en NuPAGE LDS Sample buffer 4X (Invitrogen). Las fracciones enriquecidas en proteína Ago-1 se identificaron mediante experimentos de hibridación tipo Western con anticuerpos específicos anti-Ago-1 (**apartado II. 11. 4**).

II. 11. 3. Electroforesis de proteínas.

La separación en función del tamaño de las proteínas presentes en los extractos de *M. circinelloides* se realizó mediante electroforesis en geles desnaturizantes comerciales con gradiente de poliacrilamida NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Mini Gels (Invitrogen), utilizando el equipo Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad). Las muestras conteniendo 50 µg de proteínas se prepararon en NuPAGE LDS Sample buffer 4X (Invitrogen). Tras 10 minutos de incubación a 100°C, las muestras se cargaron en el gel y se sometieron a electroforesis durante un tiempo entre 60 y 90 minutos a 200 V, utilizando el tampón de recorrido NuPAGE® MOPS SDS. Se utilizó el marcador de tamaño BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen).

II. 11. 4. Inmunodetección de proteínas.

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida se transfirieron a un soporte sólido para ser detectadas por anticuerpos específicos mediante la técnica de "Western-blotting" (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981).

II. 11. 4. 1. Transferencia de proteínas a membranas.

Las proteínas sometidas a electroforesis fueron electrotransferidas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN®, Whatmann) mediante un sistema semi-seco, utilizando el equipo Semi-Dry Electroblo tting Unit (Sigma). La transferencia se realizó durante 45 minutos a 200 mA de intensidad, utilizando el tampón de transferencia NuPAGE® Transfer Buffer (20X) (Invitrogen).

II. 11. 4. 2. Revelado de las membranas por inmunodetección.

Una vez realizada la transferencia, la membrana se sumergió durante una noche en tampón PBST con un 5 % de leche desnatada, utilizada como agente bloqueante. Al día siguiente, se eliminó la solución mediante un lavado de 10 minutos en tampón PBST y se incubó la membrana durante toda la noche a 4°C en presencia del anticuerpo primario anti-Ago-1, utilizando una dilución 1:300 en 5 ml de PBST con 5 % de leche desnatada. El

anticuerpo monoespecífico anti-Ago-1 fue generado por inmunización de conejos con el péptido de 17 aminoácidos ELRRGIPERDLSKLEKI (sintetizado *in vitro* por Pacific Immunology, USA), que corresponde a los residuos 238-254 de la proteína. Dicha región se eligió por sus propiedades inmunogénicas *in silico* y por presentar divergencia respecto a las otras proteínas Ago de *M. circinelloides*. El anticuerpo anti-Ago-1 fue purificado mediante cromatografía de afinidad utilizando el mismo péptido (Pacific Immunology, USA). Tras eliminar el exceso de anticuerpo con tres nuevos lavados de 10 minutos con PBST, se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:2500 de anticuerpo secundario de ratón anti-IgG de conejo (Amersham Biosciences), en 5 ml de PBST con 5 % de leche desnatada. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante otros tres lavados con PBST. Los lavados y las incubaciones con los anticuerpos se llevaron a cabo con agitación suave y constante. Anticuerpos monoclonales de ratón anti- α -tubulina (Sigma) se utilizaron como control de carga.

Para el revelado se utilizó el sistema AmershamTM ECLTM Western Blotting Analysis System (GE Healthcare), según las indicaciones del suministrador. La señal de quimiofluorescencia se detectó mediante la utilización del escáner Typhoon 9410 (GE Healthcare).

II. 12. Inmunoprecipitación de proteínas.

La inmunoprecipitación de la proteína Ago-1 con anticuerpos anti-Ago-1 se llevó a cabo siguiendo básicamente el protocolo descrito en Silva *et al.*, 2008, utilizando lisados celulares preparados como se indica en el apartado **II. 11. 1**, con ligeras modificaciones. La extracción se realizó a partir de micelios de las estirpes de interés crecidas en medio sólido YPG (pH 4.5) durante 24 h. El micelio triturado en nitrógeno líquido se pasó a un tubo eppendorf al que se añadió 1 ml de tampón de lisis/tampón de lavado I (**ver apartado II. 3**), 20 μ l de coctel de inhibidores (Sigma-Aldrich) y 10 μ l de benzamidina a 100 mM (Sigma-Aldrich). La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos y se centrifugó otros 30 minutos a 4°C y 14.000 r.p.m. El sobrenadante, que contiene la fracción total de proteínas, se recuperó en un eppendorf nuevo al que se añadió el anticuerpo anti-Ago-1 (1-5 μ g), manteniéndose toda la noche en agitación continua a 4°C. Al día siguiente, se añadieron 30 μ l de proteína A-agarosa (Sigma-Aldrich) y se incubó en agitación continua a 4°C durante 4 horas. Posteriormente, se procedió a los lavados de los posibles complejos

proteína Ago-1-anticuerpo-proteína A-agarosa formados durante el proceso. Se realizaron dos lavados de 20 minutos cada uno a 4°C con tampón de lavado I, dos lavados de 20 minutos cada uno a 4°C con tampón de lavado II y un lavado de 20 minutos a 4°C con tampón de lavado III (**ver apartado II. 3**). Para romper las uniones entre la proteína de interés y el anticuerpo se añadieron 60 µl de tampón de lavado III y 15 µl de tampón de carga de proteínas con β-mercaptoetanol, calentándose la muestra a 100°C. Tras centrifugar para precipitar la agarosa, alícuotas del sobrenadante fueron analizadas en experimentos tipo Western, utilizando anticuerpos anti-Ago-1.

Para facilitar la inmunoprecipitación de la proteína Ago-1 con el anticuerpo anti-Ago-1 se realizaron experimentos de crosslinking con formaldehído, que provoca una unión covalente del anticuerpo a la proteína. Para ello, tras la adición y posterior incubación durante toda la noche del anticuerpo anti-Ago-1 con la fracción total de proteínas, se incubó la mezcla con 27 µl de formaldehído (37%) a 37°C durante 30 min en agitación continua. Posteriormente, se añadieron 140 µl de glicina 2M para la neutralización y se dejó incubando durante 5 minutos a 37°C en agitación. Una vez finalizado el tratamiento para favorecer la unión covalente proteína-anticuerpo, se siguió el protocolo normal de inmunoprecipitación descrito anteriormente.

II.13 Construcción de vectores para la expresión de proteínas en el sistema de doble híbridos de levaduras.

Para llevar a cabo el estudio de las posibles interacciones entre proteínas de la maquinaria de silenciamiento, el cDNA completo del gen *qip* se clonó en fase en un vector de expresión portador del dominio de unión a DNA de GAL4 (pBD-GAL4Cam). Para ello, el cDNA de *qip* amplificado con los cebadores QIP ATG y QIP STOP (**apartado II. 10. 4**) se digirió con *EcoRI* y *Sall* y se clonó en el vector pBD-GAL4Cam digerido con las mismas enzimas (**Figura 12**). La secuenciación de varios de los plásmidos resultantes puso de manifiesto que todos ellos habían incorporado la secuencia *qip* en fase con el dominio BD de GAL4, aunque varios de los plásmidos eran portadores de mutaciones en la secuencia *qip*, generadas durante el proceso de amplificación. Ninguna de las mutaciones identificadas afectaba a los dominios Ribonucleasa H de la proteína Qip, por lo que se utilizaron todos estos plásmidos, junto con el portador de la secuencia silvestre de *qip*

(pMAT1511), para estudiar la interacción de Qip con la proteína Ago-1. Las mutaciones presentes en los distintos plásmidos son las siguientes:

- pMAT1508: cDNA de *qip* con una mutación: T438C → Tyr146His
- pMAT1509: cDNA de *qip* con cuatro mutaciones:
 - A157G → Ser53Gly
 - A236G → Gln79Arg
 - G701A → Gly233Asp
 - T829C → silenciosa (Leu)

Los plásmidos con el cDNA completo del gen *ago-1* fusionado al dominio de activación de GAL4 (pMAT1332) y los cDNAs de *dcl-1* y *dcl-2* fusionados al dominio de unión a DNA de GAL4 (pMAT1288 y pMAT1287, respectivamente) han sido generados previamente en el laboratorio (ver **Tabla 4**).

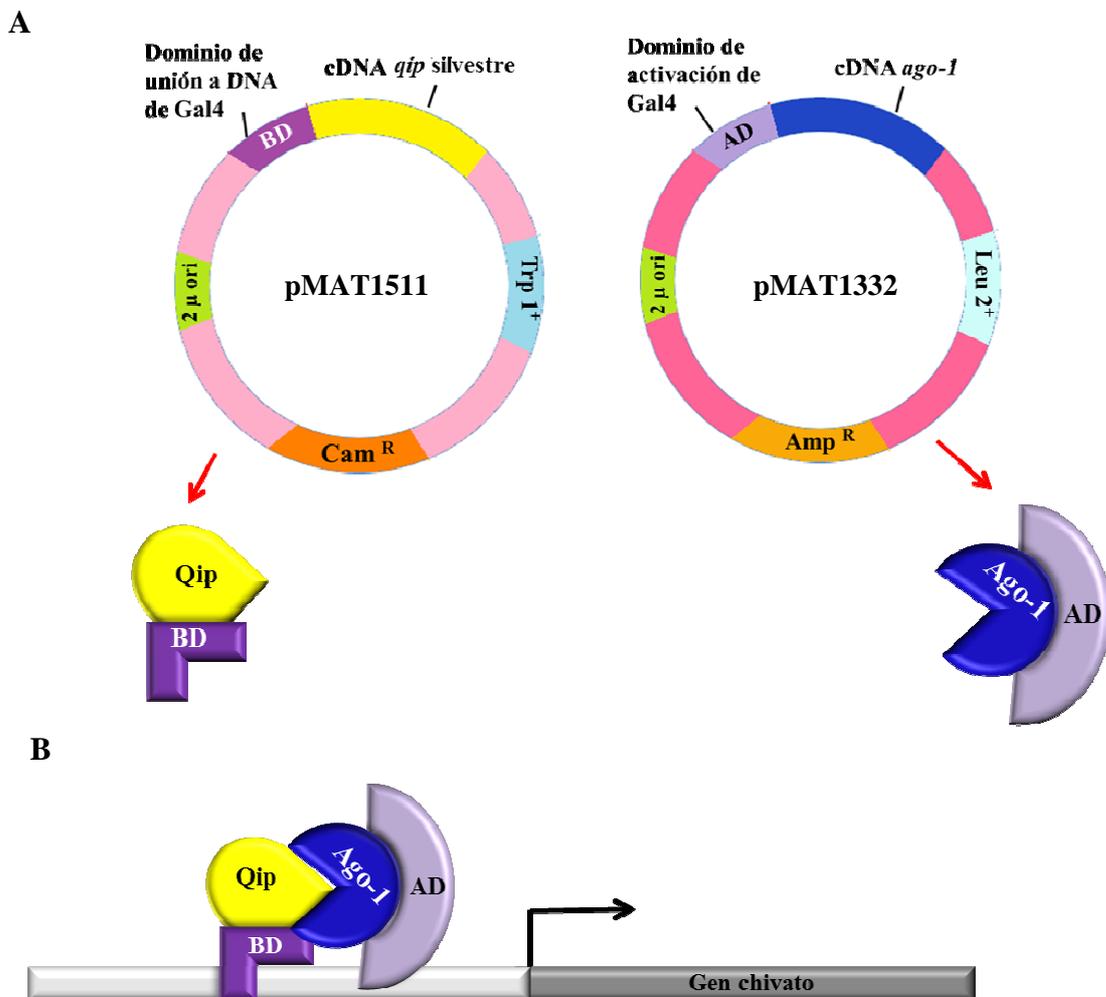


Figura 12. Sistema de doble híbrido de levaduras. (A) Plásmidos con la fusión de la proteína Qip silvestre al dominio de unión a DNA de GAL4 (BD) (pMAT1511) y la fusión de la proteína Ago-1 al dominio de activación de GAL4 (AD) (pMAT1332). (B) El sistema de doble híbrido de levaduras detecta interacciones entre proteínas, ya que es necesaria la interacción entre las proteínas Ago-1 y Qip para que los dominios BD y AD del factor transcripcional GAL4 se encuentren próximos y puedan activar la expresión de los genes chivatos.

II. 14. Cuantificación de la producción de esporas vegetativas.

Para la cuantificación de la producción de esporas de los diferentes mutantes en genes de silenciamiento se sembraron pequeñas piezas de micelio (2 mm de diámetro, $n = 10$) en medio sólido MMC pH 3,2. Se incubaron a 26°C durante 72 horas en condiciones de luz y oscuridad. Tras ese tiempo se midió el diámetro de cada una de las colonias, se introdujo la colonia completa en un eppendorf con 1 ml de agua destilada y se agitó vigorosamente en el vórtex durante 5 minutos para asegurar la completa resuspensión de las esporas. Finalmente, se cuantificaron las esporas al microscopio óptico mediante la cámara Neubauer. La producción de esporas de cada estirpe se cuantificó en relación al tamaño de las colonias.

II. 15. Cuantificación de la producción de esporas sexuales.

Esporas de las estirpes (-) y (+) se inocularon a una distancia aproximada de 2 cm en placas de medio rico YPD y se incubaron a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Tras veinte días de incubación se analizó la producción de zigosporas en los cruzamientos de la estirpe silvestre R7B y de los mutantes, de sexo (-), con la estirpe silvestre de sexo (+).

La cuantificación de las zigosporas se realizó al microscopio óptico. Para ello, se recogieron secciones de 1 cm² de la zona de interacción sexual, utilizando un bisturí para abarcar toda la profundidad del agar. Dichas secciones fueron fijadas con formaldehído al 10% durante toda la noche y posteriormente congeladas para obtener con el criotomo cortes de 30 µm, que fueron utilizados para contar las zigosporas al microscopio óptico (objetivo 10x). Para cada interacción se cuantificaron las zigosporas en doce cortes histológicos de 0,003 cm² cada uno.

II. 16. Cuantificación del proceso de autólisis.

Los experimentos para cuantificar el proceso de autólisis en las diferentes estirpes mutantes de silenciamiento se llevaron a cabo en medio rico YPD sólido, vertiendo exactamente 25 ml de medio en cada placa, con el objetivo de igualar al máximo las condiciones de crecimiento entre las distintas estirpes. Cada estirpe se sembró por triplicado utilizando un palillo para depositar en el centro de la placa Petri una gota de la

dilución de esporas frescas (aproximadamente 500 esporas por caja), incubándose finalmente en oscuridad continua a 26°C.

A partir de los 13 días de crecimiento se tomaron imágenes de los micelios mediante un escáner (HP Scanjet G4010) para estudiar su evolución. Para analizar cuantitativamente el proceso de autólisis a lo largo del tiempo se utilizó el programa de libre acceso de análisis de imagen ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/). Las imágenes capturadas con el escáner se transformaron de modo RGB a modo 8-bit, que proporciona 256 valores de grises (0-255, correspondiendo el valor 0 al color negro y el valor 255 al blanco). El programa identifica de forma automática el área micelial y la zona de autólisis por sus distintos niveles de grises, estableciéndose el rango de 1-112 para lisis y de 107-255 para micelio intacto. Finalmente, se midieron las máscaras binarias obtenidas y los resultados se expresaron como porcentaje de autólisis (área de lisis / área total de la placa).

II. 17. Análisis transcriptómicos.

II. 17. 1. Análisis transcriptómicos mediante micromatrices.

Los experimentos de hibridación de las muestras de RNA con las micromatrices y el tratamiento bioestadístico de los datos se llevaron a cabo en la empresa Bioarray S.L. (Alicante). Previamente, se diseñaron, mediante el programa informático eArray (Agilent), micromatrices que contenían oligonucleótidos de 60 bases correspondientes al extremo 3' de los 10.930 genes anotados en la versión 1 del genoma de *Mucor*. Una vez diseñados, los oligonucleótidos se imprimieron en portas de vidrio y se hibridaron con sondas derivadas de dos muestras distintas de RNA total, marcadas con distintos fluoróforos.

Se aislaron muestras de RNA de la estirpe silvestre R7B, el doble mutante MU411 (*dcl-1/dcl-2*) y los mutantes simples MU413 (*ago-1*) y MU419 (*rdrp-1*), realizándose las comparaciones indicadas en la **Figura 41**. Se realizaron cuatro réplicas biológicas de cada comparación, utilizándose muestras de RNA total de colonias diferentes e independientes de cada una de las estirpes. Las estirpes se sembraron en medio MMC sólido pH 4,5 y se incubaron en condiciones de luz continua. Para la extracción de las muestras de RNA, se recogieron los micelios de cada estirpe a las 24 y 48 horas de crecimiento, con el objetivo de realizar el estudio en diferentes fases del crecimiento vegetativo. Los micelios

congelados (100-150 mg) se trituraron en un mortero hasta conseguir un polvo fino. Seguidamente, se obtuvieron las muestras de RNA mediante la utilización del kit de extracción de RNA RNeasy Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del suministrador.

La calidad de las muestras de RNA se verificó mediante la plataforma Agilent 2100 Bioanalyzer, utilizando el kit Eukaryote Total RNA Nano (Agilent). La concentración y pureza del RNA se midió mediante el espectrofotómetro Nanodrop. En la **Tabla 7** se muestran los valores de RIN o integridad de la muestra (valor mínimo exigido $RIN \geq 8$), concentración (mínimo ≥ 300 ng/ μ l) y pureza ($A_{260}/280$ y $A_{260}/230 > 2$) de las muestras utilizadas.

Una vez verificada la calidad de las muestras se procedió a la realización del ensayo de expresión diferencial siguiendo el protocolo Two-Color Microarray-Based Gene Expression Quick Amp Labelling Kit v.6.5 (Agilent). Las muestras se marcaron con los fluoróforos Cy5 (rojo) y Cy3 (verde), realizándose las distintas réplicas de cada experimento con muestras marcadas con las dos combinaciones posibles de fluoróforos (p.e. R7B-Cy5 * MU411-Cy3 y R7B-Cy3 * MU411-Cy5). Tras escanear la fluorescencia, se analizaron los datos mediante el software Feature Extraction v.10.7 (Agilent), eliminando todos aquellos spots marcados como no válidos. La **Figura 13** muestra un ejemplo representativo de los resultados obtenidos en el análisis de los datos brutos extraídos de las micromatrices. El diagrama de densidades RG representa la distribución de las intensidades emitidas por los fluoróforos Cy5 (R) y Cy3 (G) en una micromatriz concreta (**Figura 13A**). Idealmente, la distribución debe ser similar entre las distintas micromatrices y para los dos fluoróforos. Las posibles diferencias se deben a diferentes eficacias de marcado e hibridación, y deben ser normalizadas para evitar un biás sistemático en la interpretación de los datos. El gráfico MA representa la distribución de la razón entre las dos intensidades (roja/verde) para cada spot de la micromatriz (M) respecto a la intensidad media en ese spot (A) (**Figura 13B**).

Tabla 7 (página siguiente). Calidad de las muestras de RNA utilizadas en los experimentos de expresión diferencial mediante micromatrices. Se indica el nombre de las muestras de cada estirpe: R7B, MU411 (*dcl-1/dcl-2*), MU413 (*ago-1*) y MU419 (*rdp-1*), el tiempo de incubación (24 o 48 h), el valor de RIN, la concentración, la contaminación por proteínas ($A_{260}/280$) y la contaminación por fenoles ($A_{260}/230$).

Nº	Name	RIN	Conc. Nano (ng/ul)	A260/280	A260/230
1	R7B 24h 2	10	1009,4	2,25	2,38
2	R7B 24h 3	10	763	2,3	2,54
3	R7B 24h 4	10	2274,3	2,27	2,46
4	R7B 24h 6	10	981,8	2,31	2,54
5	R7B 24h 7	10	1617,3	2,29	1,75
6	R7B 24h 8	10	1313,8	2,32	2,58
7	R7B 24h 9	9,9	781,7	2,34	2,39
8	411 24h 1	10	1205,7	2,32	2,56
9	411 24h 3	9,8	1435,3	2,29	2,44
10	411 24h 4	9,8	1324,3	2,27	2,24
11	411 24h 5	10	1439,9	2,3	2,5
12	411 24h 6	10	1061,7	2,31	2,25
13	413 24h 1	10	597,5	2,15	2,14
14	413 24h 3	10	1369,6	2,23	2,39
15	413 24h 4	9,5	601	2,25	2,2
16	413 24h 5	10	893	2,24	2,36
17	413 24h 6	10	1480,4	2,24	2,5
18	413 24h 7	9,8	1144,8	2,23	2,5
19	419 24h 1	10	840	2,27	2,46
20	419 24h 2	9	967,3	2,19	2
21	419 24h 3	9,9	1382,1	2,25	2,53
22	419 24h 4	9,9	1332,9	2,23	2,27
23	419 24h 5	9,8	1138,2	2,21	1,76
24	419 24h 7	9,9	1243,9	2,24	2,38
25	419 24h 8	10	932,4	2,24	2,16
26	R7B 48h 1	9,8	742	2,25	1,91
27	R7B 48h 2	10	823	2,25	2,39
28	R7B 48h 3	10	653,7	2,25	2,45
29	R7B 48h 4	10	535,6	2,3	2,51
30	R7B 48h 5	9,9	933,6	2,26	2,48
31	R7B 48h 6	9,7	673,2	2,26	2,5
32	R7B 48h 7	9,9	1023,2	2,26	2,59
33	R7B 48h 8	9,8	1006,2	2,26	2,43
34	411 48h 1	9,9	456,9	2,19	1,98
35	411 48h 2	10	572,8	2,29	2,3
36	411 48h 4	N/A	756,9	2,27	2,51
37	411 48h 6	10	652,1	2,27	2,39
38	411 48h 7	10	464	2,18	1,68
39	411 48h 8	10	367,4	2,21	2,07
40	413 48h 1	8,9	378,4	2,18	1,73
41	413 48h 2	10	1034,6	2,24	2,19
42	413 48h 3	10	819,7	2,25	2,2
43	413 48h 4	9,9	333,7	2,17	1,42
44	413 48h 5	9,1	693,7	2,29	2,49
45	413 48h 6	8,8	739,7	2,25	2,44
46	419 48h 1	9,9	571,1	2,16	2,41
47	419 48h 2	10	662,7	2,26	1,76
48	419 48h 3	N/A	968,4	2,26	2,55
49	419 48h 4	N/A	889,1	2,28	2,51
50	419 48h 5	10	942,2	2,26	2,24
51	419 48h 6	10	1117,5	2,26	2,25
52	419 48h 7	10	459,6	2,18	1,96
53	419 48h 8	10	629,2	2,29	2,41

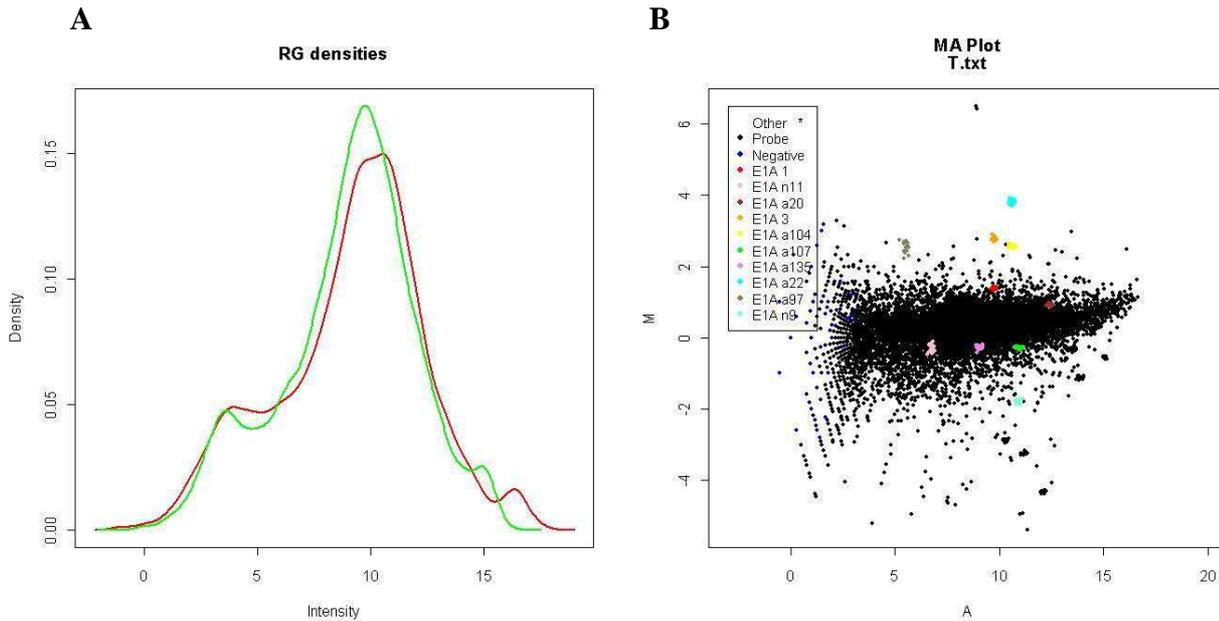


Figura 13. Análisis de los datos brutos extraídos de las micromatrices. **A.** Gráfico de densidad de una micromatriz concreta. Las líneas verde y roja indican las intensidades emitidas por los fluoróforos Cy3 (canal verde) y Cy5 (canal rojo), respectivamente. **B.** Gráfico MA, que muestra la relación entre el logaritmo de la razón entre las intensidades (M) ($\log_2 R/G$) y la media del logaritmo de las intensidades (A) ($1/2 [\log_2 R + \log_2 G]$). Los puntos de colores representan las intensidades emitidas por sondas utilizadas como control (Agilent).

Dado que es de esperar que la mayoría de los genes no muestren expresión diferencial, la mayoría de los valores de M deben ser próximos a cero y aquellos con expresión diferencial se representan como puntos que sobresalen de ese valor medio. La comparación de los valores de M de todas las micromatrices puso de manifiesto la necesidad de normalizar, aunque en todas ellas los valores medios estaban alrededor del cero. Los datos brutos se sometieron a un tratamiento estadístico para su normalización, utilizando Bioconductor con los paquetes para el análisis de micromatrices Limma y Marray. El tratamiento estadístico consistió en tres pasos:

-Sustracción de fondo, utilizado para eliminar puntos con valores de fondo anormalmente altos. Para ello se utilizó el método *normexp* con *offset = 10*.

-Normalización intramatriz, utilizada para corregir sesgos en el marcado con Cy5 y Cy3. Se utilizó para ello el método *loess*.

-Normalización intermatriz, utilizada con el fin de hacer los datos de las distintas micromatrices comparables. El método utilizado fue *Aquantiles*.

Tras estas normalizaciones se observó que todas las micromatrices presentaron una distribución de densidades homogéneas para los dos canales (**Figura 14A**) y una distribución de intensidades (valores de M) homogéneos y comparables (**Figura 14B**), indicando que los datos de todas las micromatrices son perfectamente comparables entre si. Los datos normalizados se ajustaron a un modelo lineal y a un modelo bayesiano empírico con el fin de extraer los genes con expresión diferencial significativa. Para ello se utilizó un análisis del tipo *canales separados*, que consiste en separar cada canal como una matriz independiente. De esta forma, se realizaron las distintas comparaciones y se identificaron aquellas sondas que mostraron expresión diferencial con un valor p-ajustado inferior a 0,05 (95% de confianza estadística), nivel establecido como umbral de confianza. Dada la magnitud de los datos obtenidos, y para simplificar el análisis de los mismos, se analizaron exclusivamente los genes que mostraron expresión diferencial significativa en las comparaciones entre los distintos mutantes y el silvestre, lo que nos permitiría obtener un listado completo de los genes regulados directa o indirectamente por la maquinaria de silenciamiento génico.

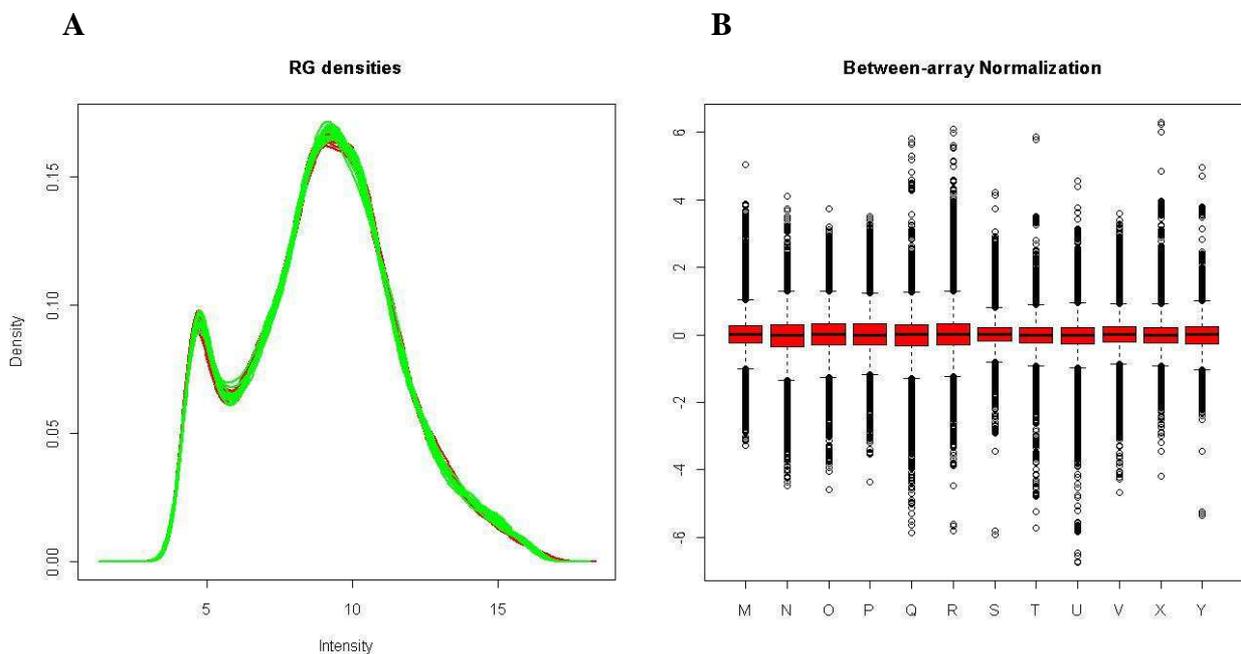


Figura 14. Análisis de los datos normalizados. **A.** Gráfico de densidades para todas las micromatrices. Las líneas verde y roja indican las intensidades emitidas por los fluoróforos Cy3 (canal verde) y Cy5 (canal rojo), respectivamente, para cada una de las micromatrices. **B.** Gráfico MA de las distintas micromatrices. Representación de los valores M de las distintas micromatrices mostrando que, en todos los casos, los valores medios de M son próximos a cero y las distribuciones homogéneas. La línea central de las cajas señala el valor medio de M y el grosor de cada caja indica la dispersión de los datos. Los círculos negros indican valores de M con diferencias significativas respecto al valor medio

II.17.2. Análisis transcriptómicos mediante RNAseq

Las estirpes utilizadas para la secuenciación del transcriptoma fueron incubadas en medio rico YPG durante 24 y 48 horas en condiciones de luz continua. Se congelaron muestras de micelio de 150 mg que se trituraron en un mortero hasta conseguir un polvo fino, extrayéndose las muestras de RNA mediante la utilización del RNeasy Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del suministrador. Las muestras se enviaron a la empresa BaseClear B.V. (Leiden, Holanda) para la construcción de las librerías de cDNA y su posterior secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo mediante la plataforma Illumina (Illumina Genome Analyzer IIa). Las lecturas en formato FASTQ fueron generadas mediante la aplicación Casava de Illumina (versión 2). Una vez eliminados los adaptadores de las lecturas, éstas se sometieron a análisis de calidad usando el programa FASQC. La **Tabla 8** muestra el número total de lecturas realizadas en cada una de las muestras, así como la calidad de las mismas. Un valor de Phred mayor de 30 indica que la probabilidad de que una base concreta haya sido correctamente asignada es mayor de 99,99%. Los datos crudos de secuenciación fueron analizados bioinformáticamente por el Dr. Simon Moxon de la Universidad de East Anglia (Reino Unido), siguiendo el protocolo descrito previamente (Nicolás *et al.*, 2010). La comparación de los datos normalizados de las distintas muestras permitió identificar genes con expresión diferencial, utilizando como umbral de confianza un valor p-ajustado menor de 0,05 (95% de confianza estadística).

Muestras	Número de lecturas	Rendimiento (en Mb)	Valor medio de calidad (Phred)
WT 24h	17,840,327	909	37.68
WT 48h	15,162,239	773	37.73
<i>ago-1</i> 24h	21,389,732	1,090	37.66
<i>ago-1</i> 48h	18,416,564	939	37.69
<i>dcl-1</i> / <i>dcl-2</i> 24h	18,878,811	962	37.77
<i>dcl-1</i> / <i>dcl-2</i> 48h	15,765,254	804	37.73
<i>rdrp-1</i> 24h	17,037,660	868	37.61
<i>rdrp-1</i> 48h	14,178,203	723	37.57
<i>rdrp-2</i> 24h	15,760,260	803	37.73
<i>rdrp-2</i> 48h	12,008,722	612	37.73

Tabla 8. Número de lecturas y calidad de las mismas en los experimentos de secuenciación de RNA.

III. RESULTADOS

III. 1. Caracterización de la maquinaria de silenciamiento.

Como se ha indicado en la Introducción (ver apartados I. 2. 3 y I. 3. 2), nuestro grupo ha identificado y caracterizado los principales genes que participan en el mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA en *M. circinelloides*: dos genes *dicer* (*dcl-1* y *dcl-2*) (Nicolás *et al.*, 2007; de Haro *et al.*, 2009), un gen que cifra una proteína de unión a dsRNA (*r2d2*) (Calo, 2010), tres genes que cifran RNA polimerasas dependientes de RNA (*rdrp-1*, *rdrp-2* y *rdrp-3*) (Calo *et al.*, 2012 y nuestros resultados no publicados) y tres genes *argonauta* (*ago-1*, *ago-2* y *ago-3*) (Cervantes *et al.*, 2013). El gen *dcl-1* no interviene en la ruta de silenciamiento inducido por transgenes, aunque juega un cierto papel en el mecanismo de silenciamiento endógeno, donde es responsable de la producción de un grupo de ex-siRNAs (Nicolás *et al.*, 2010). El gen *dcl-2* desempeña un papel principal tanto en la ruta de silenciamiento inducido por transgenes, donde es responsable, junto al producto del gen *r2d2*, de la producción de los siRNAs de 21- y 25-nt, como en el silenciamiento endógeno, donde dirige la producción de la clase mayoritaria de ex-siRNAs. Las proteínas cifradas por los genes *rdrp-1* y *rdrp-2* presentan diversificación funcional, ya que actúan en distintos pasos de la misma ruta de silenciamiento. La proteína RdRP-1 es esencial en la inducción del silenciamiento cuando éste es activado por transgenes “con sentido”, siendo dispensable cuando éste se induce directamente por moléculas de dsRNA. Además, es la proteína RdRP que juega el papel más importante en la producción de los esRNAs, siendo necesaria para la biogénesis de varias clases de ex-siRNAs. La proteína RdRP-2, por su parte, está implicada en el proceso de amplificación del silenciamiento que da lugar a los siRNAs secundarios y participa en la producción de algunos ex-siRNAs. Además, *Mucor* presenta tres genes *argonauta*, de los cuales únicamente *ago-1* está implicado en el mecanismo de silenciamiento génico, tanto exógeno (inducido por transgenes) como endógeno.

Con el objetivo de completar el análisis funcional de la ruta de silenciamiento que opera en *M. circinelloides*, se llevaron a cabo los experimentos que se detallan en los siguientes apartados: clonación y caracterización del gen *qip* y análisis de su participación en la ruta de silenciamiento génico inducido por transgenes; análisis de las posibles interacciones entre proteínas que participan en el mecanismo de silenciamiento, para establecer la posible existencia de complejos macromoleculares, y obtención de un doble mutante *rdrp-1/rdrp-2* para comprobar la posible redundancia entre ambos genes.

III. 1. 1. Identificación y caracterización del gen *qip* de *M. circinelloides*.

El gen *qip* (*qde-2 interacting protein*) de *N. crassa* cifra una proteína esencial en el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes en este hongo (Maiti *et al.*, 2007). La proteína QIP es una exonucleasa que interacciona con la proteína Argonauta de *N. crassa* (denominada QDE-2) y degrada la cadena “pasajera” del siRNA de doble cadena, permitiendo que la cadena guía de dichos siRNAs pueda identificar a los mRNA complementarios y mediar su degradación. La proteína QIP es, por tanto, necesaria para que tenga lugar la activación del complejo RISC, ya que debe eliminar la cadena “pasajera” del siRNA, una vez que ésta ha sufrido un corte endonucleolítico por QDE-2.

El papel de *qip* en el mecanismo de silenciamiento sólo se ha demostrado, hasta la fecha, en *N. crassa*, un hongo muy alejado evolutivamente de *M. circinelloides*, y más recientemente, en el parásito humano *Trypanosoma brucei* (Barnes *et al.*, 2012). Con el objetivo de identificar nuevos elementos de la maquinaria de silenciamiento de *Mucor* nos dispusimos a la búsqueda de secuencias homólogas al gen *qip* de *N. crassa* en el genoma de *M. circinelloides*.

El análisis *in silico* reveló la existencia de una secuencia que cifra una proteína con cierta similitud con la proteína QIP de *N. crassa* (BLOSUM62), presentando una identidad global del 15,2% y una similitud del 25,5%. La secuencia anotada en el genoma de *Mucor* (ID 110517) incluye un dominio Ribonucleasa H similar al presente en las proteínas QIP de *N. crassa* y *T. brucei*, por lo que se denominó provisionalmente gen *qip* a la secuencia identificada en *Mucor*.

III. 1. 1. 1. Clonación del gen *qip*.

Una vez identificado el gen *qip* en la secuencia de *M. circinelloides*, se procedió a la amplificación mediante PCR de la región genómica que contiene dicha secuencia. Para ello, se amplificó un fragmento de aproximadamente 3,35 kb, que contiene el gen *qip* (1,1 kb) y las secuencias adyacentes a éste: 1042 pb aguas arriba del codón de iniciación de la traducción y 1200 pb aguas abajo del codón de terminación (**Figura 15**).

Figura 15 (parte 1)

TAGCGGCTGCTGATGCGCTTCGAAACGAAAAGAACTTTTTGTGAGTGTATTGCATAAA
 GCAAAAGACTGCGCGGCTAACAGCAATGATAGTGTACTGAGCGAATTGAGCCGCCAA
 CTGGGCACTGTGATTGCATTATGGGAAGAATCCCCAAAATCGAGCCTCATCTTCAGC
 AACTGCGTCGCAATGTGTTTGGATCATTGGTGAAGGCTCTTGGCTGGAAGAACTTTAA
 GACTGACCCCGAGCTGTACAACCTGTTGCGTGTGTTGGTGTATCAGCGAAGCCGGTTTG
 GCAGGCGATCAGGACGTCATTGACGAAGCAAAGAAGCGATACAGCCAGTTCATTGGC
 GCGGATCATGACGCTTTATCTCCTGACTTGAGAAGTATCGTGTATCGAATCGTGCTGA
 AAAACGCGGCCGATGAGCAGGAAGAGGACCGAATCTGGCAAGAGATTTTCAGCATCT
 ACAAGAACGAGGCCCTCCCCGTAGACCAGCAGGTGACAGCATTGACATCGCTAGGCT
 ACAACATCAAGAGCGACCGGGTGATTCGCAAGACTCTGGATCTGATTTTGGACGACCA
 GCAAGTCCGTACGCAGGACGCCTGGATGTTTTTCAAGGGGTAAGCAGGAATGTTGCGT
 GCATTTTCCATCGCCACTGCTAACTCTGGAACGTAGACTGGGCGCAATTTCCATGCTC
 GCTACCAGCTGATTGACTATTTTGAGGGCAACTACGACAAGATTTACAAGCGCTTCTC
 CAAGTCGATGGGGGCATTGGGCAATGCAGTCAATTACATGATTTCTGGGTTCAACAAT
 GCGCACAAAATCCAGCAGATGGAGAGCTTCTTTGCCTCCAAGACACGCGCGAGTACT
 CTCGCAGCCTGAATGGGGCTTTGGAGAAGGCCAGAGTGAATGCAGCATTGATTGAAA
 GAGAGGGGTCAAATATGCAGAAGTGGGCACGCTCCAGAGAACAGACGCTGAGTTGAA
 TAAATCAAATAGCAGAGGGATTTTATCTTTCTTTCTTTCTTTTATACCTCAATCAGA
 CATGAAAAGGAGTACTGTCTTGGCTGGCATCTAGTGTATGACGCATTGCGGAGACTAC
 TACTACAGCTACGGTGAGTCGGCACAGAAACGGTTTAATCACTTTTATGATCCTGTGC
 ACTTTTTTGCGCCAGAATCACTGACAGTTGGCATTCCCTCTGAGTATCGGTGAGCATCGC
 TTGTGACAACAGTGCGCCGCCATTGACTGACAGCAGTGGATTAGGGGCCCATGCGGGC
 ACATGTGAAGTCGTCATGCCTCGCCACATTTACGAGCAATTGGTGTCGTTTCATCCACCA
 AGAGATCCAGAGGTACCCGAATTTAGCTGGAGACCTTGACACCGGTTGAATACGAG
 ATCATTGAGCGCTTCGAAGCCTTTGCGTCCAACGTGCTCAGTAAAAGCCATCAAAAAG
 CAAAAAGAAGACAAAGCAGCTCAACCGCATTGCCAAGCACACGAAGAAGCAGCAT
 TAGCCAAACGGCTGGTCAACTCGAGCAACTATGTCTTTGTGAGCATCGATATTGAAGC
 GTACGAGAAAGACCATTGATTTTGCTGGAAATTGGATGGTCCATGTACGATGCAAGC
 ACCAATACATGCATGGATCAGCACTACATTAATGATCAGTACCGCCATTTGCTCAATG
 GCCAATTTGTGGAGGATCAGAAGGAGAAATTCAACTACGGCACGTCTGTCTGGTGTTT
 CCTGAAGCAGGCCCTGATTGAATTACGAAAGGATTTGGATTGGGCTGTGAAACGCGAT
 GCGGGGTTTGTGCTTGTGGACATGGTTTAGACAGCGATCTCAAATACTTGGCAAAGC
 AGCACTTTCTTGGCCAGGCAGACACGGTGGCGATGTCGCCAGTGTCCAGGAGTCGGC
 CAATGTTGCTATATTGAACACAGACACCATTTATGGATCCTCTATCAATGACTTGCACA
 ACCCGCCATCGCTCGGAAAGACGCTCGCTTTGTTTGGCATTGACACATGGAATCTGCA
 TAATGCTGGTAAGTTGCTTTTCGAGGTGCCTGAAAGATGGAGTCTGATCCGTGCACTA

Figura 15 (parte 2)

GGTAATGATGCCATTATACCTCCTGCTCCTGCTGAAGCTTGTCCATGACCACTGCGA
CATCTAAAGACGCACACTGGAACGATCCACATCCGCTCCACGTAGATTTTCTCGGGC
 TATTTTCTCATCAGATAACGGTCAATTGCTGTTAAGGCTATTTCTCCGCTTTTGATCCA
 TCCACATGCATCAAACCAGCAAAGACAAGGCCTCTTTCATCACGTACAAAATGCACCA
 AAATCACACGCAAATAGTCATGAATGAATATGT**AATAAA**CTTTTCTTTATCAGTCATC
 CGCTTCCTAAACCAGTTGAAAATGCGGGGGGTGACAGACGCAACCATCCAATGACAT
 GATAACTACATGCTCAGTGCTACCATGTTTTGCACCTGAAATCACACAAATTCCATCG
 GATAACATCACACTTGAACAAGATGGAAGAATAAGCCACTTTTAAGACATGATCCATT
 CCCTTTTCTTTTCTTTTCTTTATCTCTCTTTCTCCTTTCCTTGAAACCCAAAACACT**ATG**
 CAATCCATCTCGAGAACACTGGGAGGTACGACAGTTACAAAAGGGATCCACGCGGGG
 TCTGTATGCGGTGAATTAAGCTTTTTATATTTTTCAGGTACTATTGTTGCAACAGCAG
 CAGCAGACTTTCATCCAGATCAGCTACACATGCTCCAATTCAAAGACGCCTCTATGCG
 ACTGAAGCTGCCCAATCAGCAAAGAAGTTCTCAAAGTGGTCCATGCTTAAGAACGGCG
 TCAA AATTGGCCTTG TAGGCGGTATTTCTATGGCTGTTATGGTAAGCGCAAGAGGCA
 TAGAATGTAGTGGGGGATCTTATTCACCTGTCCCGACGTAGAGATGTATGTGCAAAGA
 CATCCCTCCGCTCAAGCTGACGTGGATCCTGAAAAGAAGACCATTGTCGTCTTGGGCA
 GTGGCTGGGCCAGTACATCGTTCCTCAAAGACATTGATACCGACCACTACAATGTGGT
 AAGCTGTGTGCAATGTATGATGTTATCTGGACGTTATCGTAATGCGCTATCTTTAGGTC
 GTCGTATCTCCTCGCAACTACTTTTTGTTCACTCCTTTGCTGCCTAGCTGCACCGTAGGC
 ACCATTGATATCCGCTCTCTGGTGGAGCCTACTCGCTTCATTGCTCGCCACAAGTCGAG
 AACTGTCAAGGTGGTTGAAGCTGAGTGCCTCATATCGACCCAGAGACAAAATCCATC
 ACAATCACTGGTAAGACGCGCACGCCTGCATGGCGTAT

Figura 15. Secuencia genómica completa del gen *qip* y regiones adyacentes. La secuencia en color rojo corresponde al gen *qip*, indicándose en negro los dos intrones que posee. Las regiones adyacentes a dicho gen se muestran en verde. En fondo gris se indican los codones de inicio y fin de mensaje del gen *qip*. Fondo amarillo: secuencia CAAT del promotor. Se subraya en verde la posible región promotora rica en pirimidinas. Fondo turquesa: secuencia de poliadenilación.

Los oligonucleótidos diseñados para llevar a cabo la amplificación de dicha secuencia se denominaron Qip1 y Qip2 (**Tabla 5, ver Materiales y Métodos**) y llevaban incorporadas secuencias de restricción para las enzimas *XbaI* y *Sall*, respectivamente, con el fin de que el producto amplificado pudiera clonarse fácilmente. El fragmento amplificado a partir de DNA genómico de la estirpe silvestre se clonó en el vector pBluescript II SK+, dando lugar al plásmido pMAT1501 (**Figura 16**).

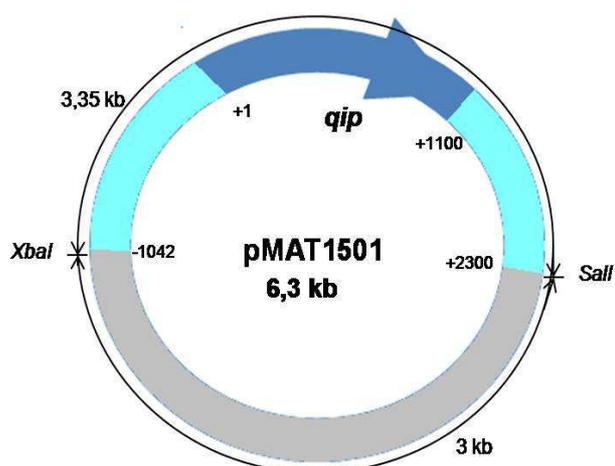


Figura 16. Plásmido pMAT1501 portador del gen *qip* completo y regiones adyacentes. Se muestran los puntos de corte utilizados para la clonación. Los números corresponden a posiciones de la secuencia del gen, siendo +1 la posición correspondiente al primer nucleótido del triplete de iniciación de la traducción. En azul oscuro se representa el gen *qip*, en azul claro las secuencias adyacentes, y el color gris corresponde al vector de clonación.

III. 1. 1. 2. Secuencia de aminoácidos de la proteína Qip.

El análisis bioinformático de la secuencia de nucleótidos del gen *qip* predice la existencia de dos intrones. Dichos intrones fueron comprobados experimentalmente mediante la comparación de la secuencia genómica con la del cDNA generado a partir del mRNA del gen (ver apartado II. 10. 4). Dichos experimentos permitieron también identificar la secuencia de poliadenilación, localizada 202 pb aguas abajo del codón fin de mensaje UAA (Figura 15). La proteína Qip deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen consta de 334 aminoácidos (Figura 17), y tiene un peso molecular estimado de 38,28 kDa y un punto isoeléctrico de 6,09.

El análisis de la secuencia en la base de datos de EMBL-EBI (InterProScan) pone de manifiesto la existencia de un dominio Ribonucleasa H con los tres motivos característicos de las exonucleasas 3'-5' de la superfamilia DEDDh. Dichos motivos poseen residuos ácidos críticos (D y E en el motivo I; H y D en el motivo II; H y D en el motivo III), siendo la Histidina del motivo III esencial en la actividad exonucleasa. Todos esos residuos conservados se encuentran presentes en la proteína Qip de *M. circinelloides* (Figura 17).

MEKEYCLGWHLVYDALRDYYSYGESAQKRFNFYDPVHFFAPESLTVGIPLSIGAHAGTC
 EVVMPRHIYEQLVSFIHQEIPVPEFQLETLTPVEYEI IERFEAFASNVLSKSHQKAKKKT
 KQLNRIRQAHEEAALAKRLVNSSNYVFVSIDIEAYEKDHSILLEIGWSMYDASTNTCMDQH
 YINDQYRHLNNGQFVEDQKEKFNYGTSVWC SLKQALIELRKDLDWAVKRDGGFVLVGHGLD
SDLKYLAKQHFLWPGRHGGDVASVQESANVAILNTDTIYGSSINDLHNPPSLGKTLALFGI
 DTWNLHNAGNDAHYTLLLLLKLVDHDCI

Figura 17. Secuencia de aminoácidos de la proteína Qip de *M. circinelloides*. En rojo, azul y rosa se indican los motivos I, II y III, respectivamente, del dominio Ribonucleasa H. Se señalan subrayados y en negrita los residuos críticos de cada motivo.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína Qip de *M. circinelloides* con proteínas similares de otros hongos mucorales secuenciados, reveló una mayor similitud (61% de identidad) con la proteína Qip de *Rhizopus oryzae* (ID RO3G_10194.3; http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html) que con las proteínas QipA (ID 79613) y QipB (ID 162641) de *Phycomyces blakesleeanus* (<http://genome.jgi-psf.org/Phybl2/Phybl2.home.html>), presentado con ellas una identidad del 48% y 50%, respectivamente (ClustalW) (**Tabla 9**). Todas las proteínas Qip de mucorales contienen los residuos conservados del dominio exonucleasa (**Figura 18**). Aún así, los bajos porcentajes de identidad que mantienen las proteínas Qip de mucorales respecto a la de *N. crassa* ponen de manifiesto la distancia evolutiva entre estos grupos de hongos.

	Qip <i>M. circinelloides</i>	Qip <i>Neurospora crassa</i>	Qip <i>Rhizopus oryzae</i>	QipB <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	QipA <i>Phycomyces blakesleeanus</i>
Qip <i>M. circinelloides</i>	-	-	-	-	-
Qip <i>Neurospora crassa</i>	15,2%	-	-	-	-
Qip <i>Rhizopus oryzae</i>	61%	14,3%	-	-	-
QipB <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	50%	15,6%	43,9%	-	-
QipA <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	48%	13,8%	45,6%	45,2%	-

Tabla 9. Porcentaje de identidad de la proteína Qip de *M. circinelloides* con proteínas similares de otros hongos.

```

M.c. qip      --MEKEYCLGWHLVYDALRDYYSYGESAQKRFNHFYDPVHFPAPESLTVGIPLR---A 54
R.o. qip     MLVKVLNSYEWNVQVYSAWRRYYEQLGQ--QAFTAFFEPEKFPAPDGNTVGIPLKLGK-T 57
P.b. qipB    --MNDNGYVNWSDVKETWYNQYTNHYGEASLNVI RHLFEPEKFFAEESTTVNMP IFTGKDP 58
P.b. qipA    ---MVKTYFPWSPVKDSWYKQYHPYGEI IQRIRPVLEATQLFEPPEL PEN--AFYTGQ-N 54
              * * .: * *: : . . : * : .:

M.c. qip     HAGTCEVVMPRHIYEQLVSPFIHQEIP--EVPEFQLETLTPVEYEI IERFEAFASNVLSKS 112
R.o. qip     FSGEHNVMVSVQIYKQLLNHFTEQFP--NVPPFPDDELVI KKYQVIEPFKATNNILSKY 115
P.b. qipB    ITQERVFLIHSLVCAQLQQLALVTNRRGLPDPVMPSPFORQNYIELSPCNIDNPQAYKKM 118
P.b. qipA    SNGVVSVYITAEALEKVRQLELVNTR-EILLFPDP ISEQPEPVDLEVQELTSTVALLRL 113
              . : : : : : : : : : : :

M.c. qip     HQAKKKTQQLNRIRQAHEEAALAKRLVNSS-NYVFSIDIEAYEKDHSILLEIGWSMYD 171
R.o. qip     KSKAKKLNKQREIEKAHQEVQLAKRLVI SEKNYMFIAIDIEAYERDHSI ILELGWSIFD 175
P.b. qipB    EKEVAKMKNGRDRLRVAKEELKLAHALIEAK-QYVFSLDIEAYEEDHSILLEIGWSIYD 177
P.b. qipA    SKRVKKINKRNERMKQAEELKMSKELIEKK-KNVFCSIDIEAWERDQSLLEIGWSMYD 172
              ... * . * : * . * : * : * : . : * : * * * : * . * : * * * : *

M.c. qip     ASTNTCMDQHYINDQYRHLNNGQFVEDQKEKFNHYGTSVWC SLKQALI ELRKDLDWAVKRD 231
R.o. qip     SRKNRFMDQHYLIDSYAHLNNGTFVEDQKLFSPGTSVWC SLAQALKELRKDLDWAVERD 235
P.b. qipB    SKTDLYMDQHYINSSYRHLVNGKYVDNQKLRFPQFGTSVWC TLKQALEELRKDLDWAVERD 237
P.b. qipA    SKTDLYMDQHYLINTYKHLKNGNFVEDNKLRFQFGTSVWSTLPQALNELKKDLDWAVERD 232
              : . : * * * * : . * * * * : * : * : * * * * : * * * * * : * * * * * : *

M.c. qip     GGFVLVGHGLSDKYLAKQHF LWP-----GRHGG--DVASVQESANVAI LNTD 278
R.o. qip     GGFVLVGHGLSSDLKYLKQKFMWP-----AVNGG--EVL DVNQSACIAI VNTD 282
P.b. qipB    GGFVLVGHGLSDIKYLATQKFKWPGRCINGSGSGSGGRGG--DVDNVRISA AVAI LNTD 295
P.b. qipA    GEVILVGHGFESDLKYLKHKFRWP-----GTRPGENDESDVHKS AVTWI LNTD 281
              * . : * * * * : * * * * : * * * . . * : . * . * * : * * *

M.c. qip     TIYGSSINDLHNPPSLGKTLALPGIDTWNLHNAGNDAHYT LLLLLKLVDHDCDI----- 332
R.o. qip     TIYGSSINDLHNPPSLGRTL DDLG IETWNLHNAGNDAHYT MLLPFLTVNYEG----- 334
P.b. qipB    TMYGASIGNPTNPPSLGTTLSKVGIDAWCLHNAGNDAHYT LLLPMTLINSTRATHGSG-- 353
P.b. qipA    TLYAASIHDLHNPPSLGKTLKLFIDITWCLHNAGNDAHYT LQLPLALVSKENEERLRK LK 341
              * : * . * * : * * * * * * . . * : * * * : * * * * * : * : * :

M.c. qip     -----
R.o. qip     -----
P.b. qipB    -----
P.b. qipA    EEKEQGTPTG 351

```

Figura 18. Alineamiento múltiple de proteínas Qip de varios mucorales: *M. circinelloides* (*M.c.*), *R. oryzae* (*R.o.*) y *P. blakesleeanus* (*P.b.*). Las barras indican los motivos I, II y III del dominio Ribonucleasa H.

III. 1. 1. 3. Análisis de la expresión del gen *qip*.

Con el fin de determinar si el gen *qip* identificado es transcripcionalmente activo, se realizó un experimento de hibridación tipo Northern. Para ello, se prepararon cultivos líquidos de la estirpe silvestre en medio mínimo YNB pH 4,5 y se incubaron en condiciones de oscuridad durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se obtuvieron muestras de RNA a partir de micelios expuestos a diferentes periodos de luz continua (**Figura 19**), y se hibridaron, en condiciones restrictivas, con una sonda de 1050 pb

correspondiente al gen *qip*, obtenida mediante la digestión del plásmido pMAT1501 con las enzimas *ScaI* y *HindIII*.

La hibridación permitió detectar un único transcrito de aproximadamente 1,1 kb que corresponde al tamaño esperado del RNA mensajero del gen *qip*. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el gen *qip* se expresa durante el crecimiento vegetativo de *M. circinelloides*, dando lugar al transcrito esperado y apoyando la funcionalidad de la secuencia clonada. Así mismo, permiten sugerir que, a diferencia de otros genes implicados en la maquinaria de silenciamiento, su expresión no se induce por la luz.

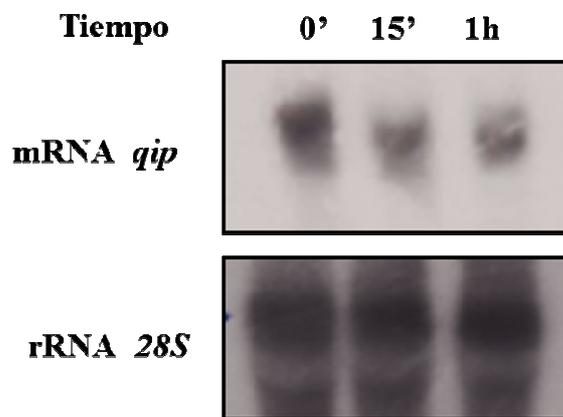


Figura 19. Expresión del gen *qip* de *M. circinelloides*. Muestras de RNA total (50 µg) procedentes de micelios de la estirpe silvestre incubados durante 48 horas en condiciones de oscuridad e iluminados con luz continua durante distintos periodos de tiempo, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se hibridaron con una sonda del gen *qip*. Como control de carga, la membrana se rehibridó con una sonda del rRNA 28S.

III. 1. 1. 4. Análisis funcional del gen *qip*.

Con el objetivo de estudiar si el gen *qip* de *M. circinelloides* participa en el mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA, se procedió a la obtención de un mutante nulo para este gen mediante la estrategia de remplazamiento génico.

III. 1. 1. 4. 1. Disrupción del gen *qip*.

El primer paso para la generación de un mutante *qip*⁻ es la construcción de un vector portador de un marcador seleccionable flanqueado por secuencias adyacentes al gen

que queremos interrumpir (en algunas ocasiones se llegan a incluir secuencias de los extremos del propio gen). En este caso, el marcador utilizado fue el gen *pyrG*, que complementa la auxotrofía para uracilo. Con esta construcción se transformará la estirpe MU402 de *M. circinelloides*, que presenta auxotrofía para uracilo y leucina (Leu^- , Ura^-). Si se produce recombinación homóloga por las regiones adyacentes al gen *qip*, el marcador *pyrG* se integrará reemplazando la secuencia *qip* y obteniéndose el mutante nulo *qip*⁻ (Leu^- , Ura^+) (Figura 20).

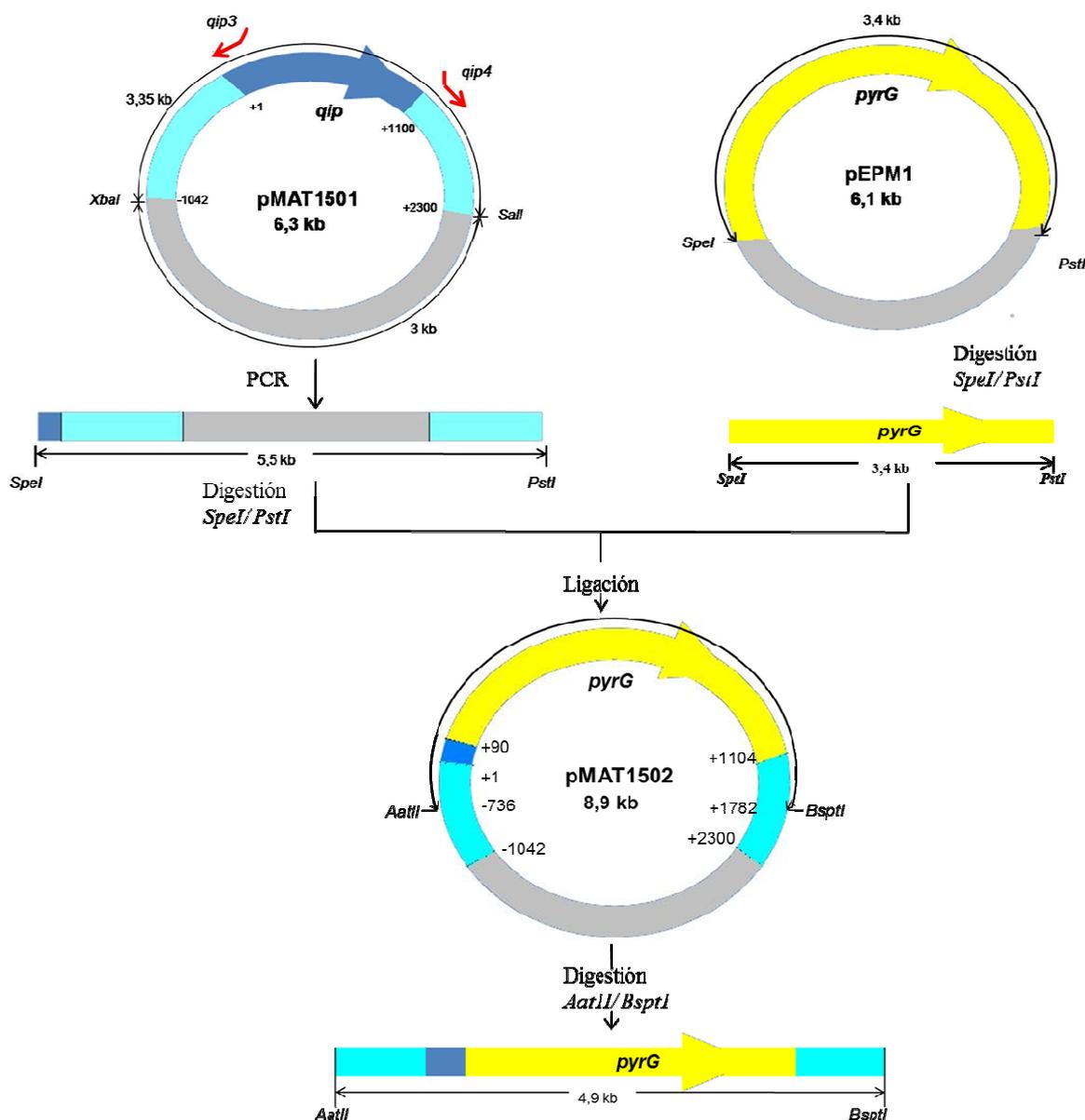


Figura 20. Construcción del plásmido pMAT1502, portador del inserto empleado para la interrupción del gen *qip*. La digestión de pMAT1502 con las enzimas de restricción *AatII* y *BspI* libera un fragmento de interrupción de 4,9 kb, que consta del marcador seleccionable *pyrG* (amarillo) flanqueado por secuencias adyacentes al gen *qip* (azul), necesarias para que tenga lugar la recombinación homóloga y la consiguiente interrupción del gen *qip* por el marcador *pyrG*.

Para generar el vector portador del fragmento de interrupción, se utilizó el plásmido pMAT1501, que contiene clonado el gen *qip* y secuencias adyacentes a éste. Dicho plásmido se utilizó como molde para realizar una PCR inversa con los oligonucleótidos Qip3 y Qip4 (Tabla 5, ver Materiales y Métodos), que incluyen los puntos de corte *SpeI* y *PstI*, respectivamente, ambos orientados hacia los extremos del gen (Figura 20). El resultado de esta PCR fue un fragmento que presenta en los extremos las secuencias adyacentes a *qip*, y que fue digerido con las enzimas *SpeI* y *PstI* para ligarlo posteriormente al fragmento de 3,4 kb que contiene el gen *pyrG*, obtenido mediante la digestión del plásmido pEPM1 con las mismas enzimas (Figura 20). Tras dicha ligación, se obtuvo el plásmido pMAT1502, en el que el gen *pyrG* sustituye 1024 pb de la región codificadora del gen *qip*, y se encuentra flanqueado por secuencias adyacentes a *qip*. La digestión con las enzimas *AatII* y *BspI* permite liberar un fragmento lineal de 4,9 kb, que contiene suficientes secuencias aguas arriba (826 pb) y aguas abajo (678 pb) de *pyrG* para asegurar su integración por recombinación homóloga en el locus *qip* (Figura 20). Dicho fragmento se utilizó para transformar la estirpe MU402 de *Mucor* y generar el mutante nulo *qip*⁻ mediante remplazamiento génico (Figura 21).

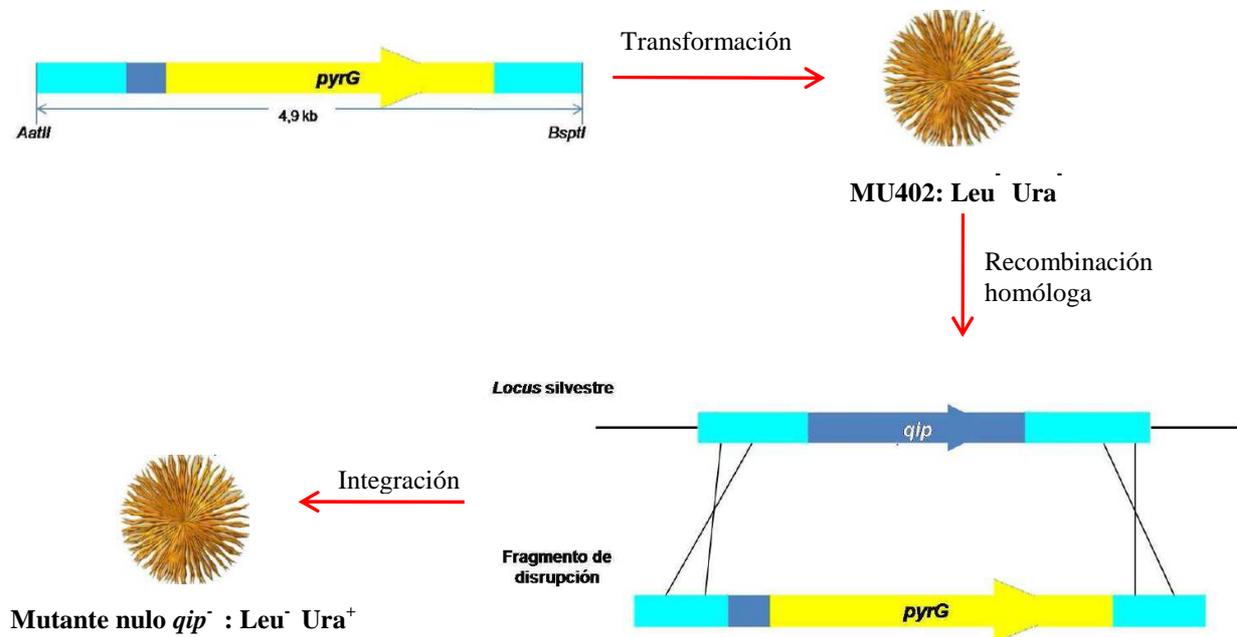
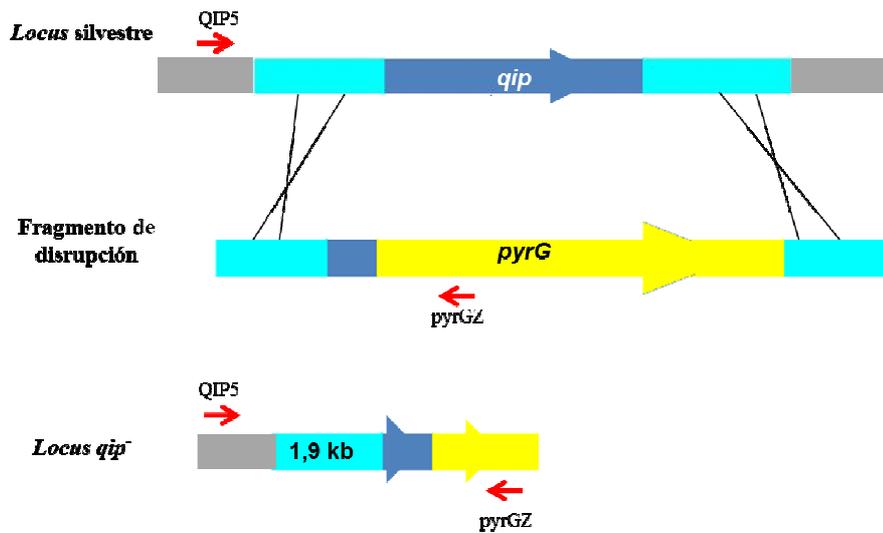


Figura 21. Representación esquemática del proceso de generación del mutante nulo *qip*⁻.

Tras llevar a cabo los experimentos de transformación de la estirpe MU402 con el fragmento de disrupción lineal, se obtuvieron 103 transformantes *pyrG*⁺ en medio mínimo MMC. Debido a que las esporas de *M. circinelloides* son multinucleadas, los transformantes son inicialmente heterocariontes, es decir, poseen núcleos transformados y núcleos silvestres. Para conseguir individuos homocariontes es necesario someterlos a sucesivos ciclos de crecimiento vegetativo en medio selectivo (Navarro *et al.*, 2001). El incremento de núcleos transformados se estima determinando el porcentaje de individuos *pyrG*⁺ derivados de cada transformante (**ver apartado II. 7**). Los 103 transformantes fueron sometidos a cuatro ciclos de crecimiento vegetativo en medio MMC. Una vez valorado el porcentaje de núcleos transformados de cada individuo tras cada ciclo de crecimiento, se seleccionaron 37 transformantes que presentaron un porcentaje de núcleos *pyrG*⁺ próximo al 100%, indicativo de que la integración del fragmento ha tenido lugar en todos los núcleos. El resto de individuos fueron desechados por presentar porcentajes de núcleos transformados muy bajos, variables o sin tendencia a incrementar tras sucesivos ciclos. Mediante amplificaciones por PCR se analizó si los transformantes seleccionados habían integrado el fragmento por recombinación homóloga en el *locus qip*, obteniéndose el mutante nulo *qip*⁻; o si el elevado porcentaje de núcleos *pyrG*⁺ se debía, por el contrario, a una integración ectópica del fragmento o a una recombinación en el *locus pyrG*. Para las reacciones de amplificación se utilizó como fuente de DNA micelio fresco de los transformantes (**ver apartado II. 8. 1**).

La amplificación se llevó a cabo con el oligonucleótido *pyrGZ*, que hibrida con la secuencia del marcador *pyrG*, y el oligonucleótido *Qip 5*, que hibrida con una secuencia adyacente al gen *qip*, que no estaba incluida en el fragmento de disrupción (**Tabla 5, ver Materiales y Métodos**) (**Figura 22A**). Esta pareja de cebadores permite la amplificación de un fragmento de 1,9 kb únicamente en el caso de que haya ocurrido el reemplazamiento del gen *qip* por el marcador *pyrG*. De los 37 transformantes analizados, solamente uno de ellos dio lugar al producto de PCR del tamaño esperado para un mutante por disrupción del gen *qip* (**Figura 22B**). En el resto de transformantes no se produjo amplificación con la pareja de oligonucleótidos *Qip5-pyrGZ*, aunque sí presentaron la banda correspondiente al control positivo. El transformante seleccionado, dado que aún no poseía el 100% de núcleos transformados, fue sometido a otro ciclo de crecimiento vegetativo bajo presión selectiva para conseguir una estirpe homocarionte, con todos los núcleos portadores de la mutación.

A



B

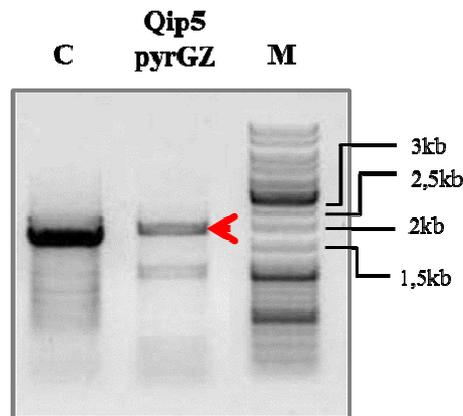
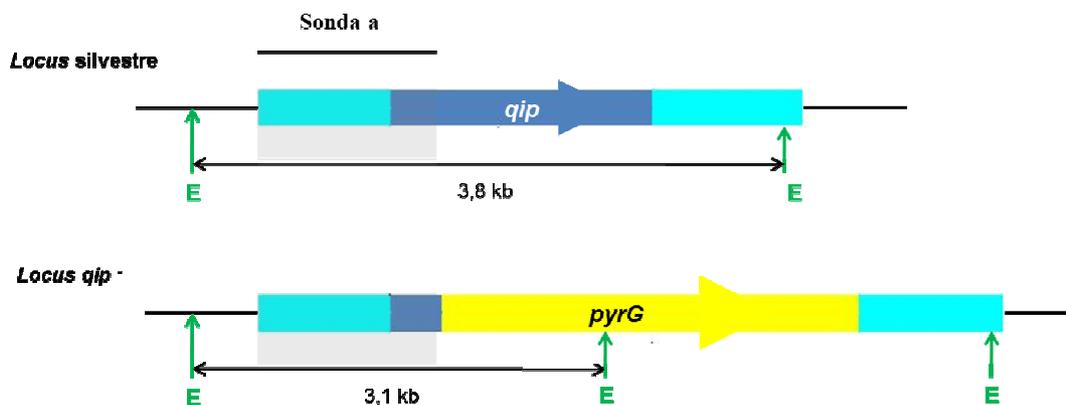


Figura 22. Análisis mediante PCR de los transformantes obtenidos en la generación del mutante *qip*⁻. (A) La integración del marcador *pyrG* por recombinación homóloga en el locus *qip* genera una secuencia exclusiva en los mutantes *qip*⁻. Dicha secuencia permite obtener mediante amplificación por PCR un producto de 1,9 kb con los cebadores Qip5 y pyrGZ. En gris aparece la región adyacente a *qip* no incluida en el fragmento de interrupción. (B) Producto de PCR del transformante que generó el fragmento de 1,9 kb esperado tras la interrupción del gen *qip*. C: control positivo de la reacción de amplificación utilizando cebadores incluidos dentro del fragmento utilizado para la interrupción. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

Para comprobar que la interrupción del gen *qip* ha tenido lugar correctamente y descartar la existencia de integraciones ectópicas, se procedió a la realización de un experimento de hibridación tipo Southern. Se digirió el DNA de la estirpe mutante con la enzima *EcoRV*, que genera un patrón de bandas diferente en la estirpe silvestre y el mutante *qip*⁻. Al hibridar la membrana con una sonda del gen *qip* que reconoce los alelos silvestre y mutante, pero que puede discriminar entre ellos (**Figura 23A, sonda a**), se observó que la estirpe mutante presentaba la banda de 3,1 kb que indica el correcto

reemplazamiento del gen *qip*. Además, se confirmó que la estirpe era homocariote, puesto que no presentaba la banda de 3,8 kb correspondiente al alelo silvestre y se descartó la existencia de integraciones ectópicas del fragmento de disrupción (**Figura 23B**). Esta estirpe mutante *qip*⁻ se denominó MU430.

A



B

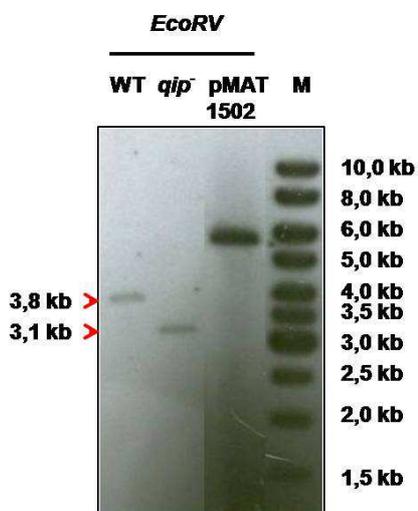


Figura 23. Disrupción del gen *qip* de *M. circinelloides*. (A) Representación esquemática de la región genómica del gen *qip* en la estirpe silvestre (R7B) y en el mutante obtenido por disrupción mediante recombinación homóloga. Se indican los puntos de corte para la enzima de restricción *EcoRV* (E). (B) Resultado de la hibridación tipo Southern de DNA de la estirpe silvestre (WT), del mutante *qip*⁻ y del plásmido pMAT1502 digeridos con la enzima *EcoRV*. La membrana se hibridó con la sonda a, representada en (A). Dicha sonda corresponde a un fragmento de 1.100 pb aislado mediante PCR con los oligos QIP1 y QIP3 a partir de pMAT1501.

III. 1. 1. 4. 2. Silenciamiento génico en el mutante *qip*⁻.

Para dilucidar si el gen *qip* participa en el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes en *M. circinelloides*, se analizó la capacidad de silenciar del mutante *qip*⁻. Para ello, se transformó la estirpe mutante *qip*⁻ (MU430) y la estirpe silvestre (R7B) con los plásmidos pMAT1279 y pMAT1253, portadores de secuencias del gen *carB* capaces de inducir el mecanismo de silenciamiento en la estirpe silvestre. El gen *carB*, que cifra la enzima deshidrogenasa de fitoeno, es utilizado rutinariamente como chivato para analizar el silenciamiento inducido por transgenes en *M. circinelloides*. La enzima deshidrogenasa de fitoeno es la encargada de convertir el fitoeno (compuesto incoloro) en carotenos coloreados. Por tanto, el silenciamiento del gen *carB* da lugar a la aparición de colonias albinas, que acumulan fitoeno, claramente distinguibles de las silvestres, que muestran un color amarillo intenso por la acumulación de β -caroteno. El plásmido pMAT1279 contiene la región genómica completa del gen *carB* (transgen “con sentido”) bajo el control del promotor constitutivo *gpd1* de *M. circinelloides*, que controla la síntesis de la enzima gliceraldehido-3-P deshidrogenasa (Calo *et al.*, 2012). El plásmido pMAT1253 contiene repeticiones invertidas de una secuencia de 840 pb del gen *carB* (transgen con “repeticiones invertidas”), separadas por un fragmento de 303 pb que contiene el segundo intrón de dicho gen (de Haro *et al.*, 2009). Esta construcción se expresa de forma constitutiva bajo el control del promotor *gpd1*, generando un transcrito que adopta una estructura de horquilla bicatenaria (“hairpin”, hpRNA), lo que provoca una elevada eficacia en la inducción del mecanismo de silenciamiento y permite obtener transformantes silenciados albinos con una frecuencia mayor del 85% en la estirpe silvestre (de Haro *et al.*, 2009). Ambos plásmidos autorreplicativos contienen el gen *leuA* como marcador seleccionable, que complementa la auxotrofia para la leucina que presentan la estirpe R7B y el mutante *qip*⁻.

Los resultados obtenidos en la **Tabla 10** indican que el gen *qip* participa de forma activa en el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes, ya que el mutante *qip*⁻ es prácticamente incapaz de silenciar la expresión de *carB* cuando se utilizan transgenes con sentido (pMAT1279) como inductores del silenciamiento y experimenta una drástica reducción de la frecuencia de silenciamiento cuando éste se induce por transgenes con repeticiones invertidas (pMAT1253).

Plásmido	Estirpe	Transformantes			Frecuencia de silenciamiento (%)
		Amarillos	Albinos	Total	
pMAT1253	WT	2	210	212	99
	<i>qip</i> ⁻	236	15	251	6
pMAT1279	WT	15	286	301	95
	<i>qip</i> ⁻	310	1	311	0,3

Tabla 10. Silenciamiento génico en el mutante *qip*⁻. Se indica el fenotipo de los transformantes obtenidos tras la introducción de los vectores de silenciamiento pMAT1253 (transgen con repeticiones invertidas) y pMAT1279 (transgen “con sentido”) en la estirpe silvestre y en el mutante *qip*⁻. El color de los transformantes se observó tras trasplantar los transformantes originales obtenidos a placas de medio mínimo YNB e incubarlas durante 4-5 días en condiciones de iluminación continua. Se incluyeron como silenciados aquellos transformantes que presentaron parches de fenotipo albino.

El silenciamiento inducido por transgenes con repeticiones invertidas en la estirpe silvestre es muy estable, ya que un 84% de los descendientes de transformantes primarios silenciados mantiene el fenotipo albino tras un ciclo de crecimiento vegetativo (Calo *et al.*, 2012). Por el contrario, los escasos individuos albinos obtenidos con el plásmido pMAT1253 en la estirpe mutante *qip*⁻ fueron muy inestables, mostrando una rápida segregación a fenotipo silvestre (amarillo) cuando se incuban en medio mínimo YNB (**Figura 24**).

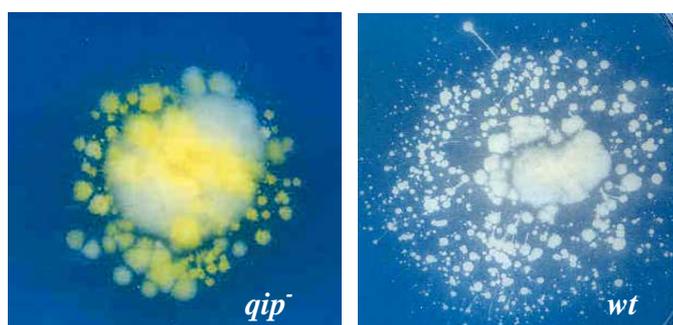


Figura 24. Estabilidad del silenciamiento en el mutante *qip*⁻. Se muestra el fenotipo de los descendientes de individuos albinos obtenidos con el plásmido pMAT1253 en fondo genético silvestre (R7B) (derecha) y mutante *qip*⁻ (izquierda). La coloración de los individuos se observó tras 48 horas de crecimiento en medio mínimo YNB en condiciones de luz continua.

Para cuantificar la estabilidad del silenciamiento en las estirpes silvestre y mutante *qip⁻* tras un ciclo de reproducción asexual, esporas procedentes de descendientes albinos de ambas estirpes, portadoras del transgen con repeticiones invertidas (pMAT1253), se inocularon en medio mínimo YNB pH 3,2. Tras ser incubadas durante 48 horas en condiciones de iluminación continua, se cuantificó el porcentaje de colonias que mantenían el fenotipo parental (**Tabla 11**). En la estirpe silvestre, los descendientes completamente albinos representan el 76% del total, ascendiendo al 100% si se contabilizan los individuos que muestran algún parche blanco. Por el contrario, en el mutante *qip⁻*, únicamente el 13% de los descendientes conservaron el fenotipo albino parental.

Estirpe silenciada	Descendientes			Total	% descendientes albinos
	Amarillos	Amarillos/ Albinos	Albinos		
Silvestre	0	12	39	51	76,5
<i>qip⁻</i>	6	7	2	15	13,3

Tabla 11. Estabilidad del silenciamiento en el mutante *qip⁻*. Se muestra el fenotipo de los descendientes de individuos completamente albinos de la estirpe silvestre y del mutante *qip⁻* obtenidos tras la introducción del plásmido pMAT1253. El color de los descendientes se observó tras la incubación en medio mínimo YNB pH 3,2 bajo condiciones de luz continua.

Los resultados obtenidos revelan que la actividad residual de silenciamiento en la estirpe mutante *qip⁻* no es suficiente para mantener de forma estable el mecanismo de silenciamiento en las siguientes generaciones, poniendo de manifiesto el papel crucial que desempeña el gen *qip* en dicho mecanismo.

III. 1. 1. 4. 3. Acumulación de siRNAs en el mutante *qip⁻*.

Dado que el mutante *qip⁻* de *M. circinelloides* se encuentra severamente afectado en el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes, y que la función del gen *qip* de *N. crassa* está relacionada con la degradación de la cadena pasajera de los siRNAs, se analizó la capacidad de este mutante para acumular las dos clases de siRNAs (21-nt y 25-nt) características del mecanismo de silenciamiento génico en *M. circinelloides*

(Nicolás *et al.*, 2003). Para ello, se llevó a cabo la detección de siRNAs correspondientes a secuencias del gen *carB* en la estirpe silvestre y en el mutante *qip*⁻ (MU430) mediante hibridaciones tipo Northern. En primer lugar, se extrajeron muestras de RNA enriquecidas en moléculas de bajo peso molecular (**ver apartado II. 10. 2**) a partir de varios transformantes no silenciados obtenidos tras la introducción del plásmido pMAT1253 en el mutante *qip*⁻. Como control positivo, se utilizó una muestra de RNA de bajo peso molecular aislada de una colonia silenciada de la estirpe silvestre R7B, transformada con el mismo plásmido. La membrana se hibridó con una ribosonda específica de *carB* capaz de detectar los siRNAs antisentido (**Figura 26A, sonda b**). Los resultados obtenidos indican que los transformantes no silenciados del mutante *qip*⁻, portadores del plásmido inductor del silenciamiento, son incapaces de acumular siRNAs antisentido del gen *carB*, aún cuando el resto de la maquinaria necesaria para la producción de los siRNAs (RdRP-1, Dcl-2, Ago-1, RdRP-2) esté intacta (**Figura 25**). Ello revela el papel primordial de la proteína Qip en el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes.

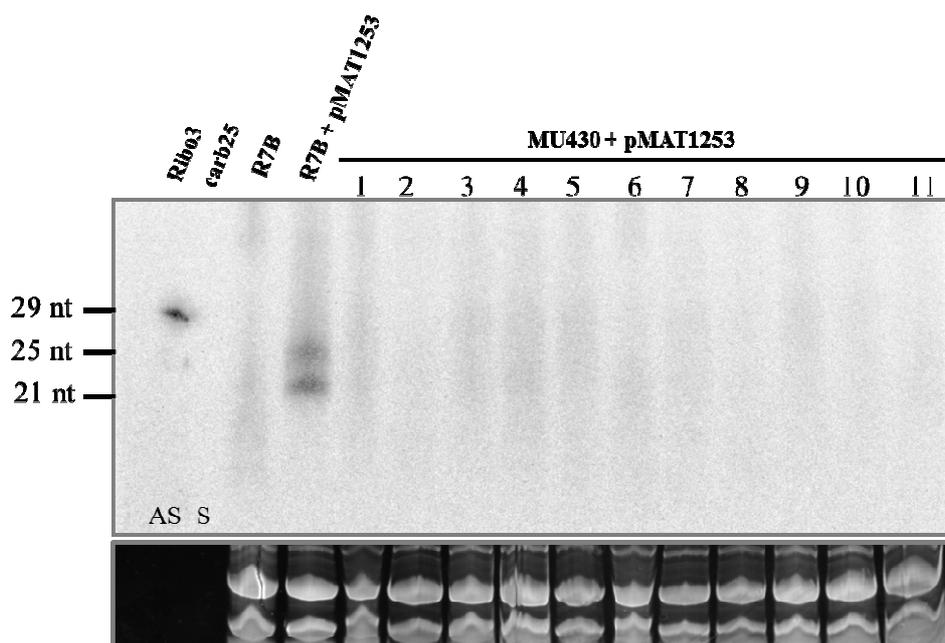


Figura 25. Análisis de siRNAs en transformantes no silenciados del mutante *qip*⁻. Muestras de RNA de bajo peso molecular (50 µg) aisladas de once transformantes no silenciados del mutante *qip*⁻, obtenidos con el plásmido pMAT1253 e incubados en medio líquido YNB pH 4,5 durante 48 horas, se sometieron a hibridación tipo Northern. Se utilizó una sonda específica de *carB* que detecta RNA antisentido (sonda b; **Figura 26A**). Como control positivo, se utilizó un transformante silenciado de la estirpe silvestre R7B obtenido con el mismo plásmido. Como control de tamaño y polaridad se utilizaron los oligonucleótidos Ribo3 (antisentido, AS) y carB25 (con sentido, S) (**Tabla 5, ver Materiales y Métodos**). Como control de carga se tiñeron los tRNAs con Bromuro de Etidio.

Dado que un pequeño porcentaje de los transformantes obtenidos en el mutante *qip*⁻ son capaces de silenciar la expresión del gen chivato (**Tabla 10**), se analizó también la presencia de los dos tipos de siRNAs en estas colonias silenciadas. Para ello, se aislaron muestras de RNA de bajo peso molecular de una colonia silenciada del mutante *qip*⁻, obtenida mediante transformación con el plásmido pMAT1279 e incubada durante distintos periodos de tiempo en medio YNB líquido pH 4,5 en condiciones de iluminación continua. Como control positivo, se utilizaron muestras de RNA de bajo peso molecular extraídas a partir de colonias albinas de la estirpe silvestre R7B transformada con el mismo plásmido e incubada en las mismas condiciones que el mutante.

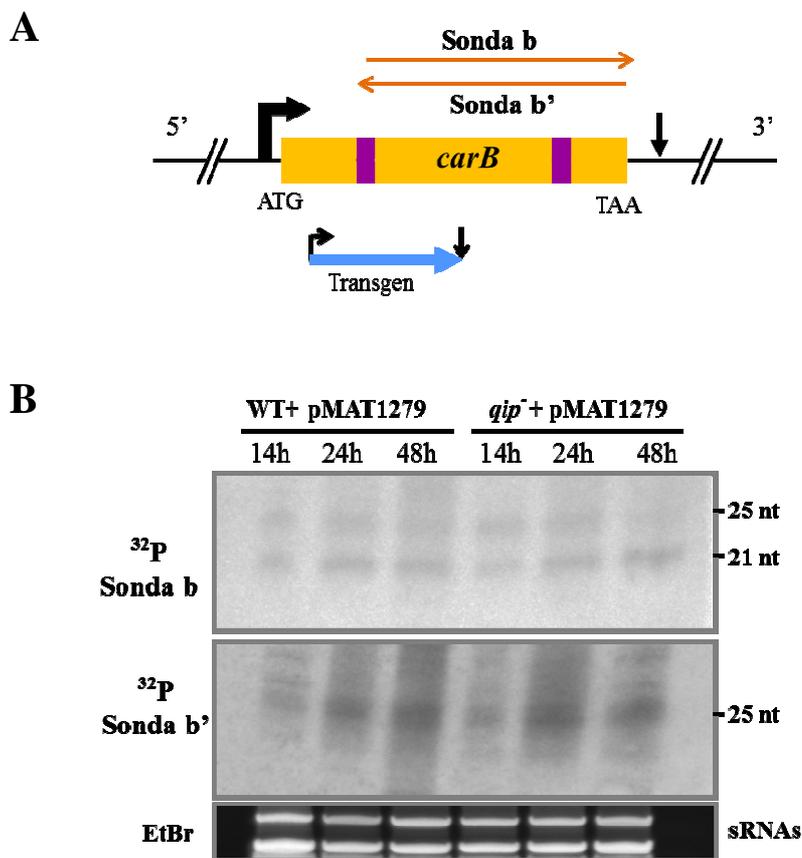


Figura 26. Producción de siRNAs en transformantes silenciados del mutante *qip*⁻. (A) Representación esquemática de las sondas de RNA de *carB* (sonda b y sonda b') utilizadas en las hibridaciones tipo Northern. La sonda con la misma dirección de transcripción del gen *carB* (sonda b) hibrida y detecta los siRNAs antisentido. La sonda con orientación contraria a la dirección de transcripción de *carB* hibrida y detecta siRNAs con sentido (sonda b'). Dichas sondas proceden de la transcripción *in vitro* de los plásmidos pMAT652 y pMAT651 (sondas b y b', respectivamente) (Nicolás *et al.*, 2003). Las flechas en el gen *carB* indican el inicio de la transcripción y el sitio de poliadenilación de dicho gen. Los dos intrones del gen están representados por rectángulos morados. Se indica la región de *carB* presente en el transgen con sentido pMAT1279. (B) Hibridación tipo Northern de muestras de RNA de bajo peso molecular (50 µg) aisladas de colonias silenciadas de la estirpe silvestre y del mutante *qip*⁻ transformados con el plásmido pMAT1279 e incubados en medio líquido YNB pH 4,5 durante distintos periodos de tiempo. Como control de carga se tiñeron los tRNAs con Bromuro de Etidio (EtBr).

La membrana de RNA obtenida se hibridó con una ribosonda específica de *carB* capaz de detectar los siRNAs antisentido (**Figura 26A, sonda b**). La misma membrana se hibridó con una ribosonda que hibrida con los siRNAs con sentido (**Figura 26A, sonda b'**). Los resultados obtenidos tras dichas hibridaciones indicaron que los individuos silenciados en fondo genético *qip*⁻ producen siRNAs antisentido de 21 y 25 nucleótidos a niveles similares a la estirpe silvestre. En cuanto a la producción de siRNAs con sentido, en el mutante *qip*⁻ únicamente se detectan los siRNAs de 25-nt, al igual que ocurre en la estirpe silvestre, corroborando resultados anteriores (Nicolás *et al.*, 2003). Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de una actividad residual en el mutante *qip*⁻ capaz de producir los dos tipos de siRNAs antisentido, actividad que, probablemente, es la responsable del pequeño nivel de silenciamiento que presentan estos mutantes.

III. 1. 2. Estudio de la interacción entre proteínas de la ruta de silenciamiento.

Datos obtenidos en *N. crassa* indican que la proteína QIP de este organismo interacciona con QDE-2 (Argonauta) para degradar la cadena pasajera del siRNA, activando de esta forma al complejo RISC (Maiti *et al.*, 2007). La posibilidad de que la maquinaria de silenciamiento actúe formando un complejo, o que varias proteínas de la ruta interaccionen entre sí, nos llevó a utilizar el sistema del doble híbrido de levaduras para comprobar las interacciones entre varias proteínas de la ruta de silenciamiento génico de *Mucor*.

El doble híbrido de levaduras se basa en la activación de la transcripción de un gen chivato mediante un factor de transcripción que posee un dominio de unión a DNA y un dominio de activación. Cada uno de estos dominios se fusiona a las proteínas de interés, de forma que únicamente se activa la transcripción del gen chivato si ambos dominios están próximos, debido a la interacción entre las proteínas fusionadas (**Figura 12B; ver apartado II. 13**). En el sistema utilizado (James *et al.*, 1996), la proteína que se fusiona al dominio de unión a DNA (“cebo”) y la proteína que se une al dominio de activación (“presa”) se expresan en dos cepas diferentes de levadura que son haploides y de distinto sexo (Mat-a y Mat- α). Estas estirpes, al interaccionar sexualmente, dan lugar a una estirpe diploide en la que se detecta si hay interacción entre las proteínas fusionadas a través del

gen “chivato” *his3*, que permite el crecimiento en medio sin histidina y que está controlado por un promotor dependiente del factor de transcripcional.

Se analizó, por tanto, la interacción de la proteína Qip de *M. circinelloides* con la proteína Ago-1, implicada en el silenciamiento génico en este organismo. Para ello, se clonó el cDNA del gen *qip* en el vector de expresión portador del dominio de unión a DNA de GAL4 (dominio BD) y del marcador seleccionable *trp1*, que complementa la auxotrofia para triptófano de la estirpe receptora de levaduras (**Figura 27**). Se obtuvieron de esta manera varios vectores, que expresan la proteína Qip silvestre o versiones mutantes que presentaban sustituciones de aminoácidos no conservados (**ver apartado II. 13**). Asimismo, se disponía en el laboratorio de un vector de expresión que sintetiza una proteína de fusión entre el dominio de activación de GAL4 (dominio AD) y la proteína Ago-1, además del marcador seleccionable *leu2*, así como de vectores que expresan el dominio BD fusionado a las proteínas Dcl-1 y Dcl-2 (**Figura 27**). Los plásmidos con las fusiones al dominio BD se utilizaron para transformar la estirpe haploide de levadura Mat- α y complementar la auxotrofia para triptófano, mientras que los plásmidos con fusiones al dominio AD se introdujeron en la estirpe de sexo opuesto Mat- α , para complementar la auxotrofia para la leucina.

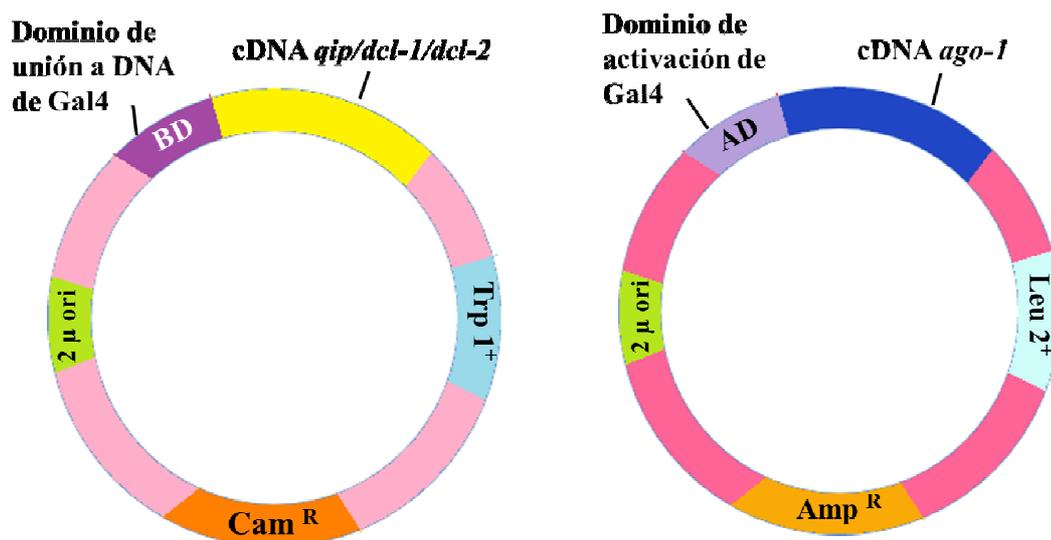


Figura 27. Vectores de expresión utilizados en el sistema del doble híbrido de levaduras. Se indican los marcadores de resistencia a antibióticos para la selección de los plásmidos en la bacteria *E. coli* y los marcadores de auxotrofia para la selección en la levadura *S. cerevisiae*. El cDNA de los distintos genes se clonó en fase con los dominios BD o AD de GAL4.

Las estirpes haploides obtenidas en el medio selectivo correspondiente (SD sin leucina o SD sin triptófano) se inocularon juntas en medio rico YPAD, depositando 5 µl de cada estirpe haploide portadora de los plásmidos con las proteínas “cebo” y “presa” en una misma posición (**Figura 28A**). Al interactuar las estirpes haploides de diferente sexo dieron lugar a estirpes diploides, que fueron seleccionadas en medio SD sin triptófano y sin leucina. Finalmente, se realizaron réplicas en medio SD sin triptófano, sin leucina y sin histidina, donde únicamente podrán crecer aquellas estirpes diploides en las que se produzca interacción entre las proteínas “cebo” y “presa” (**Figura 28B**).

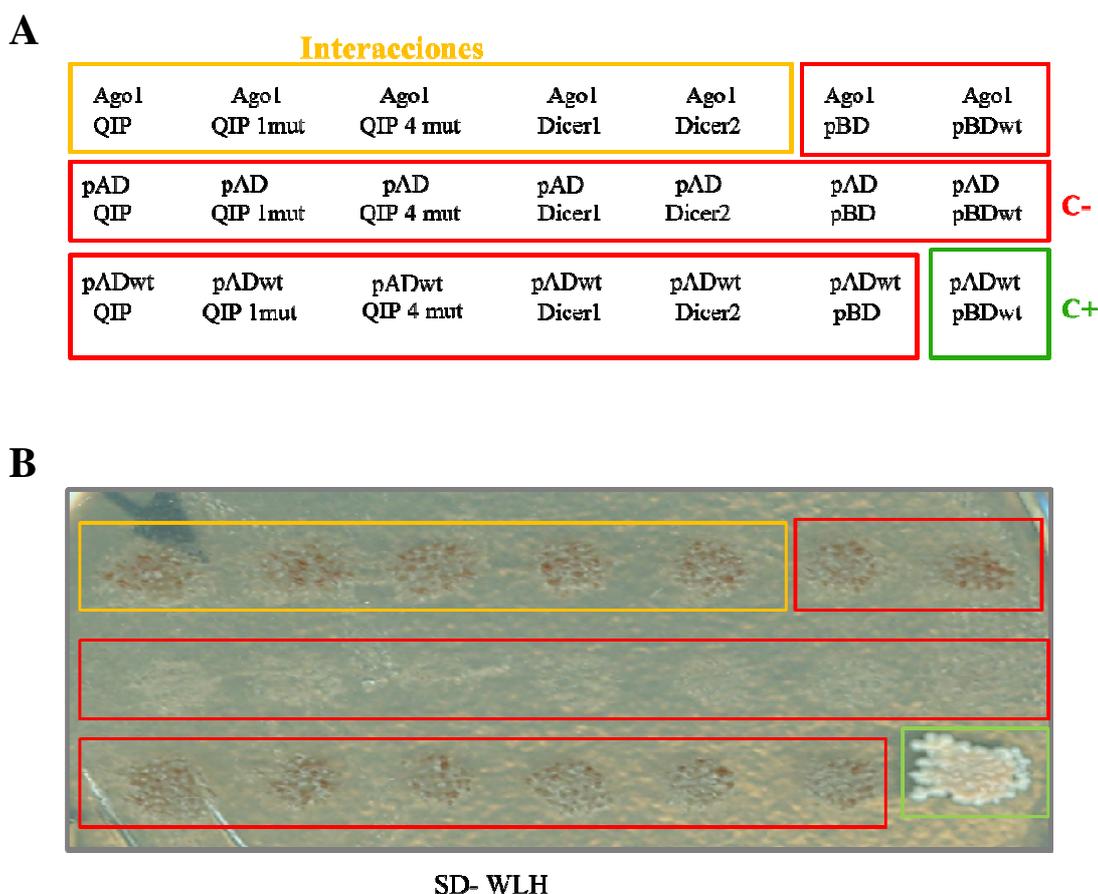


Figura 28. Análisis de la interacción entre proteínas de la maquinaria de silenciamiento mediante el sistema de doble híbrido de levaduras. (A) Esquema de las interacciones analizadas. Se muestran en amarillo las interacciones entre las proteínas de silenciamiento Qip (versiones silvestre y mutantes), Dcl-1 y Dcl-2 con la proteína Ago-1. En rojo se indican los controles negativos y en verde el control positivo con las proteínas silvestres de GAL4. (B) Resultado de las interacciones entre las diferentes estirpes indicadas en (A), tras cinco días de crecimiento en medio selectivo SD sin triptófano, sin leucina y sin histidina.

Tras cinco días de incubación en medio selectivo, no se detectó señal de interacción específica entre las proteínas de la maquinaria de silenciamiento de *Mucor*, observándose crecimiento únicamente en el control positivo. Esta falta de interacción no fue debida a un

bajo nivel de expresión de las proteínas de fusión en las levaduras, ya que experimentos tipo Western con anticuerpos específicos contra los dominios BD y AD permitieron detectar las distintas proteínas en las estirpes diploides correspondientes (resultados no mostrados). No podemos, sin embargo, descartar totalmente la posible existencia de interacción entre las proteínas analizadas, ya que éstas podrían formar parte de un complejo multiproteico o necesitar modificaciones post-traduccionales específicas de *M. circinelloides*.

III. 1. 3. Obtención de estirpes *rdrp-1*/*rdrp-2*.

El análisis de los genes *rdrp-1* y *rdrp-2* identificados en *M. circinelloides* indicó que cada uno de ellos actúa en diferentes pasos de la ruta de silenciamiento, siendo *rdrp-1* esencial para la iniciación del silenciamiento por transgenes con sentido y *rdrp-2* necesario para el proceso de amplificación. Sin embargo, la mutación *rdrp-2*⁻ no anula completamente la capacidad de amplificación, lo que sugiere la existencia de cierta redundancia funcional con otra RdRP (Calo *et al.*, 2012). La proteína RdRP-1 podría ser la responsable de la amplificación residual que muestra el mutante *rdrp-2*⁻, aunque también podría estar actuando RdRP-3, aún cuando esta proteína no tiene asignado ningún papel en el mecanismo de silenciamiento (resultados no publicados). En *M. circinelloides* se ha descrito anteriormente la existencia de redundancia parcial entre genes de silenciamiento pertenecientes a la misma familia (de Haro *et al.*, 2009). Con el objetivo de comprobar si existe redundancia entre los genes *rdrp-1* y *rdrp-2*, se realizaron experimentos encaminados a obtener mutantes dobles *rdrp-1*/*rdrp-2*⁻.

III. 1. 3. 1 Generación de un doble mutante *rdrp-1*/*rdrp-2*⁻.

La estrategia seguida para la obtención del doble mutante *rdrp-1*/*rdrp-2*⁻ fue la disrupción del gen *rdrp-1* mediante reemplazamiento génico en la estirpe *rdrp-2*⁻ (MU420). El mutante *rdrp-2*⁻ (Leu⁻, Ura⁺) se obtuvo mediante disrupción génica empleando el marcador seleccionable *pyrG* para interrumpir el gen, lo que elimina la auxotrofia para uracilo que presentaba la estirpe receptora MU402 (Calo *et al.*, 2012). Por tanto, para realizar la disrupción del gen *rdrp-1* en la estirpe mutante MU420 se utilizó el

marcador *leuA*, que complementa la auxotrofia para leucina de dicho mutante. El fragmento empleado para la interrupción debe contener el marcador seleccionable *leuA* flanqueado por secuencias del gen *rdrp-1* o adyacentes a éste, con longitud suficiente para permitir la integración por recombinación homóloga, reemplazándose de esta forma la versión silvestre de *rdrp-1* por el gen *leuA* (Figura 29). El doble mutante *rdrp-1/rdrp-2* así obtenido es protótrofo y carece, por tanto, de marcadores seleccionables que permitan la introducción de vectores de silenciamiento, lo que impediría dilucidar el grado en el que está afectado este mutante en el mecanismo de silenciamiento génico. Es necesario, una vez obtenido el mutante, someterlo a mutagénesis con el fin de obtener derivados auxótrofos para leucina o uracilo y así poder introducir vectores portadores de transgenes *carB*.

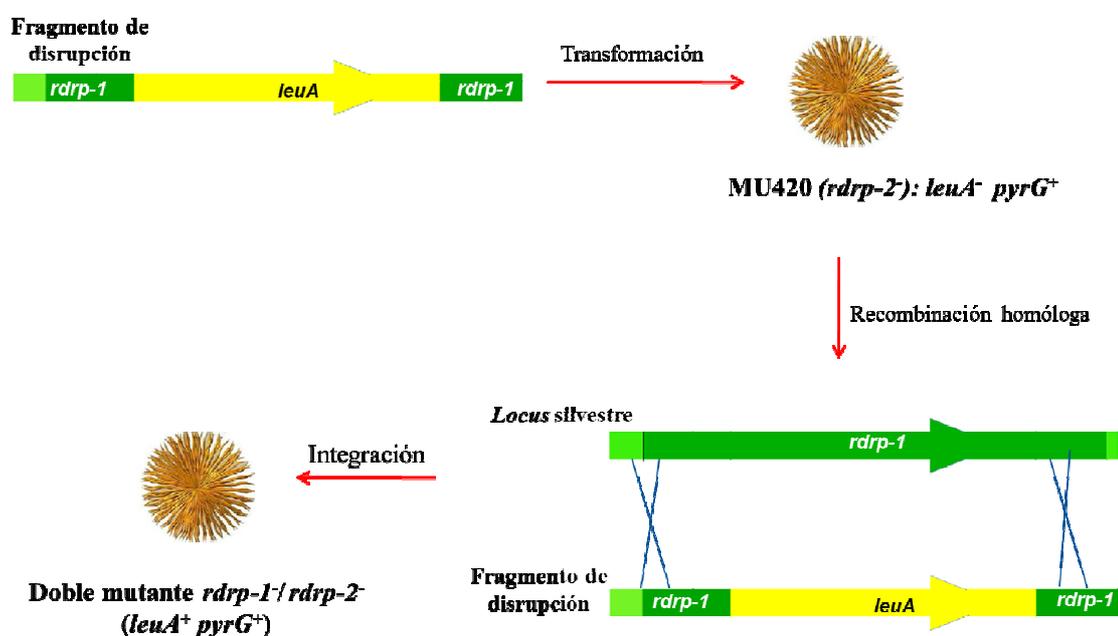


Figura 29. Representación esquemática del proceso de generación del doble mutante *rdrp-1/rdrp-2*.

Para la construcción del vector portador del fragmento de interrupción se partió del plásmido pMAT1269, que contiene la región genómica completa del gen *rdrp-1* y secuencias adyacentes a éste (Figura 30). La digestión de dicho plásmido con la enzima *PstI* genera un fragmento de 7,8 kb que incluye la secuencia del vector de clonación pUC18 y secuencias de los extremos 5' y 3' de *rdrp-1* (2.854 pb y 1.963 pb, respectivamente). Dicho fragmento, del que se han eliminado 1799 pb de la región codificadora de *rdrp-1*, se ligó con el fragmento *PstI* de 4,4 kb portador del gen *leuA* de *M.*

circinelloides, obtenido a partir del plásmido pLeu4. El plásmido resultante se denominó pMAT1513, del que se obtuvo el fragmento lineal de disrupción de 6,5 kb mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos *disrpXhoIForw* y *disrpRev* (**Figura 30**).

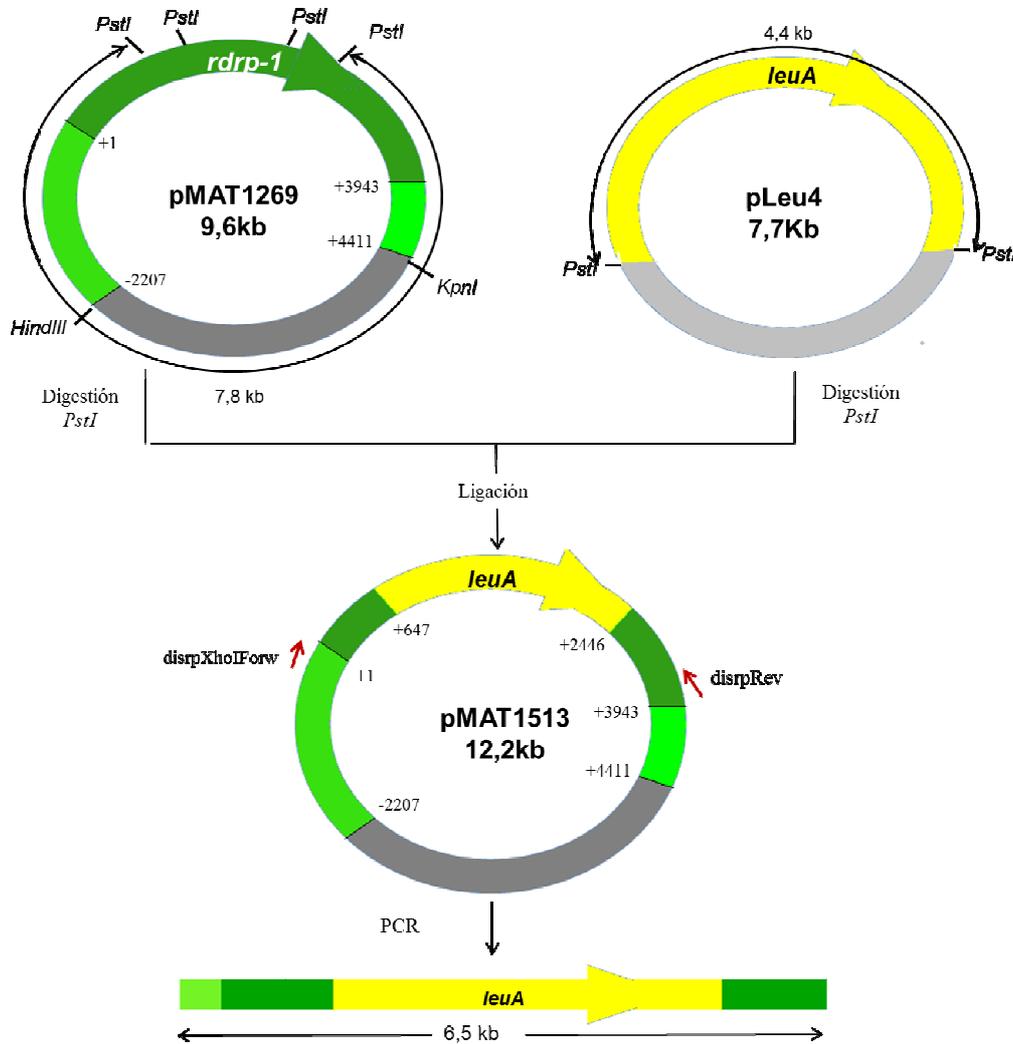


Figura 30. Construcción del plásmido pMAT1513, portador del inserto empleado para la disrupción del gen *rdrp-1*. El fragmento lineal de 6,5 kb empleado en la disrupción se obtuvo mediante PCR con los cebadores *disrpXhoIForw* y *disrpRev* (**Tabla 5, ver Materiales y Métodos**). En verde oscuro se indica la región codificadora del gen *rdrp-1* y en verde claro las secuencias adyacentes a éste. Los números indican las posiciones de la secuencia del gen *rdrp-1*, siendo +1 la posición correspondiente al primer nucleótido del triplete de iniciación de la traducción.

Los experimentos de transformación de la estirpe MU420 con el fragmento lineal de disrupción dieron lugar a 47 transformantes Leu^+ en medio mínimo YNB. Estos transformantes fueron sometidos a tres o cuatro ciclos de crecimiento vegetativo en medio selectivo para aumentar el porcentaje de núcleos transformados. Aquellos transformantes con un porcentaje de núcleos Leu^+ próximo al 100% fueron analizados mediante PCR para

comprobar la correcta integración del gen *leuA* en el locus *rdrp-1*. Dichas reacciones de PCR se llevaron a cabo con dos parejas de cebadores a partir de DNA procedente de micelio fresco (**ver apartado II. 8. 1**). Únicamente en el caso de que haya tenido lugar la integración correctamente, la pareja de cebadores *rdrp20ApaI*-*Mut1c* (**Tabla 5, ver Materiales y Métodos**) amplificará un fragmento de 2 kb en el extremo 5' del locus *rdrp-1* y la pareja de oligos *leuAP2*-*rdrp16* (**Tabla 5, ver Materiales y Métodos**) rendirá un producto de 2,5 kb a partir del extremo 3' (**Figura 31A**). De los 29 transformantes analizados, solamente uno de ellos presentó las bandas de los tamaños que cabría esperar para el doble mutante *rdrp-1*/*rdrp-2* (**Figura 31B**).

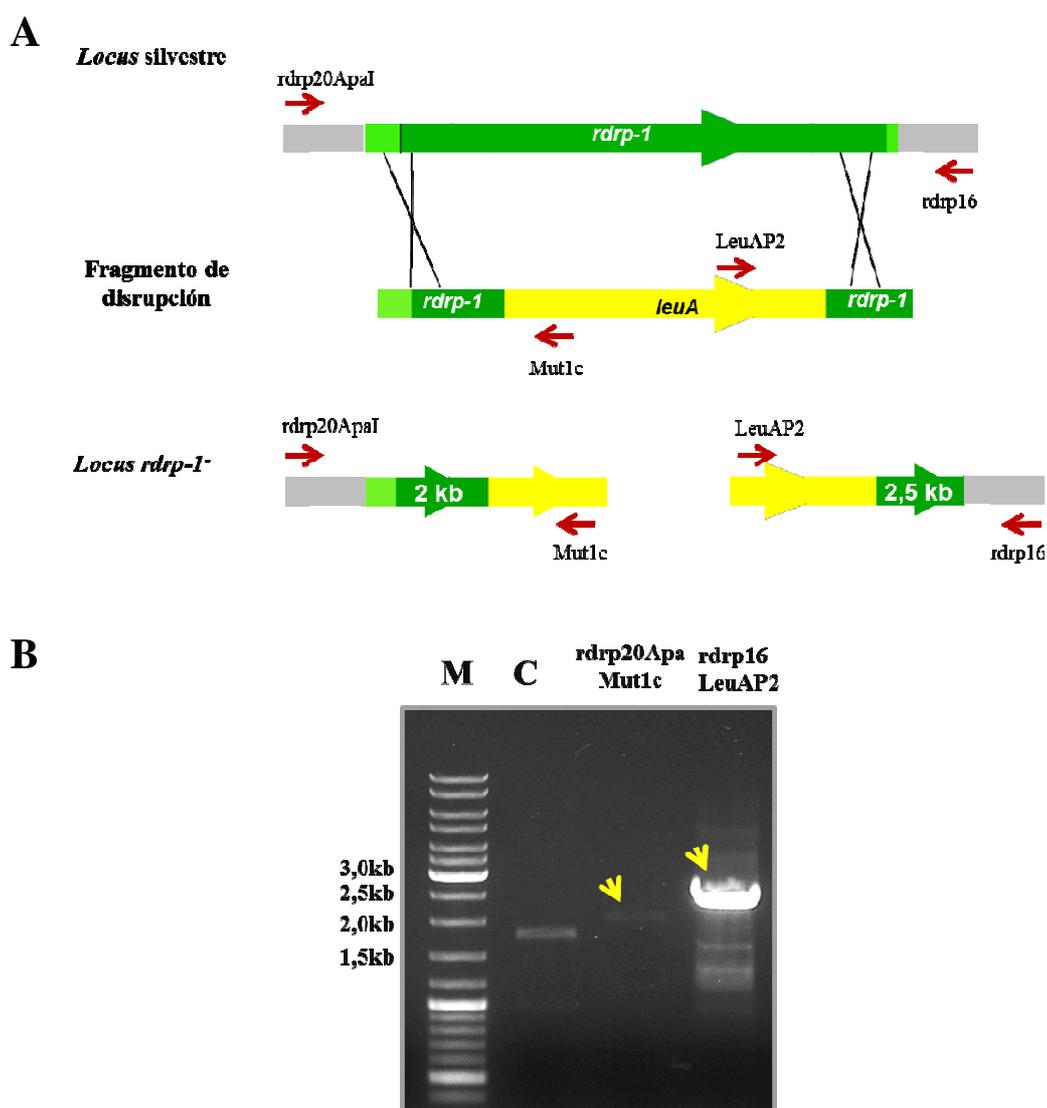


Figura 31. Análisis mediante PCR de los transformantes obtenidos en los experimentos realizados para la generación del doble mutante *rdrp-1*/*rdrp-2*. (A) La recombinación homóloga del fragmento de disrupción en el locus *rdrp-1* permite amplificar en los extremos 5' y 3' de la integración un fragmento de 2 kb y otro de 2,5 kb, respectivamente. En gris aparece la región genómica adyacente a *rdrp-1* no incluida en el fragmento de disrupción. (B) Producto de PCR del transformante que rindió las bandas del tamaño esperado tras la interrupción del gen *rdrp-1*. C: control positivo de la reacción de PCR con dos cebadores que amplifican un fragmento del gen *mcwc1a*.

La correcta interrupción de *rdrp-1* en el fondo genético *rdrp-2⁻* se comprobó mediante un experimento de hibridación tipo Southern. DNA genómico de la estirpe silvestre, de la estirpe receptora MU420 y del supuesto disruptante fue sometido a digestión con la enzima *SacI*. La membrana se hibridó con una sonda del gen *rdrp-1* que distingue entre el alelo silvestre y el mutante (**Figura 32A, sonda c**). Los resultados de dicha hibridación permitieron establecer que el transformante seleccionado presentaba la correcta disrupción del gen *rdrp-1*, tal como indica la banda de 8 kb que aparece en el experimento de hibridación. Sin embargo, los resultados revelaron que la estirpe disruptante, a pesar de mostrar un elevado porcentaje de núcleos *Leu⁺*, seguía siendo heterocariote, ya que seguía presentando la banda correspondiente al alelo silvestre (5,3 kb) (**Figura 32B**). Tras 10 ciclos de crecimiento vegetativo en medio selectivo para aumentar la proporción de núcleos transformados, se volvió a realizar el análisis tipo Southern, comprobándose que el individuo continuaba presentando el alelo silvestre sin alcanzar la homocariosis. El hecho de que no se llegue a alcanzar el 100% de núcleos con la doble mutación *rdrp-1⁻/rdrp-2⁻* podría sugerir que la ausencia completa de las proteínas RdRP-1 y RdRP-2 podría resultar letal para el hongo.

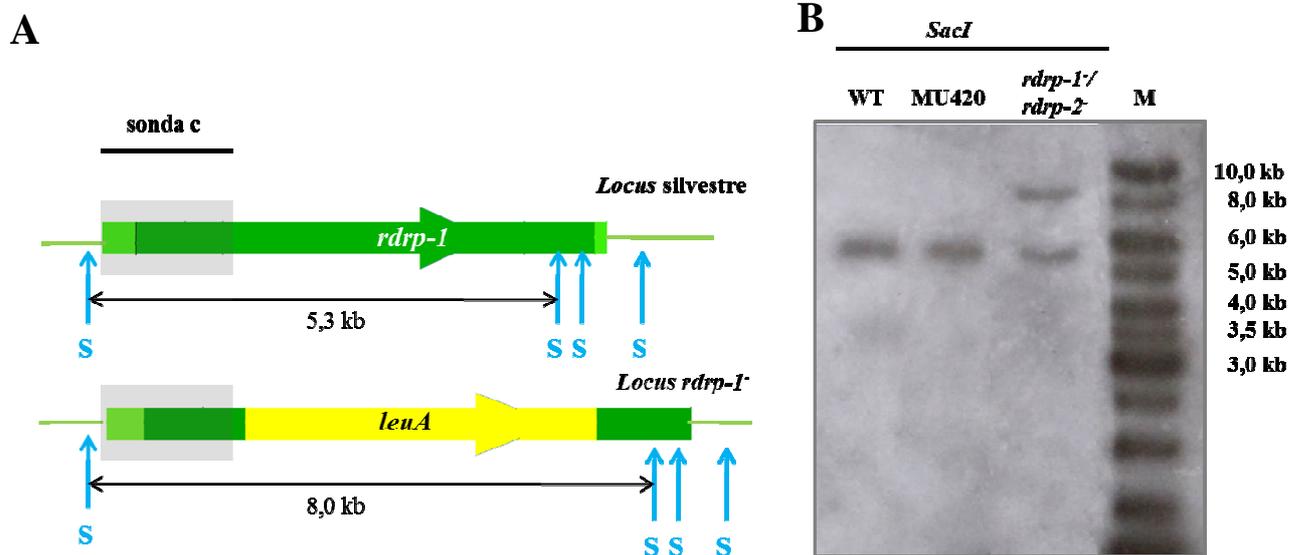


Figura 32. Interrupción del gen *rdrp-1* en la estirpe MU420 (*rdrp-2⁻*). (A) Representación esquemática de la región genómica del gen *rdrp-1* en la estirpe silvestre y en el mutante *rdrp-1⁻* obtenido por disrupción génica. Se muestran los puntos de corte de la enzima *SacI* (S) y el tamaño de los fragmentos detectados por la sonda c, que corresponde a un fragmento de 660 pb obtenido mediante PCR con los oligos *disrpXhoIForw* y *Rdrp3* a partir del plásmido pMAT1513. (B) Resultado de la hibridación tipo Southern de DNA de la estirpe silvestre, de la estirpe receptora MU420 y del disruptante, digerido con la enzima *SacI*. La membrana se hibridó con la sonda c representada en A. M: GeneRuler™ DNA Ladder Mix de Fermentas.

III. 2. Papel de Ago-1 en la producción de pequeños RNAs endógenos (esRNAs).

El mecanismo de silenciamiento génico de *M. circinelloides*, además de operar frente a secuencias exógenas, como virus, transgenes y transposones, posee también una función endógena puesta de manifiesto por nuestro grupo de investigación. Mediante secuenciación masiva de los pequeños RNAs acumulados endógenamente en *Mucor*, se identificaron esRNAs que derivan de exones (ex-siRNAs), además de otros que corresponden a transposones y regiones intergénicas (Nicolas *et al.*, 2010). Los ex-siRNAs se clasificaron en cuatro clases atendiendo a las proteínas de la maquinaria de silenciamiento requeridas para su biogénesis. Las clases I y II corresponden a aquellos ex-siRNAs que dependen de Dcl-2 para su producción. La clase II, la más numerosa, incluye ex-siRNAs derivados de 222 exones que, además de Dcl-2, requieren la participación de RdRP-1 para su biogénesis. Los ex-siRNAs de la clase I (nueve exones) no requieren RdRP-1 para su producción, pero la mayoría de ellos necesitan la participación de RdRP-2. La clase III (88 exones) corresponde a aquellos ex-siRNAs generados por RdRP-1, RdRP-2 y cualquiera de las dos proteínas Dicer (Dcl-1 o Dcl-2). Finalmente, la clase IV corresponde a un pequeño grupo de ex-siRNAs (cinco exones) que requieren Dcl-1 y las dos RdRPs para su biogénesis.

Los ex-siRNAs que dependen de Dcl-2 muestran una preferencia por Uracilo en la primera posición de la molécula (extremo 5'), característica de los sRNAs que se unen a la proteína Argonauta. Dado que de los tres genes *argonauta* de *M. circinelloides* sólo *ago-1* está implicado en el silenciamiento inducido por transgenes, se estudió el papel que desempeña la proteína Ago-1 en la biogénesis de los pequeños RNAs endógenos. Para ello se llevaron a cabo dos aproximaciones. Por un lado, se realizó la clonación, secuenciación y el análisis de la población de esRNAs acumulados endógenamente en la estirpe silvestre y en el mutante *ago-1*, con el objetivo de identificar aquellos ex-siRNAs que requieren de la proteína Ago-1 para su biogénesis. Paralelamente, se realizó la clonación y secuenciación de la población de sRNAs unidos específicamente a Ago-1, ya que esto nos permitiría identificar los esRNAs funcionales entre la población total de pequeños RNAs.

III. 2. 1. Análisis genómico de los esRNAs en el mutante *ago-1*.

El primer paso en el análisis de los sRNAs acumulados endógenamente en *M. circinelloides* fue la construcción de librerías de sRNAs de las estirpes R7B (silvestre) y MU413 (*ago-1*). Para ello, se utilizó micelio crecido en medio sólido YPG pH 4,5 durante 48 horas para la extracción de sRNAs. Tras su separación electroforética se clonaron los fragmentos de tamaños comprendidos entre 18 y 25 nt ligándolos a adaptadores específicos y convirtiendo el RNA en cDNA. La secuenciación masiva de los pequeños RNAs clonados se llevó a cabo mediante la plataforma Illumina (Illumina Genome Analyzer II), dando lugar a las lecturas que se reflejan en la **Tabla 12**. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se llevó a cabo en la Universidad de East Anglia (Simon Moxon), e incluyó el alineamiento de las lecturas con la secuencia genómica de *Mucor* y la identificación de los ex-siRNAs correspondientes a las clases I-IV en el mutante *ago-1* y en la estirpe silvestre. Las lecturas normalizadas de los ex-siRNAs correspondientes a los 324 loci exónicos en la estirpe silvestre y el mutante *ago-1* se muestran en la **Tabla S1** del **Anexo**, que también incluye el sesgo en la orientación de las cadenas de los sRNAs (sentido/antisentido).

	R7B (wt)	MU413 (<i>ago-1</i>)
Lecturas totales	14.317.874	23.435.207

Tabla 12. Estadística de los sRNAs secuenciados en las estirpes R7B y MU413. Se muestran las lecturas totales que coinciden con la secuencia genómica de *M. circinelloides*.

Los ex-siRNAs de cada exón acumulados en el mutante *ago-1* se compararon con la estirpe silvestre. Para establecer las diferencias entre ambas estirpes se siguió un criterio arbitrario, estableciendo un umbral a partir del cual se considera que la diferencia en la cantidad de sRNAs detectada en la estirpe silvestre y el mutante *ago-1* es significativa. Este umbral se estableció en un valor de al menos 1,6 (-1,6) para el logaritmo en base 2 de la relación entre las lecturas normalizadas en la estirpe mutante respecto a las obtenidas

para ese locus en la estirpe silvestre (\log_2 fold change $\leq -1,6$). Este valor equivale a una disminución en la estirpe mutante de, al menos, tres veces en el número de lecturas normalizadas con respecto a la cantidad presente en la estirpe silvestre. Los valores de las diferencias en la acumulación de los ex-siRNAs correspondientes a los distintos loci se muestran en la **Tabla S2** del **Anexo**, que también incluye datos de las diferencias estadísticas en los mutantes *dcl*⁻ y *rdrp*⁻ respecto al silvestre.

Las cuatro clases de ex-siRNAs mostraron un número significativamente menor de lecturas en la estirpe mutante *ago-1*⁻ en comparación con la estirpe silvestre (**Tabla 13**). Todos los ex-siRNAs pertenecientes a la clase I y la mayoría de los de la clase II (206 de 222) requerían la participación de Ago-1 (**Figura 33A**), puesto que se observó una acumulación de estos ex-siRNAs al menos tres veces inferior en el mutante *ago-1*⁻ en comparación con la estirpe silvestre. La mayoría de los ex-siRNAs de la clase II que no aparecían como dependientes de *ago-1* presentaron diferencias estadísticas próximas al umbral de -1,6, mostrando un descenso de al menos dos veces en el número de lecturas normalizadas en el mutante *ago-1*⁻ respecto al silvestre (**Tabla S2** del **Anexo**).

ex-siRNAs	No. de exones	Acumulación reducida en	Media del \log_2 de la tasa de cambio de <i>ago-1</i> ⁻ vs WT
Clase I	9	<i>dcl-2</i> ⁻	-9.11
Clase II	222	<i>dcl-2</i> ⁻ , <i>rdrp-1</i> ⁻	-3.21
Clase III	88	<i>dcl-1</i> ⁻ / <i>dcl-2</i> ⁻ , <i>rdrp-1</i> ⁻ , <i>rdrp-2</i> ⁻	-9.89
Clase IV	5	<i>dcl-1</i> ⁻ , <i>rdrp-1</i> ⁻ , <i>rdrp-2</i> ⁻	-6.58

Tabla 13. Acumulación de las diferentes clases de ex-siRNAs en el mutante *ago-1*⁻. Los números indican la media de los valores obtenidos al calcular, para cada secuencia, el \log_2 de la razón entre el número de lecturas normalizadas de un determinado ex-siRNA en el mutante *ago-1*⁻ respecto a la estirpe silvestre (WT). Para el cálculo de la media se utilizaron los valores del \log_2 de dicha razón indicados en la **Tabla S2**. Se indican los genes *dicer* y *rdrp* cuyas mutaciones provocan una reducción en la acumulación de las diferentes clases de ex-siRNAs (Nicolás *et al.*, 2010).

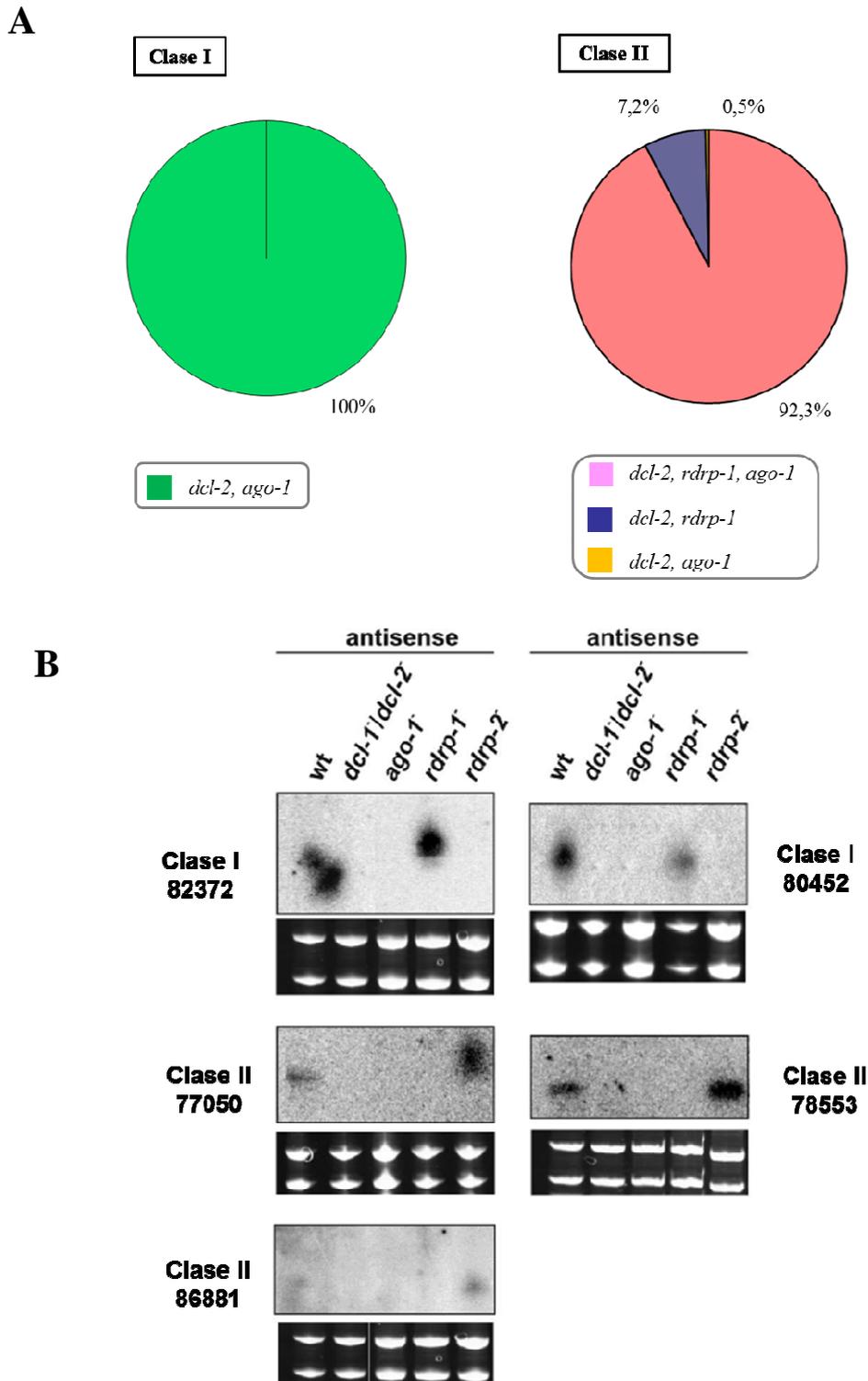


Figura 33. Participación de Ago-1 en la biogénesis de los ex-siRNAs de las clases I y II. (A) Los gráficos circulares indican el porcentaje de loci pertenecientes a cada clase que muestra una menor acumulación de ex-siRNAs en el mutante *ago-1* respecto a la estirpe silvestre. La clase I de ex-siRNAs se define por la participación de *dcl-2* y, en la mayoría de los casos, *rdrp-2* en su biogénesis, mientras que la clase II requiere las proteínas Dcl-2 y RdRP-1. (B) Detección mediante hibridaciones tipo Northern de la acumulación de ex-siRNAs en la estirpe silvestre y en los mutantes en los genes de silenciamiento *dicer*, *rdrp* y *ago-1*. Las secuencias de las sondas utilizadas para la detección de los ex-siRNAs se indican en la **Tabla 6** de Materiales y Métodos. Los gels se tiñeron con bromuro de etidio como control de carga (debajo de los radiogramas). Los *loci* corresponden a las siguientes proteínas: ID 82372: proteína desconocida; ID 80452: quinasa de serina/treonina; ID 77050: proteína desconocida; ID 78553: proteína similar a transposasa 21; ID 86881: proteína desconocida.

Para validar experimentalmente los datos obtenidos y confirmar la participación de Ago-1 en la biogénesis de las clases I y II de ex-siRNAs, se realizaron hibridaciones tipo Northern con una selección de loci de estas clases, con el fin de analizar la acumulación de los ex-siRNAs correspondientes en distintas estirpes (**Figura 33B**). En todos los casos, se detectó en la estirpe silvestre la banda correspondiente a los siRNAs antisentido de 23-24 nt, mientras que no se detectó señal alguna en el mutante *ago-1⁻*, confirmando la implicación de este gen en la biogénesis de los ex-siRNAs de las clases I y II. En las validaciones de los loci correspondientes a la clase I, tampoco se detectó señal en los mutantes *dcl-2⁻* ni en los mutantes *rdrp-2⁻*, pero sí en el mutante *rdrp-1⁻*, tal como se esperaba de los datos bioinformáticos. La validación de los ex-siRNAs de la clase II puso de manifiesto la necesidad de las proteínas Dcl-2, RdRP-1 y Ago-1 para la biogénesis de estos ex-siRNAs, puesto que en dichos mutantes no se detectó producción de siRNAs. Estos resultados indican que Ago-1 es necesaria para la producción y/o acumulación de los ex-siRNAs dependientes de Dcl-2, independientemente de si estos ex-siRNAs requieren o no la participación de RdRP-1 en su biogénesis.

De los 88 exones incluidos en la clase III, 86 de ellos mostraron también una menor acumulación de ex-siRNAs en el mutante *ago-1⁻*. En cuanto a la clase IV, 4 de los 5 exones incluidos en esta clase requerían la participación de Ago-1 para la biogénesis de los ex-siRNAs (**Figura 34**). Al realizar la validación experimental de los datos correspondientes a la clase III, no pudieron ser detectados siRNAs discretos en la estirpe silvestre, ni siquiera con técnicas que aumentaban la sensibilidad de la detección (**ver apartado II. 10. 6 de Materiales y Métodos**). Datos previos sugerían que los ex-siRNAs de la clase III, a pesar de la participación de proteínas de la maquinaria de silenciamiento en su biogénesis, poseían características diferentes a los de las clases I y II. Así, los ex-siRNAs de la clase III presentaban una distribución aleatoria de tamaños y casi todos tenían exclusivamente la misma orientación del mensajero, como cabría esperar de un proceso de degradación (Nicolás *et al.*, 2010). Ello sugiere que los ex-siRNAs de la clase III no son generados por la ruta canónica de silenciamiento, aunque los perfiles de acumulación obtenidos en el mutante *ago-1⁻* indican que la proteína Ago-1 es necesaria para la producción y/o acumulación de esta clase de ex-siRNAs.

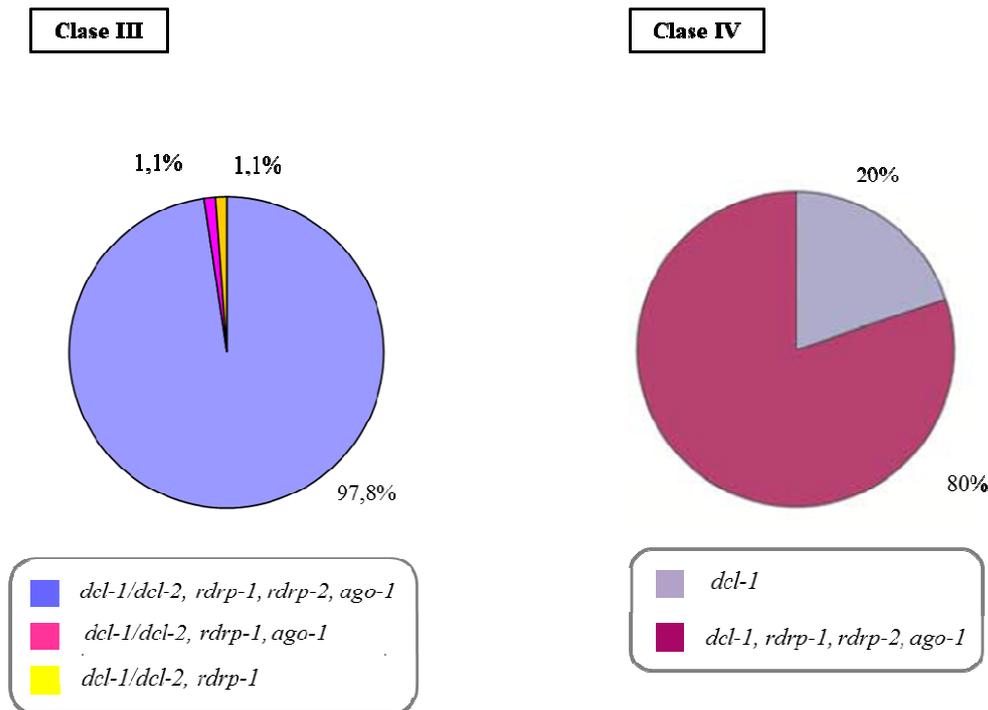


Figura 34. Participación de Ago-1 en la biogénesis de los ex-siRNAs de las clases III y IV. Los gráficos circulares indican el porcentaje de loci pertenecientes a cada clase que muestra una menor acumulación de ex-siRNAs en el mutante *ago-1* respecto a la estirpe silvestre. En la clase III de ex-siRNAs las proteínas Dcl-1 y Dcl-2 poseen un papel redundante, y además, se requiere la intervención de RdRP-1 y RdRP-2. La clase IV se caracteriza por la participación de *dcl-1*, *rdrp-1* y *rdrp-2* en su biogénesis.

III. 2. 2. Caracterización de los esRNAs unidos específicamente a Ago-1.

El hecho de que todas las clases de ex-siRNAs presenten una menor acumulación en el mutante *ago-1* respecto a la estirpe silvestre sugiere que todas ellas requieren la participación de Ago-1 para su biogénesis. Alternativamente, podría indicar que Ago-1 se une inespecíficamente a todos los pequeños RNAs y los estabiliza, de modo que la ausencia de esta proteína reduciría drásticamente el número de ex-siRNAs secuenciados. Para investigar la unión de Ago-1 a las distintas clases de ex-siRNAs se llevó a cabo la clonación y análisis de la población de esRNAs unidos específicamente a Ago-1. Con este objetivo se realizó la purificación de la proteína Ago-1 para el posterior aislamiento de los esRNAs asociados a ella.

III. 2. 2. 1. Purificación de Ago-1 mediante inmunoprecipitación.

Ago-1 es la única proteína de esta familia que participa en el mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes en *Mucor* y, como se ha demostrado en el

apartado anterior, también participa en la producción de esRNAs (Cervantes *et al.*, 2013). Con el objetivo de identificar los esRNA unidos específicamente a Ago-1, se procedió a la purificación de dicha proteína a partir del extracto total de proteínas de *Mucor* mediante la utilización de anticuerpos monoespecíficos anti-Ago-1 (**ver apartado II. 12 de Materiales y Métodos**).

Antes de llevar a cabo la inmunoprecipitación se comprobó mediante ensayos tipo Western la especificidad del anticuerpo anti-Ago-1. En dicho experimento se incluyeron las estirpes R7B, *ago-1*⁻ (MU413) y los mutantes *ago-2*⁻ (MU416) y *ago-3*⁻ (MU414), ya que, aunque el anticuerpo se diseñó contra la región de la proteína Ago-1 más divergente respecto a las otras dos proteínas Ago, se quería descartar la existencia de hibridación cruzada (**ver apartado II. 11. 4. 2 de Materiales y Métodos**). Dichas estirpes se sembraron tanto en medio rico YPG sólido como en medio mínimo MMC líquido y se incubaron a 26°C durante 24 horas en condiciones de luz continua. El extracto total de proteínas purificado de cada una de las estirpes se sometió a electroforesis en geles de un gradiente de poliacrilamida (**ver apartado II. 11. 3 de Materiales y Métodos**). Una vez separadas las proteínas, éstas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con una dilución 1:300 del anticuerpo anti-Ago-1. Los resultados obtenidos permitieron confirmar la especificidad del anticuerpo anti-Ago-1, ya que únicamente reconoce a esta proteína y no a las proteínas Ago-2 y Ago-3, que pertenecen a la misma familia y poseen un elevado grado de similitud (**Figura 35**).

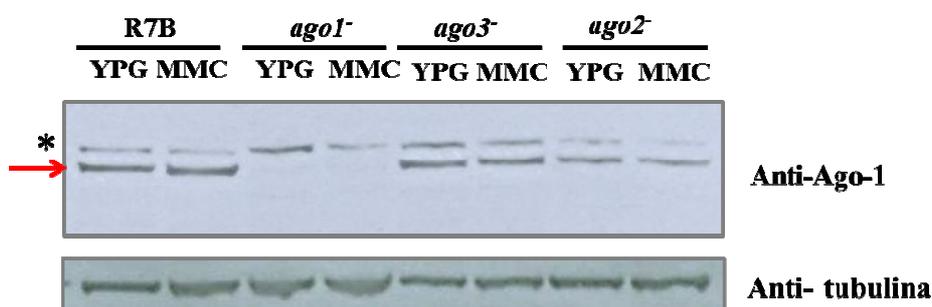


Figura 35. Especificidad del anticuerpo anti-Ago-1. El ensayo se realizó con extractos de proteínas (50 µg) de la estirpe silvestre y los mutantes *ago-1*, *ago-2* y *ago-3* incubados en los medios YPG y MMC durante 24 horas y en luz continua. Para la detección de la proteína Ago-1 se utilizó el anticuerpo monoespecífico anti-Ago-1 con una dilución 1:300. La flecha roja señala la banda correspondiente a la proteína Ago-1 de 94 kDa. El asterisco señala una banda inespecífica detectada por el anticuerpo anti-Ago-1 en todas las estirpes analizadas. Como control de carga, la misma membrana se incubó con anticuerpo anti- α -tubulina.

Una vez comprobada la eficacia del anticuerpo para detectar específicamente a la proteína Ago-1, se procedió a la inmunoprecipitación de dicha proteína para su purificación (**ver apartado II. 12 de Materiales y Métodos**). Con objeto de optimizar la inmunoprecipitación se probaron diferentes concentraciones de NaCl en el tampón de lisis, aunque en ninguna de las condiciones probadas se detectaron cantidades significativas de Ago-1 en las muestras inmunoprecipitadas (**Figura 36**). Sí se detectó en todas las muestras la presencia de anticuerpos primarios anti-Ago-1, lo que indica que la proteína A precipitó eficazmente al anticuerpo primario y sugiere que la ausencia de Ago-1 se debe a la incapacidad de este anticuerpo para reconocer a la proteína Ago-1 en las condiciones nativas usadas en el experimento. Se realizó también un crosslinking con formaldehído para unir covalentemente el anticuerpo a la proteína y facilitar su inmunoprecipitación, pero no se obtuvieron los resultados esperados (**Figura 36**). Debido a la ineficacia de la inmunoprecipitación, que no permitió obtener muestras purificadas con cantidades significativas de Ago-1, la purificación se llevó a cabo mediante una técnica alternativa, la cromatografía líquida o FPLC.

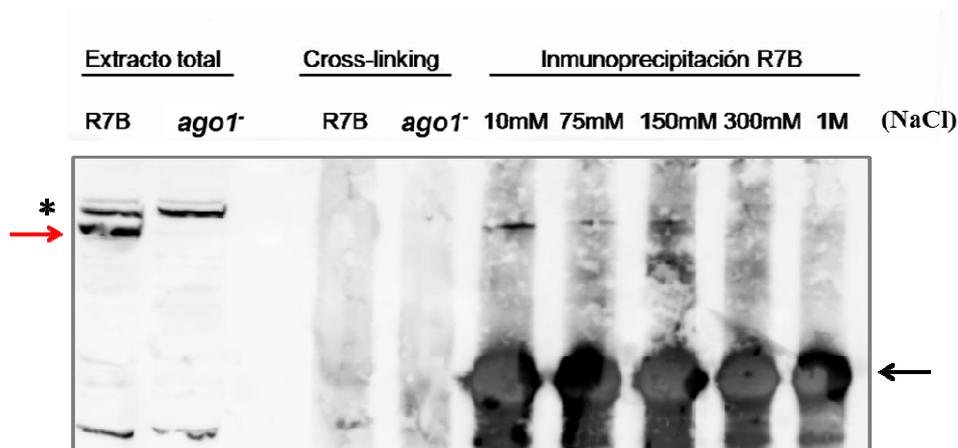


Figura 36. Inmunoprecipitación de la proteína Ago-1. Detección mediante Western de Ago-1 en el extracto total de proteínas de la estirpe silvestre y el mutante *ago-1* cultivados en medio rico YPG, y tras el experimento de inmunoprecipitación. Para intentar aumentar la cantidad de proteína obtenida tras la inmunoprecipitación se realizó cross-linking con formaldehído y se utilizaron diferentes concentraciones de NaCl en el tampón de lisis. La flecha roja señala la banda correspondiente a la proteína Ago-1. El asterisco señala una banda inespecífica detectada por el anticuerpo anti-Ago-1. La flecha negra señala el anticuerpo primario anti-Ago-1, detectado por el anticuerpo secundario en las muestras inmunoprecipitadas.

III. 2. 2. 2. Purificación de Ago-1 mediante FPLC.

Para aislar la población de esRNAs asociados específicamente a Ago-1, se llevó a cabo la purificación de dicha proteína mediante cromatografía líquida o FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) como alternativa a la inmunoprecipitación, con la que no se habían obtenido los resultados deseados. Previamente, se comprobó que la proteína Ago-1 purificada mediante FPLC mantenía específicamente unidos los sRNAs y que éstos podían ser aislados intactos de los complejos correspondientes. Para ello, se realizó el fraccionamiento del extracto total de proteínas de una estirpe silvestre silenciada con el plásmido pMAT1253, que contiene el transgen con repeticiones invertidas de *carB*, cultivada en medio rico YPG durante 48 horas. Para el fraccionamiento se utilizó la columna Superdex 200 (10/300) que separa las proteínas según su tamaño, eluyéndose en las primeras fracciones las proteínas de mayor peso molecular (**ver apartado II. 11. 2 de Materiales y Métodos**).

Las fracciones obtenidas se precipitaron con 20% TCA y se lavaron con acetona, antes de ser sometidas a análisis tipo Western, utilizando los anticuerpos específicos anti-Ago-1 para identificar aquellas fracciones que contenían la proteína (**Figura 37A**). Las fracciones B4 a B12, que incluyen aquellas en las que eluye la proteína Ago-1, se utilizaron para realizar el aislamiento de los sRNAs, con los que se llevó a cabo un experimento de hibridación tipo Northern para detectar siRNAs antisentido correspondientes a secuencias del gen *carB*, silenciado en la estirpe utilizada para la purificación de Ago-1 (**Figura 37B**). Los resultados muestran que las fracciones enriquecidas en Ago-1 contienen los siRNAs antisentido de 21 y 25 nt correspondientes a secuencias de *carB*, que son característicos del silenciamiento génico en *Mucor*, mientras que estos siRNAs no se detectan en las fracciones que no contienen Ago-1. Ello demuestra que la proteína Ago-1 purificada por FPLC mantiene específicamente unidos los siRNAs y confirma que esta estrategia es adecuada para el aislamiento de los esRNAs unidos específicamente a la proteína Ago-1 en la estirpe silvestre, para su posterior clonación y secuenciación.

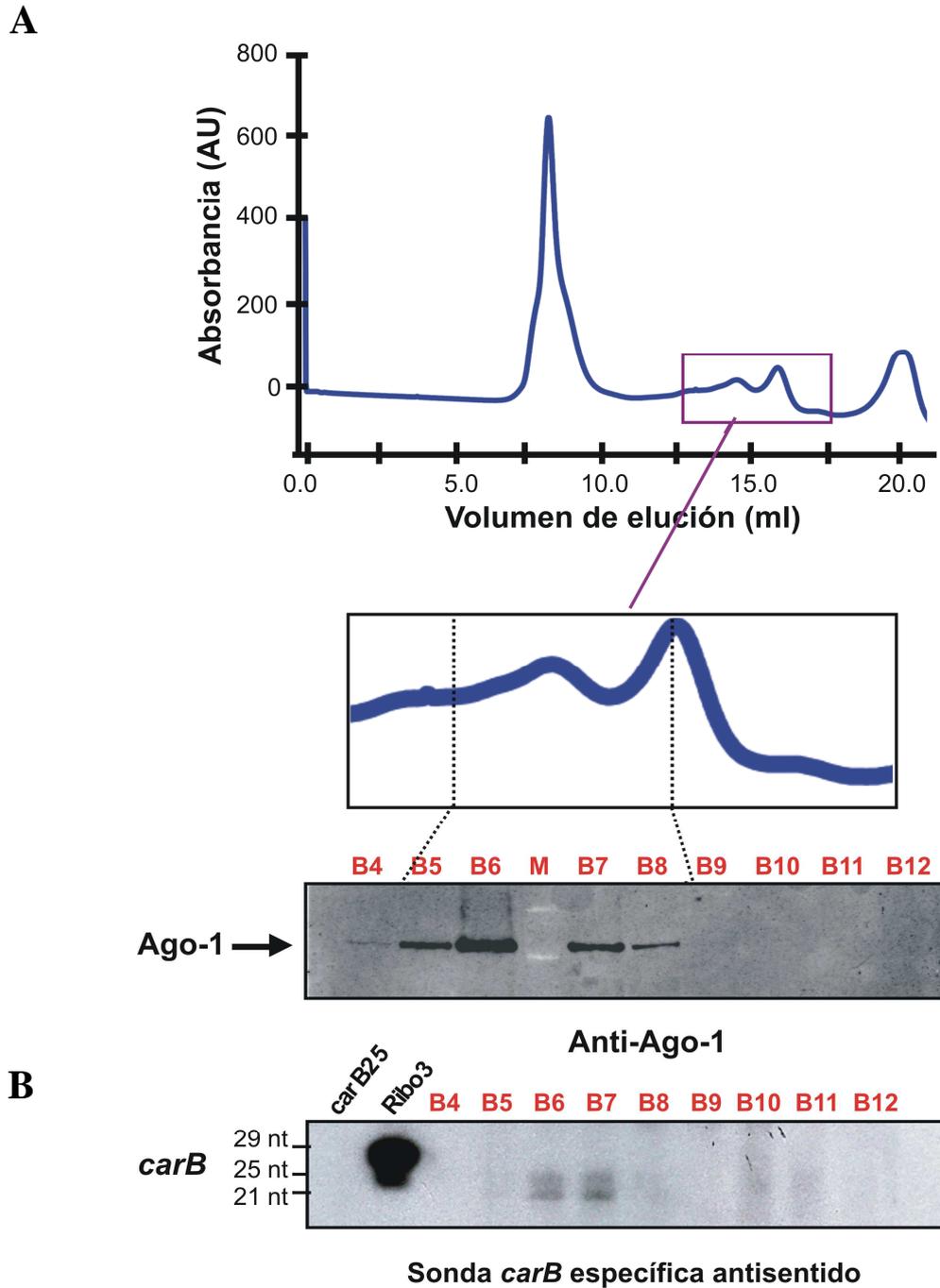


Figura 37. Purificación de Ago-1 mediante FPLC y aislamiento de sRNAs unidos a Ago-1. (A) Perfil de elución de la cromatografía de exclusión en columna Superdex 200 (10/300) de un extracto de la estirpe silvestre silenciada conteniendo un transgen con repeticiones invertidas de *carB*. Se utilizó un flujo de 0.25 ml/min, coleccionándose fracciones de 500 μ l. UA: unidades arbitrarias. Las fracciones obtenidas se sometieron a análisis tipo Western utilizando anticuerpo primario anti-Ago-1, para detectar aquellas que contenían la proteína Ago-1. (B) Para confirmar la presencia de siRNAs unidos a Ago-1, se aisló el RNA de bajo peso molecular a partir de cada una de las fracciones, realizándose un experimento tipo Northern. Para la hibridación se utilizó una ribosonda que detecta los siRNAs antisentido de *carB* (pMAT652) (Nicolás *et al.*, 2003). Se detectaron los dos tamaños de siRNAs (21- y 25-nt), únicamente en las fracciones que contenían Ago-1. Como control de tamaño y especificidad, se utilizó 1 pmol por calle de un oligonucleótido (29-mer) con orientación antisentido (Ribo3) y otro (25-mer) con orientación con sentido (carB25).

III. 2. 2. 3. Clonación y análisis de los esRNAs unidos a Ago-1.

Una vez comprobada la adecuación del método elegido, se llevó a cabo el fraccionamiento del extracto total de proteínas de la estirpe silvestre y del mutante *ago-1*⁻, utilizado como control negativo, en las mismas condiciones usadas en el apartado anterior. La aplicación de un ensayo tipo Western a las fracciones obtenidas permitió identificar aquellas enriquecidas en Ago-1 y confirmar la especificidad del anticuerpo, que no detectó ninguna banda en fracciones equivalentes del mutante *ago-1*⁻ (**Figura 38**).

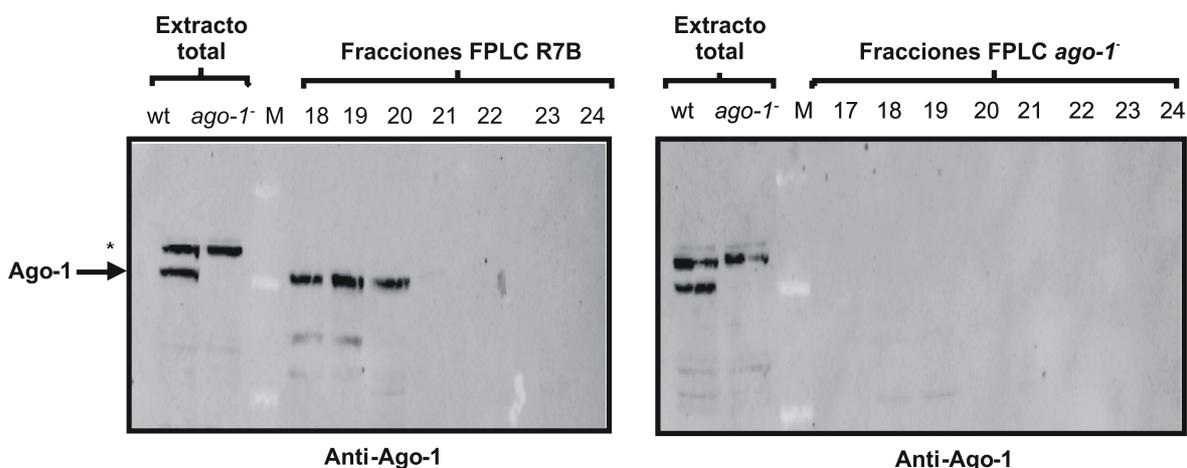


Figura 38. Obtención de fracciones enriquecidas en Ago-1 en la estirpe silvestre. Análisis tipo Western de las fracciones obtenidas mediante FPLC a partir de un extracto de la estirpe silvestre (izquierda) y del mutante *ago-1*⁻, usado como control negativo (derecha). Las fracciones enriquecidas en Ago-1 de la estirpe silvestre se utilizaron para el aislamiento de los esRNAs. El asterisco señala una banda inespecífica detectada por el anticuerpo anti-Ago-1

Con el objetivo de determinar si todas las clases de ex-siRNAs se unen específicamente a Ago-1, se llevó a cabo el aislamiento de los esRNAs de la estirpe silvestre a partir de las fracciones de FPLC enriquecidas en Ago-1. También se aislaron los sRNAs de las fracciones equivalentes del mutante *ago-1*⁻, como control negativo. Tras su separación electroforética se purificaron del gel los esRNAs de tamaños comprendidos entre 20-25 nt, que se utilizaron para la construcción de las librerías de cDNA de ambas estirpes (**ver apartado II. 10. 3 de Materiales y Métodos**). La secuenciación de dichas librerías se realizó mediante la plataforma Illumina (Illumina Genome Analyzer II α), dando lugar a las lecturas que se reflejan en la **Tabla 14**.

sRNAs unidos a Ago-1		
	R7B	MU413 (<i>ago-1</i>)
Lecturas totales	78.554.020	86.197.423

Tabla 14. Estadística de los sRNAs aislados de fracciones enriquecidas en Ago-1 de las estirpes R7B (silvestre) y MU413. Se muestran las lecturas totales que coinciden con la secuencia genómica de *M. circinelloides*.

Al comparar los datos obtenidos de la secuenciación de la estirpe silvestre y el mutante *ago-1* se identificaron 417 loci de ex-siRNAs que mostraron un incremento de al menos 3 veces (\log_2 fold change $\geq 1,6$) en el número de lecturas normalizadas en las fracciones enriquecidas en Ago-1 de la estirpe silvestre respecto a las fracciones equivalentes del mutante *ago-1* (**Tabla S3 del Anexo**). La comparación de estos listados con los correspondientes a las clases I a IV permitió establecer que una alta proporción de los ex-siRNAs específicamente unidos a Ago-1 pertenecían a las clases I y II, mientras que solamente dos de los 88 loci de la clase III y ninguno de la clase IV aparecían entre los ex-siRNAs unidos a Ago-1 (**Tabla 15 y Tabla S4 del Anexo**). A pesar de que los ex-siRNAs de las clases III y IV no aparecen prácticamente representados en la población de siRNAs co-purificados con Ago-1, los resultados mostrados anteriormente (**apartado III. 2. 1**) indican que la población de ex-siRNAs de estas clases acumulados en el mutante *ago-1* es significativamente menor que en la estirpe silvestre (**Tabla 15**). Estos resultados sugieren que los ex-siRNAs de las clases III y IV requieren de la proteína Ago-1 para su biogénesis, pero no se asocian específicamente a ella para ejercer su función reguladora, como ocurre con los ex-siRNAs de las clases I y II.

Los ex-siRNAs de las clases I y II que co-purifican con Ago-1 muestran una fuerte preferencia por Uracilo en la posición 5', mientras que los de las clases III y IV presentan mayoritariamente Adenina en el extremo 5' (**Figura 39**). La presencia de Uracilo en el extremo 5' de la molécula es una característica común de esRNAs unidos a proteínas Argonauta en animales, plantas y otros hongos. Es posible que la preferencia por Adenina en el extremo 5' de los ex-siRNAs de la clase III sea responsable, al menos en parte, de su falta de unión a la proteína Ago-1. En conjunto, estos resultados sugieren que los ex-

siRNAs de las clases I y II son esRNAs funcionales, generados por la maquinaria canónica de silenciamiento, que se unen a Ago-1 para regular la expresión de sus genes diana.

Clases	No. de exones	Población total de ex-siRNAs (mutante vs WT) ¹						ex-siRNAs asociados a Ago-1 ²	
		<i>dcl-1</i>	<i>dcl-2</i>	<i>dcl-1/2</i>	<i>rdrp-1</i>	<i>rdrp-2</i>	<i>ago-1</i>	WT vs <i>ago-1</i>	% de ex-siRNAs asociados a AGO-1
Clase I	9	-	-12,84	-8,86	3,74	-	-9,11	8,31	100
Clase II	222	-	-3,79	-8,72	-5,02	-	-3,21	6,40	88,74 (197 de 222)
Clase III	88	-	-	-3,21	-4,52	-3,50	-9,89	-	2,27 (2 de 88)
Clase IV	5	-2,45	-	-	-2,61	-2,42	-6,58	-	0

Tabla 15. Unión de las diferentes clases de ex-siRNAs a la proteína Ago-1. ¹Los números indican la media del \log_2 de la razón entre el número de lecturas normalizadas de un determinado ex-siRNA en los distintos mutantes de silenciamiento respecto a la estirpe silvestre (WT). Para su cálculo se utilizaron los valores del \log_2 de dicha razón indicados en la **Tabla S2**. ²Los números indican la media de los valores obtenidos al calcular, para cada secuencia, el \log_2 de la razón entre el número de lecturas normalizadas de un determinado ex-siRNA en la fracción enriquecida en Ago-1 en la estirpe silvestre (WT) respecto al mutante *ago-1*. Para el cálculo de la media se utilizaron los valores del \log_2 de dicha razón indicados en la **Tabla S4**.

Para confirmar la participación de *ago-1* en la regulación de la expresión de genes endógenos mediante los ex-siRNAs de las clases I y II, se procedió al análisis, mediante Northern blot, de la acumulación de los mRNA diana de varios loci seleccionados en la estirpe mutante *ago-1*, en relación con la estirpe silvestre. Así mismo, se analizó también la acumulación de esos mRNA en los otros mutantes implicados en la biogénesis de las clases I y II de ex-siRNAs (**Figura 40**). Todos los mRNA analizados, correspondientes a loci con expresión reducida de ex-siRNAs en el mutante *ago-1*, mostraron un incremento en su nivel de acumulación en el mutante *ago-1* respecto a la estirpe silvestre. Ese mismo comportamiento se observó en los otros mutantes en genes de silenciamiento implicados en la biogénesis del correspondiente ex-siRNA. Así, los mRNA regulados por ex-siRNAs de la clase I aumentaron su expresión en los mutantes *dcl-2*, *ago-1* y *rdrp-2*, mientras que los regulados por ex-siRNAs de la clase II presentaron una mayor acumulación en los mutantes *dcl-2*, *ago-1* y *rdrp-1*. Estos resultados demuestran que la reducción en los

niveles de ex-siRNAs supone un aumento en la acumulación de los mRNA diana correspondientes. Además, confirman que los ex-siRNAs unidos a Ago-1 son completamente funcionales y capaces de suprimir la expresión de sus genes diana, poniendo de manifiesto el importante papel de Ago-1 en la regulación de la expresión de genes endógenos en *M. circinelloides*.

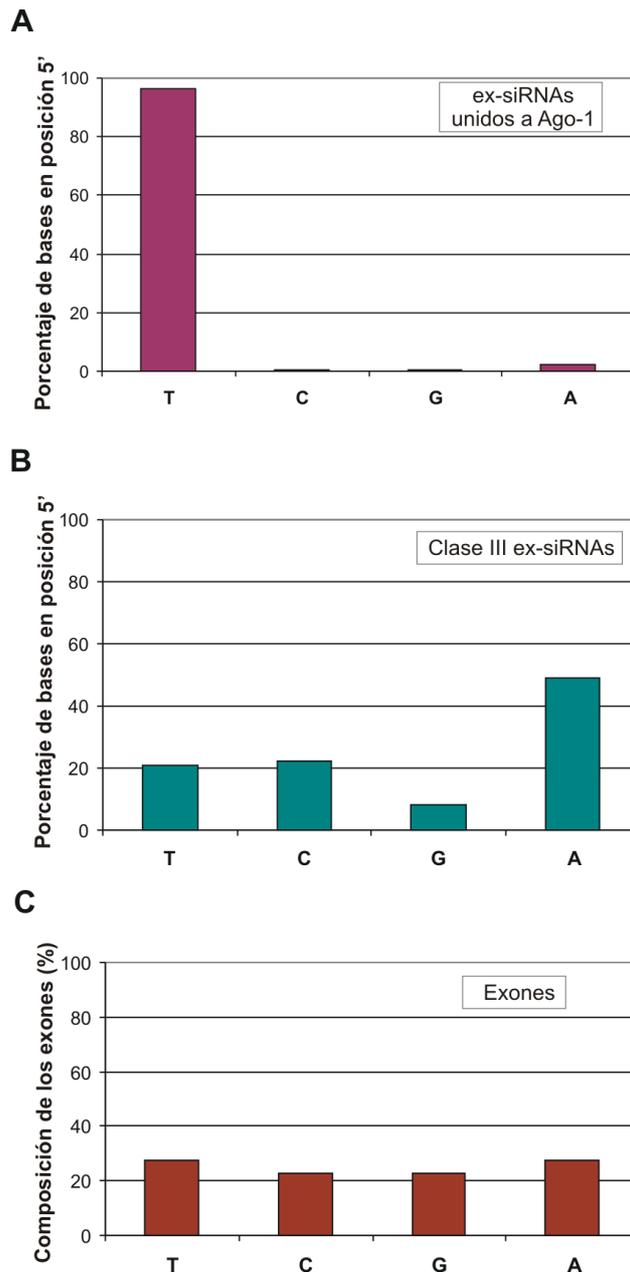


Figura 39. Nucleótidos en el extremo 5' de los ex-siRNAs. Se representan los porcentajes de las cuatro bases (timidina/uracilo, citosina, guanina y adenina en el extremo 5' de los ex-siRNAs aislados de las fracciones enriquecidas en Ago-1 de la estirpe silvestre (A) y los porcentajes correspondientes en la clase III de ex-siRNAs (B). Para comparación, se muestra en C la composición nucleotídica del total de exones identificados en el genoma de *M. circinelloides*.

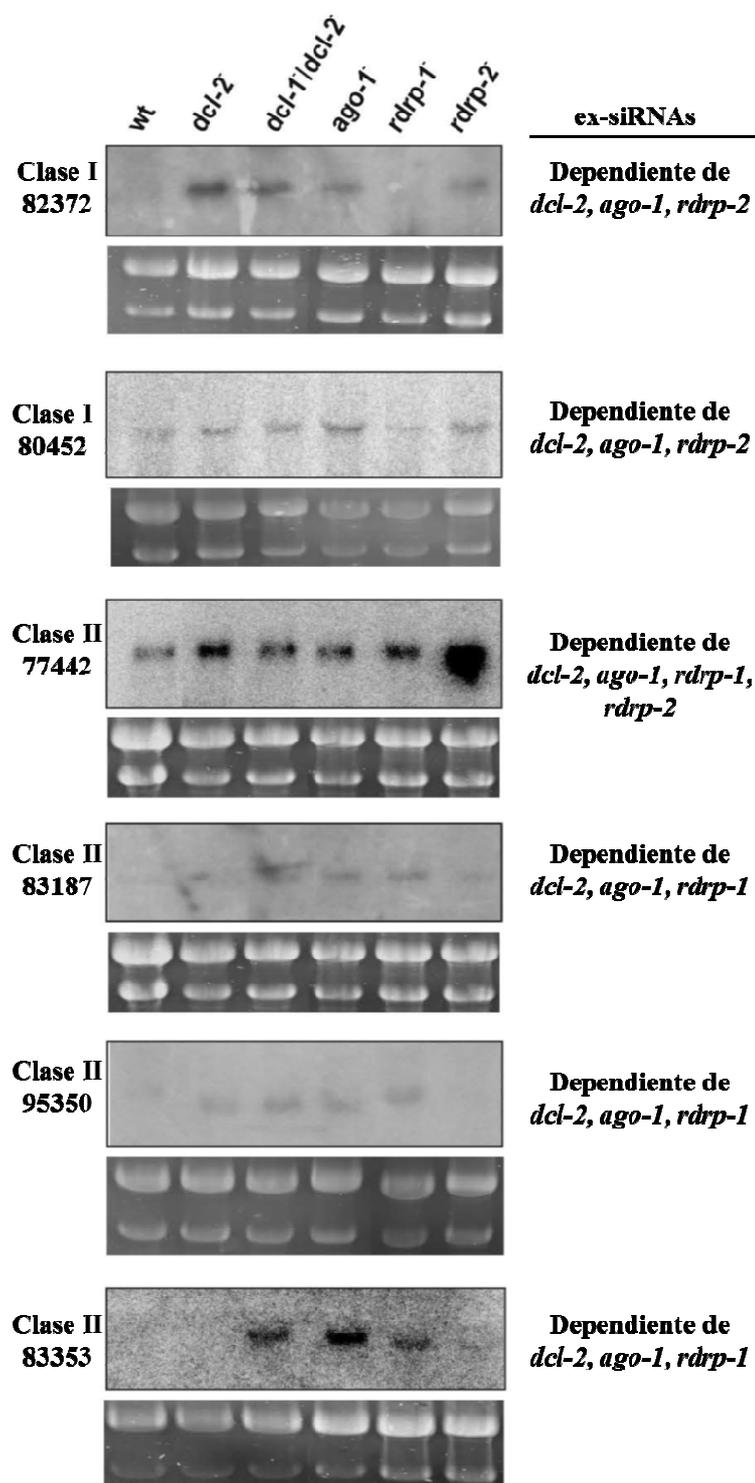


Figura 40. Acumulación de mRNAs en la estirpe silvestre y en los mutantes en genes de silenciamiento. Se muestran los niveles de expresión de loci pertenecientes a las clases I y II de ex-siRNAs. Muestras de RNA total (50 µg) procedentes de micelio de las diferentes estirpes incubadas en medio MMC durante 24 h, se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y las membranas se hibridaron con sondas específicas para cada locus (ver **Tabla 6** en **Materiales y Métodos**). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio como control de carga (debajo de los radiogramas). Se indican también los genes de silenciamiento necesarios para la biogénesis de los correspondientes ex-siRNAs. Los distintos loci corresponden a las siguientes proteínas: ID 82372: proteína desconocida; ID 80452: quinasa de serina/treonina; ID 77442: proteína desconocida; ID 83187: proteína helicasa de unión a DNA con cromodominio; ID 95350: proteína desconocida; ID 83353: proteína desconocida.

III. 3. Análisis global de los mRNAs acumulados diferencialmente en mutantes de silenciamiento.

Los datos obtenidos en el apartado anterior ponen de manifiesto la existencia de distintos tipos de ex-siRNAs que difieren en las proteínas requeridas para su biogénesis. Las validaciones experimentales realizadas indican que estos ex-siRNAs son funcionales, ya que suprimen la expresión de los genes diana. Sin embargo, estos experimentos no permiten tener una visión global del papel del mecanismo de silenciamiento génico en la regulación de la expresión de genes endógenos, ni de las diferentes combinaciones de proteínas de silenciamiento implicadas en la regulación de distintos grupos de genes. Dado que el mecanismo de silenciamiento génico en *M. circinelloides* actúa mediante la degradación de los mRNAs (Nicolás *et al.*, 2003), la identificación de genes que muestren una acumulación diferencial de mRNAs en mutantes afectados en las rutas de silenciamiento respecto a la estirpe silvestre es una aproximación básica para determinar las funciones celulares reguladas por este mecanismo. Para ello, se llevaron a cabo análisis transcriptómicos a nivel genómico con el objetivo de identificar los perfiles de mRNAs en cada una de las estirpes sometidas al ensayo.

III. 3. 1. Análisis transcriptómico mediante micromatrices.

La caracterización a nivel genómico de los perfiles de mRNA acumulados diferencialmente en la estirpe silvestre y en mutantes en genes de silenciamiento se llevó a cabo mediante el uso de micromatrices diseñadas específicamente para *M. circinelloides*, utilizando la plataforma desarrollada por Agilent Technologies. La hibridación de las muestras de RNA con las micromatrices y el tratamiento bioestadístico de los datos se llevaron a cabo en la empresa Bioarray S.L. (Alicante). En el **apartado II.17.1 de Materiales y Métodos** se describe cómo se llevaron a cabo estos análisis y todos los aspectos técnicos relacionados con el desarrollo experimental.

Las estirpes incluidas en estos análisis fueron: la estirpe silvestre R7B, el doble mutante MU411 (*dcl-1/dcl-2*⁻) y los mutantes simples MU413 (*ago-1*⁻) y MU419 (*rdrp-1*⁻), realizándose las comparaciones indicadas en la **Figura 41**. Las estirpes se sembraron en medio MMC sólido pH 4,5 y se incubaron en condiciones de luz continua durante 24 y 48 horas, con el objetivo de realizar el estudio en diferentes fases del crecimiento vegetativo.

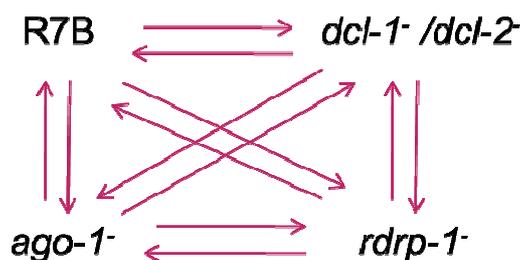


Figura 41. Esquema de las comparaciones realizadas en el experimento de expresión diferencial mediante micromatrices (diseño en loop no conectado). En total se realizaron 12 comparaciones con micelios crecidos durante 24 horas y otras 12 con micelios crecidos durante 48 horas.

Una vez obtenidos los datos normalizados se realizaron las distintas comparaciones y se identificaron aquellas sondas que mostraron expresión diferencial con un valor *p*-ajustado inferior a 0,05 (95% de confianza estadística), nivel establecido como umbral de confianza. Dada la magnitud de los datos obtenidos, y para simplificar el análisis de los mismos, se analizaron exclusivamente los genes que mostraron expresión diferencial significativa en las comparaciones entre los distintos mutantes y el silvestre, lo que nos debe permitir obtener un listado completo de los genes regulados directa o indirectamente por la maquinaria de silenciamiento génico.

En la **Tabla 16** se indica el número de loci que mostraron expresión diferencial significativa en el mutante indicado respecto a la estirpe silvestre, tanto en las muestras obtenidas a las 24 como a las 48 horas. Cabe señalar que, mientras el número de loci con expresión diferencial en el mutante *rdrp-1* fue similar en las muestras tomadas a las 24 y 48 horas, el número de genes diferencialmente expresados en el doble mutante *dcl-1/dcl-2* fue significativamente mayor a las 48 horas, una vez que las células han alcanzado la fase estacionaria de crecimiento.

	24 h			48 h		
	<i>dcl-1/2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>	<i>dcl-1/2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>
Nº loci con mayor acumulación en mutante vs WT	53	53	649	702	31	527
Nº loci con menor acumulación en mutante vs WT	46	135	425	870	14	647

Tabla 16. Loci con expresión diferencial significativa en los mutantes de silenciamiento respecto al silvestre identificados en los experimentos de transcriptómica con micromatrices. Se indica el número de loci que mostraron una mayor o menor acumulación de transcritos en la estirpe mutante indicada respecto al silvestre, tanto a las 24 horas como a las 48 horas de crecimiento vegetativo.

La comparación de los listados de genes diferencialmente expresados en cada uno de los mutantes respecto al silvestre permitió establecer las intersecciones entre ellos e identificar aquellos genes con regulación diferencial en más de un mutante. Un total de 99 genes mostraron expresión diferencial en el doble mutante *dcl-1/dcl-2*⁻ en las muestras tomadas a las 24 horas, es decir, cuando las células se encuentran en fase exponencial temprana (**Figura 42**). De éstos, 53 mostraron una mayor acumulación de transcritos en el mutante (**Figura 42A**) y 46 acumularon más mRNA en la estirpe silvestre (**Figura 42B**). Más de la mitad de estos genes mostraron una expresión diferencial similar en el mutante *ago-1*⁻ (23 y 29 genes, respectivamente) sugiriendo que estos genes son directa o indirectamente regulados por la maquinaria canónica de silenciamiento. El escaso solapamiento entre los genes regulados por las proteínas Dicer y Argonata y aquellos que muestran una expresión diferencial en el mutante *rdrp-1*⁻ sugiere que esta proteína debe participar en mecanismos de regulación independientes de la ruta canónica de silenciamiento.

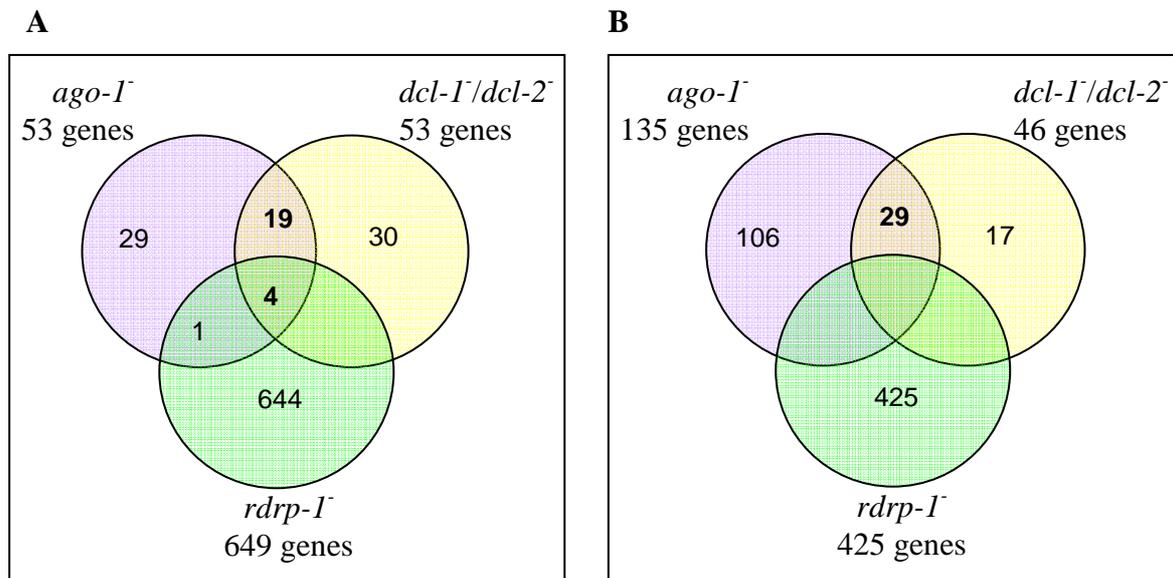


Figura 42. Análisis de genes con expresión diferencial a las 24 horas de crecimiento. Se muestra el solapamiento entre los genes con mayor acumulación de transcritos en los distintos mutantes respecto al silvestre (A) y aquellos con menor acumulación en los mutantes respecto al silvestre (B).

El número de genes regulados por la maquinaria de silenciamiento aumentó de forma notable a las 48 horas de crecimiento, cuando las células han alcanzado la fase estacionaria (**Figura 43**). Un total de 1572 genes mostraron expresión diferencial en el

doble mutante *dcl-1/dcl-2* respecto a la estirpe silvestre, 702 de los cuales vieron aumentada su expresión en el mutante (**Figura 43A**) y 870 acumularon más mRNA en la estirpe silvestre (**Figura 43B**). Sin embargo, sólo una pequeña fracción de los genes con expresión diferencial en el mutante *dcl-1/dcl-2* mostraron también diferencias de expresión en el mutante *ago-1*, sugiriendo de nuevo que, además de participar en la regulación de genes endógenos mediante el mecanismo canónico de silenciamiento génico, las proteínas Dicer también participan en rutas no canónicas de regulación de la expresión génica. Es importante resaltar que la proteína RdRP-1 debe también participar en estas rutas no canónicas, ya que una proporción relevante de los genes que son regulados diferencialmente en el doble mutante *dicer* son similarmente activados o reprimidos en el mutante *rdrp-1* (**Figura 43**). Por otro lado, el pequeño número de genes que ven alterada su expresión en el mutante *ago-1* muestran también expresión diferencial en mutantes afectados en los genes *dicer* y/o *rdrp-1*, lo que sugiere que la regulación de la expresión génica por la proteína Ago-1 se lleva a cabo exclusivamente a través de su papel en el mecanismo de silenciamiento génico.

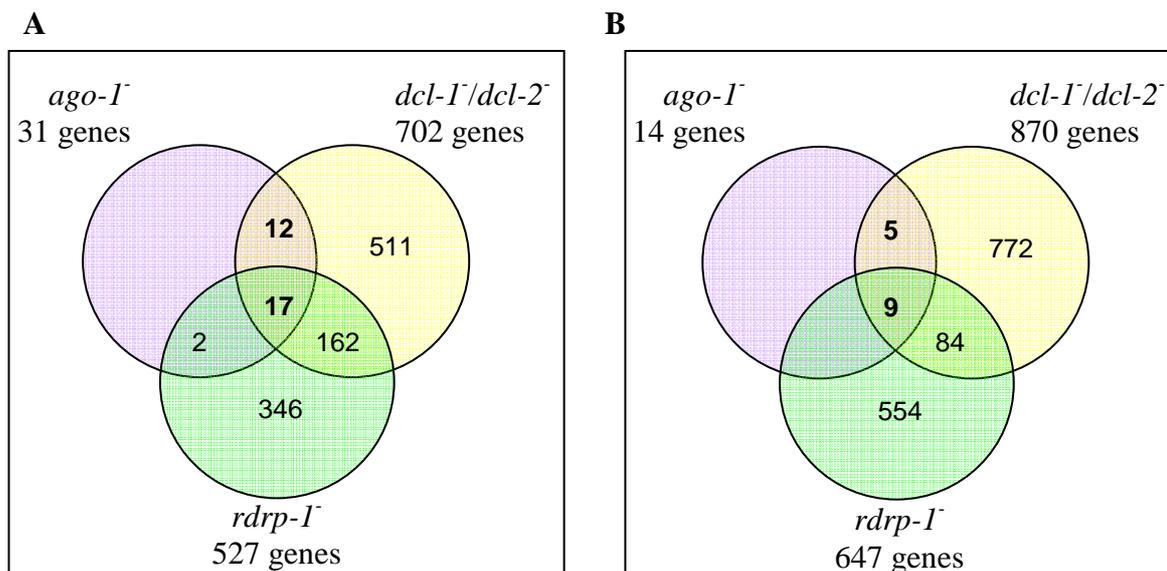


Figura 43. Análisis de genes con expresión diferencial a las 48 horas de crecimiento. Se muestra el solapamiento entre los genes con mayor acumulación de transcritos en los distintos mutantes respecto al silvestre (A) y aquellos con menor acumulación en los mutantes respecto al silvestre (B).

Es importante resaltar que los cambios en los niveles de expresión génica detectados en los mutantes de silenciamiento respecto a la estirpe silvestre fueron en todos los casos moderados, identificándose un número pequeño de genes en los que los valores

de cambios en los niveles de expresión respecto al silvestre superaron las dos veces. La **Tabla 17** muestra los valores medios del \log_2 de la tasa de cambio en la expresión génica (Log₂ Fold Change [Log₂FC]) de los genes que aumentan su expresión en los mutantes de silenciamiento respecto al silvestre. Como se puede observar, la media de esos valores difícilmente alcanza un valor de 1, que correspondería a un aumento en la expresión de dos veces. Valores similares se obtienen cuando se analizan los niveles de expresión de los genes que presentan menor acumulación de transcritos en los mutantes en relación a la estirpe silvestre.

Tiempo	Media del \log_2 de la tasa de cambio mutante vs WT		
	<i>dcl-1/dcl-2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>
24 h	1,02	1,04	0,91
48 h	0,76	1,29	0,74

Tabla 17. Valores medios de expresión diferencial en los mutantes de silenciamiento. Los números indican la media de los valores obtenidos al calcular, para cada gen con expresión diferencial, el \log_2 de la razón entre la expresión en los mutantes indicados y la de la estirpe silvestre (WT).

Dado que cambios pequeños en los niveles de expresión génica pueden aumentar la aparición de falsos positivos, centramos nuestro análisis en aquellos genes con una mayor diferencia en los niveles de expresión. Así, cuando se establece un umbral significativo más estricto ($\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,6$ ó $\leq -1,6$), que equivale a una variación en la acumulación del mRNA de al menos 3 veces en el mutante respecto al silvestre, el número de genes que presentan expresión diferencial disminuye considerablemente (**Tabla 18**).

	24 h			48 h		
	<i>dcl-1/2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>	<i>dcl-1/2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>
Loci con mayor acumulación en mutante vs WT	9	8	76	36	5	17
Loci con menor acumulación en mutante vs WT	8	26	11	238	4	89

Tabla 18. Loci con mayores diferencias de expresión en los mutantes de silenciamiento respecto al silvestre. Se indica el número de loci que presentaron una acumulación al menos tres veces mayor o menor en los mutantes indicados respecto a la estirpe silvestre (WT).

El análisis de los genes que presentan las mayores diferencias de expresión génica en los distintos mutantes respecto al silvestre puso de manifiesto un mayor solapamiento entre ellos y permitió identificar genes con valores altos de expresión diferencial en más de un mutante. Dado que los genes *dicer* y *ago* constituyen los elementos centrales de la maquinaria canónica de silenciamiento, realizamos un análisis *in silico* de las posibles funciones de estos genes regulados simultáneamente por *dcl-1/dcl-2* y *ago-1*. La **Tabla 19** muestra las funciones propuestas para las proteínas correspondientes, identificadas al comparar sus secuencias con la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot, que contiene información sobre proteínas con funciones conocidas, utilizando el programa WU-BLAST (Blosun45). Varios de los genes que muestran una menor expresión en los mutantes *dicer* y *ago* respecto al silvestre podrían estar implicados en funciones relacionadas con la pared celular (proteínas con ID 75156, 14092 y 86104), y con el crecimiento (proteína con ID 82942) (ver **Discusión**). Por otro lado, la mayoría de genes que acumulan más mRNA en los mutantes cifran proteínas que no presentan similitudes globales con proteínas de funciones conocidas presentes en las bases de datos, aunque varias de ellas contienen dominios presumiblemente implicados en regulación de la expresión génica (**Tabla 19**). Estos genes tienen el comportamiento esperado de aquellos que son regulados directamente por los ex-siRNAs (aumento de la expresión del mRNA en los mutantes de silenciamiento). Sus posibles funciones reguladoras podrían explicar el elevado número de genes que muestran alterada su regulación en los mutantes de silenciamiento.

Es interesante destacar que el gen que muestra una mayor expresión diferencial, tanto en el mutante *dcl-1/dcl-2* como en el *ago-1*, es el que cifra la proteína con ID 83353 (**Tabla 19**). Este gen corresponde a uno de los loci productores de ex-siRNAs de la clase II y, además de aumentar la expresión del mensajero en los mutantes mencionados, también lo hace en el mutante *rdp-1*, tanto en las muestras de las 24 como de las 48 horas (**Tabla 20**). La proteína ID 83353 muestra una alta similitud con la poliproteína Gag de los retrotransposones de la familia Ty3/Gypsy, lo que podría confirmar el papel directo de la maquinaria de RNAi en el silenciamiento de los transposones durante el crecimiento vegetativo de *M. circinelloides* (ver **Discusión**).

ID de la Proteína ^a	Tasa de cambio mutante/wt ^b	Definición KOG ^c	Clase KOG
14092	-6.07	Glycolipid 2-alpha-mannosyltransferase	Carbohydrate transport and metabolism
27267	-4.98	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Energy production and conversion
81113	-4.25	Defense-related protein containing SCP domain	Function unknown
86104	-3.62	Glycolipid 2-alpha-mannosyltransferase	Carbohydrate transport and metabolism
86710	-3.48	Serine-threonine phosphatase 2B, catalytic subunit	General function prediction only
24134	-3.46	Sorting nexin SNX11	Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
27693	-3.18	Ca ²⁺ /H ⁺ antiporter VCX1 and related proteins	Inorganic ion transport and metabolism
82942	-3.14	Cyclin	General function prediction only
75156	-3.09	O-mannosyl transferase	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
82565	-3.07	Polyadenylate-binding protein (RRM superfamily)	Translation, ribosomal structure and biogenesis
81803	-3.01	Poly(ADP-ribose) polymerase Parp	Transcription
77287	+3.21	Homeobox protein	General function prediction only
75997	+3.58	Esterase/lipase/thioesterase	Lipid transport and metabolism
76671	+3.92	FOG: Zn-finger	General function prediction only
84028	+4.03	Short-chain alcohol dehydrogenase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
85858	+24.6	RRM motif-containing protein	General function prediction only
83353	+25.63	Zinc finger, CCHC-type. Retrotransposon gag protein	General function prediction only

Tabla 19. Genes diferencialmente expresados en los mutantes *dcl1/dcl-2* y *ago-1* respecto al silvestre. ^aNúmero de identificación de la proteína en la versión 1 de la secuencia genómica de *M. circinelloides* (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci1/Mucci1.home.html>). ^bLos signos (+) y (-) indican mayor o menor expresión, respectivamente, en los mutantes *dcl-1/dcl-2* y *ago-1* respecto a la estirpe silvestre (wt). Para cada gen, se indica el valor de la tasa de cambio (*fold change*) en el mutante (*dcl-1/dcl-2* o *ago-1*) que muestra la mayor expresión diferencial. ^cKOG: grupos de ortólogos eucarióticos. Es una herramienta específica de eucariotas para identificar proteínas ortólogas y parálogas. Se incluyen las definiciones y grupos KOG tal como aparecen en las proteínas anotadas.

Log ₂ de la tasa de cambio mutante vs WT para el locus ID 83353			
Tiempo	<i>dcl-1/dcl-2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>
24 h	2,27	4,68	1,85
48 h	3,75	4,31	2,69

Tabla 20. Valores de expresión diferencial en los mutantes de silenciamiento para el locus ID 83353. Los números indican el log₂ de la razón entre la expresión en los mutantes indicados y la de la estirpe silvestre (WT).

El aumento en la acumulación de mRNA en los mutantes de silenciamiento asociado a la disminución en la producción de ex-siRNA en esos mutantes es el comportamiento esperado de los genes regulados directamente por ex-siRNAs. Para verificar a nivel global la regulación por los ex-siRNAs de la expresión de sus mRNA diana, se comprobó si los genes que solapan con los loci de ex-siRNAs muestran expresión diferencial de mRNA (**Tabla 21**). Una proporción relevante de estos genes mostraron un aumento significativo en los niveles de mRNA en aquellos mutantes en los genes de silenciamiento requeridos para la biogénesis de los correspondientes ex-siRNAs. La proporción de genes diana de ex-siRNAs con expresión diferencial de mensajeros fue similar en las muestras analizadas a las 24 y 48 horas de crecimiento vegetativo. Sin embargo, excepto en unos pocos casos, como el indicado en la **Tabla 20**, el aumento en los niveles de mRNA fue modesto (entre 1,7 y 2 veces), sugiriendo que los ex-siRNAs modulan la expresión de los mRNA diana sin producir cambios drásticos en sus niveles.

Clases	Nº de genes	Genes con expresión diferencial (%)	Media de la tasa de cambio mutantes vs WT
Clase I	5	100	x1,85
Clase II	187	27,5	x1,7
Clase III	79	56,9	x2,1

Tabla 21. Porcentaje de genes diana de ex-siRNAs con expresión diferencial de mRNA significativa (valor p ajustado < 0,05). Se muestra el número de genes incluidos en las tres clases principales de loci de ex-siRNAs y el porcentaje de ellos que presenta expresión diferencial en los análisis realizados a las 24 horas de crecimiento vegetativo. El número de genes es menor que el número de exones porque hay genes que tienen más de un exón productor de ex-siRNAs. En la última columna se muestra la media del incremento en el mRNA acumulado en las estirpes mutantes respecto a la estirpe silvestre, para los genes regulados por las diferentes clases de ex-siRNAs.

De cualquier forma, los datos obtenidos corresponden a patrones de expresión en unas condiciones determinadas. No se puede excluir la posibilidad de que el mecanismo de silenciamiento génico en *M. circinelloides* pueda tener efectos más acusados en la expresión génica en diferentes condiciones de crecimiento o estados de desarrollo.

III. 3. 2. Análisis transcriptómico mediante RNA-seq.

La secuenciación de RNA (RNA-seq) es una tecnología desarrollada como consecuencia de los avances en las técnicas de secuenciación masiva, que permite la obtención del perfil transcriptómico de un organismo en una determinada condición mediante secuenciación de alto rendimiento (high-throughput sequencing). La ventaja del RNA-seq respecto a otros métodos es la mayor precisión de la medida de los niveles de cada uno de los transcritos y sus diferentes isoformas (Wang *et al.* 2010). Debido a que los datos de transcriptómica obtenidos mediante micromatrices revelaron diferencias moderadas en la acumulación de transcritos en los mutantes de silenciamiento respecto a la estirpe silvestre, nos propusimos validar esos resultados y aumentar su resolución mediante la secuenciación directa del transcriptoma.

Las estirpes incluidas en el estudio fueron: la estirpe silvestre R7B, el doble mutante *dcl-1/dcl-2* y los mutantes simples *ago-1*, *rdrp-1* y *rdrp-2*. Las muestras de RNA fueron aisladas de micelios sembrados en medio rico YPG durante 24 y 48 horas en condiciones de luz continua, ya que éstas fueron las condiciones en las que se habían aislado y caracterizado los ex-siRNAs endógenos (YPG, 48h). Estas muestras fueron secuenciadas por la empresa BaseClear B.V. (Leiden, Holanda) mediante la plataforma Illumina (Illumina Genome Analyzer II α). Los análisis de calidad llevados a cabo para cada una de las muestras pusieron de manifiesto la elevada calidad de la secuenciación (ver **apartado II.17.2**). El análisis bioinformático de los datos se llevó a cabo por el Dr. Simon Moxon de la Universidad de East Anglia (Reino Unido). En todos los casos, se compararon las lecturas normalizadas para cada gen en cada uno de los mutantes con las correspondientes en la estirpe silvestre, identificándose aquellos genes con expresión diferencial significativa (valor p-ajustado < 0,05; 95% de confianza estadística).

	24 h				48 h			
	<i>dcl1/2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>	<i>rdrp-2</i>	<i>dcl1/2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>	<i>rdrp-2</i>
Nº loci con mayor acumulación en mutante vs WT	38	99	30	47	26	48	8	53
Nº loci con menor acumulación en mutante vs WT	193	294	323	81	49	85	26	55

Tabla 22. Loci con expresión diferencial significativa en los mutantes de silenciamiento respecto al silvestre en los experimentos de RNA-seq. Se indica el número de loci que mostraron una mayor o menor acumulación de transcritos en la estirpe mutante indicada respecto al silvestre, tanto a las 24 horas como a las 48 horas de crecimiento vegetativo.

La **Tabla 22** muestra el número de loci que presentaron expresión diferencial significativa en cada uno de los mutantes respecto a la estirpe silvestre, tanto a las 24 como a las 48 horas de crecimiento. Se puede observar que, en estos experimentos, se obtuvo el mayor número de genes con expresión diferencial en las muestras de 24 h, sobre todo en los mutantes afectados en la maquinaria central de silenciamiento, los genes *dicer* y *ago*. En este sentido, cabe señalar que los RNAs secuenciados derivan de micelios crecidos en medio completo, que han alcanzado una fase avanzada de crecimiento a las 24 horas de incubación (medida por la turbidez de los cultivos). Por el contrario, los micelios utilizados para la hibridación de las micromatrices se incubaron en medio mínimo, por lo que presentan un crecimiento más lento y se encuentran en fase exponencial temprana tras 24 horas de crecimiento.

Los valores de expresión diferencial obtenidos para los distintos mutantes mediante la secuenciación de los mRNAs fueron considerablemente superiores a los obtenidos en los experimentos previos utilizando micromatrices. La **Tabla 23** muestra los valores medios del \log_2 de la tasa de cambio en la expresión génica (Log₂ Fold Change [Log₂FC]) de los genes con acumulación diferencial de transcritos en los mutantes de silenciamiento a las 24 horas de crecimiento. Como se puede observar, los cambios en los niveles de expresión génica respecto a la estirpe silvestre superaron, como media, las tres veces (Log₂FC $\geq 1,6$ ó $\leq -1,6$). De hecho, un número significativo de genes presentó valores de Log₂FC mayores a 3 ó menores a -3, lo que indica una acumulación de transcritos al menos ocho veces mayor o menor en el mutante correspondiente respecto a la estirpe silvestre (**Tabla 24**).

	Media del log ₂ de la tasa de cambio mutante vs WT			
	<i>dcl-1/dcl-2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>	<i>rdrp-2</i>
Mayor acumulación en mutante vs WT	1,78	1,62	1,50	1,72
Menor acumulación en mutante vs WT	-3,13	-3,0	-3,0	-2,43

Tabla 23. Valores medios de expresión diferencial en los mutantes de silenciamiento a las 24 horas de crecimiento. Los números indican la media de los valores obtenidos al calcular, para cada gen con expresión diferencial, el log₂ de la razón entre la expresión en los mutantes indicados y la de la estirpe silvestre (WT).

	24 h				48 h			
	<i>dcl1/2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>	<i>rdrp-2</i>	<i>dcl1/2</i>	<i>ago-1</i>	<i>rdrp-1</i>	<i>rdrp-2</i>
Nº loci con mayor acumulación en mutante vs WT	3	4	0	1	4	7	1	3
Nº loci con menor acumulación en mutante vs WT	89	115	115	21	7	16	2	7

Tabla 24. Loci con mayores diferencias de expresión en los mutantes de silenciamiento respecto al silvestre. Se indica el número de loci que presentaron una acumulación al menos ocho veces mayor o menor (Log₂FC ≥ 3 o ≤ -3) en los mutantes indicados respecto a la estirpe silvestre (WT).

La comparación de los genes diferencialmente expresados en los distintos mutantes puso de manifiesto un alto grado de solapamiento entre ellos, en el sentido de que la mayoría de los genes identificados presentaban expresión diferencial en más de un mutante de silenciamiento (**Figura 44**). Esta comparación puso también de manifiesto la participación preferente de distintas combinaciones de proteínas de silenciamiento según si la expresión de los genes se ve reprimida o activada en las estirpes mutantes respecto al silvestre. Así, 178 de los 193 genes que ven reprimida su expresión en el mutante *dcl-1/dcl-2* son también regulados por *ago-1* y de éstos, el 91,5% (163) están también reprimidos en el mutante *rdrp-1* (**Figura 44A**). La proteína RdRP-2 juega un papel menos relevante en la represión de estos genes, ya que sólo 63 de los 163 genes regulados por *dcl-*

l/dcl-2, *ago-1* y *rdrp-1* (el 38,6%) reprimen también su expresión en el mutante *rdrp-2* (resultados no mostrados). No se identificaron genes con expresión reprimida exclusivamente en los mutantes *dcl-1/dcl-2*, *ago-1* y *rdrp-2*. Estos resultados sugieren un papel esencial de las proteínas Dicer, Ago-1 y RdRP-1 en la regulación de este grupo de genes. Dado que estas son las proteínas requeridas para la biosíntesis de la clase 2 de ex-siRNAs, los genes identificados en estos análisis podrían ser dianas secundarias de este grupo de ex-siRNAs. Por otro lado, 35 de los 38 genes que ven aumentada su expresión en el mutante *dcl-1/dcl-2* muestran el mismo comportamiento en el mutante *ago-1* y de éstos, el 68,6% (24) son también regulados por el gen *rdrp-2* (**Figura 44B**). En este caso, sólo una pequeña proporción de los genes (30,4%) requieren también *rdrp-1*, identificándose un único gen que ve activada su expresión exclusivamente en los mutantes *dcl-1/dcl-2*, *ago-1* y *rdrp-1* (resultados no mostrados).

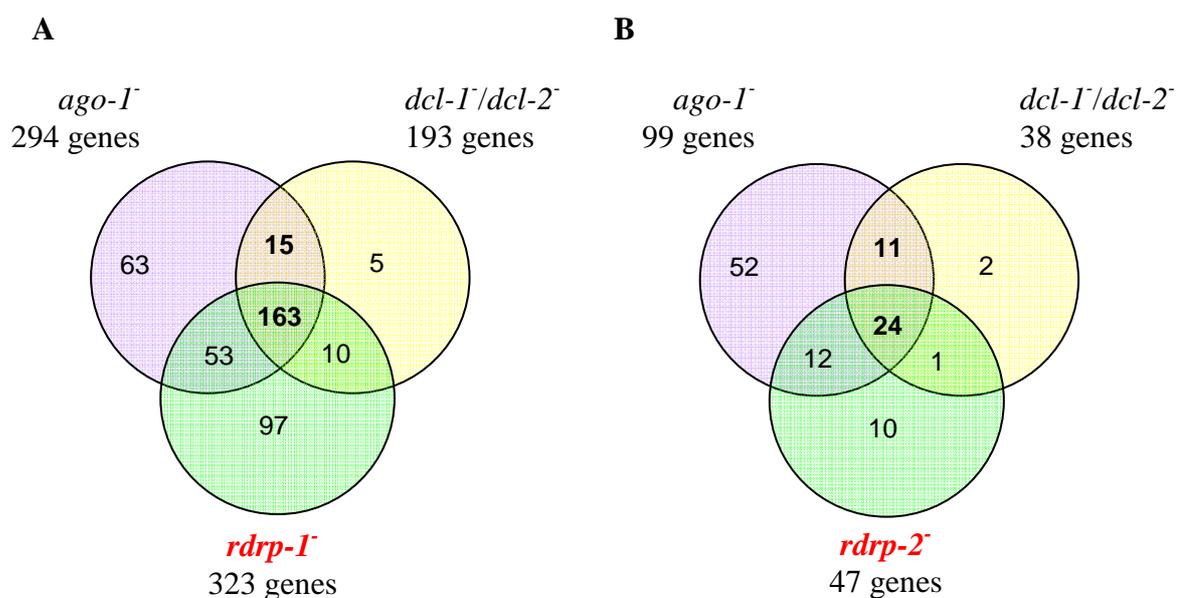


Figura 44. Análisis de genes con expresión diferencial a las 24 horas de crecimiento. Se muestra el solapamiento entre los genes que ven reprimida su expresión en los distintos mutantes respecto al silvestre (A) y aquellos con mayor acumulación de transcritos en los mutantes respecto al silvestre (B).

La práctica totalidad de los genes identificados en los experimentos de micromatrices por presentar las mayores diferencias de expresión en los mutantes *dicer1*/*2* y *ago-1* respecto al silvestre (**Tablas 18 y 19**), fueron también identificados en los análisis transcriptómicos realizados mediante secuenciación de RNA. Sin embargo, los valores absolutos de expresión diferencial fueron diferentes, como se espera de la

utilización de dos métodos distintos para medir la expresión génica. La **Tabla 25** muestra los genes que presentaron los mayores niveles de represión en el mutante *ago-1* respecto al silvestre, indicándose los valores de expresión diferencial en los restantes mutantes. Como se ha señalado anteriormente, mientras todos los genes ven alterada su expresión en los mutantes *rdrp-1*, sólo una proporción de ellos muestra diferencias significativas en el mutante *rdrp-2*.

ID de la proteína	Log ₂ FC <i>ago-1</i> vs WT	Log ₂ FC <i>dcl-1/-2</i> vs WT	Log ₂ FC <i>rdrp-1</i> vs WT	Log ₂ FC <i>rdrp-2</i> vs WT	Definición KOG
82567	-8,09	-4,77	-6,78	-3,20	Uncharacterized conserved protein
79122	-7,46	-4,99	-6,69	-	RNA binding protein RBM12/SWAN
85023	-7,32	-4,59	-6,01	-	Expansin family protein. Contains a DPBB_1 domain
86670	-7,16	-5,42	-6,84	-	Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase
35389	-7,12	-5,71	-6,55	-4,10	FOG: RRM domain
14092	-7,03	-5,80	-7,56	-3,13	Glycolipid 2-alpha- mannosyltransferase
83735	-7,01	-6,89	-6,73	-7,38	Chromatin modification- related protein
81805	-6,95	-4,00	-5,05	-	FOG: Zn-finger
79121	-6,86	-6,12	-5,55	-	-
85508	-6,72	-3,76	-4,82	-	Uncharacterized conserved protein
78587	-6,67	-6,35	-7,03	-3,74	-
82686	-6,65	-4,17	-5,11	-	Uncharacterized conserved protein
82942	-5,47	-7,49	-5,516	-3,45	Cyclin

Tabla 25. Valores de expresión diferencial de los genes con un mayor nivel de represión en los mutantes de silenciamiento tras 24 horas de crecimiento. Se indica el log₂ (Log₂ FC) de la razón entre la expresión en los mutantes indicados y la de la estirpe silvestre (WT). Se incluyen las definiciones KOG de las proteínas, tal como aparecen anotadas.

La **Tabla 26** muestra los resultados de un análisis similar realizado entre los genes que aumentan su expresión en los mutantes *dicer1*⁻/*2*⁻ y *ago-1*⁻. En este caso, los cambios en los niveles de expresión son menores que los indicados para el grupo de genes que ven su expresión reprimida (**Tabla 25**) y, como se ha señalado anteriormente, mientras que la mayoría de los genes ven aumentada su expresión de forma similar en los mutantes *dicer1*⁻/*2*⁻, *ago-1*⁻ y *rdrp-2*⁻, sólo una proporción reducida de ellos altera también su expresión de forma significativa en el mutante *rdrp-1*⁻.

ID de la proteína	Log ₂ FC <i>ago-1</i> ⁻ vs WT	Log ₂ FC <i>dcl-1</i> ⁻ / <i>2</i> ⁻ vs WT	Log ₂ FC <i>rdrp-1</i> ⁻ vs WT	Log ₂ FC <i>rdrp-2</i> ⁻ vs WT	Definición KOG
83353	6,24	5,30	-	-	Zinc finger, CCHC-type. Retrotransposon gag protein
74496	3,87	3,26	-	3,06	SAM-dependent methyltransferases
77432	3,29	2,79	-	2,65	-
81703	3,05	3,31	-	2,87	-
93337	2,98	2,18	-	2,55	Conserved protein, contains GRAM domain
44864	2,74	2,07	1,93	-	Transcription elongation factor TFIIIS
44243	2,69	2,37	-	2,34	Protein transporter of the TRAM superfamily
38974	2,65	2,17	-	2,43	Oxysterol-binding protein
91639	2,28	1,52	-	1,76	-
46183	2,26	1,34	-1,33	1,69	Long-chain acyl-CoA synthetases
72770	2,25	2,11	-1,45	2,61	3-oxoacyl-(acyl-carrier- protein) synthase
95896	2,18	1,55	-1,81	2,25	Serine/threonine-protein kinase (PKA)

Tabla 26. Valores de expresión diferencial de los genes con una mayor acumulación de transcritos en los mutantes de silenciamiento tras 24 horas de crecimiento. Se indica el log₂ (Log₂ FC) de la razón entre la expresión en los mutantes indicados y la de la estirpe silvestre (WT). Se incluyen las definiciones KOG de las proteínas, tal como aparecen anotadas.

Aún cuando el comportamiento de los genes indicados en la **Tabla 26** es el esperado de una regulación directa por ex-siRNAs (mayor acumulación de mRNA en los mutantes respecto a la estirpe silvestre), sólo uno de ellos (ID 83353) corresponde a un locus productor de ex-siRNAs. Este gen cifra una proteína que muestra similitud con la poliproteína Gag de los retrotransposones de la familia Ty3/Gypsy y había sido identificado previamente en el análisis transcriptómico con micromatrices como uno de los que muestran mayor expresión diferencial, tanto a las 24 como a las 48 h de crecimiento (**Tablas 19 y 20**). El resto de los genes expresados a partir de los loci productores de ex-siRNAs conocidos o bien no manifestaron diferencias significativas de expresión en los experimentos de RNA-seq realizados a las 24 h de crecimiento o bien estas diferencias fueron modestas, con valores medios de la tasa de cambio de entre 1,5 y 2 veces.

Las posibles funciones cifradas por los genes que muestran los mayores valores de expresión diferencial a las 24 horas de crecimiento en los experimentos de RNA-seq (**Tablas 25 y 26**) son similares a las identificadas en los experimentos previos con las micromatrices. Así, varias de las proteínas que disminuyen sus niveles en los mutantes de silenciamiento podrían estar implicadas en funciones relacionadas con la pared celular (ID 85023, ID 86670, ID 14092) o la división celular (ID 82942). De hecho, algunos de estos genes ya habían sido identificados en los experimentos de micromatrices (ID 14092, ID 82942) (**Tabla 19**). Por otro lado, la mayoría de los genes que aumentan su expresión en los mutantes de silenciamiento cifran proteínas con dominios presumiblemente implicados en la regulación de la expresión génica o en transducción de señales. Estas proteínas, a excepción de la ya mencionada proteína derivada de retrotransposones (ID 83353), son distintas a las identificadas en los experimentos de micromatrices, aunque pertenecen, en principio, a grupos de genes funcionalmente similares.

El número de genes que mostró diferencias significativas de expresión tras 48 horas de crecimiento en medio rico disminuyó notablemente respecto al identificado a las 24 horas (**Tabla 22**). Estos genes mostraron, como media, valores menores de expresión diferencial, sugiriendo que las diferencias de expresión génica se atenúan en la fase estacionaria avanzada de crecimiento. Sin embargo, dado que los análisis de ex-siRNAs se llevaron a cabo en estas condiciones (medio rico, 48 h) es de esperar que una proporción significativa de los genes identificados puedan ser dianas directas o indirectas de los ex-siRNAs de las clases 1-4. En efecto, el análisis de los genes que muestran los mayores

aumentos de expresión en los mutantes *dicer1*⁻² y *ago-1* identifica un número elevado de genes regulados directamente por ex-siRNAs (**Tabla 27**).

ID de la proteína	Log ₂ FC <i>ago-1</i> vs WT	Log ₂ FC <i>dcl-1</i> ⁻² vs WT	Log ₂ FC <i>rdrp-1</i> vs WT	Log ₂ FC <i>rdrp-2</i> vs WT	ex-siRNA	Definición KOG
83353	6,42	5,76	5,93	3,46	ex-siRNA clase II	Zinc finger, CCHC-type. Retrotransposon protein
76671	4,88	4,48	-	5,17	-	C2H2 finger domain-containing protein.
75923	4,50	7,88	-	-	ex-siRNA clase II	Sortin nexin
82755	3,22	2,68	-	2,96	-	Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain.
83549	2,76	2,75	-	-	ex-siRNA clase II	Conserved protein. DNA replication control
39104	2,65	1,71	-	2,47	-	Small heat-shock protein Hsp30-like
85302	2,53	1,81	-	2,70	ex-siRNA clase I	Predicted reverse-transcriptase-like protein
84028	2,22	2,14	-	1,73	-	Short-chain alcohol dehydrogenase
91131	1,90	1,22	-	2,21	-	Predicted methyltransferase.
82197	1,83	2,14	-	1,58	ex-siRNA clase I	-

Tabla 27. Valores de expresión diferencial de los genes con una mayor acumulación de transcritos en los mutantes de silenciamiento tras 48 horas de crecimiento. Se indica el log₂ (Log₂ FC) de la razón entre la expresión en los mutantes indicados y la de la estirpe silvestre (WT). Se indica, en su caso, la existencia de ex-siRNAs derivados de los loci correspondientes. Se incluyen las definiciones KOG de las proteínas, tal como aparecen anotadas.

Tal y como se había observado en las muestras analizadas a las 24 horas, la mayoría de los genes que aumentan su expresión en los mutantes *dicer1*⁻² y *ago-1* a las 48 horas de crecimiento también lo hacen en el mutante *rdrp-2*, aunque sólo una minoría muestra diferencias significativas en el mutante *rdrp-1*. Este comportamiento es el esperado de una regulación directa por ex-siRNAs de la clase I, como es el caso de varios de los genes identificados (ID 85302, ID 82197). Los genes regulados por ex-siRNAs de la clase II deberían ver alterada su expresión en el mutante *rdrp-1*, ya que la producción de

esta clase de ex-siRNAs requiere la participación del gen *rdrp-1*. Esto es lo que ocurre en uno de ellos (ID 83353). Sin embargo, hay que hacer notar que, en los otros dos genes regulados por ex-siRNAs de la clase 2 (ID 75923 e ID 83549) incluidos en la **Tabla 27**, los valores de expresión diferencial en el mutante *rdrp-1* están justo por debajo del umbral de confianza estadística elegido (p -ajustado $< 0,05$).

El análisis de los genes que reprimen su expresión de forma significativa en los mutantes *dicer1/2* y *ago-1* a las 48 horas de crecimiento puso de manifiesto que una proporción significativa de éstos veían su expresión reprimida en el mutante *rdrp-2* y no en el mutante *rdrp-1* (**Tabla 28**). Este comportamiento es distinto al observado en las muestras tomadas durante el crecimiento exponencial tardío (24 horas), en el que los genes que reprimen su expresión dependen del gen *rdrp-1* (**Tabla 25**). Ello podría indicar que la regulación de ambos grupos de genes depende de tipos distintos de ex-siRNAs, y apuntaría a una acumulación diferencial de las distintas clases de ex-siRNAs a lo largo del crecimiento. El análisis del repertorio de ex-siRNAs en distintos estados de crecimiento permitiría resolver esta cuestión.

Por otro lado, el patrón de las funciones propuestas para los genes que muestran expresión diferencial a las 48 horas de crecimiento es diferente del identificado a tiempos menores de crecimiento (**Tablas 27 y 28**). Así, varias de las proteínas identificadas podrían estar relacionadas con actividad de transposones, metabolismo de lípidos, esporulación, envejecimiento celular y respuesta a estrés (ver **Discusión**). Es importante destacar que durante la fase estacionaria tardía ocurren los procesos de esporulación y acumulación de vesículas lipídicas, asociados a una reducción en el aporte de nutrientes. En cualquier caso, aún cuando los datos de secuenciación requieren una validación experimental para su confirmación, la información obtenida en los experimentos de transcriptómica apoya el papel de la maquinaria de silenciamiento en la regulación de genes endógenos en *M. circinelloides*. De confirmarse, ello permitiría ampliar el repertorio de organismos eucarióticos en los que el mecanismo de RNAi, además de servir de defensa frente a la invasión por ácidos nucleicos extraños, podría controlar una amplia variedad de funciones celulares endógenas.

ID de la proteína	Log ₂ FC <i>ago-1</i> vs WT	Log ₂ FC <i>dcl-1/-2</i> vs WT	Log ₂ FC <i>rdrp-1</i> vs WT	Log ₂ FC <i>rdrp-2</i> vs WT	Definición KOG
83735	-4,98	-5,67	-6,47	-6,17	Chromatin modification-related protein
35121	-4,83	-3,17	-1,93	-4,37	Predicted amino acid transporter
86285	-4,37	-4,80	-	-4,30	Esterol 24-C-methyltransferase.
26849	-4,06	-2,70	-2,23	-4,48	NADH:flavin oxidoreductase
50782	-4,02	-1,97	-1,91	-5,48	Polysaccharide deacetylase: chitin deacetylase
82526	-2,10	-1,80	-	-2,18	Small nucleolar RNA associated protein
90667	-1,83	-2,15	-	-1,77	Methyltransferase
30836	-1,75	-1,60	-1,45	-1,83	-
83045	-1,68	-1,33	-	-1,71	Predicted lipase
89967	-1,62	-1,58	-1,54	-2,09	Ca ²⁺ -dependent lipid-binding protein CLB1

Tabla 28. Valores de expresión diferencial de los genes con un mayor nivel de represión en los mutantes de silenciamiento tras 48 horas de crecimiento. Se indica el log₂ (Log₂ FC) de la razón entre la expresión en los mutantes indicados y la de la estirpe silvestre (WT). Se incluyen las definiciones KOG de las proteínas, tal como aparecen anotadas.

III. 4. Estudio fenotípico de los mutantes en la ruta de silenciamiento.

Los resultados mostrados en los apartados anteriores validan el papel regulador de la maquinaria de silenciamiento en *M. circinelloides*. Por un lado, dichos resultados confirman la existencia de distintas clases de pequeños RNAs endógenos generados por la maquinaria de silenciamiento. La mayoría de estos esRNAs corresponden a secuencias de exones y regulan la acumulación del mRNA correspondiente. Por otro lado, los datos obtenidos en los experimentos de transcriptómica indican que los genes implicados en la maquinaria de silenciamiento controlan, directa o indirectamente, la expresión de genes endógenos. El elevado número de genes que ven modulada su expresión en los mutantes afectados en la maquinaria de silenciamiento hace prever que puedan presentar alteraciones en diversos procesos celulares. Con el fin de establecer las diferentes funciones fisiológicas y los procesos celulares que están bajo el control del mecanismo de silenciamiento génico se realizó un estudio fenotípico detallado de los mutantes afectados en dicho mecanismo.

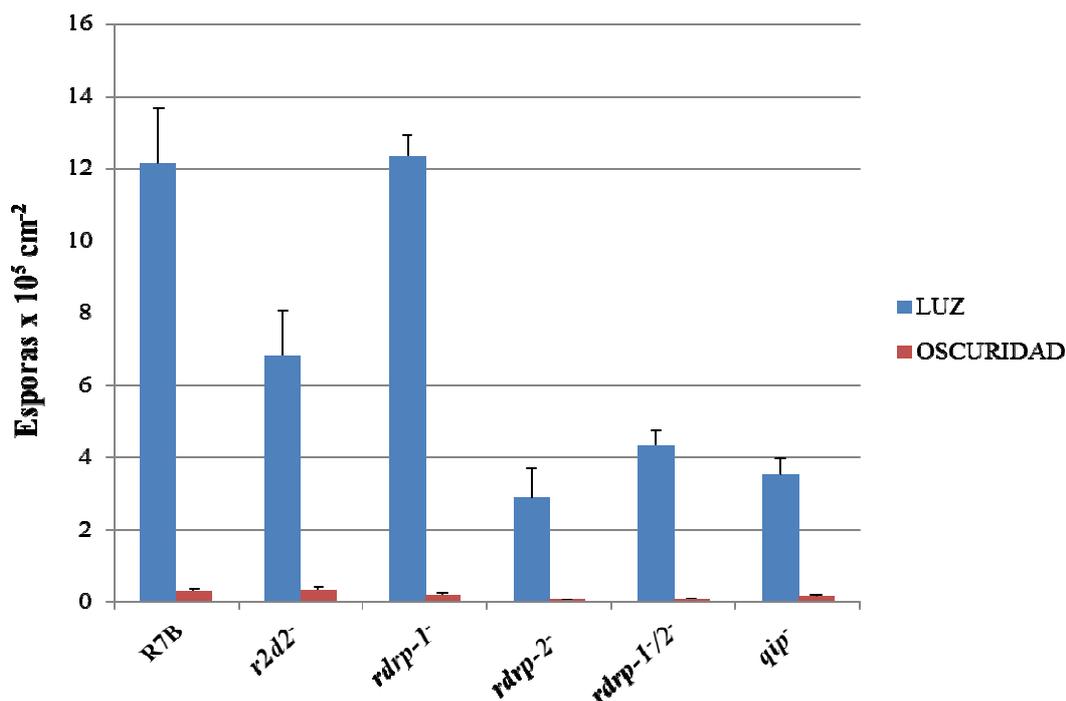
Se analizaron aspectos fenotípicos tales como la eficacia de la esporulación durante el desarrollo vegetativo, la producción de zigosporas durante el desarrollo sexual, la influencia del pH en la tasa de crecimiento, la respuesta a distintas situaciones de estrés (oxidativo, térmico), el proceso de autólisis inducido por estrés nutricional y la virulencia en sistemas heterólogos.

III. 4. 1. Producción de esporas durante el desarrollo vegetativo.

Datos previos de nuestro laboratorio demuestran que los mutantes *dcl-2⁻* y *ago-1⁻*, afectados en el mecanismo de silenciamiento, muestran una disminución en la producción de esporas asexuales respecto a la estirpe silvestre, con una eficacia de aproximadamente el 30% (de Haro *et al.*, 2009; Cervantes *et al.*, 2013). Con el objetivo de analizar detalladamente la participación de la maquinaria de silenciamiento en el proceso de esporulación vegetativa, y debido al fenotipo que mostraron los mutantes mencionados, se llevó a cabo el estudio de la eficacia de esporulación del resto de estirpes mutantes en genes de la ruta de silenciamiento de *Mucor*. En los análisis se incluyeron las siguientes estirpes: R7B (silvestre), *r2d2⁻* (MU412), *rdp-1⁻* (MU419), *rdp-2⁻* (MU420), *qip⁻* (MU430) y el heterocarionte *rdp-1⁻/rdp-2⁻* (MU431). Todas las estirpes se sembraron en medio sólido MMC pH 3,2 y se incubaron durante 72 horas a 26° C. Diez colonias de cada

una de las estirpes se incubaron en condiciones de luz continua, y otras diez réplicas por estirpe se incubaron en oscuridad. Tras la recolección de las esporas asexuales producidas por cada colonia durante el crecimiento vegetativo (**ver apartado II. 14 de Materiales y Métodos**), éstas fueron cuantificadas en la estirpe silvestre y en cada uno de los mutantes (**Figura 45A**).

A



B

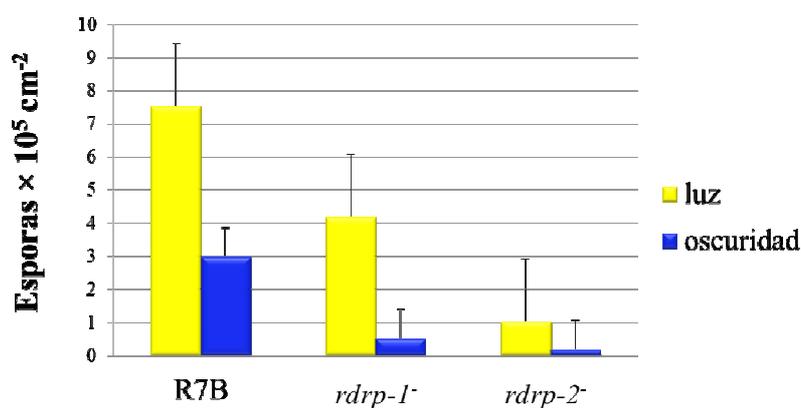


Figura 45. Producción de esporas vegetativas en las estirpes mutantes en la ruta de silenciamiento. (A) Los datos representados corresponden a la media y error típico de diez colonias independientes de cada estirpe. Las esporas producidas se cuantificaron en relación al tamaño de cada colonia. Las estirpes fueron incubadas en medio MMC durante 72 h en condiciones de luz continua (barras azules) y oscuridad (barras rojas). (B) Los datos mostrados corresponden a diez colonias independientes de la estirpe silvestre y de los mutantes *rdrp-1* y *rdrp-2* sembrados en medio mínimo YNB durante 72h en condiciones de luz (barras amarillas) y oscuridad (barras azules).

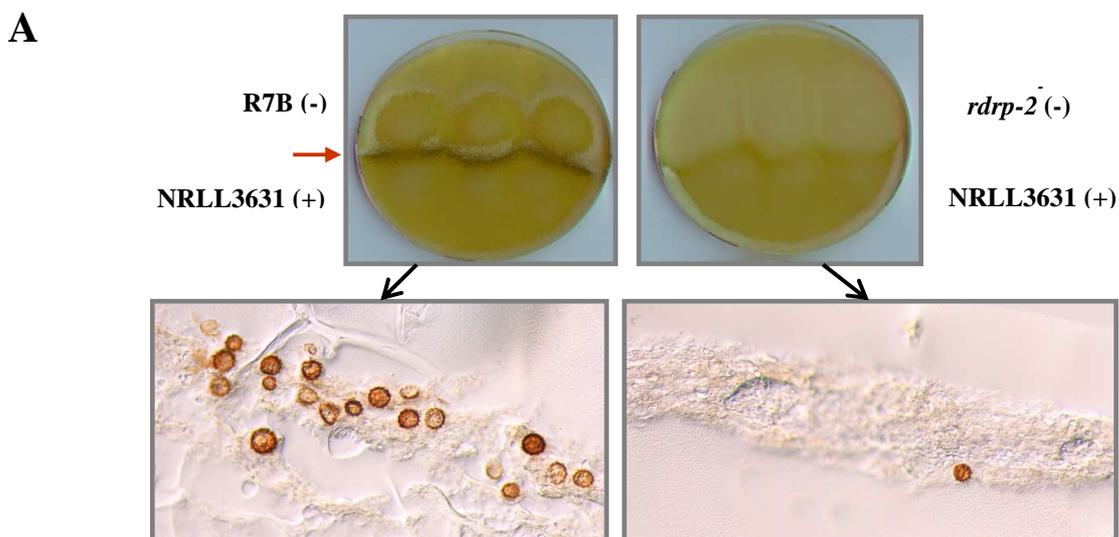
Todos los mutantes mostraron una inducción de la esporulación por la luz, como ocurre en la estirpe silvestre (Nicolás *et al.*, 2008). Sin embargo, los mutantes *rdrp-2⁻*, *qip⁻* y el heterocarionte *rdrp-1⁻/rdrp-2⁻* mostraron una reducción en la producción de esporas vegetativas con respecto a la estirpe silvestre, presentando una eficacia de esporulación similar a la de los mutantes *dcl-2⁻* y *ago-1⁻*. El mutante *r2d2⁻* también presentó una disminución de la eficacia de esporulación (alrededor del 50%), aunque con un fenotipo menos acusado que el resto de mutantes afectados. Estos datos señalan a *rdrp-2* y *qip* como elementos de la maquinaria de silenciamiento, junto con *dcl-2* y *ago-1*, implicados en la regulación del desarrollo vegetativo. El mutante *rdrp-1⁻* no presentó una disminución de la esporulación en el medio semi-complejo MMC; sin embargo, sí sufrió una reducción significativa en la eficacia de esporulación respecto a la estirpe silvestre cuando se analizó su capacidad para producir esporas vegetativas en medio mínimo YNB (**Figura 45B**). Estos resultados indican que el mutante *rdrp-1⁻* muestra una sensibilidad a los cambios ambientales, puesto que responde de manera diferencial en la producción de esporas vegetativas según las condiciones de cultivo.

III. 4. 2. Producción de zigosporas durante el desarrollo sexual.

M. circinelloides es un hongo heterotálico que presenta dos tipos sexuales, (+) y (-). El ciclo sexual tiene lugar cuando dos micelios de diferente sexo interactúan entre sí y forman unas estructuras sexuales denominadas zigosporas, donde ocurre la fusión de los núcleos de distinto tipo sexual (cariogamia).

Con la finalidad de comprobar la participación de la ruta de silenciamiento en el desarrollo sexual del hongo, se llevó a cabo un estudio de la producción de zigosporas de cada uno de los mutantes en la maquinaria de silenciamiento, todos ellos de sexo (-), durante la interacción sexual con la estirpe silvestre de sexo opuesto NRLL3631 (+). Se sometieron a estudio la estirpe silvestre R7B (-) y los mutantes *dcl-1⁻*, *dcl-2⁻*, *dcl-1⁻/dcl-2⁻*, *ago-1⁻*, *r2d2⁻*, *rdrp-1⁻* y *rdrp-2⁻*. Esporas de las estirpes (-) y (+) se inocularon a una distancia aproximada de 2 cm en placas de medio rico YPD y se incubaron a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Tras veinte días de incubación se analizó la producción de zigosporas de la estirpe silvestre y de los mutantes al interactuar sexualmente con la estirpe (+). La producción de zigosporas en los cruzamientos silvestres se puede observar a simple vista como una línea oscura en la zona de interacción de los

micelios de los dos sexos (**Figura 46A**). Esta línea oscura fue mucho más sutil en algunos de los cruzamientos que implicaban a mutantes en genes de silenciamiento, lo que sugería una menor producción de zigosporas.



B

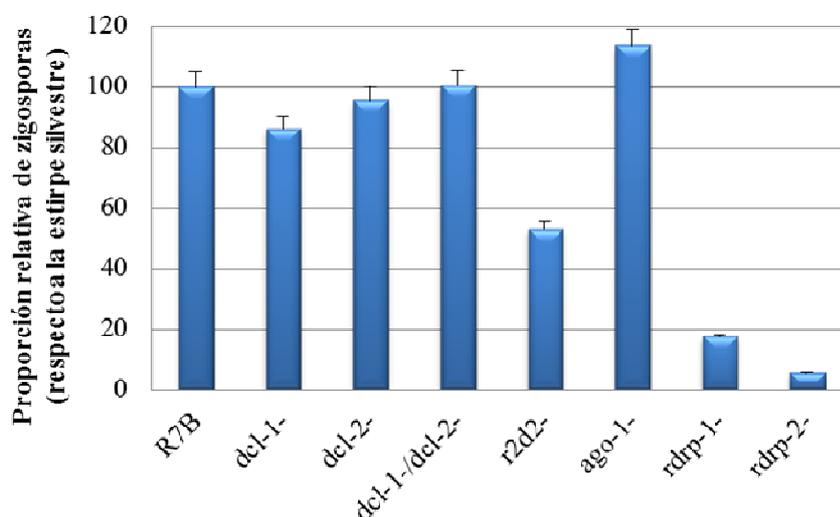


Figura 46. Producción de zigosporas en mutantes de la ruta de silenciamiento. (A) Interacción sexual de la estirpe silvestre y el mutante *rdrp-2* con la estirpe de sexo (+). La flecha roja señala la producción de zigosporas en la zona de interacción. Se muestra un corte histológico de la zona de interacción sexual observado al microscopio óptico (10x). (B) Cuantificación de la producción de zigosporas en mutantes en genes de silenciamiento. Los datos representados corresponden a la media y error típico de las zigosporas observadas en doce cortes histológicos (0,003 cm²) de la zona de interacción sexual de cada mutante con la estirpe de tipo sexual (+), relativos a los valores obtenidos en el cruzamiento de las estirpes silvestres.

La cuantificación de la producción de zigosporas por las distintas estirpes fue imposible llevarla a cabo mediante recolección y conteo de las mismas, ya que éstas permanecían adheridas fuertemente al medio. Por tanto, la cuantificación de las zigosporas se realizó al microscopio óptico. Para ello, se recogieron secciones de 1 cm² de la zona de interacción sexual, que fueron fijadas con formaldehído y posteriormente congeladas para obtener con el criotomo cortes de 30 µm, que fueron utilizados para contar las zigosporas al microscopio óptico (**ver apartado II. 15 de Materiales y Métodos**). Para cada interacción se analizó la presencia de zigosporas en doce cortes histológicos de 0,003 cm² cada uno. Los datos obtenidos se representan en la **Figura 46B**, donde se muestran los porcentajes medios de zigosporas que produce cada mutante durante el ciclo sexual, en relación con la estirpe silvestre. El análisis de estos resultados puso de manifiesto una reducción (aproximadamente del 50%) en la producción de zigosporas en el mutante *r2d2*⁻, mientras que los mutantes *rdrp-1*⁻ y *rdrp-2*⁻ mostraron una disminución muy significativa en la producción de zigosporas, sugiriendo un papel de estos dos genes en el desarrollo sexual.

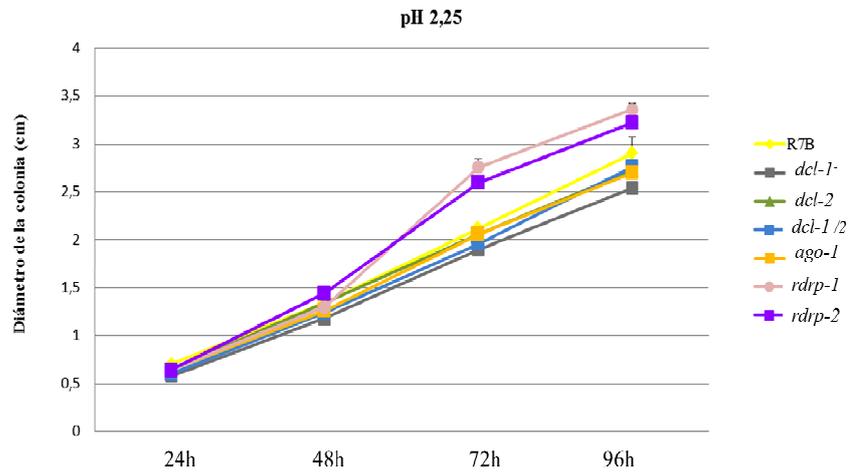
III. 4. 3. Influencia del pH en la tasa de crecimiento.

M. circinelloides es capaz de crecer en un amplio rango de pH, mostrando un crecimiento compacto y denso a pH ácido, lo que da lugar a colonias pequeñas y discretas, y un crecimiento más extendido a pH básico, generando colonias más grandes y menos compactas que pueden llegar a extenderse por toda la placa. En este apartado se muestran los resultados obtenidos al caracterizar el crecimiento de los diferentes mutantes de la ruta de silenciamiento en respuesta a distintos pH, con el objetivo de determinar si alguno de ellos presentaba alguna diferencia con la estirpe silvestre.

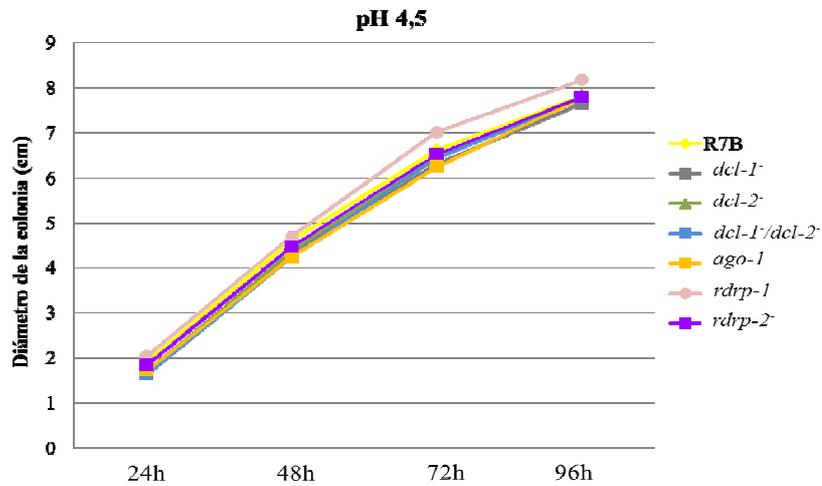
Pequeñas gotas de suspensiones de esporas (1000 esporas/gota, n = 5) de cada una de las estirpes a estudiar se inocularon en placas de medio rico YPG a diferentes pH: pH 2,25 (**Figura 47A**), pH 4,5 (**Figura 47B**), pH 6 (**Figura 47C**), pH 7 (**Figura 47D**) y pH 8 (**Figura 47E**). Se realizó el seguimiento de cada una de las colonias midiendo su diámetro cada 24 horas. En las gráficas se muestra el tamaño medio de las colonias de cada una de las estirpes a diferentes tiempos de incubación en los distintos medios. Los resultados indican que sólo a pH muy ácido (**Figura 47A**, pH 2,25) se observa alguna diferencia en la tasa de crecimiento de las estirpes analizadas, ya que, tras 48 horas de incubación, las

colonias de los mutantes *rdrp-1*⁻ y *rdrp-2*⁻ comienzan a crecer de forma menos compacta, dando lugar a colonias más grandes que la estirpe silvestre. En el resto de condiciones analizadas no se encontraron diferencias significativas en el patrón de crecimiento vegetativo de los mutantes respecto de la estirpe silvestre R7B.

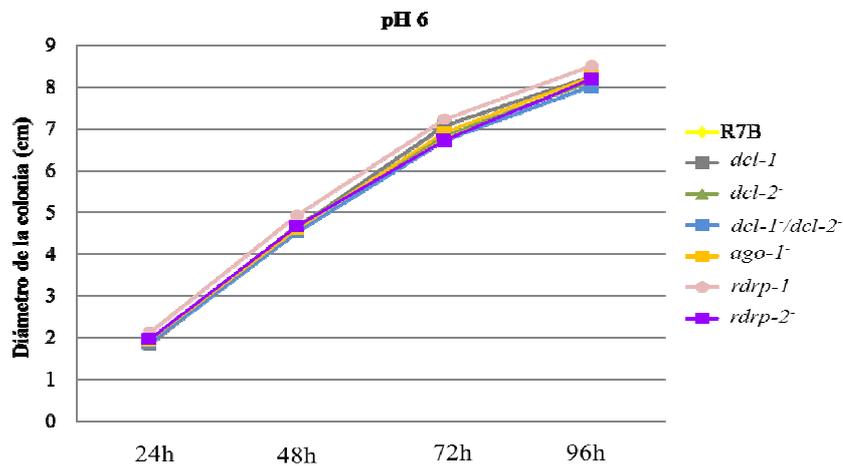
A



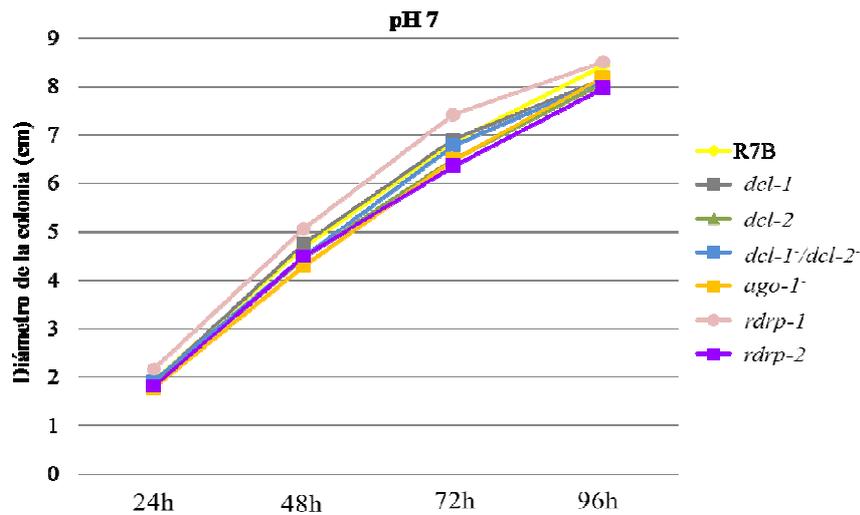
B



C



D



E

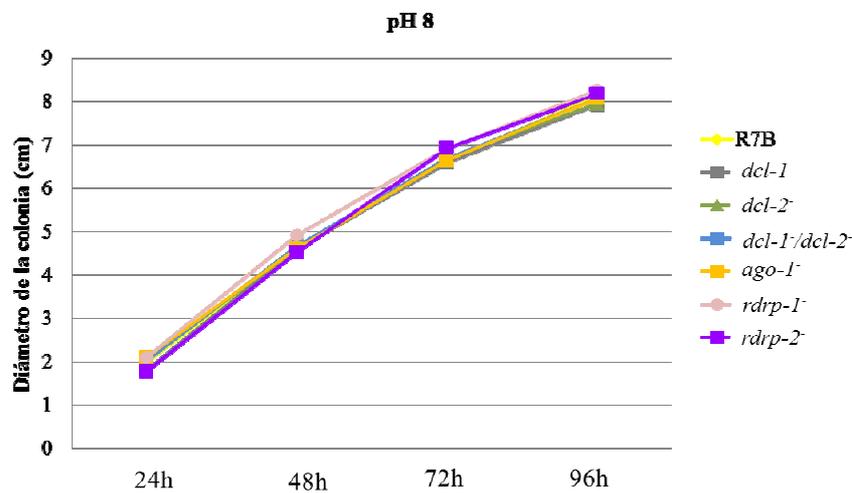


Figura 47. Caracterización del crecimiento de los mutantes a diferentes pH. Los datos representados corresponden a la media y error típico del diámetro de cinco colonias de cada una de las estirpes (las barras de error típico son difícilmente apreciables en la mayoría de los puntos por sus bajos valores). Las estirpes fueron sembradas en medio rico YPG a pH 2,25 (A), pH 4,5 (B), pH 6 (C), pH 7 (D) y pH 8 (E),

III. 4. 4. Respuesta a estrés oxidativo.

Dado que los mutantes en los genes *rdrp-1* y *rdrp-2* muestran alteraciones en las respuestas a algunos estímulos ambientales (interacción sexual, condiciones de pH extremo), se estudió la respuesta de estos mutantes a diversas situaciones de estrés, como estrés oxidativo y estrés térmico, con el fin de analizar su capacidad de respuesta a situaciones extremas en comparación con la estirpe silvestre.

Las especies reactivas de oxígeno son tóxicas para la célula, ya que provocan daños en el DNA y reaccionan y oxidan los aminoácidos de las proteínas y los ácidos grasos de los lípidos, alterando su función. Para determinar la capacidad de respuesta a estrés oxidativo de los mutantes en los genes *rdrp*, éstos se sembraron en medio mínimo YNB pH 3,2 en presencia de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las estirpes sometidas a estudio, auxótrofas para la leucina (Leu^-), se transformaron con el plásmido pLeu4, que complementa dicha auxotrofia, para poder cultivarlas en medio mínimo YNB. Se sembraron tres réplicas de cada una de las estirpes (R7B, *rdrp-1⁻* y *rdrp-2⁻*) en las diferentes concentraciones de H_2O_2 : 0 mM; 2,5 mM; 5 mM; 6 mM; 7,5 mM y 10 mM. Se inocularon alrededor de 1000 esporas viables de la estirpe correspondiente en cada caja, y se incubaron a 26°C durante 72 horas en condiciones de oscuridad. Tras ese tiempo se determinó el porcentaje de supervivencia de cada una de las estirpes (**Figura 48**).

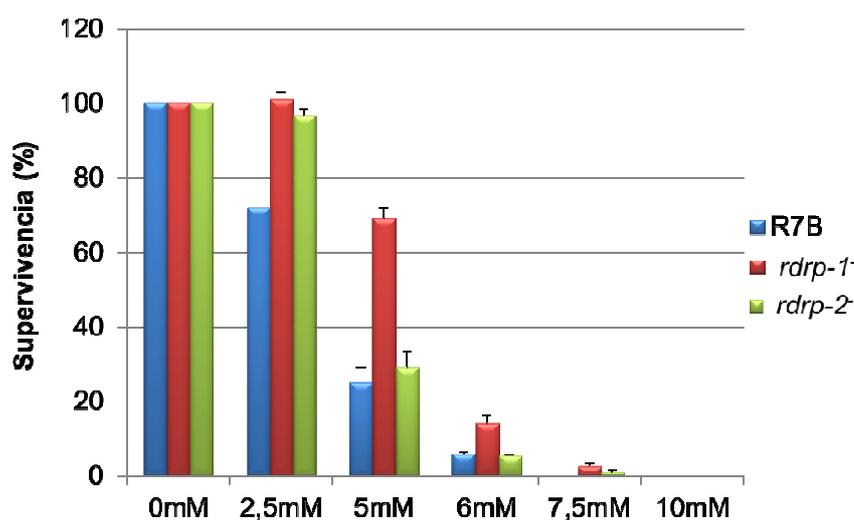


Figura 48. Respuesta a estrés oxidativo de los mutantes *rdrp-1⁻* y *rdrp-2⁻*. Se representa el porcentaje de supervivencia de la estirpe silvestre y los mutantes *rdrp-1⁻* y *rdrp-2⁻* frente a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Los datos representados corresponden a la media y error típico de tres experimentos independientes de cada estirpe.

Como se desprende de los resultados obtenidos, el mutante *rdrp-1⁻* muestra una mayor resistencia al estrés oxidativo que la estirpe silvestre, siendo esta diferencia más significativa a concentraciones de 5 mM de H_2O_2 , condición en la que la supervivencia de la estirpe silvestre y el mutante *rdrp-2⁻* se ve muy comprometida. A concentraciones más bajas (2,5 mM de H_2O_2) también el mutante *rdrp-2⁻* muestra diferencias significativas respecto a la estirpe silvestre en la respuesta al estrés oxidativo, pero esta diferencia desaparece a concentraciones mayores de peróxido de hidrógeno. En conjunto, estos datos

ponen de manifiesto la mayor capacidad de los mutantes en los genes *rdrp*, fundamentalmente del mutante *rdrp-1*, para responder a condiciones ambientales extremas.

III. 4. 5. Respuesta a estrés térmico.

Se comprobó la capacidad de los mutantes *rdrp-1* y *rdrp-2* para crecer a temperaturas inusuales, con objeto de analizar su respuesta al estrés térmico. La temperatura óptima de crecimiento de *M. circinelloides* es 26°C, por lo que se analizó la termotolerancia en medio mínimo (YNB) y en medio semicomplejo (MMC) a 26°C, 37°C y 40°C. Para los experimentos en medio mínimo se utilizaron las estirpes originales transformadas con el plásmido pLeu4.

Las estirpes analizadas (R7B, *rdrp-1* y *rdrp-2*) se sembraron por triplicado en cada medio y condición. En medio YNB pH 3 se sembraron 2500 esporas/caja, y en medio MMC pH 3 únicamente 250 esporas/caja, ya que en este medio las colonias adquieren un mayor tamaño. Tras 72 horas de incubación en oscuridad, se valoró el porcentaje de supervivencia de las distintas estirpes a cada temperatura (**Figura 49**). Los datos revelan una clara influencia del medio de cultivo en relación a la capacidad de las distintas estirpes para germinar y crecer a temperaturas restrictivas, independientemente de la presencia de mutaciones en la maquinaria de silenciamiento. El medio mínimo YNB no permite el crecimiento a 37°C de ninguna de las estirpes estudiadas, mientras que en medio MMC todas las estirpes presentaron colonias a dicha temperatura. En este caso, los mutantes en los genes *rdrp* mostraron unos valores de supervivencia ligeramente menores que la estirpe silvestre, aunque las diferencias fueron poco significativas. A 40°C no se detectó crecimiento de ninguna de las estirpes en ninguno de los medios utilizados.

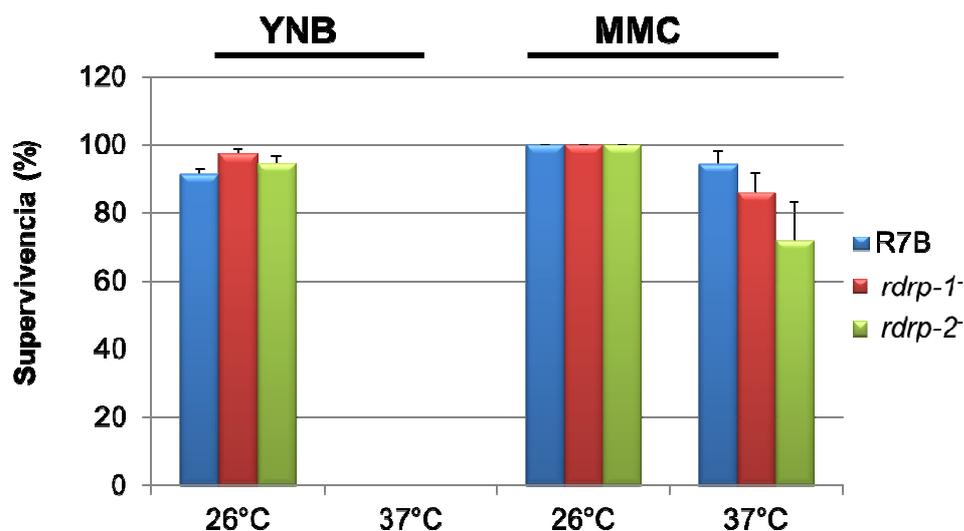


Figura 49. Termotolerancia de la estirpe silvestre R7B y los mutantes *rdrp-1* y *rdrp-2* en distintos medios de cultivo. Se representa la media y error típico de los valores de supervivencia de las distintas estirpes a 26°C y 37°C en medio mínimo YNB y medio semicomplejo MMC. Los datos están referidos a los valores obtenidos para cada estirpe en medio MMC a 26°C.

Aunque no se detectaron grandes diferencias entre las distintas estirpes en cuanto al porcentaje de supervivencia, sí se observó una clara diferencia en la tasa de crecimiento a 37°C en medio MMC. Para cuantificar estas diferencias, se determinó el diámetro de 40 colonias independientes de cada una de las estirpes crecidas en MMC a 37°C (**Figura 50A**). Las colonias de los mutantes *rdrp-1* y *rdrp-2* fueron significativamente más grandes que las de la estirpe silvestre, siendo casi tres veces mayor el diámetro de las colonias de los mutantes. Estas diferencias de tamaño no se observaron cuando las estirpes se incubaron en el mismo medio a 26°C (**Figura 50B**), sugiriendo que la falta de función de los genes *rdrp-1* y *rdrp-2*, aún cuando no afecta significativamente a la capacidad de germinación de las esporas a temperatura restrictiva, provoca un aumento en la tasa de crecimiento a dicha temperatura y refleja, por tanto, una alteración en la respuesta al estrés térmico. En conjunto, estos datos sugieren que las enzimas RdRPs son necesarias para que *Mucor* desencadene una adecuada respuesta frente a distintas condiciones de estrés.

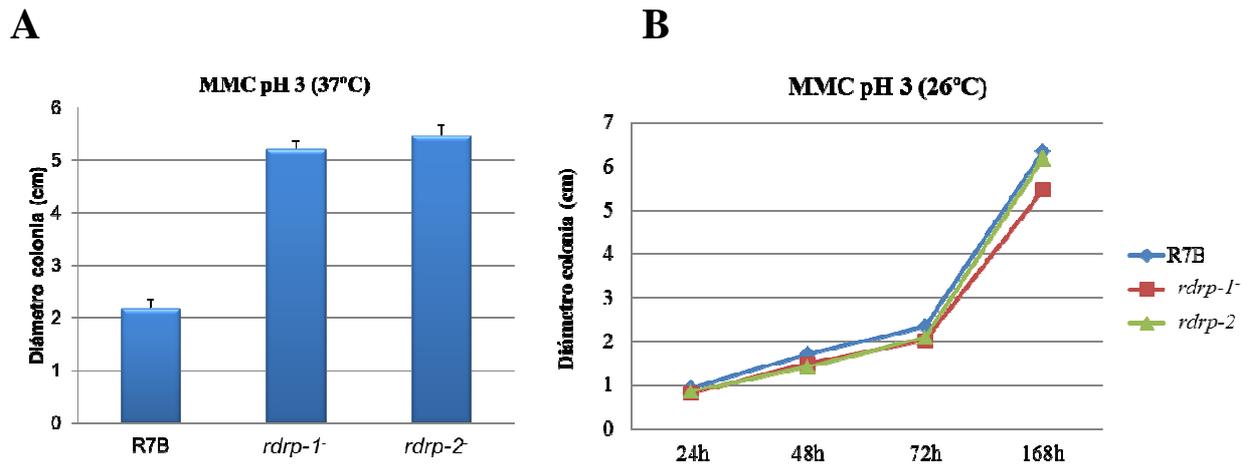


Figura 50. Tasa de crecimiento de los mutantes *rdrp-1* y *rdrp-2* a temperatura restrictiva. (A) Se representa la media y error típico del diámetro de 40 colonias independientes de cada una de las estirpes analizadas. Las colonias se incubaron en medio MMC pH 3 a 37°C durante 72 horas. (B) Los datos representados corresponden a la media y error típico de diez colonias independientes de la estirpe silvestre y los mutantes en los genes *rdrp* incubados en medio MMC pH 3 a 26°C (las barras de error típico son difícilmente apreciables por sus bajos valores).

III. 4. 6. Cuantificación del proceso de autólisis.

La autólisis fúngica es un proceso natural que consiste en la autodestrucción de las propias células debido a la actuación de enzimas hidrolíticas como proteasas, glucanasas y quitinasas que destruyen la pared celular (White *et al.*, 2002). Este proceso ocurre en muchos hongos filamentosos, principalmente en cultivos con un elevado grado de envejecimiento, y está inducido por la falta de nutrientes. La autólisis ha sido muy estudiada en hongos con gran importancia industrial como *Penicillium chrysogenum* (McNeil *et al.*, 1998) y *Aspergillus niger* (van Munster *et al.*, 2012), y otros organismos modelo como *A. nidulans* (Reyes *et al.*, 1989) y *N. crassa* (Reyes *et al.*, 1981). Además, este proceso también ha sido estudiado en Mucorales como *B. trispora* (Nanou *et al.*, 2007) y *Mucor rouxii* (Alfonso *et al.*, 1992).

Durante el análisis fenotípico de los mutantes afectados en el mecanismo de silenciamiento se hizo evidente que algunas de estas estirpes parecían sufrir un proceso de autólisis prematura, ya que los cultivos envejecidos de ciertos mutantes se lisaban más rápidamente que la estirpe silvestre. Para caracterizar detalladamente este fenómeno, todas las estirpes mutantes en genes de la maquinaria de silenciamiento, así como la estirpe silvestre, fueron incubadas durante un periodo prolongado de tiempo en placas de medio

rico, analizándose la aparición de zonas de lisis en las diferentes estirpes a distintos tiempos de incubación.

Los experimentos se llevaron a cabo con las estirpes R7B (silvestre), MU406 (*dcl-1*⁻), MU410 (*dcl-2*⁻), MU411 (*dcl-1*⁻/*dcl-2*⁻), MU412 (*r2d2*⁻), MU413 (*ago-1*⁻), MU414 (*ago-3*⁻), MU416 (*ago-2*⁻), MU419 (*rdrp-1*⁻), MU420 (*rdrp-2*⁻) y MU430 (*qip*⁻), que fueron sembradas por triplicado en medio rico YPD a 26°C e incubadas en condiciones de oscuridad continua (**ver apartado II. 16 de Materiales y Métodos**). Una vez que los micelios alcanzaron la fase de crecimiento estacionario, en el que el micelio cubre toda la placa (3-4 días), se siguió la evolución de los cultivos mediante la toma de imágenes de los micelios con un escáner (HP Scanjet G4010) tras distintos días de incubación, con el objetivo de realizar un seguimiento de la aparición de lisis en las diferentes estirpes (**Figura 51**).

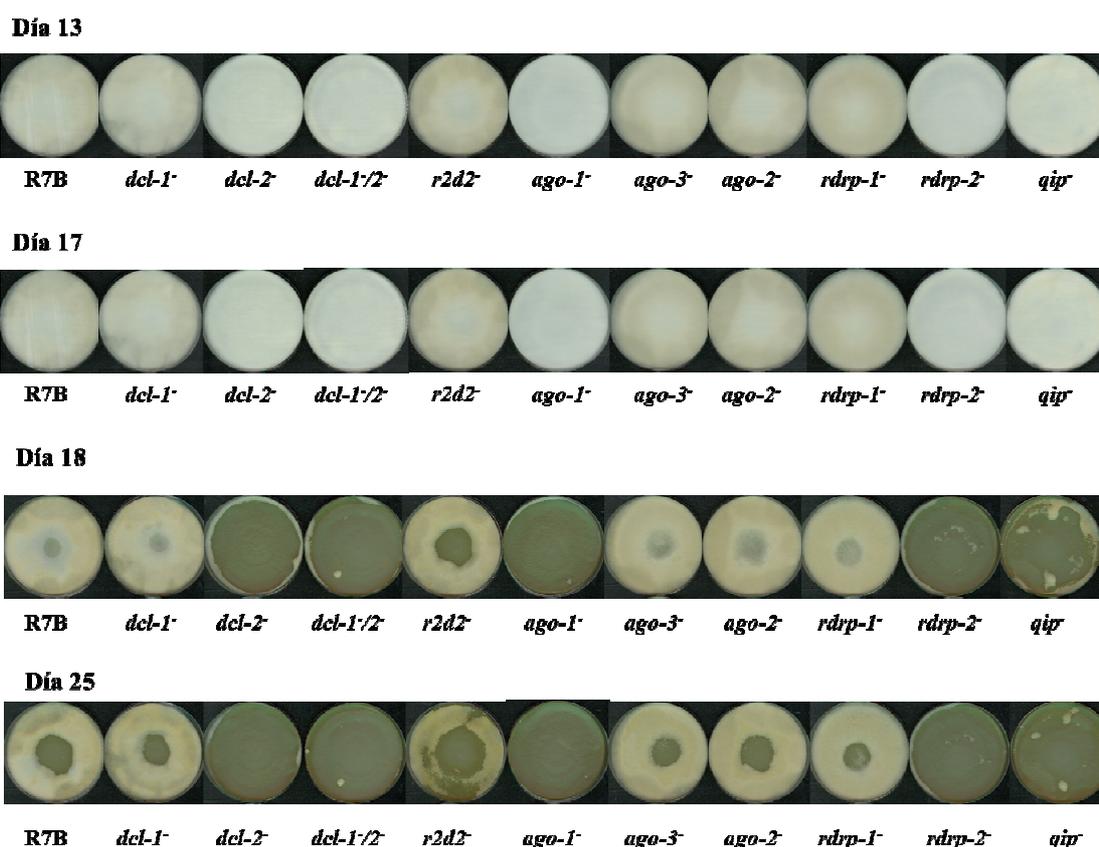


Figura 51. Proceso de autólisis en la estirpe silvestre y en mutantes de la maquinaria de silenciamiento. Todas las estirpes fueron incubadas en medio rico YPD a 26°C en oscuridad. En la parte superior se indican los días de incubación de los micelios en el momento de la obtención de la imagen. Las imágenes son representativas de las tres réplicas realizadas.

Todos los micelios ocuparon la totalidad de la placa tras 4 días de crecimiento, permaneciendo intactos hasta el día 17. Al día siguiente (día 18) se desencadenó un proceso de autólisis acelerada en los mutantes *dcl-2⁻*, *dcl-1⁻/dcl-2⁻*, *ago-1⁻*, *rdrp-2⁻* y *qip⁻*, que en menos de 24 horas provocó la degradación de prácticamente todo el micelio. El mutante *r2d2⁻* también presentó un mayor grado de autólisis que la estirpe silvestre, aunque ésta no avanzó a la misma velocidad que en los mutantes mencionados anteriormente. El fenotipo de lisis acelerada es específico de los mutantes mencionados, ya que el resto de las estirpes, los mutantes *dcl-1⁻*, *ago-3⁻*, *ago-2⁻*, y *rdrp-1⁻* no lo presentaron, manteniendo hifas viables durante más de 30 días, al igual que la estirpe silvestre. Sí se observó en todas estas estirpes un pequeño halo de lisis tras 25 días de incubación, consecuencia natural del propio envejecimiento de los micelios. El fenotipo de autólisis acelerada mostrado por los mutantes *dcl-2⁻*, *dcl-1⁻/dcl-2⁻*, *ago-1⁻*, *rdrp-2⁻* y *qip⁻* está asociado con la degradación completa de las hifas del hongo en el área lisada (**Figura 52**), lo que constituye el último paso del proceso de autólisis inducida por ayuno de nutrientes (Emri *et al.*, 2008).

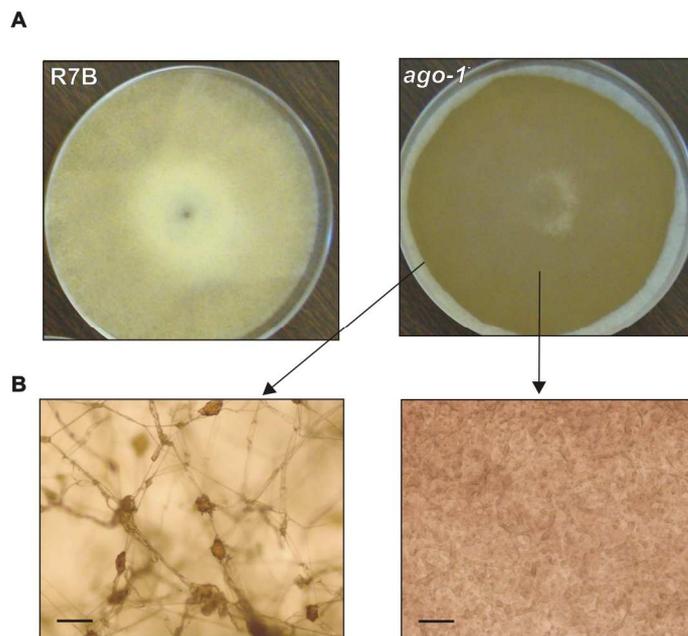


Figura 52. Destrucción de las hifas y formación de hifas vacías en cultivos envejecidos de mutantes de silenciamiento. (A) Se muestra la autólisis acelerada de cultivos envejecidos del mutante *ago-1⁻* en comparación con la estirpe silvestre. (B) El micelio lisado del mutante *ago-1⁻* presenta vacuolización e hifas vacías en el límite entre las áreas micelial y de autólisis (izquierda), mientras que la parte central del área de autólisis está completamente libre de material fúngico (derecha). Las fotografías corresponden a cultivos incubados en medio YPD durante 18 días. Escala = 100 μm .

Para cuantificar el proceso de autólisis acelerada que presentaron algunos de los mutantes afectados en genes de silenciamiento, las imágenes obtenidas a los distintos tiempos de incubación se analizaron mediante el programa de libre acceso ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/) (ver apartado II. 16 de Materiales y Métodos). Este programa de análisis de imagen proporcionó los valores correspondientes a las áreas de micelio intacto y autolisado, expresando los resultados como porcentaje de lisis (área de lisis/área total de la placa) que mostró cada una de las estirpes tras los diferentes días de incubación (Figura 53). Los mutantes *dcl-2⁻*, *dcl-1/dcl-2⁻*, *ago-1⁻*, *rdrp-2⁻* y *qip⁻* presentaron el 90% del micelio autolisado tras 18 días de incubación, llegando a alcanzar prácticamente el 100% de micelio lisado el día 19. Sin embargo, la estirpe silvestre y los mutantes *dcl-1⁻*, *ago-3⁻*, *ago-2⁻*, y *rdrp-1⁻* presentaron menos del 20% de la superficie del micelio lisada tras 19 días de incubación, manteniéndose este porcentaje prácticamente inalterado durante más de 25 días. Como se señaló anteriormente, el mutante *r2d2⁻* presentó unos valores de autólisis intermedios, indicando la participación parcial del gen *r2d2* en el control de este proceso.

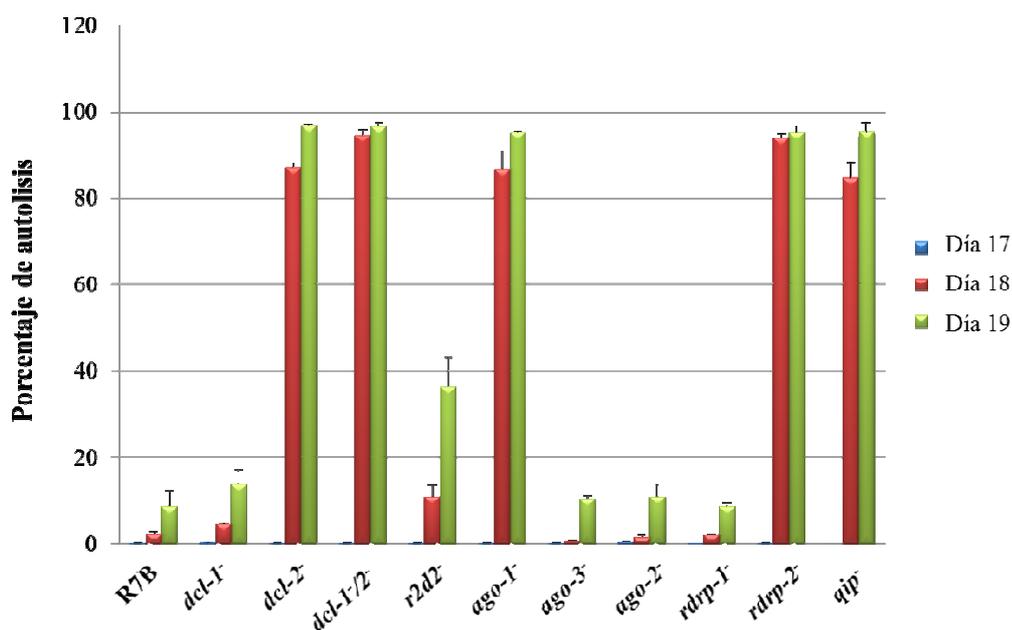


Figura 53. Cuantificación del proceso de autólisis celular en la estirpe silvestre y en mutantes afectados en la maquinaria de silenciamiento. Se indica el porcentaje de autólisis (área de lisis/área total de la placa) que mostraron las diferentes estirpes tras 17, 18 ó 19 días de crecimiento en medio rico YPD, a 26°C y en condiciones de oscuridad. Los datos representan la media y error típico de tres experimentos independientes.

Los datos obtenidos indican que mutantes afectados en genes esenciales de la maquinaria de silenciamiento, *dcl-2*, *ago-1*, *rdrp-2* y *qip*, activan el programa de lisis inducida por ayuno de nutrientes a tiempos menores que la estirpe silvestre y sugieren que la deficiencia en alguno/s de los ex-siRNAs cuya producción depende de estos genes altera la activación de dicho programa por estrés nutricional.

III. 4. 7. Análisis de la virulencia en sistemas heterólogos.

M. circinelloides ha sido identificado recientemente como un patógeno oportunista emergente, agente causal de una infección fúngica denominada mucormicosis que puede llegar a ser letal (Alvarez *et al.*, 2009). Esta infección prevalece principalmente en pacientes inmunodeprimidos como consecuencia de enfermedades hematopoyéticas, trasplante de órganos, diabetes mal controlada o VIH, aunque también se han detectado casos de infección en personas no inmunodeprimidas.

La colaboración de nuestro grupo con el grupo dirigido por el profesor Joseph Heitman (Universidad de Duke, EE.UU), ha permitido demostrar una clara relación entre el tamaño de las esporas de *Mucor* y su virulencia. El estudio realizado demuestra que las esporas grandes y multinucleadas, producidas por las estirpes silvestres de sexo (-), son más virulentas que las esporas pequeñas y mayoritariamente uninucleadas producidas por la estirpe NRLL3631 de sexo (+) (Li *et al.*, 2011). Dado que algunos de los mutantes afectados en genes de silenciamiento muestran alteraciones en la producción de esporas vegetativas y en las respuestas a distintas situaciones de estrés (térmico, oxidativo), que podrían estar asociadas al proceso infeccioso, se analizó *in vivo* la capacidad patogénica de los diferentes mutantes afectados en la maquinaria de silenciamiento [todos de sexo (-)]. Para ello, se utilizó como hospedador un organismo heterólogo, concretamente larvas de *Galleria mellonella*, conocida como la polilla de la cera.

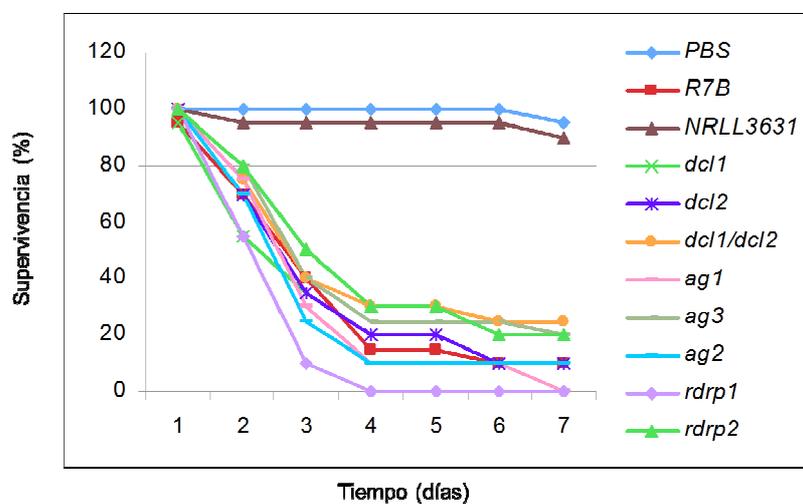
Las estirpes sometidas a estudio fueron los mutantes MU406 (*dcl-1*⁻), MU410 (*dcl-2*⁻), MU411 (*dcl-1/dcl-2*⁻), MU413 (*ago-1*⁻), MU414 (*ago-3*⁻), MU416 (*ago-2*⁻), MU419 (*rdrp-1*⁻), MU420 (*rdrp-2*⁻), todos ellos afectados en los genes clave de la maquinaria de silenciamiento, y las estirpes silvestres R7B (-) y NRLL3631 (+). De cada una de las estirpes se prepararon esporas frescas, que se diluyeron en tampón PBS para inyectar 1000 esporas/larva en un volumen de 5 µl, utilizando una microjeringa Hamilton de 10 µl (Hamilton 701 RN, Fisher Scientific). Las inyecciones se realizaron en un

pseudópodo del penúltimo anillo de la larva, para evitar dañar la masa intestinal. En cada experimento se inyectaron veinte larvas por estirpe, realizándose varios experimentos independientes con muestras biológicas diferentes. Tras la infección, se analizó la mortalidad de las larvas a intervalos de un día, durante un plazo de 7-8 días. Las larvas infectadas con las estirpes de *Mucor* patogénicas mostraron tejido necrosado en la zona de inoculación a partir de las 24 horas de la inyección. Dicha necrosis se iba expandiendo por el resto de la larva hasta que finalmente moría (**Figura 54A**). Como se había descrito previamente, la inoculación con esporas de la estirpe de tipo sexual (+) (NRLL3631) dio lugar a un porcentaje de supervivencia próximo al 100%, al igual que ocurre cuando se inyecta sólo el tampón PBS. Sin embargo, todos los mutantes analizados presentaron un grado de virulencia similar al que muestra la estirpe silvestre R7B (-), dando lugar a la necrosis y muerte de la mayoría de las larvas infectadas en el plazo de 5-6 días (**Figura 54B**). Resultados similares se obtuvieron en réplicas sucesivas del experimento, variando en algunos casos el patrón temporal de letalidad, que se mostró dependiente del lote de larvas utilizado (**Figura 54C**).

A



B



C

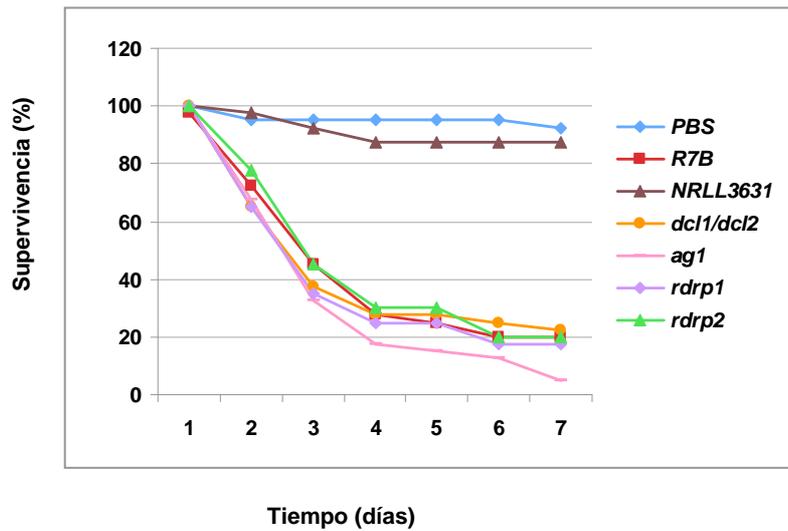


Figura 54. Estudio *in vivo* de la virulencia de las estirpes mutantes en genes de silenciamiento. (A) Larvas de *Galleria mellonella* antes y después de la infección con las estirpes patogénicas de *Mucor*. Tras la inyección de las esporas, las larvas presentan necrosis a partir de la zona de inoculación, y finalmente mueren. (B) Porcentaje de supervivencia de larvas de *Galleria* infectadas con esporas de las diferentes estirpes. Veinte larvas fueron infectadas con 1000 esporas/larva de cada uno de los mutantes afectados en genes de silenciamiento y de las estirpes silvestres NRLL3631 (+) y R7B (-). (C) Réplica del mismo experimento, con un lote diferente de larvas. Por claridad, sólo se muestran los datos de las estirpes silvestres y los mutantes afectados en genes esenciales para la ruta canónica de silenciamiento en *M. circinelloides*.

Los resultados obtenidos indican que los mutantes en genes de silenciamiento no parecen mostrar grandes alteraciones en el patrón de virulencia, al menos cuando se utilizan modelos heterólogos como hospedador. Ello sugiere que la patogenicidad de *M. circinelloides* no está regulada, al menos de forma significativa, por la maquinaria de silenciamiento, aunque serán necesarios nuevos experimentos, utilizando otros modelos animales, para descartar la participación del mecanismo de silenciamiento en el control de la patogénesis en *M. circinelloides*.

IV. DISCUSIÓN

IV. 1. La maquinaria de silenciamiento génico de *M. circinelloides*.

El silenciamiento génico mediado por RNA es un complejo mecanismo de regulación génica, que suprime de forma específica la expresión de los genes diana mediante la acción de pequeñas moléculas de RNA, de tamaño definido, que inducen la degradación del mRNA, impiden su traducción o inhiben su transcripción. En *M. circinelloides*, nuestro grupo de investigación ha descrito la existencia de un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional asociado a la presencia de moléculas de siRNAs de dos tamaños distintos, 21 y 25 nt (Nicolás *et al.*, 2003) y ha identificado los principales componentes que intervienen en el mismo. Este mecanismo responde a la introducción tanto de transgenes con repeticiones invertidas, que generan directamente dsRNA (de Haro *et al.*, 2009), como de transgenes con sentido, en cuyo caso se requiere de la proteína RdRP-1 para transformar el ssRNA en la molécula de dsRNA inductora del silenciamiento (Calo *et al.*, 2012). Esta molécula de dsRNA es procesada por la ribonucleasa Dcl-2 para dar lugar a los siRNAs de 21 y 25 nt (de Haro *et al.*, 2009), que son incorporados al complejo RISC. En este complejo una de las cadenas del siRNA es degradada, permitiendo así que la proteína Ago-1, unida a la cadena guía del siRNA, identifique al mRNA diana y provoque su degradación (Cervantes *et al.*, 2013). Los productos resultantes de la degradación del mRNA diana son reconocidos por la proteína RdRP-2 que genera nuevas moléculas de dsRNA, amplificando así la señal inicial de silenciamiento (Calo *et al.*, 2012) (**Figura 6**).

Un paso clave en el mecanismo de silenciamiento es la activación del complejo RISC, donde es crítica la eliminación de la cadena “pasajera” del siRNA para la eficiente activación del complejo. Así, en *N. crassa*, una exonucleasa que interacciona con la proteína Argonauta QDE-2, denominada QIP (QDE-2 Interacting Protein), es la encargada de la degradación de la cadena pasajera, una vez que QDE-2 ha realizado en ella un corte endonucleolítico (Maiti *et al.*, 2007). Esta proteína es esencial para el silenciamiento génico en *N. crassa*, lo que pone de manifiesto su papel crucial en la activación del complejo RISC. En *T. brucei* también se identificó una exonucleasa 3'-5' de la superfamilia DnaQ, denominada TbRIF4, encargada de la conversión de los dúplex de siRNAs en siRNAs de cadena sencilla (Barnes *et al.*, 2012). Ambas exonucleasas cumplen funciones similares, aunque no idénticas, en la activación del complejo RISC, ya que la proteína TbRIF4 puede llevar a cabo la conversión de los dúplex de siRNAs en moléculas de cadena sencilla en ausencia de la actividad catalítica de Argonauta (Barnes *et al.*, 2012).

También la situación en el caso de *Drosophila* es distinta, ya que la eliminación de la cadena pasajera es llevada a cabo por C3PO, una endorribonucleasa dependiente de Mg^{+2} cuya subunidad catalítica, Trax, promueve la activación del complejo RISC mediante la eliminación de la cadena “pasajera” (Liu et al., 2010).

La disponibilidad de la secuencia genómica de *Mucor* permitió identificar una proteína que, aunque presenta una baja identidad global (15%) con la proteína QIP de *Neurospora*, podría ser funcionalmente similar. Esta secuencia incluye un dominio Ribonucleasa H similar al dominio exonucleasa 3’-5’ que presenta la proteína QIP de *Neurospora*, que pertenece a la superfamilia DEDDh. Conserva también los residuos críticos presentes en los diferentes motivos de dicho dominio, donde la histidina del motivo III es la encargada de dirigir el ataque nucleofílico al enlace fosfodiéster terminal y es esencial para la actividad exonucleasa (Hamdan et al., 2002) (**Figura 55**). Ello nos llevó a denominar *qip* al gen identificado en *Mucor*.

	Motivo I	Motivo II	Motivo III
	* *	*	* *
<i>E. coli</i> Dna Q	QIVLD TE TTGM . . .	LVIHNAAF D IGFM . . .	KRTL H GALL D AQIL
<i>N. crassa</i> QIP	FVAID LE AYEL . . .	LVFHDQSQ D LKYI . . .	WKNM H NAGN D AVYT
<i>T. brucei</i> RIF4	FVFLD VE AAVV . . .	LINKGSLMD V QAL . . .	YTES H CALK D AQVI
<i>Mucor</i> QIP	FVSI DIE AYEK . . .	LVGHGLDS D LKYL . . .	TWNL H NAGN D AHYT

Figura 55. Alineamiento de las secuencias de los tres motivos característicos de las exonucleasas 3’-5’ de la superfamilia DDEDh: DnaQ de *E. coli*, QIP de *N. crassa*, RIF4 de *T. brucei* y Qip de *Mucor*. Se indica en color rojo y con asterisco aquellos aminoácidos críticos conservados en los tres motivos de las exonucleasas.

En la región reguladora del locus *qip*, aguas arriba del posible codón de inicio de la traducción, se encuentran dos elementos característicos de promotores de hongos filamentosos, una región de 28 pb rica en pirimidinas y una secuencia CAAT cuatro nucleótidos aguas abajo (**Figura 15**) (Gurr et al., 1987). Sin embargo, no existe un motivo canónico TATAAA, hecho que no es infrecuente en genes de hongos filamentosos (May et al., 1987; Kos et al., 1988). Además, la ausencia de dicho motivo se relaciona con la presencia de secuencias ricas en pirimidinas especialmente largas (Gurr et al., 1987), regiones que han sido implicadas en la correcta iniciación de la transcripción en algunos promotores de *A. nidulans* (Punt et al., 1990). La determinación del extremo 3’ del gen mediante experimentos de 3’RACE permitió identificar la secuencia de poliadenilación

AAUAAA, 202 pb aguas abajo del codón fin de mensaje del gen (UAA) (**Figura 15**). Dichos experimentos también permitieron la obtención del cDNA completo de *qip*, de 1005 pb, cuya comparación con la secuencia genómica mostró con exactitud la localización de los dos intrones anotados (**Figura 15**). El tamaño del cDNA corresponde al tamaño del mRNA detectado mediante Northern blot y cifra una proteína de 334 aminoácidos.

El análisis de la expresión del gen *qip* en la estirpe silvestre reveló la existencia de un transcrito del tamaño esperado, que se expresa a altos niveles durante el crecimiento vegetativo (**Figura 19**). Dicho análisis permitió determinar que la expresión de *qip* no se induce por la luz, a diferencia de lo que ocurre en otros genes de la maquinaria de silenciamiento de *Mucor*, como *ago-1* (Cervantes *et al.*, 2013). La luz regula muchos aspectos de la biología fúngica, incluyendo el desarrollo de estructuras reproductivas y la biosíntesis de carotenos, que facilitan la adaptación y la supervivencia en la naturaleza (Corrochano y Garre, 2010). Dado que la maquinaria de silenciamiento de *Mucor* parece estar principalmente implicada en la respuesta a señales ambientales y de desarrollo (ver más adelante), se ha especulado que la regulación por la luz de *ago-1* podría ser parte de una respuesta dirigida a modular la expresión de los genes que responden a la luz por la maquinaria de silenciamiento (Cervantes *et al.*, 2013). El hecho de que la expresión del gen *qip* sea constitutiva podría sugerir, por tanto, que la función de este gen no está limitada a su participación en el mecanismo de silenciamiento de *Mucor*. No se detectaron mensajeros de diferentes tamaños que evidencien la existencia de un procesamiento alternativo de los transcritos primarios, tal como se ha descrito para algunos genes de silenciamiento, como es el caso del gen *dcl-1* (Nicolás *et al.*, 2007).

La obtención de un mutante nulo para el gen *qip* mediante recombinación homóloga fue muy laboriosa. Sin embargo, dado que la recombinación homóloga ocurre con muy baja frecuencia en hongos filamentosos (revisado en Kück y Hoff, 2010), produciéndose con mayor probabilidad una integración ectópica, no es de extrañar que se obtuviera únicamente un mutante *qip*⁻ tras numerosos intentos. Los resultados obtenidos en el análisis funcional de dicho mutante muestran que la frecuencia de silenciamiento se encuentra severamente reducida en el mutante *qip*⁻ respecto a la que presenta la estirpe silvestre, tanto cuando se introducen transgenes con “repeticiones invertidas” como cuando se induce la ruta mediante transgenes “con sentido” (**Tabla 10**). Estos resultados demuestran que el gen *qip* cumple un papel esencial en el mecanismo de silenciamiento

génico inducido por transgenes. Asimismo, la estabilidad del silenciamiento se encuentra claramente afectada en el mutante *qip⁻*, ya que los escasos individuos silenciados no son capaces de mantener el fenotipo albino tras un ciclo de crecimiento vegetativo (**Tabla 11** y **Figura 24**). Por homología con el papel de la proteína QIP de *N. crassa*, los datos obtenidos parecen indicar que la proteína Qip de *M. circinelloides* interviene en la activación del complejo RISC tanto en el proceso de inducción mediante transgenes, como en la posterior amplificación de la señal de silenciamiento, esencial para que el mecanismo de silenciamiento génico se mantenga de forma estable en *M. circinelloides* (Calo *et al.*, 2012). Al bloquear la activación del complejo RISC, los transformantes *qip⁻* no silenciados, portadores de los vectores de silenciamiento, deben ser incapaces de acumular suficiente cantidad de siRNAs secundarios para llevar a cabo el silenciamiento del gen chivato. Estos transformantes, sin embargo, deberían acumular pequeñas cantidades de siRNAs primarios, procedentes del procesamiento de la molécula inductora por la enzima Dcl-2. Sin embargo, en *M. circinelloides*, los siRNAs detectados mediante experimentos tipo Northern son fundamentalmente siRNAs secundarios, productos de la amplificación a partir del mRNA diana, puesto que los siRNAs primarios son producidos en muy bajas concentraciones (Nicolás *et al.*, 2003; Cervantes *et al.*, 2013). Por ello, no es sorprendente que no se detecten siRNAs primarios en los transformantes *qip⁻* con fenotipo no silenciado (**Figura 25**). Alternativamente, la falta de acumulación de siRNAs primarios podría ser debida a la degradación de éstos, al no activarse el complejo RISC y no formar un complejo estable por la ausencia de la proteína Qip.

La imposibilidad de detectar siRNAs primarios en los mutantes *qip⁻* dificulta el análisis de la posible actividad exonucleasa de Qip sobre la cadena pasajera de los siRNAs, tal como se ha llevado a cabo en *N. crassa*. Sería necesario otro tipo de aproximación experimental, como el estudio de la complementación funcional del mutante *qip⁻* con la proteína QIP de *Neurospora*, para confirmar el papel del gen *qip* en *M. circinelloides*. Los escasos individuos con fondo genético *qip⁻* que son capaces de silenciar el gen chivato producen siRNAs antisentido de 21 y 25 nt y siRNAs con sentido de 25 nt, al igual que la estirpe silvestre (**Figura 26**). Esta actividad residual podría explicarse por la actuación de otra exonucleasa que desempeñara la función de Qip en ausencia de ésta, aunque con menor eficacia.

En *N. crassa* la detección de la interacción entre QIP y QDE-2 (Argonauta) (Maiti *et al.*, 2007) se llevó a cabo mediante experimentos de inmunoprecipitación *in vivo*, ya

que se dispone de versiones de las proteínas de silenciamiento etiquetadas con distintos epitopos y anticuerpos eficaces contra ellos. Sin embargo, en *Mucor*, la baja eficacia de integración por recombinación homóloga dificulta la sustitución de la versión silvestre de los genes por versiones etiquetadas, por lo que se han generado anticuerpos contra las distintas proteínas de silenciamiento. Estos anticuerpos, sin embargo, no funcionan eficazmente en experimentos de inmunoprecipitación, por lo que para estudiar la posible interacción entre Qip y Ago-1 en *Mucor* se utilizó el sistema del doble híbrido de levaduras. En dichos experimentos no se detectaron interacciones entre las proteínas Ago-1 y Qip, ni tampoco entre Ago-1 y las proteínas Dcl-1 y Dcl-2, aún cuando se utilizaron condiciones que permiten detectar interacciones débiles (**Figura 28**). La ausencia de resultados positivos en levaduras no descarta la posibilidad de que realmente exista interacción entre dichas proteínas en *M. circinelloides*, puesto que las proteínas de la maquinaria de silenciamiento podrían formar un complejo multiproteico de tal modo que, si alguna de las proteínas que lo forman está ausente, no se pueda constituir el complejo. Alternativamente, las proteínas sometidas a estudio podrían necesitar modificaciones post-traduccionales específicas de *Mucor*, que no serían llevadas a cabo en levaduras. Actualmente, se llevan a cabo en nuestro laboratorio nuevas aproximaciones experimentales para favorecer la introducción de etiquetas en las proteínas de silenciamiento, que permitan el análisis de las posibles interacciones en *M. circinelloides*.

Un aspecto sin resolver en la ruta de silenciamiento de *M. circinelloides* es la posible redundancia funcional entre las proteínas RdRPs en el proceso de amplificación. El mutante *rdrp-2*⁻ no tiene anulada completamente la capacidad de amplificación, por lo que debe de existir una actividad residual que podría ser debida a las proteínas RdRP-1 o RdRP-3. La existencia de cierta redundancia funcional entre proteínas de silenciamiento de la misma familia ha sido descrita previamente, como ocurre con los genes *dcl-1* y *dcl-2* de *Mucor* (de Haro *et al.*, 2009). Dada la participación de *rdrp-1* en el mecanismo de silenciamiento, se llevó a cabo la construcción de un doble mutante *rdrp-1/rdrp-2*⁻, resultando imposible obtener un individuo homocariote con la doble mutación. Ello podría sugerir que la presencia de mutaciones en los dos genes *rdrp* podría ser letal para el hongo. El hecho de que ambos genes desempeñan un papel esencial en el silenciamiento de genes endógenos (Nicolas *et al.*, 2010) podría explicar esta letalidad (ver más adelante).

IV. 2. Los sRNAs endógenos de *M. circinelloides*.

En eucariotas superiores, el silenciamiento génico mediado por RNA, además de operar frente a secuencias exógenas como virus o transposones, posee también una función endógena, requiriéndose diferentes clases de proteínas Argonauta para la producción de una gran variedad de esRNAs (Kim *et al.*, 2009). En mamíferos, se han descrito varias clases de esRNAs: miRNAs que regulan en *trans* la expresión de genes endógenos, endo-siRNAs que corresponden principalmente a regiones intergénicas, y pseudogenes y piRNAs que silencian transposones. En *D. melanogaster*, diferentes proteínas Argonauta se asocian a miRNAs, endo-siRNAs, piRNAs y exo-siRNAs, que derivan de secuencias de virus, situación que también se da en plantas (Kim *et al.*, 2009). En *M. circinelloides* la ruta de silenciamiento canónica, además de silenciar secuencias exógenas (Nicolás *et al.*, 2003), tiene también un importante papel en la regulación de genes endógenos, controlando su expresión mediante la producción de ex-siRNAs (Nicolas *et al.*, 2010). La mayoría de los ex-siRNAs (clases I y II) son producidos por la actuación de la enzima Dcl-2 y presentan una preferencia por Uracilo en el extremo 5' de la molécula (**Figura 39**), característica compartida por sRNAs unidos a Argonauta en animales, plantas y otros hongos (Drinnenberg *et al.*, 2009).

En *M. circinelloides* existen tres genes *argonauta*, de los cuales únicamente *ago-1* participa en el mecanismo de silenciamiento inducido por transgenes (Cervantes *et al.*, 2013). Los análisis realizados en esta tesis de la población total de sRNAs acumulados en la estirpe silvestre y en el mutante *ago-1* demuestran que este gen también está implicado en el mecanismo de silenciamiento endógeno, ya que las cuatro clases de ex-siRNAs muestran una menor acumulación en el mutante *ago-1* en relación con la estirpe silvestre (**Tabla 13**). Las validaciones de las clases I y II de ex-siRNAs indican que Ago-1 es necesaria para la biogénesis y/o estabilidad de estos ex-siRNAs (**Figura 33B**) y demuestran la funcionalidad de los mismos, ya que regulan la expresión de los genes de los que derivan (**Figura 40**).

El aislamiento de sRNAs unidos específicamente a la proteína Ago-1 permitió identificar 417 loci de ex-siRNAs que muestran un incremento de al menos 3 veces en el número de lecturas normalizadas en las fracciones enriquecidas en Ago-1 de la estirpe silvestre respecto a fracciones equivalentes del mutante *ago-1* (**Tabla S3 del Anexo**). Estos ex-siRNAs pertenecen mayoritariamente a las clases I y II, siendo muy minoritaria la presencia de ex-siRNAs de las clases III y IV entre la población unida específicamente a

Ago-1 (**Tabla 15** y **Tabla S4** del **Anexo**). La discrepancia entre el número de loci de ex-siRNAs unidos a Ago-1 (417) y la suma de los loci de las clases I y II (231) es probablemente debida a los diferentes umbrales de significación que se usaron para identificar loci con acumulación diferencial de sRNAs. En los primeros experimentos, el umbral se estableció en una diferencia de 4 veces ($\text{Log}_2 \text{Fold Change} \geq 2$), mientras que en los análisis de los sRNAs unidos a Ago-1 este umbral se estableció en una diferencia de 3 veces ($\text{Log}_2 \text{Fold Change} \geq 1,6$).

La preferencia por Uracilo en el extremo 5' de los ex-siRNAs de las clases I y II es, probablemente, responsable de su asociación específica con Ago-1 (**Tabla 15**). Dicha asociación corrobora la funcionalidad de estos ex-siRNAs, que serían producidos por la ruta canónica de silenciamiento para silenciar la expresión de sus genes diana. El extremo 5' de los sRNAs es un factor determinante para distintos aspectos funcionales del mecanismo de silenciamiento en plantas (Mi *et al.*, 2008). En *A. thaliana*, el análisis de los sRNAs asociados a las diferentes proteínas AGO reveló la preferencia por un nucleótido concreto en el extremo 5' del sRNA según el miembro específico de la familia de proteínas AGO al que estuviera asociado. Incluso si este nucleótido era modificado, el sRNA se asociaba a la nueva proteína AGO correspondiente, según el nuevo nucleótido de su extremo 5', modificándose también su actividad biológica (Mi *et al.*, 2010). Esta especificidad está basada en la estructura del dominio MID de las proteínas Argonauta, dominio responsable de la unión al extremo 5' de los sRNAs y que contiene un lazo que confiere especificidad para un nucleótido concreto (Ma *et al.*, 2005). En hongos, existe también esta preferencia por Uracilo en el extremo 5' del sRNA, como ocurre en los miRNAs, disiRNAs y los sRNAs asociados a QDE-2 de *N. crassa* (Lee *et al.*, 2010), en los sRNAs asociados a Ago-1 de *S. pombe* (Bühler *et al.*, 2008), en los sRNAs de *M. oryzae* (Nunes *et al.*, 2011) y en los sRNAs de *S. castellii* y *K. polysporus* (Drinneberg *et al.*, 2009). Por el contrario, en animales, la unión de los sRNAs a AGO depende principalmente de las características estructurales de los precursores (Steiner *et al.*, 2007; Tomari *et al.*, 2007).

La fuerte preferencia por sRNAs con Uracilo en el extremo 5' que muestra la proteína Ago-1 de *M. circinelloides* explicaría el hecho de que los ex-siRNAs de la clase III, que presentan preferencia por Adenina en el extremo 5' de la molécula (**Figura 39**), no se unan específicamente a Ago-1 (**Tabla 15**). Además, como se comentó en la Introducción (**ver apartado I. 3. 2**), los ex-siRNAs de la clase III poseen características

estructurales diferenciales respecto a las clases I y II, que apuntan a que son originados por una ruta no canónica de silenciamiento. La amplia distribución de tamaños de los ex-siRNAs de la clase III, su orientación casi exclusivamente en el mismo sentido que el mRNA y la ausencia de Uracilo en su extremo 5' sugieren la participación de un proceso de degradación. Sin embargo, este proceso de degradación no debe ser aleatorio, ya que los ex-siRNAs de la clase III muestran una marcada preferencia por Uracilo en la penúltima posición de la molécula, independientemente del tamaño del sRNA (Nicolás *et al.*, 2010) (**Figura 56**).

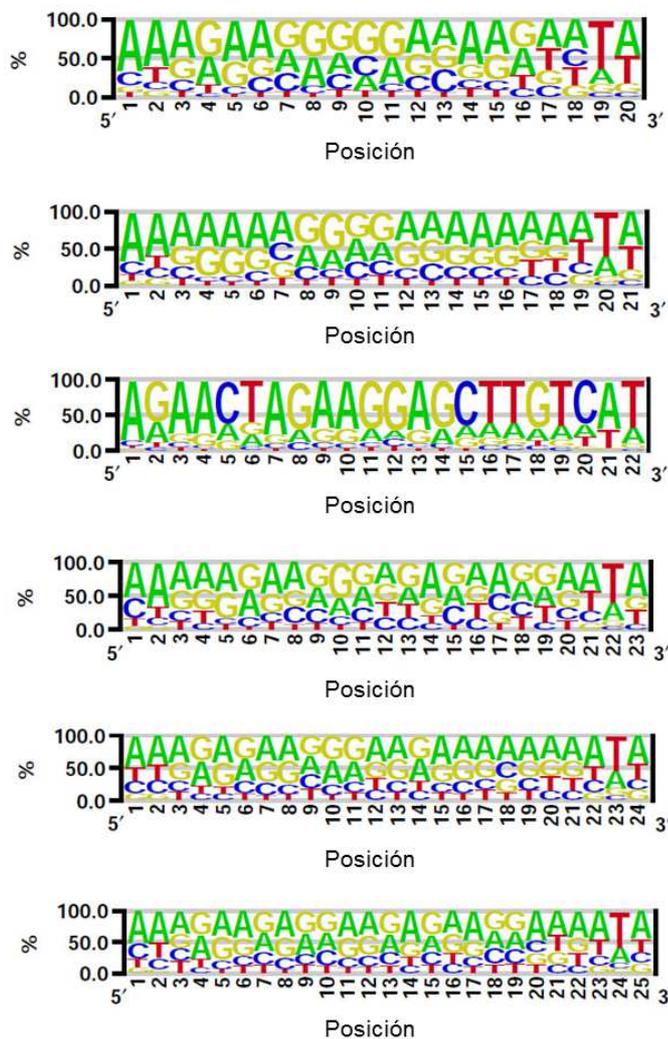


Figura 56. Logos de los ex-siRNAs pertenecientes a la clase III. Se incluyen sRNAs de diferentes tamaños (20-25 nt). El tamaño de la letra indica la frecuencia de cada nucleótido en esa posición concreta.

Como se ha comentado anteriormente, todas las clases de ex-siRNAs mostraron una menor acumulación en el mutante *ago-1^r* respecto a la estirpe silvestre. La ausencia de ex-

siRNAs de las clases I y II en el mutante *ago-1* indica que Ago-1 debe participar en la biogénesis y/o estabilidad de estos ex-siRNAs. Sin embargo, esto no es aplicable a los ex-siRNAs de las clases III y IV. Estos ex-siRNAs no se unen a Ago-1, al menos con suficiente fuerza como para ser aislados en complejos RNA-proteínas. Por lo tanto, su reducción en el mutante *ago-1* no puede ser explicada por la pérdida de la estabilidad producida por su unión a Ago-1, sino que sugiere que Ago-1 es necesaria para la biogénesis de los ex-siRNAs de las clases III y IV. La participación de proteínas Argonauta en la maduración de los piRNAs en animales se conoce desde hace tiempo (Ghildiyal y Zamore, 2009). Más recientemente, se ha descrito también en *N. crassa* (Lee *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2012), donde la proteína Argonauta (QDE-2), pero no su actividad catalítica, es absolutamente imprescindible para la producción de algunos miRNAs. En este caso, además de la proteína Argonauta, se requiere la participación de un complejo con otras proteínas de silenciamiento, como QIP y Dicer y proteínas del exosoma.

La falta de unión a Ago-1 indica que las clases III y IV no son *bona fide* ex-siRNAs, como sugerían sus características estructurales. Estos ex-siRNAs podrían actuar a través de un mecanismo de silenciamiento no canónico, una situación frecuente en hongos (Lee *et al.*, 2010). Alternativamente, las clases III y IV podrían unirse a una proteína Ago diferente. Los bajos niveles de expresión de la proteína Ago-3 durante el crecimiento vegetativo de *M. circinelloides* (Calo *et al.*, 2012) impidieron analizar la unión de los ex-siRNAs de las clases III y IV a esta proteína, ya que ninguno de los anticuerpos diseñados específicamente contra la proteína Ago-3 permitió detectarla en experimentos de hibridación tipo Western (resultados no mostrados). Por otro lado, *ago-2* es un pseudogen que contiene un codón de parada prematuro que daría lugar a una proteína truncada (Calo *et al.*, 2012). Anticuerpos dirigidos contra el extremo amino de esta proteína también fueron incapaces de detectarla en cultivos vegetativos de *M. circinelloides* (resultados no mostrados). Por tanto, es difícil suponer que los ex-siRNAs de las clases III y IV pudieran unirse a una proteína diferente a Ago-1.

Se puede proponer un modelo para explicar la biogénesis de los ex-siRNAs de las clases III y IV por una ruta distinta a la que genera los ex-siRNAs canónicos de las clases I y II (**Figura 57**). En este modelo, los RNA aberrantes transcritos de los genes diana podrían tener dos destinos. En unos casos, la acción secuencial de RdRP-1 y Dcl-2, o bien la acción directa de Dcl-2 sobre moléculas de dsRNA generadas sin la participación de RdRP-1, darían lugar a los ex-siRNAs de las clases I y II. Éstos serían reconocidos por la

proteína Ago-1 para mediar la identificación y degradación de los mensajeros diana. En los ex-siRNAs de la clase I, los mensajeros procesados serían reconocidos por RdRP-2 para amplificar la señal de silenciamiento. (**Figura 57, izquierda**). Sin embargo, en el caso de los ex-siRNAs de las clases III y IV, los transcritos de los genes dianas serían reconocidos por un supra-complejo formado por las proteínas de silenciamiento, donde Ago-1 sería esencial para la estabilización de dicho complejo. Este complejo atraería a una RNasa, aún por identificar, que sería la encargada de la degradación del RNAm, pero no de forma aleatoria, sino cortando preferentemente dos posiciones aguas abajo de cualquier Uracilo (**Figura 57, derecha**). En definitiva, los ex-siRNAs de las clases I y II serían *bona fide* siRNAs producidos por la ruta canónica de silenciamiento, mientras que los de la clase III, y probablemente también la clase IV, serían productos de degradación que requieren a Ago-1 para su producción.

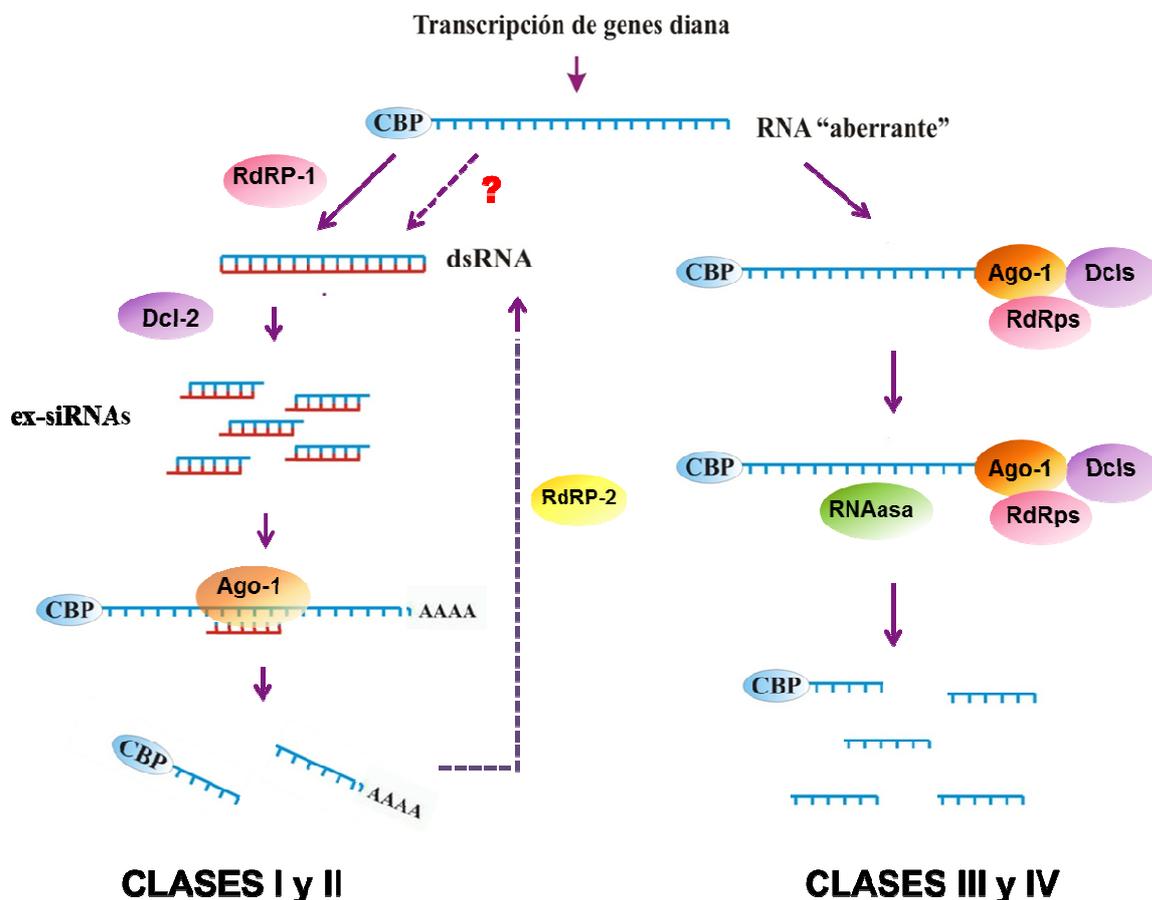


Figura 57. Modelo propuesto para la biogénesis de las distintas clases de ex-siRNAs. La clase II (izquierda, línea continua), requiere RdRP-1, Dcl-2 y Ago-1, mientras que la clase I (línea discontinua), requiere Dcl-2, Ago-1 y RdRP-2. Las clases III y IV serían generadas mediante un proceso de degradación en el que participa un complejo de proteínas de silenciamiento que incluye Ago-1.

La relación entre los mecanismos que controlan la calidad de los mRNAs y la maquinaria de silenciamiento génico es cada vez más evidente, no solo por la participación del exosoma en la biogénesis de esRNAs (Xue *et al.*, 2012), sino también por la cooperación entre ambos mecanismos para la unión y procesamiento de RNAs aberrantes (Yamanaka *et al.* 2013). En eucariotas superiores, la sobre-saturación de los mecanismos de control de la calidad de los mensajeros puede resultar en la activación del mecanismo de silenciamiento génico para degradar mRNAs aberrantes. Es posible que en hongos basales, los componentes básicos de la maquinaria de silenciamiento puedan utilizarse para canalizar mensajeros aberrantes hacia su degradación por nucleasas específicas o hacia su procesamiento en esRNAs canónicos. No se conoce cómo los componentes de la maquinaria de silenciamiento de *M. circinelloides* discriminan qué RNAs son dirigidos a la ruta canónica de silenciamiento o a la ruta de degradación. Sin embargo, es posible que el nivel de transcripción génica juegue un papel importante en el destino de los RNAs aberrantes. El análisis *in silico* de los genes regulados por ex-siRNAs de la clase III revela que son genes altamente expresados, implicados en metabolismo y procesos celulares básicos, como adhesión, transporte y señalización (**Figura 11B**). Por otro lado, la mayoría de los genes regulados por las clases I y II de ex-siRNAs corresponden a secuencias de función desconocida, conservadas en mucorales y otros hongos, que muestran una expresión reducida durante el crecimiento vegetativo (**Figura 11A**). Muchos de estos genes cifran proteínas implicadas en transducción de señales y almacenamiento y procesamiento de la información genética, lo que podría indicar la participación de estos ex-siRNAs en la regulación de distintos procesos celulares. Sin duda, identificar las señales que determinan el destino de los transcritos aberrantes de los genes diana y su reconocimiento por una u otra ruta requerirá nuevas y originales aproximaciones experimentales.

IV. 3. Expresión diferencial en mutantes de la ruta de silenciamiento.

Con el objetivo de disponer de una visión global del papel del mecanismo de silenciamiento génico en la regulación de la expresión de genes endógenos, y establecer con mayor precisión las funciones celulares reguladas por dicho mecanismo, se analizaron los mRNA diferencialmente acumulados en las estirpes mutantes en genes de la maquinaria de silenciamiento en relación con la estirpe silvestre. Aquellos loci que muestran expresión diferencial en varios de los mutantes respecto a la estirpe silvestre

serían los candidatos a ser regulados, directa o indirectamente, por la maquinaria de silenciamiento.

En un primer análisis se utilizaron micromatrices, identificándose loci con expresión diferencial en los mutantes de silenciamiento, tanto en muestras aisladas de cultivos en fase exponencial temprana (24 horas en medio mínimo), como al comienzo de la fase estacionaria (48 horas en medio mínimo). En ambas muestras se distinguieron tanto loci con mayor acumulación de transcritos en los mutantes respecto a la estirpe silvestre, tal y como cabría esperar de aquellos regulados directamente por ex-siRNAs, como otros con una mayor acumulación en la estirpe silvestre. Sin embargo, es importante resaltar que los cambios en los niveles de expresión génica en las estirpes mutantes respecto al silvestre, aunque estadísticamente significativos, fueron muy moderados (**Tabla 17**), identificándose un número pequeño de genes en los que los cambios en los niveles de expresión superaron las dos veces. Al utilizar un umbral significativo más estricto, para eliminar en lo posible falsos positivos o diferencias biológicamente no relevantes, el número de genes con expresión diferencial significativa disminuyó notablemente (**Tabla 18**), aumentando de forma paralela la proporción de genes que mostraron dicha expresión diferencial en varios de los mutantes de silenciamiento analizados. Así, la mayoría de estos genes mostraron el mismo patrón de expresión diferencial en los mutantes *dcl-1/dcl-2* y *ago-1* y, algunos de ellos, también en el mutante *rdrp-1*, sugiriendo que están regulados, directa o indirectamente, por la maquinaria canónica de silenciamiento (véase un ejemplo en la **Tabla 29**). Hay que destacar, sin embargo, que la proteína RdRP-1, además de intervenir en la regulación génica a través del mecanismo canónico de silenciamiento, podría estar participando en otras rutas de regulación de la expresión génica, ya que el análisis de las micromatrices identifica un número significativo de genes que muestran expresión diferencial sólo en el mutante *rdrp-1* (**Figura 42** y **Tabla 18**). En este sentido, es interesante comentar que el análisis de los esRNAs acumulados en la estirpe silvestre y los distintos mutantes de silenciamiento identificó, además de los ex-siRNAs que requieren alguna de las proteínas Dicer para su biogénesis (clases I-IV), un importante número de loci que producen ex-siRNAs mediante un mecanismo que requiere de las proteínas RdRPs pero es independiente de Dicer (*RdRP-dependent*, *Dicer-independent* ex-siRNAs) (nuestros resultados no publicados). Actualmente, se llevan a cabo experimentos para identificar la ribonucleasa implicada en la producción de estos ex-siRNAs, generados, probablemente, por una vía de silenciamiento alternativa.

ID de la proteína	Log ₂ FC <i>ago-1</i> vs WT		Log ₂ FC <i>dcl-1/-2</i> vs WT		Log ₂ FC <i>rdrp-1</i> vs WT		Definición KOG
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	
14092	-2,6	-	-2,0	-	-	-	Glycolipid 2-alpha-mannosyltransferase
27267	-2,31	-	-1,86	-	1,42	-	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
81113	-2,09	-	-1,45	-1,05	-	-	Defense-related protein containing SCP domain
86104	-1,86	-	-1,57	-1,30	1,37	-	Glycolipid 2-alpha-mannosyltransferase
86710	-1,80	-	-1,57	-	-	-	Serine-threonine phosphatase 2B
24134	-1,79	-	-1,77	-1,97	-	-	Sorting nexin SNX11
27693	-1,67	-	-1,58	-	-	-	Ca ²⁺ /H ⁺ antiporter VCX1 and related proteins
82942	-1,65	-	-1,50	-	-	-	Cyclin
75156	-1,63	-	-1,27	-	-	-	O-mannosyl transferase
82565	-1,23	-1,62	-	-1,90	-	-	Polyadenylate-binding protein (RRM family)
81803	-1,35	-1,68	-	-1,46	-	-1,59	Poly(ADP-ribose) polymerase Parp
77287	1,68	1,36	1,69	1,43	-	-	Homeobox protein
75997	1,85	2,57	1,39	2,98	-	-	Esterase/lipase/thioesterase
76671	1,97	2,63	1,78	3,31	-	-	FOG: Zn-finger
84028	2,01	2,88	1,53	3,45	-	-	Short-chain alcohol dehydrogenase
85858	4,62	4,01	1,93	1,50	-	-	RRM motif-containing protein
83353	4,68	4,31	2,27	3,75	1,85	2,69	Zinc finger, CCHC-type. Retrotransposon protein

Tabla 29. Expresión diferencial de genes seleccionados (ver **Tabla 19**) a las 24 y 48 horas. Se indica el log₂ (Log₂ FC) de la razón entre la expresión en los mutantes indicados y la de la estirpe silvestre (WT) en muestras tomadas a las 24 y 48 horas. En fondo blanco, genes con mayor expresión en el silvestre. En fondo gris, genes con mayor expresión en las estirpes mutantes.

Cabe resaltar que la expresión diferencial de aquellos genes que acumulan más mRNA en los mutantes de silenciamiento respecto al silvestre se mantiene más o menos constante en las muestras tomadas a las 24 y 48 horas, mientras que la mayoría de los genes que se sobre-expresan en la estirpe silvestre a las 24 horas son distintos de los que lo hacen a las 48 horas (**Figura 58**). Dado que la sobre-acumulación de mensajeros en los mutantes de silenciamiento es lo esperado de una regulación por ex-siRNAs, este comportamiento podría sugerir que la regulación directa por la maquinaria canónica de silenciamiento actúa de forma continuada en el tiempo.

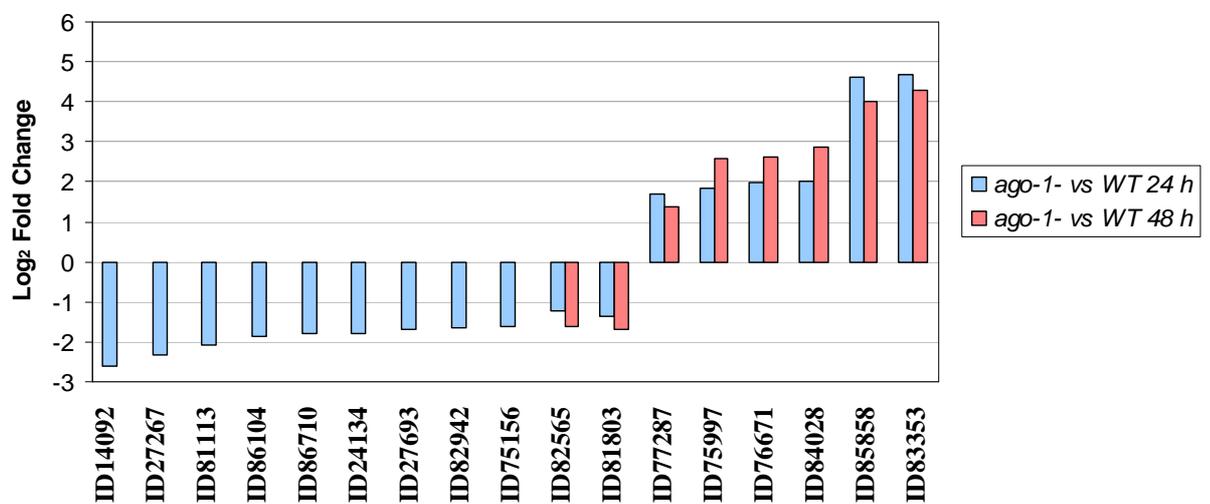


Figura 58. Representación gráfica de la expresión diferencial de genes seleccionados (ver **Tabla 29**). Se indica el log₂ (Log₂ Fold Change) de la razón entre la expresión en el mutante *ago-1* y la de la estirpe silvestre, en muestras tomadas a las 24 y 48 horas.

El análisis detallado de los loci que presentaron los mayores valores de expresión diferencial en los mutantes *dicer* y *ago* respecto al silvestre (**Tabla 29**), identificó genes que podrían estar implicados en crecimiento, respuestas a estrés y autofagia. Así, varios de los genes que mostraron una reducción en la acumulación de transcritos en los mutantes respecto a la estirpe silvestre, podrían tener funciones relacionadas con modificaciones de la pared celular (ID 75156, ID 14092, ID 86104) o con el control del crecimiento (ID 82942). La proteína con ID 75156 posee una elevada similitud con el producto del gen *ogm4* de *S. pombe* (E-value: 2,0e⁻¹⁸⁹), una O-manosiltransferasa implicada en la modificación post-traduccional de proteínas indispensable para la integridad de la pared celular (Tanaka *et al.*, 2005). Estas modificaciones son necesarias para el desarrollo normal

de la pared celular, la septación y la viabilidad (Willer *et al.* 2005). Así mismo, los genes que cifran las proteínas con ID 86104 y 14092 son ortólogos de los genes *mnt1* (E-value: $1,3e^{-79}$) y *mnt2* (E-value: $8,2e^{-106}$) de *C. albicans*, respectivamente (Munro *et al.*, 2005). Los genes *mnt1* y *mnt2* están involucrados en la glicosilación de proteínas de la pared celular, proceso importante para la correcta adhesión a la superficie del huésped y la virulencia de este patógeno humano. Por otro lado, la proteína con ID 82942 muestra similitud con la ciclina PCL1 (E-value: $2,0e^{-14}$) de *S. cerevisiae*, específica de la transición G1/S. Esta proteína interacciona con la quinasa específica de ciclina PHO85, implicada en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular y en la autofagia inducida por ausencia de nutrientes (Toh-E y Nishizawa, 2001; Yang *et al.* 2010; Jiménez *et al.*, 2013). La disminución en los niveles de estas proteínas en los mutantes de silenciamiento podría explicar, al menos en parte, los defectos en el crecimiento polar, desarrollo asexual y respuestas a estrés que presentan estos mutantes. La regulación por la maquinaria de silenciamiento de genes implicados en el establecimiento de la polaridad celular y la septación podría ser una característica común en hongos filamentosos, ya que genes implicados en estos procesos muestran también expresión diferencial en mutantes *dicer* del ascomiceto *T. atroviride* (Carreras-Villaseñor *et al.* 2013), habiéndose propuesto que la desregulación de esos genes podría ser responsable de los fenotipos mostrados por dichos mutantes.

También se identificaron loci que mostraron mayor acumulación de mRNA en los mutantes *dicer* y *ago*, en principio más interesantes por ser aquellos que podrían estar regulados directamente por ex-siRNAs (**Tabla 29**). Sin embargo, la mayoría de ellos resultaron cifrar proteínas con función desconocida, aunque en muchos casos portadoras de dominios implicados en la regulación de la expresión génica. Ello podría explicar el alto número de genes regulados, de forma indirecta, por la maquinaria de silenciamiento. Es interesante resaltar que el gen que mostró la mayor acumulación de transcritos en los mutantes *dcl-1/dcl-2* y *ago-1* y que también presentó expresión diferencial en el mutante *rdrp-1* (ID de la proteína 83353) corresponde a un locus productor de ex-siRNAs de la clase II (dependiente de Dcl-2, Ago-1 y RdRP-1). Es decir, la sobre-expresión del mRNA se correlaciona con una disminución en los niveles de ex-siRNAs de ese locus en los mutantes de silenciamiento. La proteína 83353 presenta una elevada homología con la poliproteína Gag de los retrotransposones de la familia Ty3/Gypsy (E-value: $6,5e^{-7}$) (Clemens *et al.*, 2013), lo que pone de manifiesto el papel directo del mecanismo de

silenciamiento génico en la defensa del genoma frente al salto de los transposones durante el crecimiento vegetativo de *M. circinelloides*.

La mayoría de los genes que solapan con otros loci de ex-siRNAs también mostraron una mayor acumulación de mRNA en los mutantes *dicer* y *ago* respecto a la estirpe silvestre, como cabría esperar de loci regulados directamente por ex-siRNAs (**Tabla 21**). Sin embargo, el aumento en los niveles de mRNA fue, en general, modesto (no superior a las 2 veces), confirmando que el mecanismo de silenciamiento actúa como modulador de la expresión de los genes diana, sin producir cambios bruscos en ella, al menos, durante el crecimiento vegetativo en condiciones estándar de laboratorio.

El análisis transcriptómico mediante RNA-seq permitió validar los datos obtenidos con las micromatrices y ampliar el catálogo de genes regulados por ex-siRNAs. La técnica de RNA-seq permite una mayor precisión y resolución en la medida de los niveles de los transcritos (Wang *et al.*, 2009), lo que disminuye, *a priori*, la aparición de falsos positivos. En efecto, los valores de expresión diferencial obtenidos fueron, en todos los casos, superiores a los obtenidos en los experimentos con micromatrices (**Tabla 23**), identificándose un número significativo de genes que mostraron diferencias de expresión de más de ocho veces en los mutantes de silenciamiento respecto a la estirpe silvestre (**Tabla 24**). Rangos similares de expresión diferencial han sido descritos en mutantes *dicer* de *T. atroviride* (Carreras-Villaseñor *et al.* 2013) y *M. oryzae* (Raman *et al.*, 2013), en los que se han realizado análisis transcriptómicos mediante RNA-seq. Las diferencias en los rangos de expresión diferencial obtenidos en los experimentos de RNA-seq respecto a los realizados con micromatrices son conocidas, ya que estas últimas permiten un rango limitado de detección debido a altos niveles de fondo y a la saturación de las señales (Wang *et al.*, 2010).

Debido, probablemente, a la mayor significación de los datos y la previsible disminución de falsos positivos, el porcentaje de genes que mostraron expresión diferencial en varios de los mutantes de silenciamiento fue superior al obtenido en los experimentos con micromatrices (**Figura 44**), poniendo de manifiesto la mayor resolución de la técnica de RNA-seq. Los resultados obtenidos mostraron la participación de diferentes combinaciones de proteínas de la maquinaria de silenciamiento en la regulación diferencial de la expresión de genes endógenos. Así, la mayoría de los genes que ven reprimida su expresión a las 24 horas de crecimiento en los mutantes *dicer* y *ago* están también reprimidos en el mutante *rdrp-I*, pudiendo representar dianas indirectas de los ex-siRNAs

de la clase II (**Figura 44A**). Como se ha comentado anteriormente, los ex-siRNAs de la clase II derivan, mayoritariamente, de genes que cifran proteínas de función desconocida que, en muchos casos, contienen dominios implicados en la transducción de señales o en el procesamiento de la información genética (Nicolás *et al.*, 2010). Es de esperar, por tanto, que los genes regulados directamente por estos ex-siRNAs puedan, a su vez, ejercer su posible acción activadora o represora sobre una amplia gama de genes de respuesta secundaria.

Los genes reprimidos en los mutantes de silenciamiento que muestran los mayores valores de expresión diferencial cifran proteínas con funciones similares a las obtenidas en los análisis realizados con micromatrices, y algunos de ellos habían sido identificados en estos análisis, como los implicados en división celular (ID 82942) o relacionados con modificaciones de la pared celular (ID 14092) (**Tablas 25 y 29**). Es de destacar el importante número de genes reprimidos en los mutantes de silenciamiento que cifran proteínas implicadas en el transporte y catabolismo de carbohidratos. Así, de los mostrados en la **Tabla 25**, tanto la proteína con ID 14092, como la proteína con ID 86670, que presenta una elevada homología con una α -1,2 manosidasa de *C. elegans* (E-value: $1,1e^{-71}$; Wilson, 2012) estarían dentro de este grupo. En el conjunto de genes reprimidos, casi el 20% de los que cifran proteínas con funciones conocidas están implicados en procesos metabólicos relacionados con carbohidratos (datos no mostrados). También en *T. atroviride* se ha descrito un enriquecimiento en genes implicados en el metabolismo de carbohidratos entre los genes que ven reprimida su expresión en los mutantes *dicer* y se ha sugerido el posible papel de esta expresión reducida en los defectos de crecimiento y esporulación mostrados por dichos mutantes (Carreras-Villaseñor *et al.* 2013). Además de proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, los genes reprimidos en los mutantes de silenciamiento en *M. circumloides* participan en una amplia variedad de funciones, como transducción de señales, transcripción, traducción, etc.

A diferencia del grupo anterior, aquellos loci que aumentan su expresión en los mutantes *dicer* y *ago* a las 24 horas de incubación también lo hacen en el mutante *rdrp-2*, y sólo una pequeña proporción ve afectada su expresión de forma significativa en el mutante *rdrp-1* (**Figura 44B**). Ello podría indicar una regulación directa por ex-siRNAs de la clase I y, en menor medida, de las clases II y/o III. Sin embargo, solo uno de los genes que mostraron los mayores valores de expresión diferencial (**Tabla 26**; ID 83353) resultó corresponder con un locus productor de ex-siRNAs. Este gen, que ya fue

identificado en los análisis con micromatrices, cifra una proteína Gag derivada de retrotransposones. El resto de los genes expresados a partir de loci productores de los ex-siRNAs conocidos no mostró diferencias de expresión en los cultivos de 24 horas o éstas fueron muy modestas. Dado que los ex-siRNAs conocidos fueron aislados de cultivos en fase estacionaria avanzada de crecimiento (Nicolás *et al.*, 2010; Cervantes *et al.*, 2013), es posible que las diferencias de expresión génica detectadas en las muestras tomadas a las 24 horas sean debidas a la regulación, directa o indirecta, por ex-siRNAs diferentes, que se producirían durante la fase exponencial de crecimiento. Alternativamente, los pequeños cambios de expresión en las dianas directas de los ex-siRNAs de las clases 1-4 producidos durante el crecimiento exponencial podrían dar lugar a cambios más significativos en la expresión de las dianas indirectas.

Entre los genes activados en los mutantes de silenciamiento que muestran los valores mayores de expresión diferencial (**Tabla 26**) destaca el responsable de la síntesis de la subunidad catalítica de la quinasa de proteína A (PKA) de *M. circinelloides* (ID 95896). La PKA dependiente de AMPc es uno de los reguladores clave de la polaridad en hongos, así como de otros procesos como el desarrollo, la sexualidad y la virulencia (Borges-Walmsley y Walmsley, 2000). De hecho, la ruta de PKA en *M. circinelloides* controla el crecimiento y la diferenciación, jugando las distintas isoformas diferentes papeles en el control de estos procesos (Ocampo *et al.*, 2012). Es posible, por tanto, que la desregulación de la proteína con ID 95896 en los mutantes de silenciamiento pueda estar relacionada con los defectos en la eficacia de esporulación que muestran estos mutantes. Finalmente, una proporción importante de los genes que mostraron los mayores incrementos en los valores de expresión (**Tabla 26**) cifran proteínas implicadas en el transporte y metabolismo de lípidos, como se ha descrito en *T. atroviride* (Carreras-Villaseñor *et al.* 2013).

Los análisis realizados a las 48 horas de crecimiento permitieron comprobar que una gran proporción de los loci que mostraron los mayores aumentos en la acumulación de transcritos correspondían a loci regulados directamente por ex-siRNAs (**Tabla 27**). Esto es lo esperado, ya que los ex-siRNAs fueron identificados en estas mismas condiciones de crecimiento (Nicolás *et al.*, 2003). Se identifican loci regulados por ex-siRNAs de las clases I y II. En el caso de los loci regulados por ex-siRNAs de la clase I (ID 85302, ID 82197), la expresión diferencial se manifiesta en los mutantes *dicer*, *ago* y *rdrp-2*, como cabe esperar de los genes implicados en la biogénesis de esta clase de ex-siRNAs. En

cuanto a los loci regulados por la clase II, sólo uno de los tres identificados mostró un aumento de expresión en el mutante *rdrp-I*, situación que sería lo esperable de la regulación por esta clase de ex-siRNA (**Tabla 27**). Sin embargo, hay que señalar que en los otros dos loci los valores de expresión diferencial en el mutante *rdrp-I* quedaron justo por debajo del umbral del valor p-ajustado elegido. En conjunto, los resultados mostrados en la **Tabla 27** confirman el papel modulador de los ex-siRNAs sobre los niveles de mRNA de los genes diana.

En cuanto a las funciones de las proteínas cifradas por los genes que muestran expresión diferencial a las 48 horas de crecimiento, se observa una relación con procesos que ocurren, fundamentalmente, durante la fase estacionaria del crecimiento. Así, entre las proteínas que alteran su expresión en los mutantes de silenciamiento se identifican proteínas implicadas en la movilidad de transposones (ID 83353, ID 85302), envejecimiento celular (ID 84028), respuestas a estrés (39104), metabolismo de lípidos (ID 86285, ID 83045, ID 89967) y esporulación (ID 50782) (**Tablas 27 y 28**). La proteína con ID 84028 (**Tabla 27**) presenta una elevada similitud con una hidroxil-acil-CoA-deshidrogenasa de función mitocondrial (E value: $1,3e^{-49}$) que podría estar implicada en el envejecimiento celular en ratas (Ivell *et al.*, 2003). La proteína con ID 50782 es una deacetilasa de quitina (E value: $4,6e^{-76}$) que disminuye su expresión en los mutantes de silenciamiento (**Tabla 28**). Esta proteína hidroliza los grupos N-acetamido de los residuos de N-acetil-glucosamina de la quitina, y es requerida para la síntesis de quitosano, la forma deacetilada de la quitina y componente de la pared celular de la espora en levaduras. La deficiencia en esta proteína resulta en alteraciones de la pared celular de las ascosporas de *S. cerevisiae* y *S. pombe*, que afectan a su resistencia a distintos estreses (Christodoulidou *et al.*, 1996; Christodoulidou *et al.*, 1999) y a la propia formación de la espora (Matsuo *et al.*, 2005), respectivamente. Los hongos mucorales contienen quitosano como la fracción mayoritaria de la pared celular, tanto de las hifas vegetativas como de la espora. En *Mucor rouxii* se ha caracterizado bioquímicamente la biosíntesis de quitosano que, al igual que en levaduras, requiere la acción coordinada de sintasas y deacetilasas de quitina (Davis y Bartnicki-Garcia, 1984). Es muy posible, por tanto, que la disminución en los niveles de deacetilasa de quitina en los mutantes de silenciamiento de *M. circinelloides* tenga que ver con los defectos de esporulación que presentan estos mutantes. Por otro lado, la proteína con ID 39104 (**Tabla 27**) es una chaperona de respuesta a choque térmico de la familia Hsp20 (E-value: $2,2e^{-23}$). Mutantes en el gen ortólogo de *N. crassa* (gen *hsp30*; proteína

NCU09364) muestran una sensibilidad acusada al efecto combinado de altas temperaturas y limitación de carbohidratos (Plesofsky-Vig y Brambl, 1990). Es factible pensar, por tanto, que el aumento en la tasa de crecimiento mostrado por algunos mutantes de silenciamiento a elevadas temperaturas en medio MMC (**Figura 50A**) pudiera estar relacionado con el aumento en los niveles de la proteína ID 39104 en dichos mutantes.

Todos estos datos, aún cuando requieren una validación experimental para su confirmación, ponen de manifiesto la clara intervención de la maquinaria de silenciamiento en la regulación de los niveles de mRNA de sus genes diana. Así mismo, los datos apuntan a genes concretos como posibles responsables de los fenotipos mostrados por los mutantes afectados en la producción de los ex-siRNAs. El análisis individual de esos genes nos permitirá comprobar su papel en los procesos celulares endógenos regulados por la maquinaria de silenciamiento.

IV. 4. Procesos celulares afectados en mutantes de la ruta de silenciamiento.

Los cambios relativamente moderados en los niveles de expresión génica que muestran los mutantes de *M. circinelloides* afectados en la maquinaria de silenciamiento son, probablemente, los responsables de los fenotipos relativamente suaves que presentan estos mutantes. Sólo en unos pocos hongos filamentosos, además de *M. circinelloides*, se han descrito fenotipos asociados a mutaciones en los genes que participan en la biogénesis de sRNAs, y en todos los casos, los cambios fenotípicos han sido moderados. En *M. oryzae*, los mutantes en genes *dicer* muestran una reducción en la tasa de crecimiento (Kadotani *et al.*, 2004), mientras que en *T. atroviride* se ha descrito tanto una reducción en la producción de esporas como en la tasa de crecimiento (Carreras-Villaseñor *et al.* 2013).

En *M. circinelloides*, los mutantes *dcl-2⁻* y *ago-1⁻* presentan alteraciones en la producción de esporas asexuales (De Haro *et al.*, 2009; Cervantes *et al.*, 2013), mientras que el mutante *dcl-1⁻* está afectado en el crecimiento vegetativo (Nicolás *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que también los mutantes *rdrp-2⁻*, *qip⁻* y, en menor medida, *r2d2⁻* presentan una reducción en la eficacia de esporulación, con niveles similares a los de los mutantes *dcl-2⁻* y *ago-1⁻* (**Figura 45A**). La reducción en la producción de esporas en estos mutantes sugiere que la ruta canónica de silenciamiento debe desempeñar un papel importante en la regulación de este proceso de desarrollo

vegetativo, en el que se ha descrito la participación de varios genes, como el gen *crgA*, un represor de la carotenogénesis (Nicolás *et al.*, 2008) o la proteína kinasa A (Ocampo *et al.*, 2009). De hecho, y como se ha mencionado en el apartado anterior, varios de los genes que muestran expresión diferencial en los mutantes de silenciamiento podrían estar directamente implicados en la formación de esporas viables (**Tabla 30**).

El comportamiento del mutante *rdrp-1*⁻ revela una notable sensibilidad a los cambios ambientales, sensibilidad que es compartida, en algunos casos y en menor medida, por el mutante *rdrp-2*⁻. Así, sólo en medio mínimo el mutante *rdrp-1*⁻ muestra una reducción en la eficacia de esporulación durante el crecimiento vegetativo, mientras que no se aprecian diferencias en medio semicomplejo (**Figura 45**). Por otro lado, el mutante *rdrp-1*⁻ muestra mayor resistencia al estrés oxidativo que la estirpe silvestre (**Figura 48**) y, junto a *rdrp-2*⁻, también a condiciones extremas de pH (**Figura 47A**) o temperatura (**Figura 50**). Como se ha mencionado en el apartado anterior, algunos de los genes que exhiben expresión diferencial en los mutantes de silenciamiento podrían estar directamente implicados en la respuesta al estrés térmico en determinadas condiciones de crecimiento (**Tabla 30**). La relación entre la regulación de genes endógenos por la ruta de silenciamiento y la respuesta a condiciones ambientales ha sido recientemente demostrada en *S. pombe* (Yamanaka *et al.*, 2013). En este organismo, la maquinaria de silenciamiento y factores asociados a la heterocromatina cooperan para silenciar loci regulados por señales ambientales o de desarrollo, como por ejemplo, los genes inducidos durante la diferenciación sexual (Yamanaka *et al.*, 2013). También a baja temperatura o en condiciones limitantes en la fuente de carbono se observan modificaciones en la heterocromatina y un aumento en la producción de siRNAs de loci específicos, indicando que la formación de estos dominios de heterocromatina por la ruta de RNAi está regulada por las condiciones de crecimiento y por señales de desarrollo. Los transcritos de estos genes regulados por la ruta de RNAi son también dianas de degradación por el exosoma (Yamanaka *et al.*, 2013). Es decir, en *S. pombe*, la actividad exonucleasa 3'-5' del exosoma y la maquinaria de RNAi constituyen dos rutas paralelas y necesarias para silenciar completamente los genes diana, lo que resulta en la falta de fenotipo de los mutantes simples afectados en uno u otro mecanismo (Yamanaka *et al.*, 2013). Los fenotipos moderados mostrados por los mutantes de silenciamiento en *M. circinelloides* podrían sugerir un papel predominante del mecanismo de silenciamiento en la regulación de loci que responden a señales ambientales o de desarrollo.

	Esporulación vegetativa	Respuesta a estrés	Autolisis	Estabilidad genómica	Virulencia
ID 83353 Proteína de retrotransposón				+	
ID 85302 Proteína retrotranscriptasa				+	
ID 95896 Quinasa de proteína A	+				
ID 75156 Modificación de la pared celular	+				
ID 86670 Modificación de la pared celular	+				
ID 14092 Modificación de la pared celular	+				+
ID 86104 Modificación de la pared celular	+				+
ID 50782 Deacetilasa de quitina	+		+		
ID 82942 Ciclina transición G1/S			+		
ID 84028 Posible papel en envejecimiento			+		
ID 80452 Quinasa de proteína de respuesta a daños			+		
ID 39104 Chaperona de choque térmico		+			

Tabla 30. Proteínas previsiblemente implicadas en los cambios fenotípicos mostrados por los mutantes en genes de silenciamiento, en función de su similitud con proteínas conocidas de otros organismos. Se indican los ID de las proteínas reguladas por la maquinaria de silenciamiento que podrían estar implicadas en los distintos procesos celulares alterados en los mutantes de silenciamiento, así como las funciones anotadas para dichas proteínas en distintos organismos. El signo (+) indica un posible papel de la proteína en el proceso señalado.

Dado que varias de las situaciones de estrés analizadas sólo se han caracterizado en los mutantes *rdrps*, serán necesarios nuevos experimentos para discernir si esta respuesta a los cambios ambientales es debida a la participación de *rdrp-1* y *rdrp-2* en la ruta canónica de silenciamiento, en la que también participarían los genes *dicer* y *ago*, o a la ruta alternativa, mencionada anteriormente, en la que sólo participan las proteínas RdRPs. Probablemente, es esta ruta alternativa la que participa en la regulación de genes durante el desarrollo sexual del hongo, ya que sólo los mutantes *rdrp-1*⁻ y *rdrp-2*⁻, y en menor medida *r2d2*⁻, mostraron una acusada disminución en la producción de zigosporas durante el ciclo sexual (**Figura 46B**). Será necesario realizar un análisis detallado de los genes que cambian sus niveles de expresión sólo en los mutantes *rdrps* respecto al silvestre para poder identificar posibles genes candidatos implicados en el desarrollo sexual y regulados por la ruta de silenciamiento independiente de Dicer.

Además de los defectos de esporulación, varios mutantes de silenciamiento comparten un fenotipo común en relación con la respuesta autolítica al estrés nutricional. La autólisis fúngica es un proceso fisiológico que ocurre en cultivos con un elevado grado de envejecimiento y consiste en la autodigestión de las propias células cuando existe un ayuno nutricional (White *et al.*, 2002). Dicho proceso no es una simple necrosis, sino que es un fenómeno muy bien regulado y en el que intervienen varias enzimas, como hidrolasas, glucanasas y quitinasas, que destruyen la pared del hongo (Emri *et al.*, 2008). Estas actividades enzimáticas causan vacuolización, formación de hifas vacías y disrupción de orgánulos y de la estructura de la pared celular (White *et al.*, 2002). El fenotipo de autólisis acelerada que muestran los mutantes *ago-1*⁻, *dcl-2*⁻ y *rdrp-2*⁻ y, en menor medida, *r2d2*⁻ (**Figuras 52 y 53**), sugiere que este proceso podría estar regulado por ex-siRNAs. Algunos de los ex-siRNAs de la clase I requieren *ago-1*, *dcl-2* y *rdrp-2* para su biogénesis (p.e. locus 80452; **Figura 33B**) y los correspondientes transcritos muestran una mayor acumulación en los mutantes correspondientes respecto a la estirpe silvestre (**Figura 40**). El locus 80452 (locus 109224 en la versión 2 del genoma de *M. circinelloides*) codifica una proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina que muestra una elevada similitud con proteínas kinasas implicadas en el control del ciclo celular de la familia de Cds1/Rad53/ChK2 (E-value: $2e^{-102}$). Estas proteínas se activan en respuesta al daño en el DNA para prevenir la entrada en mitosis, provocando la parada del ciclo celular en G1 (Skelding *et al.*, 2011). Esta familia de proteínas también está implicada en la conexión entre el ciclo celular y diversos procesos como la senescencia y el ciclo circadiano

(revisado en Chen & Poon, 2008). Así, proteínas similares en humanos y ratón actúan como reguladores de la autofagia, induciendo dicho proceso durante la senescencia celular (Young *et al.*, 2009). Se podría especular, por tanto, que en *M. circinelloides* el aumento en los niveles de esta proteína en los mutantes en genes de silenciamiento podría estar afectando la ruta de señalización, acelerando la muerte celular inducida por el daño en el DNA en cultivos envejecidos. También la proteína con ID 84028, mencionada anteriormente por su similitud con proteínas de mamíferos posiblemente implicadas en el envejecimiento celular, aumenta sus niveles en los mutantes *ago-1*⁻, *dcl-2*⁻ y *rdrp-2*⁻ (**Tabla 27**) y podría participar en el proceso de autólisis acelerada que presentan estos mutantes (**Tabla 30**). Futuros análisis permitirán revelar el papel específico de éstas y otras proteínas reguladas por ex-siRNAs en las respuestas a señales ambientales en *M. circinelloides*.

Finalmente, el reciente descubrimiento de la capacidad patogénica de *M. circinelloides* como agente causal de la mucormicosis centró nuestra atención en el estudio del posible papel del mecanismo de silenciamiento en la patogénesis. La mayor resistencia de algunos de los mutantes de silenciamiento al estrés oxidativo, condiciones extremas de pH o elevadas temperaturas, situaciones que podrían darse en el ambiente celular de los macrófagos, podrían apuntar a un posible papel del mecanismo de silenciamiento en el proceso de infección del huésped. Sin embargo, cuando se estudió la virulencia de los mutantes en genes de silenciamiento en la larva *G. mellonella* no se observaron diferencias significativas en los niveles de mortalidad (**Figura 54**). Estos datos revelan, por tanto, que el mecanismo de silenciamiento no jugaría un papel importante en la patogénesis, al menos en este organismo modelo. Sin embargo, no se puede descartar una respuesta diferencial en modelos de mamíferos, como el ratón, ya que la respuesta inmune del invertebrado *G. mellonella*, aunque muestra muchas similitudes, es diferente de la de mamíferos (Kavanagh y Reeves, 2004). Actualmente, se están llevando a cabo experimentos encaminados a analizar la virulencia de los distintos mutantes afectados en el mecanismo de silenciamiento en otros modelos animales, como el pez cebra y el ratón, con la hipótesis de que la diferente respuesta a estímulos ambientales que muestran los mutantes de silenciamiento podría tener un efecto sobre la virulencia.

Los datos presentados en esta tesis sugieren que la ruta de silenciamiento de *M. circinelloides* está involucrada en la respuesta a señales ambientales, como aquellas que activan el desarrollo vegetativo o la autólisis. Otros datos también indican que podría participar en la respuesta a la luz. La luz regula diversos aspectos de la biología de los

hongos, incluyendo el desarrollo de estructuras reproductivas y la biosíntesis de carotenos que mejoran la adaptación y la supervivencia en la naturaleza (Navarro *et al.*, 2001; Nicolás *et al.*, 2008). La expresión de algunos de los genes de silenciamiento, como *ago-1*, se ve inducida por la luz (Cervantes *et al.*, 2013). Por otro lado, análisis preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que un número relevante de ex-siRNAs derivan de genes regulados por la luz a través de los productos de los genes *crgA* y *mcwc-1b* (Navarro *et al.*, 2013). Es más, la eficacia de silenciamiento es 30 veces mayor en fondo genético *crgA⁻*, en el que se expresan constitutivamente muchos de los genes inducidos por la luz, que en la estirpe silvestre (Nicolás *et al.*, 2009). En conjunto, estos datos sugieren que la luz podría provocar la activación de la maquinaria de silenciamiento, aunque son necesarios nuevos experimentos para esclarecer la participación del mecanismo de silenciamiento en la regulación de la expresión génica en respuesta a la luz.

V. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

1. El gen *qip* de *M. circinelloides* cifra una proteína con un dominio ribonucleasa H que conserva todos los motivos característicos de las exonucleasas 3'-5' de la superfamilia DEDDh.
2. El análisis funcional del gen *qip* demuestra que este gen es esencial para el eficaz funcionamiento del mecanismo de silenciamiento génico inducido por transgenes. Los datos sugieren un papel de dicho gen en la activación del complejo RISC, tanto en el proceso de inducción como en la posterior amplificación de la señal de silenciamiento.
3. La utilización de sistemas heterólogos para analizar la interacción entre proteínas de la maquinaria de silenciamiento de *M. circinelloides* no ha dado resultados positivos, lo que podría deberse a la necesidad de modificaciones post-traduccionales específicas de las proteínas de silenciamiento o a la formación de complejos multiproteicos.
4. La presencia simultánea de mutaciones en los genes *rdrp-1* y *rdrp-2* podría ser letal para *M. circinelloides*, probablemente por la participación de las proteínas correspondientes en diversas rutas de silenciamiento endógeno.
5. El gen *ago-1* está implicado en el mecanismo de silenciamiento endógeno de *M. circinelloides*, siendo necesario para la biogénesis y/o estabilidad de las cuatro clases de ex-siRNAs. Las clases I y II de ex-siRNAs se unen específicamente a Ago-1 para llevar a cabo la identificación y degradación de sus mensajeros diana. Las clases III y IV son generadas por una ruta de silenciamiento no canónica, en la que se requiere la participación de Ago-1, pero no la unión específica de estos ex-siRNAs a dicha proteína.
6. Los análisis transcriptómicos ponen de manifiesto la regulación por el mecanismo de silenciamiento de un gran número de genes endógenos a lo largo del crecimiento vegetativo. Distintas combinaciones de proteínas de silenciamiento participan en la regulación de genes que ven su expresión aumentada o reducida en los mutantes de silenciamiento, sugiriendo la participación de distintas clases de ex-siRNAs en dicha regulación.

7. Las diferencias de expresión entre los mutantes en genes de silenciamiento y la estirpe silvestre son moderadas, lo que sugiere que el mecanismo de silenciamiento posee un papel modulador de la expresión de sus genes diana, sin provocar cambios drásticos en dicha expresión.
8. Las proteínas cifradas por los genes diferencialmente expresados presentan funciones relacionadas con la biogénesis y modificación de la pared celular, el control de la división celular y el crecimiento, metabolismo de carbohidratos, envejecimiento celular o respuesta a estrés, lo que sugiere que los fenotipos que presentan los mutantes podrían ser debidos a la desregulación de estos genes.
9. El comportamiento de los mutantes sugiere un papel predominante del mecanismo de silenciamiento en la regulación de genes que responden a señales ambientales o de desarrollo.
10. La ruta canónica de silenciamiento está implicada en la regulación del proceso de esporulación vegetativa y en la activación del programa de autólisis inducido por estrés nutricional. La regulación del desarrollo sexual debe ser llevada a cabo por una ruta no canónica independiente de Dicer.
11. Los experimentos de patogénesis llevados a cabo en la larva *G. mellonella* no revelan una clara participación del mecanismo de silenciamiento en el proceso de virulencia, aunque no se descarta una respuesta diferencial en otros organismos modelo, como el ratón.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso C., Martinez M.J. & Reyes, F. (1992).** Purification and properties of two endochitosanases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation. *FEMS Microbiology Letters*, 95: 187-94.
- Alvarez, E., Sutton, D. a, Cano, J., Fothergill, a W., Stchigel, a, Rinaldi, M. G., & Guarro, J. (2009).** Spectrum of zygomycete species identified in clinically significant specimens in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (6): 1650-6.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25 (17): 3389-402.
- Anaya, N. & Roncero, M. I. (1991).** Transformation of a methinine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* by direct cloning of the corresponding wild type gene. *Molecular & General Genetics*, 230 (3): 449-55.
- Aramayo, R. & Metzberg, R.L. (1996).** Meiotic transvection in fungi. *Cell*, 86: 103-13.
- Aravin, A.A., Naumova, N.M., Tulin, A.V., Vagin, V.V., Rozovsky, Y.M. & Gvozdev, V.A. (2001).** Double-stranded RNA mediates silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Current Biology*, 11: 1017-27.
- Barnes, R.L., Shi1, H., Kolev, N.G., Tschudi, C. & Ullu E. (2012).** Comparative genomics reveals two novel RNAi factors in *Trypanosoma brucei* and provides insight into the core machinery. *PLoS Pathogens*, 8(5): e1002678. doi:10.1371/journal.ppat.1002678.
- Bartnicki-García, S. & Nickerson, W.J. (1962).** Induction of yeast-like development in the *Mucor* by carbon dioxide. *Journal of Bacteriology*, 84: 841-58.
- Benito, E.P., Díaz-Mínguez, J.M., Iturriaga, E.A., Campuzano, V. & Eslava, A.P. (1992).** Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides pyrG* gene

encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase: use of *pyrG* for homologous transformation. *Gene*, 116: 59-67.

Benito, E. P., Campuzano, V., López-Matas, M. A., De Vicente, J. I. & Eslava, A. P. (1995). Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of *Mucor circinelloides* OMPdecase-deficient mutants. *Molecular and General Genetics*, 248 (2): 126-35.

Bernstein, E., Caudy, A.A. Hammond, S.M. & Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363-6.

Borges-Walmsley, M.I. & Walmsley, A.R. (2000). cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiology*, 8 (3): 133-41.

Bühler, M., Spies, N., Barte, D.P. & Moazed, D. (2008). TRAMP-mediated RNA surveillance prevents spurious entry of RNAs into the *Schizosaccharomyces pombe* siRNA pathway. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15 (10): 1015-23.

Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112 (2): 195-203.

Calo, S. (2010). Polimerasas de RNA y su papel en el silenciamiento génico mediado por RNA en *Mucor circinelloides*. *Tesis Doctoral. Universidad de Murcia*.

Calo, S., Nicolás, F. E., Vila, A., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2012). Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*, 83 (2): 379–94.

Carreras-Villaseñor, N., Esquivel-Naranjo, E.U., Villalobos-Escobedo, J.M., Abreu-Goodger, C. & Herrera-Estrella, A. (2013). The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *Molecular Microbiology*, 89 (1): 96-112.

- Carthew, R.W. & Sontheimer, E.J. (2009).** Origins and mechanisms of miRNA and siRNAs. *Cell*, 136 (4): 642-55.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. & Cogoni, C. (2000).** Gene silencing in worms and fungi. *Nature*, 404: 245.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. & Cogoni, C. (2002).** Involvement of small RNAs and role of the qde genes in the gene silencing pathway in *Neurospora crassa*. *Genes & Development*, 16 (7): 790-5.
- Catalanotto, C., Pallota, M., ReFalo, P., Sachs, M.S., Vayssie, L., Macino, G. & Cogoni, C. (2004).** Redundancy of the two *dicer* genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 24: 2536-45.
- Cecere, G. & Cogoni, C. (2009).** Quelling targets the rDNA locus and functions in rDNA copy number control. *BMC Microbiology*, 9: 44.
- Cervantes, M.C., Vila, A., Nicolás, F.E., Moxon, S., De Haro, J.P., Dalmay, T., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R.M. (2013).** A single *Argonaute* gene participates in exogenous and endogenous RNAi and controls cellular functions in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *PLoS ONE*, 8(7): e69283. doi: 10.1371/journal.pone.0069283.
- Chang, S.S., Zhang, Z. & Liu, Y. (2012).** RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annual Reviews of Microbiology*, 66: 305-23.
- Cheloufi, S., Do Santos, C.O., Chong, M.M. & Hannon, G.J. (2010).** A *dicer*-independent microRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, 465 (7298): 584-9.
- Chen, Y. & Poon, R.Y. (2008).** The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability. *Frontiers in Biosciences*, 13: 5016-29.

- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. & Thireos, G. (1996).** Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (49): 31420-5.
- Christodoulidou, A., Briza, P., Ellinger, A. & Bouriotis, V. (1999).** Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes. *FEBS Letters*, 460 (2): 275-9.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., Wolfe, S.A. & Giraldez, A.J. (2010).** A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*, 328 (5986): 1694-8.
- Clemens, K., Bilanchonea, V., Beliakova-Bethella, N., Larsena, L.S.Z., Nguyena, K. & Sandmeyer, S. (2013).** Sequence requirements for localization and packaging of Ty3 retroelement RNA. *Virus Research*, 171: 319-31.
- Cogoni, C., Irelan, J. T., Schumacher, M., Schmidhauser, T. J., Selker, E. U. & Macino, G. (1996).** Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *The EMBO Journal*, 15 (12): 3153-63.
- Cogoni, C. & Macino, G. (1997).** Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 10233-8.
- Cogoni, C. & Macino, G. (1999a).** Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 399: 166-9.
- Cogoni, C. & Macino, G. (1999b).** Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science*, 286: 2342-4.

- Corrochano, L. & Garre, V. (2010).** Photobiology in the Zygomycota: Multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genetics and Biology*, 47: 893-9.
- Czech, B., Malone, C.D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J.A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J. & Brennecke, J. (2008).** An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature*, 453 (7196): 798-802.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. & Baulcombe, D.C. (2000).** An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell*, 101: 543-53.
- Davis, L.L. & Bartnicki-García, S. (1984).** Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Biochemistry* 23 (6): 1065-73.
- 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): 1486-97.
- Díaz-Mínguez, J.M., López-Matas, M.A. & Eslava, A.P. (1999).** Complementary mating types of *Mucor circinelloides* show electrophoretic karyotype heterogeneity. *Current Genetics*, 36 (6): 383-9.
- Drinnenberg, I.A., Weinberg, D.E., Xie, K.T., Mower, J.P., Wolfe, K.H., Fink, G.R. & Bartel, D.P. (2009).** RNAi in Budding Yeast. *Science*, 326 (5952): 544-50.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001a).** RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. *Genes & Development*, 15: 188-200.
- Emri T, Molnár Z, Szilágyi M, Pócsi I (2008).** Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151: 211-20.

- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., & Sonenberg, N. (2008).** Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers inside? *Nature Reviews Genetics*, 9 (2): 102-14.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391 (6669): 806-11.
- Fisher, S.E. (2010).** Small RNA-mediated gene silencing pathways in *C. elegans*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42: 1306-15.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2005).** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press.
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M.D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E.L., Zapp, M.L., Weng, Z. & Zamore, P.D. (2008).** Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science*, 320 (5879): 1077-81.
- Ghildiyal, M. & Zamore, P.D. (2009).** Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, 10: 94-108.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. & Woods, R.A. (1995).** Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11 (4): 355-60.
- Gooday, G. W. (1973).** Differentiation in the Mucorales. *Symposium of the Society of General Microbiology*, 23: 269-93.
- Gooday, G. W., Fawcett, P., Green, D. & Shaw, G. (1973).** The formation of fungal sporopollenin in the zygosporangium wall of *Mucor mucedo*: a role for the sexual carotenogenesis in the Mucorales. *Journal of General Microbiology*, 74: 223-39.
- Grewal, S.I. & Jia, S. (2007).** Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics*, 8: 35-46.

- Guo, S. & Kempfues, K. J. (1995).** *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is assymmetrically distributed. *Cell*, 81 (4): 611-20.
- Gurr, S.J., Unkles, S.E. & Kinghorn, J.R. (1987).** The structure and organization of nuclear genes in filamentous fungi. *Society for General Microbiology. Special publication 32: Gene structure in eukaryotic microbes*. Ed. J.R. Kinghorn. IRL Press, Oxford. 93-139.
- 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): 442-6.
- Hamada, W. & Spanu, P.D. (1998).** Co-suppression of the hydrophobin gene HCf-1 is correlated with antisense RNA biosynthesis in *Cladosporium fulvum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 259: 630-8.
- Hamdan, S., Carr, P.D., Brown, S.E., Ollis, D.L. & Dixon, N.E. (2002).** Structural basis for proofreading during replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Structure*, 10: 535-546.
- Hamilton, A. & Baulcombe, D. (1999).** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286: 950-2.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. (2002).** Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal*, 21: 4671-9.
- Hammond, T.M. & Keller, N.P. (2005).** RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerases. *Genetics*, 169: 607-17.
- Hanahan, D. (1983).** Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 66 (4): 557-80.
- Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981).** A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114 (1): 193-7.

- Ishizu, H., Siomi, H. & Siomi, M.C. (2012).** Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes & Development*, 26 (21): 2361-73.
- Ivell, R., Balvers, M., Anand, R.J., Paust, H.J., McKinnell, C & Sharpe, R. (2003).** Differentiation-dependent expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, type 10, in the rodent testis: effect of aging in Leydig cells. *Endocrinology*, 144 (7): 3130-7.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996).** Genomic Libraries and a Host. *Genetics*, 144: 1425-36.
- Jiang, N., Yang, Y., Janbon, G., Pan, J. & Zhu, X. (2012).** Identification and functional demonstration of miRNAs in the fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLoS ONE*, 7 (12): e52734.
- Jiménez, J., Ricco, N., Grijota-Martínez, C., Fadó, R. & Clotet, J. (2013).** Redundancy or specificity? The role of the CDK Pho85 in cell cycle control. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 4 (3): 140-9.
- Jinek, M. & Doudna, J.A. (2009).** A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457 (7228): 405-12.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. & Mayama, S. (2003).** RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16: 769-76.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. & Mayama, S. (2004).** One of the two Dicer-like proteins in the filamentous fungi *Magnaporthe oryzae* genome is responsible for hairpin RNA-triggered RNA silencing and related small interfering RNA accumulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 44467-74.
- Kato, A., Akamatsu, Y., Sakuraba, Y. & Inoue, H. (2004).** The *Neurospora crassa mus-19* gene is identical to the *qde-3* gene, which encodes a RecQ homologue and is

- involved in recombination repair and postreplication repair. *Current Genetics*, 45(1): 37-44.
- Kavanagh, K. & Reeves, E.P. (2004).** Exploring the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28 (1): 101-12.
- Ketting, R. F., Haverkamp, T. H., van Luenen, H. G. & Platerk, R. H. (1999).** Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*, 99 (2): 133-41.
- Kim, V.N., Han, J. & Siomi, M.C. (2009).** Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10: 126-39
- Koss, T., Kuijvenhoven, A., Hessing, H.G., Pouwels, P.H. & van den Hondel, C.A. (1988).** Nucleotide sequence of *Aspergillus niger trpC* gene: structural relationship with analogous genes of other organisms. *Current Genetics*, 13: 137-44.
- Kück, U. & Hoff, B. (2010).** New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 51-62.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23 (21): 2947-8.
- Larsen, G.G., Appel, K.F., Wolff, A.-M., Nielsen, J., and Arnau, J. (2004).** Characterisation of the *Mucor circinelloides* regulated promoter *gpdIP*. *Current Genetics*, 45: 225-34.
- Lasker, B.A. & Borgia, P.T. (1980).** High-frequency heterokaryon formation by *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology*, 141 (2): 565-9.
- Lau, S.K., Chow, W.N., Wong, A.Y., Yeung, J.M., Bao, J., Zhang, N., Lok, S., Woo, P.C. & Yuen, K.Y. (2013).** Identification of microRNA- like RNAs in mycelial and

yeast phases of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7 (8): e2398.

Lee, D.W., Pratt, R.J., McLaughlin, M. & Aramayo, R. (2003). An Argonaute-like protein is required for meiotic silencing. *Genetics*, 164: 821-8.

Lee, D.W., Seong, K.Y., Pratt, R.J., Baker, K. & Aramayo, R. (2004). Properties of unpaired DNA required for efficient silencing in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 167: 131-50.

Lee, H.C., Chang, S.S., Choudhary, S., Aalto, A.P., Maiti, M., Bamford, D.H. & Liu, Y. (2009). qiRNA is a new type of small interfering RNA induced by DNA damage. *Nature*, 459 (7244): 274-7.

Lee, H.C., Li, L., Gu, W., Xue, Z., Crosthwaite, S.K., Pertsemlidis, A., Lewis, Z.A., Freitag, M., Selker, E.U., Mello, C.C. & Liu, Y. (2010). Diverse pathways generate microRNAs-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular Cell*, 38 (6): 803-14.

Li, C.H., Cervantes, M., Springer, D.J., Boekhout, T., Ruiz-Vazquez, R.M., Torres-Martinez, S.R., Heitman, J., and Lee, S.C. (2011). Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*, 7 (6): e1002086.

Liu, Y., Ye, X., Jiang, F., Liang, C., Chen, D., Peng, J., Kinch, L.N., Grishin, N.V. & Liu, Q. (2009). C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science*, 325 (5941): 750-3.

Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A. & Carrington, J.C. (2002). Endogenous silencing-associated small RNAs in plants. *The Plant Cell*, 14 (7): 1605-19.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193 (1): 265-75.

- Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T. & Patel, D.J. (2005).** Structural basis for 5'-end specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, 434 (7033): 666-70.
- Maiti, M., Lee, H.-C., & Liu, Y. (2007).** QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora* Argonaute protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. *Genes & Development*, 21 (5): 590-600.
- Matsuo, Y., Tanaka, K., Matsuda, H. & Kawamukai, M. (2005).** *cda1+*, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosacharomyces pombe*. *FEBS Letters*, 579 (12): 2737-43.
- May, G.S., Tsang, M.L., Smith, H., Field, F. & Morris, N. (1987).** *Aspergillus nidulans* beta-tubulin genes are unusually divergent. *Gene*, 55: 231-43.
- McNeil, B., Berry, D.R., Harvey, L.M., Grant, A. & White, S. (1998).** Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 57 (3): 297-305.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J. & Qi, Y. (2008).** Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell*, 133: 116-27.
- Miller, J.H. (1972).** *Experiments in Molecular Genetics*. (pp. 325-355). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Morace, G. & Borghi, E. (2012).** Invasive mold infections: virulence and pathogenesis of Mucorales. *International Journal of Microbiology*, Article ID 349278, doi: 10.1155/2012/349278.
- Munro, C.A., Bates, S., Buurman, E.T., Hughes, H.B., MacCallum, D.M., Bertram, G., Atrih, A., Ferguson, M.A.J., Bain, J.M., Brand, A., Hamilton, S., Westwater, C., Thomson, L.M., Brown, A.J.P., Odds, F.C. & Gow, N.A.R. (2005).** Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant α -1,2-mannosyltransferases that

participate in *O*-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (2): 1051-60.

Murcia-Flores, L., Lorca-Pascual, J.M., Garre, V., Torres-Martínez, S. & Ruiz-Vázquez, R.M. (2007). Non-AUG translation initiation of a fungal RING finger repressor involved in photocarotenogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 15394-403.

Nakayashiki, H., Kadotani, N. & Shigeyuki, M. (2006). Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. *Journal of Molecular Evolution*, 63 (1): 127-35.

Nanou, K., Roukas, T. & Kotzekidou, P. (2007). Role of hydrolytic enzymes and oxidative stress in autolysis and morphology of *Blakeslea trispora* during beta-carotene production in submerged fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (2): 447-53.

Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co- Suppression of Homologous Genes in trans. *The Plant Cell*, 2 (4): 279-89.

Navarro, E., Lorca-Pascual, J.M., Quiles-Rosillo, M.D., Nicolás, F.E., Garre, V., Torres-Martínez, S., and Ruiz-Vázquez, R.M. (2001). A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics*, 266: 463-70.

Navarro, E., Peñaranda, A., Hansberg, W., Torres-Martínez, S. & Garre, V. (2013). A white collar 1-like protein mediates opposite regulatory functions in *Mucor circinelloides*. *Fungal Genetics and Biology*, 52: 42-52.

Nicolás, F.E., Torres-Martínez, S., and Ruiz-Vázquez, R.M. (2003). Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *The EMBO Journal*, 22: 3983-91.

Nicolás, F. E., De Haro, J. P., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R. M. (2007). Mutants defective in a *Mucor circinelloides* *dicer*-like gene are not compromised in

siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genetics and Biology*, 44 (6): 504-16.

Nicolás, F.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: 81-8.

Nicolás, F.E., Torres-Martínez, S., & Ruiz-Vázquez, R.M. (2009). Transcriptional activation increases RNA silencing efficiency and stability in the fungus *Mucor circinelloides*. *Journal of Biotechnology*, 142 (2): 123-6.

Nicolás, F. E., Moxon, S., De Haro, J. P., Calo, S., Grigoriev, I. V, Torres-Martínez, S., Moulton, V., et al. (2010). Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acids Research*, 38 (16): 5535-41.

Nicolás, F. E. & Ruiz-Vázquez, R. M. (2013). Functional diversity of RNAi-associated sRNAs in fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 15348-60.

Nolan, T., Braccini, L., Azzalin, G., De Toni, A., Macino, G. & Cogoni, C. (2005). The pos-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research*, 33 (5): 1564-73.

Nunes, C.C.; Gowda, M.; Sailsbery, J.; Xue, M.; Chen, F.; Brown, D.E.; Oh, Y.Y.; Mitchell, T.K.; Dean, R.A. (2011.) Diverse and tissue-enriched small RNAs in the plant pathogenic fungus; *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics*, 12: 288.

Nyilasi, L., Acs, K., Papp, T., Nagy, E. & Vágvölgyi, C. (2005). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiologica*, 50 (5): 415-20.

Ocampo, J., Fernández-Núñez, L., Silva, F., Pereyra, E., Moreno, S., Garre, V. & Rossi, S. (2009). A subunit of protein kinase A regulates growth and differentiation in the fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic Cell*, 8: 933-44.

- 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.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H. & Siomi, M.C. (2004).** Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development*, 18: 1655-66.
- Okamura, K. (2012).** Diversity of animal small RNA pathways and their biological utility. *Wiley Interdisciplinary Reviews*, 3 (3): 351-68.
- Pak, J. & Fire, A. (2007).** Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*, 315 (5809): 241-4.
- Plesofsky-Vig, N. & Brambl, R. (1990):** Gene sequence and analysis of hsp30, a small heat shock protein of *Neurospora crassa* which associates with mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (26): 15432-40.
- Punt, P.J., Dingemans, M.A., Kuyvenhoven, A., Soede, R.D., Pouwels, P.H. & van den Hondel, C.A. (1990).** Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* *gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 93 (1): 101-9.
- Raman, V., Simon, S.A., Romagosa, A., Demirci, F., Mathioni, S.M., Zhai, J., Meyers, B.C. & Donofrio, N.M. (2013).** Physiological stressors and invasive plant infections alter the small RNA transcriptome of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics*, 14: 326.
- Reyes F., Lahoz R. & Val Moreno A. (1981).** Synthesis of 1,3- β -glucanase and β -N-acetylglucosaminidase during autolysis of *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 126: 347-53.
- Reyes, F., Calatayud, J. & Martínez, M.J. (1989).** Endochitinase from *Aspergillus nidulans* implicated in the autolysis of its cell wall. *FEMS Microbiology Letters*, 51(1): 119-24.

- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. & Bartel, D.P. (2002).** Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110 (4): 513-20.
- Romano, N. & Macino, G. (1992).** Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology*, 6 (22): 3343-53.
- Roncero, M.I., Zabala, C. & Cerdá-Olmedo, E. (1984).** Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on *Phycomyces* spores. *Mutation Research*, 125 (2): 195-204.
- Roncero M. I., Jepsen L. P., Stroman, P. & van Heeswijk, R. (1989).** Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene*, 84 (2): 335-43.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Schipper, M.A.A. (1976).** On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Studies of Mycology*, 12: 1-40.
- Segers, G.C., Zhang, X., Deng, F., Sun, Q. & Nuss, D.L. (2007).** Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 12902-6.
- Shiu, P.K., Raju, N.B., Zickler, D. & Metzberg, R.I. (2001).** Meiotic silencing by unpaired DNA. *Cell*, 107: 905-16.
- Silva, F., Torres-Martínez, S., and Garre, V. (2006).** Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*, 61: 1023-37.
- Silva, F., Navarro, E., Peñaranda, A., Murcia-Flores, L., Torres-Martínez, S. & Garre, V. (2008).** A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a white collar-1-like activator. *Molecular Microbiology*, 70: 1026-36.

- Siomi, H. & Siomi, M.C. (2009).** On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457: 396-404.
- Skelding, K.A., Rostas, J.A. & Verrills, N.M. (2011).** Controlling the cell cycle: the role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. *Cell Cycle*, 10: 631-9.
- Son, H.; Min, K.; Lee, J.; Raju, N.B.; Lee, Y.W. (2011).** Meiotic silencing in the homothallic fungus *Gibberella zeae*. *Fungal Biology*, 12: 1290-302.
- Steiner, F.A., Hoogstrate, S.W., Okihara, K.L., Thijssen, K.L., Ketting, R.F. Plasterk, R.H. & Sijen, T. (2007).** Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14 (10): 927-33.
- Tanaka, N., Fujita, Y., Suzuki, S., Morishita, M., Giga-Hama, Y., Shimoda, C. & Takegawa, K. (2005).** Characterization of *O*-mannosyltransferase family in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330: 813-20.
- Toh-E, A., & Nishizawa, M. (2001).** Structure and function of cyclin-dependent Pho85 kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 47 (3): 107-17.
- Tomari, Y., Du, T., & Zamore, P.D. (2007).** Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell*, 130 (2): 299-308.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (9): 4350-4.
- Van Heeswijck, R. (1984).** The formation of protoplasts from *Mucor* species. *Carlsberg Research Communications*, 49: 597-609.

- Van Heeswijck, R. & Roncero, M. I. (1984).** High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmids DNA. *Carlsberg Research Communications*, 49: 691-702.
- Van Munster, J.M., van der Kaaij, R.M., Dijkhuizen, L. & van der Maarel, M.J. (2012).** Biochemical characterization of *Aspergillus niger* CfcI, a glycoside hydrolase family 18 chitinase that releases monomers during substrate hydrolysis. *Microbiology*, 158 (Pt 8): 2168-79.
- Vicente, G., Bautista, L. F., Rodríguez, R., Gutiérrez, F. J., Sádaba, I., Ruiz-Vázquez, R.M., Torres-Martínez, S. & Garre, V. (2009).** Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*, 48: 22-7.
- Vicente, G., Bautista, L. F., Gutiérrez, F. J., Rodríguez, R., Martínez, V., Rodríguez-Frometa, R. A., Ruiz-Vázquez, R.M., Torres-Martínez, S. & Garre, V. (2010).** Direct transformation of fungal biomass from submerged cultures into biodiesel. *Energy Fuels*, 24: 3173-8.
- Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M., (2009).** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10 (1): 57-63.
- Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N. & Imai, H. (2006).** Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposons-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes & Development*, 20 (13): 1732-43.
- White, S., McIntyre, M., Berry, D.R., and McNeil, B. (2002).** The autolysis of industrial filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22: 1-14.
- Willer, T., Brand, M., Sipiczki, M. & Strahl, S. (2005).** Protein *O*-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Molecular Microbiology*, 57 (1): 156-70.
- Wilson, I.B.H. (2012).** The class I α 1, 2-mannosidases of *Caenorhabditis elegans*. *Glycoconjugate Journal*, 29: 173-9.

- Wu-Scharf, D., Jeong, B., Zhang, C. & Cerutti, H. (2000).** Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science*, 290:1159-62.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E. & Carrington, J.C. (2004).** Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2(5): e104. doi:10.1371/journal.pbio.0020104.
- Xue, Z., Yuan, H., Guo, J. & Liu, Y. (2012).** Reconstitution of an Argonaute-dependent small RNA biogenesis pathway reveals a handover mechanism involving the RNA exosome and the exonuclease QIP. *Molecular Cell*, 46 (3): 299-310.
- Yamanaka, S., Mehta, S., Reyes-Turcu, F.E., Zhuang, F., Fuchs, R.T., Rong, Y., Robb, G.B. & Grewal, S.I.S. (2013).** RNAi triggered by specialized machinery silences developmental genes and retrotransposons. *Nature*, 493 (7433): 557-60.
- Yang, Q.; Li, L.; Xue, Z.; Ye, Q.; Zhang, L.; Li, S.; Liu, Y. (2013).** Transcription of the major *Neurospora crassa* microRNA-like small RNAs relies on RNA polymerase III. *PLoS Genetics*, 9 (1): e1003227. doi:10.1371/journal.pgen.1003227.
- Yang, Z., Geng, J., Yen, W.L., Wang, K., Klionsky, D.J. (2010).** Positive or negative roles of different cyclin-dependent kinase Pho85-cyclin complexes orchestrate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 38 (2): 250-64.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33 (1) : 103-19.
- Yekta, S., Shih, I.H. & Bartel, D.P. (2004).** MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science*, 304 (5670): 594-6.
- Young, A.R., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M. & Narita, M. (2009).** Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & Development*, 23 (7): 798-803.

- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. & Bartel, D.P. (2000).** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101: 25-33.
- Zhang, X. & Nuss, D.L. (2008).** A host *dicer* is required for defective viral RNA production and recombinant virus vector RNA instability for a positive sense RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43: 16749-54.
- Zhang, Z., Chang, S.-S., Zhang, Z., Xue, Z., Zhang, H., Li, S., & Liu, Y. (2013).** Homologous recombination as a mechanism to recognize repetitive DNA sequences in an RNAi pathway. *Genes & Development*, 27 (2): 145-50.
- Zhou, J, Fu, Y, Xie, J., Li, B., Jiang, D., Li, G. & Cheng, J. (2012).** Identification of microRNA- like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. *Molecular Genetics and Genomics*, 287 (4): 275-82.

VII. ANEXOS

Tabla S1

ID del transcrito	Abundancia en R7B	Sesgo de cadena en R7B ¹	Abundancia en ago-1 ⁻	Sesgo de cadena en ago-1 ⁻¹
12058	103,6	-0,44	3,27	-0,6
12058	102,33	-0,44	1,74	-0,62
13065	203,34	1	0,71	1
13790	134,09	0,84	15,91	0,14
16281	54,19	0,3	10,02	-0,06
22967	62,3	1	0,57	1
24857	51,41	1	0,07	1
27316	133,86	1	0,07	1
27711	59,87	1	0,36	1
27973	332,57	1	0,93	1
29038	354,57	1	0,86	0,83
29653	89,86	1	0,21	1
30166	147,37	1	0	0
31141	131,31	1	0,14	0
32849	78,28	1	0	0
33552	242,48	1	0,07	1
36390	129,11	1	0,29	1
37397	61,14	1	1,21	1
38503	295,05	1	0,14	1
45585	88,7	0,14	102,44	0,39
45670	95,07	1	1	1
45935	727,67	1	1,57	1
46499	321,45	1	0,96	0,71
46499	126,22	1	0,78	1
46975	64,62	1	0,14	1
47486	173,93	1	0,93	1
47807	840,23	1	1,36	0,89
48455	85,69	1	0,93	1
48689	156,33	1	1,36	1
51423	587,79	1	0	0
51581	68,78	1	1,21	1
51876	167,68	-0,98	2,21	-0,48
68860	102,94	-1	0	0
68938	419,3	1	4,64	0,97
71324	375,53	1	0,57	1
72854	116,49	1	0,14	1
73657	68,32	1	0,07	1
73807	127,15	0,98	0,07	1
73988	119,43	1	0,71	0,8
74643	60,68	-1	0,29	-1
75923	156,79	-0,91	15,62	-0,19
75939	82,45	0,69	7,49	0,41
76071	167,21	0,35	55,43	0,55
76077	3261,75	-0,96	252,21	-0,66
76105	99,7	-0,93	21,54	-0,72
76158	625,54	0,63	34,77	0,15
76229	109,08	-1	13,27	-0,82
76230	1416,9	-0,75	41,27	-0,33
76230	103,52	-0,93	8,42	-0,29
76330	91,39	0,98	12,91	0,97
76403	53,73	-0,82	2,35	-0,52
76488	179,37	-0,73	6,14	0,17
76601	67,28	0,87	2,85	0,55

76838	276,52	-0,86	28,14	0,4
76922	177,4	1	0,36	1
76941	158,87	-0,58	18,83	-0,05
76941	75,27	0,13	2,46	0,11
76982	119,5	-0,91	37,52	-0,51
77020	270,16	-0,98	10,84	-0,41
77020	63,69	1	0,25	1
77036	108,16	-0,8	20,69	0,1
77038	700,58	-0,98	52,72	-0,53
77039	122,98	-0,21	37,99	0
77050	1690,88	-1	11,98	-0,86
77142	57,44	-0,14	25,82	-0,17
77171	122,98	-0,63	24,9	-0,21
77203	128,69	0,35	16,04	0,19
77205	323,65	-0,89	34,32	-0,22
77282	205,43	-0,27	47,83	0,56
77325	97,73	-0,62	15,02	-0,19
77325	122,4	-0,42	26,04	0,44
77331	100,05	-0,12	34,85	0,2
77392	124,83	0,45	39,27	0,55
77442	1586,81	-0,91	45,54	-0,97
77503	82,68	-0,66	28,39	0,05
77520	69,25	0,08	13,09	-0,03
77527	803,17	-1	51,93	-0,84
77620	352,33	0,99	2,85	0,9
77620	231,36	-0,12	26,18	0,43
77620	71,56	-0,74	17,34	-0,19
77853	66,39	1	2,18	1
77956	276,87	1	0,07	1
77956	130,39	1	0,07	1
77956	76,43	1	0	0
78011	61,6	0,26	14,48	0,02
78011	169,76	1	5,14	0,92
78120	201,87	-0,95	40,09	-0,92
78167	284,98	-0,07	87,19	0,31
78207	163,74	-0,86	47,16	-0,27
78302	85,34	-0,84	11,13	-0,54
78304	67,47	-0,93	10,99	-0,49
78304	56,51	-0,85	27,39	-0,8
78325	789,74	-0,93	78,26	-0,66
78345	575,51	-0,06	84,73	0,08
78424	63,92	-0,45	9,06	-0,1
78466	188,29	-0,92	6,92	0,75
78520	261,47	-0,5	43,45	-0,22
78553	1110,96	-0,72	37,95	0,43
78571	115,1	1	0,21	1
78743	72,49	0,17	20,47	0,54
78887	344,38	1	1,07	1
78926	242,44	-0,18	55,32	0,2
78926	289,49	-0,8	26,54	-0,48
78952	190,75	-0,27	38,81	0,52
79017	140,81	1	0,23	1
79061	150,77	0,39	79,36	0,43
79134	100,51	-0,24	22,9	0,05
79183	125,99	-0,28	45,01	-0,24
79278	133,63	-0,95	9,99	-0,49

79285	136,18	-0,67	7,42	-0,4
79493	175,09	-0,51	11,27	-0,35
79511	376,57	0,4	12,77	-0,59
79511	54,19	-0,62	24,01	-0,39
79577	698,49	-0,66	39,24	0,07
79713	352,72	-0,6	80,97	0,06
79714	216,08	-0,73	57,25	0,51
79753	189,56	-0,79	20,62	-0,19
79776	279,07	-0,92	10,91	-0,32
79798	794,6	0,46	51,86	-0,17
79907	84,18	0,17	19,73	0,58
79959	85,69	-0,19	9,63	-0,17
80061	279,23	-0,25	43,87	0,04
80110	353,3	-0,73	105,47	0,11
80211	167,91	0,82	47,51	0,45
80244	333,96	0,79	18,23	0,33
80443	190,14	-0,52	18,3	-0,11
80452	7718,84	-0,99	71,98	-0,97
80452	538,69	-0,99	13,48	-0,96
80452	146,6	-0,32	8,7	-0,67
80452	87,77	-0,23	7,35	-0,67
80623	81,06	-0,77	8,06	0,03
80649	147,99	-0,98	38,17	-0,57
80654	76,89	1	0,14	1
80749	1633,1	-0,77	153,2	0,68
80750	163,04	-0,69	24,9	-0,11
80762	159,45	-0,8	25,54	0,01
80794	935,18	-0,89	0,07	1
80794	58,25	-0,74	0,18	1
80938	244,33	0,58	64,17	0,53
80938	110,24	-0,98	6,43	-0,5
80992	131,97	-0,86	39,08	-0,46
81030	90,61	-0,59	1,03	0,61
81072	58,01	1	0,07	1
81492	80,6	0,69	12,48	0,51
81516	204,96	1	0,36	0,2
81619	115,33	-0,53	30,46	-0,27
81619	191,99	-1	4,57	-0,59
81795	107,69	-0,95	10,5	-0,7
81796	107,69	-0,95	10,5	-0,7
81899	469,68	-0,77	25,15	-0,17
81974	77,24	-0,85	48,51	0,01
81974	97,27	-0,85	25,04	-0,41
82026	57,55	0,7	11,38	0,18
82197	1931,74	-1	104,73	-0,99
82208	116,72	-0,42	24,47	0,35
82247	66,35	-0,86	11,2	-0,28
82275	452,31	-0,45	57,78	-0,12
82337	51,52	0,07	20,37	0,87
82337	67,67	0,27	19,34	0,64
82372	406,45	-0,98	0	0
82385	115,86	-0,6	31,57	0,55
82415	625,54	0,63	34,77	0,15
82417	102,37	-1	16,34	-0,96
82471	593,81	-0,9	29,61	-0,02
82472	141,27	-0,69	29,18	-0,19

82518	71,33	0,93	1,14	0,4
82578	124,56	0,28	71,98	0,05
82579	90,09	0,43	33,39	0,12
82648	70,41	1	0	0
82833	186,13	-0,97	19,37	-0,13
82926	625,31	-1	2,53	-0,5
83098	79,84	-0,65	1,46	0,42
83115	98,43	-0,99	1,14	0,11
83142	140,35	0,98	21,97	0,91
83187	66,82	-0,88	10,34	-0,72
83227	151,23	1	1	0
83353	86,62	-0,78	31,32	-0,6
83411	125,76	-0,76	37,1	-0,25
83462	50,49	-0,96	4,57	0,28
83549	2013,03	-0,79	98,45	0,33
83611	269,35	-0,91	14,13	-0,52
83652	107,69	-0,57	13,27	0,24
83695	208,9	0,89	17,41	0,8
83695	67,24	0,29	15,69	0,2
83735	56,74	-0,9	11,34	-0,4
83826	287,87	-0,49	54,65	0,49
83860	73,88	1	0,14	1
83918	67,16	1	0,43	0,67
83973	50,72	-0,33	5,99	0,31
83986	85	-0,53	10,2	-0,38
83986	121,82	-0,21	6,99	0,35
83986	128,07	-0,41	8,77	-0,31
83987	64,75	0,94	15,16	0,72
83994	345,66	-0,12	87,9	0,33
84203	96,46	0,55	15,98	-0,05
84406	503,6	-0,64	60,89	0,21
84406	60,45	-0,87	8,42	-0,22
84406	266,33	-0,97	9,35	-0,63
84406	76,19	-0,68	7,42	-0,4
84406	116,49	1	0,5	0,71
84460	246,88	-0,86	36,53	-0,48
84461	140,35	-0,31	42,87	-0,55
84478	604,08	-0,39	74,76	0,13
84646	58,59	-0,91	1	-0,57
84657	122,71	-0,84	33,41	-0,41
84706	184,35	1	1,93	1
84773	269,31	0,07	22,1	0,18
84773	58,28	-0,86	3,54	0,05
84826	1064,41	-0,83	112,36	-0,04
84880	463,38	0,87	39,34	0,56
84912	253,83	-0,97	28,5	-0,69
84919	242,02	-0,86	31,75	-0,24
84929	245,03	-0,78	19,19	-0,47
84944	140,81	-0,93	6,06	-0,53
84944	91,06	-0,84	17,98	0,13
84945	456,24	-0,84	31,1	-0,53
84957	158,41	-0,17	11,34	0,39
84958	51,18	-0,91	3,57	-0,72
84987	224,18	-0,13	10,34	0,12
85021	272,82	-0,84	35,1	0,07
85066	58,13	-0,84	18,55	-0,38

85164	190,14	-0,88	69,56	0,36
85168	3777,55	-1	0,36	-1
85168	97,27	0,94	6,14	0,74
85223	223,26	-0,75	52,22	-0,23
85223	81,06	0,61	31,89	0,43
85302	1494,1	-0,9	85,02	-0,81
85309	375,18	-0,56	28,54	-0,35
85309	70,75	-0,9	21,76	-0,02
85421	100,74	-0,74	17,19	0,43
85423	449,99	-0,42	22,47	0,12
85468	165,13	-0,58	11,2	0,5
85526	227,89	-0,11	23,83	0,12
85556	117,19	-0,93	82,11	0,69
85565	149,38	-0,38	33,32	0,28
85565	65,31	0,08	27,11	0,56
85623	190,6	-0,89	19,33	0,28
85624	210,29	-0,26	57,43	-0,01
85642	632,72	-0,99	4,14	-0,55
85642	166,75	0,45	25,18	0,21
85731	379,93	0,86	11,06	-0,02
85742	57,2	-0,59	19,97	-0,5
85793	364,72	0,16	155,95	0,18
85794	178,68	0,2	39,06	0,5
85822	394,41	0,71	85,68	0,62
85823	252,44	-0,83	35,74	-0,41
85828	149,84	1	0,14	1
85846	65,77	-0,1	59,6	0,24
85857	242,41	-0,66	14,09	-0,36
85892	167,98	0,2	37,17	0,21
85972	56,05	0,65	21,26	0,4
85973	63,57	0,27	25,04	-0,13
86022	188,87	-0,92	12,22	-0,26
86022	119,27	-0,55	21,9	-0,61
86048	81,98	-0,72	6,56	-0,26
86166	99,35	1	0,36	1
86260	375,18	-0,66	28,96	0,44
86260	74,81	0,03	10,38	-0,08
86261	734,62	-0,83	40,13	0,11
86294	352,84	0,6	31,21	0,67
86330	50,72	0,04	7,42	0,15
86335	156,56	-0,97	6,54	-0,67
86354	111,86	-0,99	0,71	-1
86368	55,81	0,93	13,91	0,93
86417	50,72	-0,91	12,34	-0,39
86467	64,38	-0,99	4,42	-0,52
86476	153,78	-0,33	31,75	-0,19
86485	75,5	-0,84	12,91	-0,28
86602	85,69	-0,8	40,02	0,7
86627	93,73	-0,93	10,24	0,42
86665	440,73	0,99	18,98	0,86
86685	129,23	-0,39	13,06	0,57
86787	83,84	-0,96	9,84	0,1
86881	2874,56	-0,99	37,38	-0,45
86930	440,96	-0,12	22,69	-0,62
87086	1106,68	1	1,03	1
87857	506,73	1	0,21	1

88145	1042,3	1	0,78	1
88244	118,58	1	0,43	1
88271	435,08	1	1,43	1
89225	665,95	1	22,33	1
90193	219,48	1	0,5	1
90818	787,42	1	0,57	1
90826	54,66	1	0,21	1
90885	462,5	1	0,43	1
91077	69,02	1	0,14	1
91402	56,51	1	0,21	1
91508	146,6	1	0,29	1
92041	101,09	1	0,14	1
92570	102,13	1	0,78	0,64
92716	152,16	1	1	1
92875	169,06	-0,66	17,12	-0,3
92980	88,7	1	0	0
93062	130,62	1	0,86	1
93062	67,86	1	2,5	1
93062	54,19	1	2,25	0,94
93203	1234,33	1	6,96	1
93645	111,51	1	0,07	1
93776	134,9	1	0,93	1
93857	109,54	1	0,14	1
93912	241,92	0,99	8,36	0,79
93912	68,05	-0,7	21,37	0,12
94043	3510,29	1	4,78	1
94043	97,39	1	1,5	0,9
94247	427,76	1	1,14	0,88
94382	67,86	0,01	19,05	-0,03
94525	82,45	1	0,21	0,33
94536	69,94	1	0,21	1
94604	202,65	1	1,28	1
94870	220,02	0,51	7,42	0,08
94937	242,31	0,99	8,81	0,79
94937	57,32	-0,71	19,4	-0,08
94953	65,08	1	3,07	1
95149	345,42	1	4,28	1
95149	181,46	1	2,57	0,94
95149	93,1	1	1,14	1
95149	60,68	1	1,21	1
95230	241,92	0,99	8,36	0,79
95230	57,4	-0,71	19,49	-0,08
95350	241,69	0,99	8,07	0,79
95350	57,4	-0,71	19,49	-0,08
95577	222,33	1	2,21	1
95922	695,37	1	0,64	0,78
96051	376,69	1	3,57	1

Tabla S1. Lecturas normalizadas y sesgo de cadenas de los ex-siRNAs en la estirpe silvestre y el mutante *ago-1*⁻. Los datos están ordenados por el ID de los transcritos.

¹ El sesgo de cadenas se refiere a la relación entre secuencias con la misma orientación del mRNA y secuencias con orientación antisentido, donde 1 indica todas las secuencias con sentido y -1 todas las secuencias antisentido

Tabla S2

ID del transcrito	log ₂ de la tasa de cambio <i>dcl-1</i> vs WT	log ₂ de la tasa de cambio <i>dcl-2</i> vs WT	log ₂ de la tasa de cambio <i>dcl-1</i> /2 vs WT	log ₂ de la tasa de cambio <i>rdrp-1</i> vs WT	log ₂ de la tasa de cambio <i>rdrp-2</i> vs WT	log ₂ de la tasa de cambio <i>ago-1</i> vs WT
80452	0,34	-29,71	-9,29	3,17	-1,00	-3,58
80794	0,33	-29,12	-7,70	4,40	-0,38	-8,34
80452	0,16	-9,14	-7,02	3,98	-1,53	-4,07
80794	0,60	-8,84	-9,88	3,78	-1,30	-13,71
82197	-0,70	-8,56	-7,53	6,51	0,70	-4,21
82372	1,54	-8,31	-8,68	3,69	-2,71	-31,92
80452	0,33	-8,23	-10,32	2,13	-2,11	-5,32
80452	0,64	-7,76	-10,86	3,87	-2,26	-6,74
85302	-0,14	-5,89	-8,42	2,17	-1,35	-4,14
77442	0,12	-7,74	-12,37	-8,99	-2,47	-5,12
83462	0,98	-7,60	-6,91	-4,72	1,40	-3,47
83987	0,19	-7,45	-8,08	-5,35	1,00	-2,09
86881	0,05	-6,93	-10,86	-6,53	0,34	-6,26
77020	-0,30	-6,64	-8,83	-6,47	-0,50	-7,99
82926	0,24	-6,09	-9,52	-5,92	0,97	-7,95
84406	-0,42	-5,86	-8,07	-6,21	-0,23	-4,83
80649	0,06	-5,72	-8,95	-5,23	1,54	-1,95
77050	0,15	-5,66	-9,38	-5,88	0,65	-7,14
86467	-0,00	-5,65	-7,85	-6,07	0,16	-3,86
86354	0,66	-5,60	-30,06	-4,66	1,45	-7,30
83611	0,49	-5,58	-8,09	-4,95	1,65	-4,25
84460	-0,17	-5,52	-7,96	-6,20	0,96	-2,76
86022	0,52	-5,44	-8,27	-4,27	1,94	-3,95
82518	-0,11	-5,43	-4,17	-3,57	1,28	-5,97
83098	0,39	-5,35	-5,71	-4,62	0,51	-5,77
79776	0,56	-5,34	-8,96	-6,26	0,61	-4,68
76230	0,12	-5,34	-9,53	-6,58	0,23	-3,62
84929	0,96	-5,32	-8,45	-5,83	0,28	-3,67
77527	0,50	-5,31	-9,88	-5,39	1,17	-3,95
84406	0,83	-5,30	-6,75	-4,58	2,30	-2,84
81030	0,30	-5,20	-5,38	-4,86	0,52	-6,46
80938	0,75	-5,17	-9,62	-5,04	1,32	-4,10
79278	1,34	-5,12	-6,57	-3,14	3,24	-3,74
85623	-0,01	-5,08	-8,41	-4,83	1,27	-3,30
85642	-0,50	-5,06	-10,56	-8,12	-1,40	-7,26
84958	0,88	-5,06	-8,51	-4,15	1,71	-3,84
82471	0,17	-5,05	-9,45	-5,59	0,87	-4,33
84406	1,19	-5,04	-8,22	-5,41	1,08	-3,05
79493	0,30	-4,96	-9,29	-5,27	1,03	-3,96
83227	1,27	-4,96	-30,49	-4,78	1,57	-7,24
86627	-0,21	-4,93	-29,80	-5,61	1,19	-3,19
76229	0,47	-4,93	-8,61	-4,44	2,01	-3,04
76403	1,37	-4,91	-29,00	-5,64	1,16	-4,51
78466	-0,44	-4,88	-7,79	-5,76	0,78	-4,77
83695	0,91	-4,87	-7,91	-4,18	1,81	-2,10
81492	0,49	-4,84	-7,58	-4,81	1,19	-2,69
78304	0,16	-4,79	-29,07	-7,88	-0,55	-1,04
12058	0,52	-4,71	-8,28	-6,05	0,25	-5,88
78304	0,46	-4,69	-5,99	-6,55	-0,41	-2,62
78325	1,15	-4,66	-8,87	-3,19	3,75	-3,34
83973	-0,17	-4,64	-7,50	-5,26	1,09	-3,08
83735	0,49	-4,62	-8,66	-3,93	2,14	-2,32
76941	-0,11	-4,62	-29,49	-6,29	0,22	-4,94
85423	0,78	-4,60	-9,05	-5,69	0,58	-4,32
79285	0,50	-4,60	-9,93	-4,32	1,56	-4,20
84944	0,22	-4,57	-7,02	-5,18	1,32	-2,34
86787	-0,06	-4,55	-7,23	-4,70	1,63	-3,09
12058	0,55	-4,55	-8,29	-6,02	0,29	-4,99
84646	0,45	-4,52	-29,13	-3,76	2,95	-5,87

83826	0,02	-4,49	-8,68	-5,74	0,73	-2,40
85223	1,19	-4,48	-7,46	-3,56	3,22	-2,10
85857	0,41	-4,48	-7,16	-5,34	0,96	-4,10
84944	0,38	-4,46	-8,97	-4,42	1,87	-4,54
79511	-0,31	-4,46	-9,39	-6,19	0,45	-4,88
86335	0,28	-4,43	-7,53	-4,61	1,52	-4,58
82833	0,30	-4,42	-9,38	-4,28	1,78	-3,26
83411	0,92	-4,42	-9,81	-4,95	1,82	-1,76
81899	0,45	-4,42	-9,39	-5,87	0,68	-4,22
78926	1,33	-4,42	-9,36	-5,19	1,31	-3,45
84773	0,15	-4,42	-6,70	-5,81	0,33	-4,04
83986	0,55	-4,40	-6,30	-5,47	0,75	-3,87
80992	0,53	-4,40	-10,88	-5,55	1,27	-1,76
77205	1,47	-4,36	-7,99	-5,26	1,12	-3,24
94382	0,20	-4,35	-6,32	-5,34	1,69	-1,83
86261	0,76	-4,33	-9,10	-4,81	1,93	-4,19
83353	1,11	-4,32	-6,67	-4,18	2,05	-1,60
84657	0,04	-4,29	-10,78	-5,64	0,99	-1,88
77020	0,68	-4,26	-10,91	-0,09	1,81	-4,64
78887	0,33	-4,25	-9,68	-6,63	-0,09	-8,33
76982	0,37	-4,23	-7,14	-4,32	2,24	-1,67
85309	0,86	-4,22	-8,06	-4,30	2,30	-3,72
84773	0,36	-4,21	-7,09	-5,28	1,23	-3,61
81795	0,37	-4,20	-5,99	-4,36	2,32	-3,36
81796	0,37	-4,20	-5,99	-4,36	2,32	-3,36
76077	0,87	-4,19	-8,31	-4,79	1,48	-3,69
81619	0,33	-4,17	-7,69	-4,59	1,33	-1,92
84461	1,62	-4,15	-7,65	-4,70	1,66	-1,71
77036	0,67	-4,14	-6,99	-4,82	1,49	-2,39
83986	0,79	-4,13	-9,25	-4,61	1,93	-3,06
76488	0,17	-4,10	-6,73	-6,79	-1,36	-4,87
83187	0,50	-4,08	-8,31	-5,46	0,86	-2,69
84912	0,92	-4,07	-8,22	-3,81	2,84	-3,15
84406	0,50	-4,05	-8,09	-5,22	1,11	-3,36
76230	0,47	-4,05	-10,12	-5,55	1,06	-5,10
83986	-0,21	-4,04	-8,77	-5,29	1,04	-4,12
77325	0,84	-3,99	-8,45	-4,92	2,00	-2,70
77038	0,01	-3,98	-8,47	-5,57	0,83	-3,73
76158	-0,02	-3,98	-6,56	-5,74	0,40	-4,17
82415	-0,02	-3,98	-6,56	-5,74	0,40	-4,17
84406	-0,69	-3,97	-30,12	-6,46	-1,07	-7,86
83549	-0,47	-3,96	-10,80	-6,69	0,16	-4,35
84826	1,48	-3,96	-9,56	-5,25	1,27	-3,24
86260	0,52	-3,95	-8,91	-5,23	1,68	-3,70
86330	1,01	-3,93	-8,50	-5,92	1,22	-2,77
78207	1,14	-3,93	-7,59	-3,09	3,29	-1,80
85624	0,45	-3,93	-7,54	-2,66	3,00	-1,87
80938	0,65	-3,92	-7,24	-4,87	1,46	-1,93
84919	0,63	-3,91	-8,15	-5,12	1,31	-2,93
77142	1,23	-3,91	-6,36	-3,74	2,35	-1,15
84945	1,01	-3,89	-7,96	-5,55	1,07	-3,87
95230	0,58	-3,87	-5,83	-3,86	2,44	-1,60
95350	0,58	-3,87	-5,83	-3,86	2,44	-1,60
94937	0,57	-3,87	-5,83	-3,86	2,44	-1,60
85309	1,23	-3,86	-7,98	-3,21	2,96	-1,70
76071	1,56	-3,86	-6,89	-4,42	2,39	-1,60
83115	0,49	-3,83	-29,87	-7,36	0,32	-6,43
78520	0,25	-3,83	-6,85	-5,07	1,44	-2,59
80750	0,74	-3,83	-9,19	-4,83	1,43	-2,71
79511	0,35	-3,82	-5,88	-4,82	1,51	-1,17
77620	0,75	-3,81	-7,41	-4,64	1,69	-2,05
78345	0,21	-3,74	-8,67	-5,13	1,13	-2,76
77620	0,82	-3,73	-6,51	-5,19	1,09	-3,14

82247	2,00	-3,73	-6,07	-5,01	1,06	-2,57
86417	0,59	-3,73	-28,92	-4,82	1,69	-2,04
84880	0,10	-3,73	-7,29	-5,47	0,94	-3,56
79798	0,98	-3,70	-7,88	-5,27	1,57	-3,94
77325	0,46	-3,69	-8,77	-5,24	0,63	-2,23
80110	0,34	-3,69	-7,20	-4,85	1,48	-1,74
82337	-0,24	-3,68	-1,50	-3,52	2,83	-1,34
85526	0,10	-3,65	-8,07	-5,47	1,19	-3,26
77503	0,65	-3,64	-6,38	-4,22	2,03	-1,60
79713	0,67	-3,64	-8,70	-4,87	1,61	-2,12
13790	0,22	-3,63	-9,32	-4,07	1,33	-3,08
82579	1,06	-3,60	-5,52	-4,20	2,31	-1,43
82472	1,22	-3,59	-6,65	-4,05	2,38	-2,28
84478	0,21	-3,57	-7,72	-5,90	0,70	-3,01
78553	0,24	-3,57	-8,94	-6,11	1,44	-4,87
85021	0,78	-3,55	-7,46	-4,10	2,13	-2,96
93912	1,07	-3,53	-6,00	-4,02	2,24	-1,67
85822	0,68	-3,53	-7,55	-5,23	1,09	-2,20
80749	-0,41	-3,53	-7,50	-6,09	0,54	-3,41
85421	1,05	-3,49	-8,49	-5,02	1,07	-2,55
79753	0,57	-3,49	-7,58	-4,63	1,76	-3,20
81619	-0,39	-3,49	-30,84	-6,12	-0,09	-5,39
81974	0,69	-3,44	-7,86	-4,46	1,93	-1,96
92875	0,43	-3,44	-6,06	-6,46	0,65	-3,30
77039	0,66	-3,42	-6,45	-5,00	1,79	-1,69
75923	0,94	-3,40	-7,31	-4,38	1,87	-3,33
80762	0,70	-3,35	-7,55	-4,45	2,05	-2,64
84987	0,89	-3,33	-9,06	-5,55	0,23	-4,44
94937	0,86	-3,33	-5,22	-5,27	1,23	-4,78
93912	0,87	-3,32	-5,22	-5,25	1,22	-4,85
95230	0,87	-3,32	-5,22	-5,25	1,22	-4,85
95350	0,87	-3,32	-5,22	-5,32	1,19	-4,90
77620	0,26	-3,32	-10,06	-5,60	0,86	-6,95
78952	-0,28	-3,28	-6,65	-5,47	0,60	-2,30
78302	-0,00	-3,24	-10,74	-6,47	0,17	-2,94
81974	0,69	-3,24	-8,11	-3,84	2,77	-0,67
82337	0,45	-3,21	-4,67	-4,69	1,41	-1,81
85972	1,16	-3,19	-5,72	-4,62	1,51	-1,40
82208	1,16	-3,19	-7,10	-3,91	2,48	-2,25
76601	0,86	-3,18	-7,59	-4,61	1,53	-4,56
85468	0,77	-3,15	-7,88	-6,10	0,35	-3,88
78011	-0,30	-3,13	-5,71	-5,83	0,87	-5,05
77392	0,83	-3,12	-7,08	-4,43	1,61	-1,67
86665	0,34	-3,09	-8,61	-6,29	0,22	-4,54
85823	0,64	-3,09	-9,23	-5,09	1,33	-2,82
82026	-0,41	-3,09	-6,51	-4,91	1,27	-2,34
85066	0,75	-3,07	-6,70	-3,88	1,87	-1,65
86930	1,24	-3,06	-7,81	-5,57	0,83	-4,28
76838	0,15	-3,05	-8,13	-5,12	1,20	-3,30
78926	1,09	-3,04	-6,82	-4,38	2,32	-2,13
86476	0,53	-3,04	-7,28	-4,93	1,67	-2,28
85556	0,75	-3,03	-6,38	-3,32	3,08	-0,51
77282	0,76	-2,99	-8,52	-5,13	1,23	-2,10
78743	1,35	-2,98	-6,19	-3,88	2,27	-1,82
75939	-0,12	-2,98	-6,60	-6,52	0,08	-3,46
86485	0,64	-2,96	-6,90	-4,90	1,59	-2,55
85742	1,26	-2,95	-6,67	-4,31	2,19	-1,62
84203	0,38	-2,93	-7,43	-4,82	1,47	-2,59
85731	0,66	-2,92	-7,94	-6,52	0,10	-5,10
77203	0,11	-2,91	-8,84	-5,54	1,11	-3,00
83994	0,36	-2,85	-7,94	-5,38	1,26	-1,98
80623	0,25	-2,85	-7,59	-5,49	1,36	-3,33
86022	0,73	-2,84	-8,22	-5,13	1,13	-2,45

76330	0,32	-2,83	-4,02	-4,67	1,22	-2,82
82275	0,98	-2,83	-7,84	-4,69	2,03	-2,97
77171	0,43	-2,82	-7,46	-4,03	2,26	-2,30
84957	0,33	-2,82	-6,38	-5,56	1,09	-3,80
85642	0,52	-2,81	-6,89	-6,12	0,52	-2,73
77520	0,63	-2,78	-9,95	-4,89	1,43	-2,40
85164	1,37	-2,77	-6,23	-3,82	2,77	-1,45
86260	0,27	-2,73	-8,06	-5,20	0,86	-2,85
82417	1,05	-2,72	-7,93	-3,69	2,72	-2,65
78167	0,43	-2,69	-8,17	-5,14	1,46	-1,71
78424	0,36	-2,68	-6,01	-5,06	1,89	-2,82
85892	0,67	-2,67	-6,38	-4,11	2,62	-2,18
85565	1,61	-2,64	-6,24	-4,94	1,80	-2,16
79577	0,67	-2,63	-8,58	-5,15	1,37	-4,15
82385	0,14	-2,61	-3,42	-4,10	1,01	-1,88
86685	1,09	-2,61	-7,03	-5,49	1,34	-3,31
83142	0,55	-2,56	-8,38	-4,47	1,90	-2,68
80443	0,96	-2,56	-8,09	-5,11	1,61	-3,38
78011	0,39	-2,56	-5,31	-3,36	2,94	-2,09
77331	0,57	-2,55	-6,30	-4,87	1,19	-1,62
80061	0,85	-2,52	-10,96	-4,56	1,64	-2,67
79134	1,11	-2,47	-7,17	-4,10	2,07	-2,13
85793	0,79	-2,35	-6,62	-3,77	2,64	-1,23
76105	0,82	-2,34	-5,94	-4,87	1,60	-2,21
79714	0,00	-2,33	-7,64	-5,78	0,57	-1,92
78120	0,74	-2,31	-7,39	-5,60	0,50	-2,33
79907	0,46	-2,30	-6,41	-4,60	2,09	-2,09
79959	0,61	-2,26	-8,26	-5,16	1,37	-3,15
85846	1,36	-2,25	-8,88	-3,89	2,67	-0,14
83695	0,69	-2,25	-7,21	-5,38	1,01	-3,58
83652	1,13	-2,22	-7,27	-3,56	2,51	-3,02
86294	-0,57	-2,19	-8,04	-6,36	-0,12	-3,50
79183	0,73	-2,18	-6,71	-3,82	2,53	-1,60
76941	0,96	-2,18	-6,68	-4,09	2,31	-3,08
94870	0,91	-2,16	-2,96	-4,49	0,57	-4,89
86048	0,64	-2,14	-7,61	-5,33	0,88	-3,64
80244	0,08	-2,12	-6,82	-5,92	0,88	-4,20
80211	0,49	-2,07	-8,23	-4,93	1,39	-1,82
85168	0,06	-2,03	-7,12	-6,86	0,50	-3,99
82578	0,63	-2,00	-4,89	-4,19	2,18	-0,79
79061	0,95	-1,93	-6,36	-3,92	2,13	-0,93
16281	0,51	-1,68	-7,60	-5,50	1,77	-2,44
85794	0,86	-1,65	-7,30	-4,39	1,74	-2,19
85973	0,52	-1,61	-6,42	-3,79	2,61	-1,34
85565	1,24	-1,60	-7,28	-5,18	1,63	-1,27
86602	0,99	-1,48	-8,26	-4,13	2,09	-1,10
92716	-1,95	-1,98	-5,49	-5,99	-6,90	-7,25
51581	-1,06	-1,59	-2,47	-2,94	-3,41	-5,83
51423	-1,91	-1,14	-3,60	-6,19	-4,92	-32,45
74643	-1,69	-1,03	-3,80	-5,66	-4,31	-7,71
48689	-1,26	-1,00	-4,12	-4,83	-4,62	-6,84
92980	-1,29	-0,97	-2,73	-5,21	-4,36	-29,72
72854	-1,60	-0,90	-3,60	-7,92	-5,94	-9,70
95577	-0,80	-0,89	-2,13	-4,30	-3,86	-6,65
85223	0,82	-0,87	-7,18	-5,01	1,62	-1,35
89225	-1,03	-0,87	-3,30	-2,79	-4,50	-4,90
22967	-0,49	-0,75	-2,52	-3,41	-3,45	-6,77
51876	-1,10	-0,49	-3,35	-4,84	-3,08	-6,25
85168	-1,37	-0,45	-35,14	-14,94	-8,25	-13,36
88244	-1,10	-0,41	-2,07	-3,74	-3,18	-8,11
91077	-0,84	-0,40	-2,41	-3,85	-4,00	-8,95
95922	-1,32	-0,38	-3,34	-6,33	-4,01	-10,09
94043	-0,44	-0,33	-4,35	-6,20	-4,20	-9,52

90193	-0,85	-0,29	-3,05	-3,96	-3,94	-8,78
93857	-0,95	-0,26	-2,82	-4,31	-3,64	-9,61
93203	-0,45	-0,23	-2,46	-5,22	-3,79	-7,47
24857	-1,00	-0,23	-2,10	-3,84	-3,38	-9,52
46499	-0,40	-0,22	-2,61	-2,40	-1,96	-7,34
93645	-0,80	-0,20	-4,87	-7,05	-4,87	-10,64
29038	-0,72	-0,19	-2,75	-4,19	-3,02	-8,69
92041	-0,86	-0,18	-3,10	-5,02	-4,15	-9,50
33552	-1,29	-0,17	-2,95	-6,23	-4,17	-11,76
48455	-0,70	-0,16	-2,74	-3,65	-3,38	-6,53
91402	-0,44	-0,14	-2,67	-4,49	-3,63	-8,07
92570	-0,09	-0,12	-2,08	-3,09	-2,68	-7,03
36390	-0,44	-0,09	-2,42	-4,17	-3,58	-8,80
94536	-0,38	-0,06	-2,00	-3,76	-3,65	-8,38
77956	-0,69	-0,03	-2,92	-4,84	-4,07	-10,86
80654	-0,79	-0,03	-2,43	-3,37	-2,80	-9,10
86368	0,58	-0,02	-4,80	-4,33	1,07	-2,00
47807	-0,25	-0,02	-2,55	-4,31	-3,87	-9,27
86166	-0,99	-0,01	-2,59	-4,20	-2,84	-8,11
93062	0,28	-0,00	-2,97	-2,91	-3,67	-7,25
37397	-0,73	-0,00	-2,72	-3,95	-3,67	-5,66
96051	-0,20	0,01	-3,47	-3,92	-3,26	-6,72
31141	-0,92	0,01	-3,03	-5,85	-4,26	-9,87
85828	-0,54	0,01	-3,35	-6,83	-4,00	-10,06
90818	0,06	0,04	-3,17	-4,78	-4,57	-10,43
32849	-1,49	0,09	-2,14	-3,33	-2,75	-29,54
94604	-0,18	0,10	-3,58	-5,11	-3,89	-7,31
68938	-0,32	0,10	-2,31	-2,72	-2,32	-6,50
73988	-1,13	0,11	-2,10	-4,59	-3,03	-7,39
84706	-0,31	0,12	-2,08	-2,27	-2,92	-6,58
30166	-0,18	0,13	-4,09	-5,87	-4,97	-30,46
95149	-0,98	0,16	-2,92	-3,11	-2,78	-6,35
82648	-0,33	0,20	-2,21	-4,34	-3,56	-29,39
81516	-0,44	0,21	-2,56	-4,63	-3,76	-9,15
77956	-0,26	0,27	-2,28	-4,54	-3,13	-11,95
38503	-0,10	0,27	-2,17	-3,63	-3,03	-11,04
27316	-0,09	0,29	-2,30	-4,44	-2,77	-10,90
77956	-0,30	0,30	-2,80	-5,51	-4,71	-29,51
71324	0,10	0,31	-2,94	-4,17	-3,97	-9,36
47486	-0,02	0,32	-2,47	-2,72	-2,94	-7,55
87857	-1,33	0,32	-2,00	-5,35	-3,31	-11,24
81072	0,21	0,37	-2,60	-2,87	-3,19	-9,69
87086	-0,09	0,38	-2,24	-4,31	-3,69	-10,07
46499	0,16	0,39	-2,70	-2,59	-2,18	-8,39
27973	-0,50	0,41	-3,45	-5,58	-4,34	-8,48
78571	-0,56	0,42	-2,83	-4,80	-3,71	-9,10
88271	-1,30	0,46	-2,55	-5,57	-2,84	-8,25
83918	-0,34	0,47	-2,10	-3,70	-3,24	-7,29
93062	0,62	0,49	-3,02	-2,65	-3,04	-4,59
93062	0,33	0,51	-2,69	-3,11	-3,51	-4,76
94953	-0,11	0,54	-2,22	-3,13	-3,03	-4,41
88145	-0,29	0,55	-2,45	-6,71	-2,87	-10,38
94043	0,02	0,58	-3,24	-4,81	-3,49	-6,02
46975	-0,23	0,59	-2,45	-5,37	-3,64	-8,85
68860	-0,66	0,63	-2,84	-3,85	-3,60	-29,94
95149	-0,09	0,67	-2,66	-2,98	-3,02	-5,65
94247	-0,33	0,67	-2,65	-2,33	-2,83	-8,55
95149	0,02	0,69	-3,31	-3,43	-3,21	-6,14
79017	0,24	0,69	-2,10	-3,95	-3,76	-9,26
83860	-0,61	0,92	-2,45	-4,63	-4,43	-9,04
94525	0,23	0,97	-2,06	-3,14	-2,67	-8,62
95149	0,32	1,03	-2,27	-2,61	-2,45	-6,33
90885	0,63	1,07	-2,31	-3,75	-3,13	-10,07

45670	0,05	1,07	-2,54	-6,31	-2,96	-6,57
73657	0,34	1,11	-2,45	-6,35	-2,98	-9,93
91508	-0,39	1,14	-2,05	-4,40	-3,09	-8,98
45935	-0,09	1,24	-2,61	-4,59	-3,41	-8,86
93776	0,27	1,42	-2,16	-5,09	-2,37	-7,18
13065	0,18	1,43	-2,69	-3,60	-3,12	-8,16
77853	-0,42	1,51	-2,51	-5,29	-3,48	-4,93
73807	0,38	1,76	-2,90	-5,46	-3,93	-10,83
45585	-3,12	1,18	2,16	1,20	0,81	0,21
27711	-2,13	-0,11	-1,00	-2,15	-2,06	-7,38
76922	-2,06	-0,55	-1,52	-3,33	-2,87	-8,94
90826	-2,10	-0,97	-1,39	-3,22	-3,17	-8,02
29653	-2,85	-0,85	-3,34	-5,55	-4,83	-8,74

Tabla S2. Log₂ de la tasa de cambio de los ex-siRNAs en diferentes mutantes comparados con el silvestre (WT).

Se utilizaron las lecturas normalizadas de la Tabla S1 para calcular la tasa de cambio de los ex-siRNAs en el mutante *ago-1*⁻ en relación con la estirpe silvestre. Se incluyen también los datos de los mutantes *dcl-1*⁻, *dcl-2*⁻, *dcl-1*⁻/*dcl-2*⁻, *rdrp-1*⁻ y *rdrp-2*⁻. Los datos están ordenados por la tasa de cambio en la estirpe *dcl-2*⁻, que separa las cuatro clases de ex-siRNAs. Las clases I, II, III y IV están señaladas en amarillo, blanco, azul y gris, respectivamente. Los valores que representan un cambio igual o superior a tres veces respecto a la estirpe silvestre están marcados en negrita. El descenso en la expresión se muestra en rojo y el aumento, en verde.

Tabla S3

Coordenadas del locus	Abundancia en fracciones Ago-1 en R7B	Abundancia en fracciones Ago-1 en ago-1⁻	log₂ de la tasa de cambio WT vs ago-1⁻ de sRNAs unidos a Ago-1
scaffold_1:1261590-1262489(-)	101,11	0,12	9,72
scaffold_5:1078038-1078109(+)	189,23	0,23	9,68
scaffold_10:840451-840774(-)	166,73	0,23	9,50
scaffold_3:3980953-3981152(-)	1007,42	1,39	9,50
scaffold_1:4948339-4948704(+)	78,76	0,12	9,36
scaffold_10:1160379-1161128(+)	150,05	0,23	9,35
scaffold_3:3981817-3982026(-)	750,04	1,16	9,34
scaffold_5:1077941-1077989(+)	295,84	0,46	9,33
scaffold_7:855-1733(-)	55,87	0,12	8,86
scaffold_3:3981539-3981638(-)	312,09	0,69	8,82
scaffold_6:1408981-1409119(+)	207,99	0,46	8,82
scaffold_5:2991644-2992917(+)	103,32	0,23	8,81
scaffold_5:1077274-1077490(+)	308,61	0,69	8,80
scaffold_1:535521-536077(+)	300,5	0,69	8,77
scaffold_1:5749020-5749146(-)	99,79	0,23	8,76
scaffold_3:3980645-3980889(-)	6679,33	16,42	8,67
scaffold_1:4751022-4751379(+)	4724,04	12,26	8,59
scaffold_1:4750110-4750958(+)	25885,48	67,99	8,57
scaffold_1:5124037-5124438(-)	2321,05	6,24	8,54
scaffold_7:396920-397428(-)	928,72	2,54	8,51
scaffold_14:36463-36761(-)	566,91	1,62	8,45
scaffold_3:3981208-3981332(-)	311,99	0,93	8,39
scaffold_10:567971-568172(-)	74,2	0,23	8,33
scaffold_1:535097-535456(+)	143,18	0,46	8,28
scaffold_5:1078207-1078423(+)	999,73	3,24	8,27
scaffold_4:222499-223296(+)	1180,3	4,16	8,15
scaffold_4:2075426-2075702(-)	123,73	0,46	8,07
scaffold_5:1076673-1077206(+)	268,89	1	8,07
scaffold_7:869285-869646(-)	122,67	0,46	8,06
scaffold_11:490829-490951(+)	61,24	0,23	8,06
scaffold_5:769360-769746(+)	58,82	0,23	8,00
scaffold_1:1902838-1904074(+)	307,35	1,27	7,92
scaffold_8:521862-522222(-)	54,22	0,23	7,88
scaffold_2:2390244-2390533(-)	53,98	0,23	7,87
scaffold_1:596457-596585(+)	160,25	0,69	7,86
scaffold_14:185393-185465(-)	105,84	0,46	7,85
scaffold_3:886620-886758(-)	51,76	0,23	7,81
scaffold_12:746041-746502(-)	51,47	0,23	7,81
scaffold_11:587319-587564(-)	50,02	0,23	7,76
scaffold_6:1696153-1696264(+)	98	0,46	7,74
scaffold_3:1847143-1847481(-)	97,81	0,46	7,73
scaffold_6:2607285-2607556(+)	195,08	0,93	7,71
scaffold_4:983106-985686(+)	1120,75	5,36	7,71
scaffold_2:1654454-1654694(+)	95,58	0,46	7,70
scaffold_2:2517397-2517616(+)	335,6	1,62	7,69
scaffold_5:531317-531406(-)	2954,1	14,34	7,69
scaffold_7:168910-169627(-)	92,97	0,46	7,66
scaffold_11:808208-808684(+)	137,81	0,69	7,64
scaffold_1:3395233-3395554(+)	273	1,39	7,62
scaffold_12:857249-857737(-)	361,72	1,85	7,61
scaffold_1:683894-685347(-)	113,05	0,58	7,61

scaffold_9:713690-714001(+)	358,23	1,85	7,60
scaffold_1:682884-683541(-)	111,45	0,58	7,59
scaffold_9:378459-378911(-)	220,18	1,16	7,57
scaffold_3:1574919-1575739(-)	547,94	2,89	7,57
scaffold_2:3868184-3868580(+)	86,39	0,46	7,55
scaffold_1:576695-577080(-)	691,61	3,7	7,55
scaffold_6:117553-120449(-)	998,05	5,47	7,51
scaffold_3:3981692-3981756(-)	83,49	0,46	7,50
scaffold_1:1639879-1640298(+)	124,36	0,69	7,49
scaffold_4:2940973-2941407(-)	249,79	1,39	7,49
scaffold_9:356928-358271(+)	3013,92	16,96	7,47
scaffold_3:1582270-1582352(+)	81,36	0,46	7,47
scaffold_6:1910377-1910660(-)	164,27	0,93	7,46
scaffold_3:124858-125136(-)	245,14	1,39	7,46
scaffold_3:4611508-4612003(-)	101,97	0,58	7,46
scaffold_7:396472-396847(-)	351,95	2,08	7,40
scaffold_2:2389587-2390063(-)	116,48	0,69	7,40
scaffold_3:2368958-2370289(-)	165,62	1	7,37
scaffold_13:169616-169887(+)	76,14	0,46	7,37
scaffold_10:906865-907407(-)	76,09	0,46	7,37
scaffold_9:103157-103529(+)	487,77	3,01	7,34
scaffold_2:2063997-2064857(+)	449,99	2,78	7,34
scaffold_8:527049-528043(+)	333,86	2,08	7,33
scaffold_2:4804199-4804775(+)	459,72	2,89	7,31
scaffold_8:1244913-1245597(-)	184,34	1,16	7,31
scaffold_3:2367678-2368283(-)	73,07	0,46	7,31
scaffold_4:221727-222345(+)	568,13	3,58	7,31
scaffold_4:2473055-2473493(+)	108,83	0,69	7,30
scaffold_7:868046-868696(-)	219,12	1,39	7,30
scaffold_1:2375453-2376973(+)	127,5	0,81	7,30
scaffold_6:1376156-1376553(-)	72,36	0,46	7,30
scaffold_10:171393-172046(+)	179,84	1,16	7,28
scaffold_11:829803-830513(+)	118,25	0,77	7,26
scaffold_9:1606492-1607666(+)	123,26	0,81	7,25
scaffold_12:198534-198891(+)	69,9	0,46	7,25
scaffold_5:977234-977714(+)	277,16	1,85	7,23
scaffold_1:3653999-3654359(+)	411,1	2,78	7,21
scaffold_7:171315-171894(-)	186,21	1,27	7,20
scaffold_10:971898-972629(-)	287,52	1,97	7,19
scaffold_1:4737163-4737339(-)	99,93	0,69	7,18
scaffold_10:382317-383973(+)	451,64	3,12	7,18
scaffold_3:887762-888202(-)	167,8	1,16	7,18
scaffold_6:2170419-2171438(+)	365,44	2,54	7,17
scaffold_4:726583-726848(-)	166,73	1,16	7,17
scaffold_9:1465434-1466006(-)	198,8	1,39	7,16
scaffold_4:4033170-4034732(+)	82,93	0,58	7,16
scaffold_1:1901090-1902652(+)	82,8	0,58	7,16
scaffold_4:713508-714012(+)	82,62	0,58	7,15
scaffold_3:604641-606203(-)	82,61	0,58	7,15
scaffold_8:1514620-1514866(-)	64,87	0,46	7,14
scaffold_9:1466049-1466356(-)	126,34	0,93	7,09
scaffold_1:5748514-5748766(-)	219,41	1,62	7,08
scaffold_4:2430874-2431477(+)	779,21	5,78	7,07
scaffold_1:4299268-4300776(+)	155,92	1,16	7,07
scaffold_11:493579-494209(+)	60,75	0,46	7,05
scaffold_1:1082263-1082508(+)	90,99	0,69	7,04

scaffold_2:2518298-2518699(+)	227,42	1,73	7,04
scaffold_5:1113262-1113805(+)	90,6	0,69	7,04
scaffold_4:46056-46615(+)	257,62	1,97	7,03
scaffold_4:714079-715358(+)	406,94	3,12	7,03
scaffold_2:4622978-4623681(-)	421,31	3,24	7,02
scaffold_4:1082249-1082579(-)	59,79	0,46	7,02
scaffold_1:596743-597906(+)	3007,73	23,2	7,02
scaffold_11:586459-587172(-)	223,91	1,73	7,02
scaffold_2:3368696-3369199(+)	208,67	1,62	7,01
scaffold_3:3941845-3941979(-)	88,08	0,69	7,00
scaffold_6:2033515-2034074(+)	147,92	1,16	6,99
scaffold_3:4226858-4227295(-)	118,41	0,93	6,99
scaffold_7:1557038-1557444(-)	206,01	1,62	6,99
scaffold_10:603983-604549(-)	147,49	1,16	6,99
scaffold_5:2511750-2512073(-)	216,09	1,7	6,99
scaffold_9:102724-103103(+)	402,54	3,24	6,96
scaffold_11:594283-595659(+)	731,09	5,9	6,95
scaffold_10:971112-971304(+)	84,94	0,69	6,94
scaffold_8:1106093-1106927(+)	753,17	6,13	6,94
scaffold_7:170791-171256(-)	169,3	1,39	6,93
scaffold_5:1386278-1386946(-)	279,68	2,31	6,92
scaffold_10:1064637-1065273(-)	168,04	1,39	6,92
scaffold_1:3726747-3728591(-)	557,94	4,63	6,91
scaffold_4:3843333-3844379(-)	250,04	2,08	6,91
scaffold_9:1194439-1195285(-)	372,26	3,12	6,90
scaffold_10:908929-909252(+)	81,91	0,69	6,89
scaffold_6:179377-179856(-)	164,07	1,39	6,88
scaffold_1:4949308-4950310(+)	203,98	1,73	6,88
scaffold_3:4533270-4533629(-)	163,88	1,39	6,88
scaffold_3:1704439-1705752(-)	325	2,78	6,87
scaffold_6:1031039-1031890(+)	348,22	3,01	6,85
scaffold_9:724950-726074(+)	494,88	4,28	6,85
scaffold_1:534708-534960(+)	88,68	0,77	6,85
scaffold_8:1023557-1024216(+)	398,09	3,47	6,84
scaffold_1:1082753-1083250(+)	580,4	5,09	6,83
scaffold_8:1174914-1176398(-)	129,99	1,16	6,81
scaffold_11:808707-809099(-)	103,9	0,93	6,80
scaffold_1:140849-141595(+)	129,05	1,16	6,80
scaffold_2:3347991-3348526(-)	50,98	0,46	6,79
scaffold_20:9419-9861(-)	76,41	0,69	6,79
scaffold_3:1783458-1784549(-)	229,86	2,08	6,79
scaffold_12:856717-856988(-)	152,5	1,39	6,78
scaffold_3:2832513-2833293(-)	975,45	8,9	6,78
scaffold_1:5748217-5748461(-)	152,03	1,39	6,77
scaffold_5:531471-531632(-)	2369,2	21,74	6,77
scaffold_2:2517864-2517961(+)	150,92	1,39	6,76
scaffold_6:1695393-1695862(+)	1266,01	11,79	6,75
scaffold_1:89768-90466(-)	222,84	2,08	6,74
scaffold_1:3768890-3769513(+)	514,47	4,86	6,73
scaffold_3:2703221-2706571(-)	548,72	5,2	6,72
scaffold_7:869711-870189(-)	145,02	1,39	6,71
scaffold_2:2139284-2140603(-)	980,49	9,4	6,70
scaffold_8:1055786-1056319(+)	71,78	0,69	6,70
scaffold_9:1450248-1450552(+)	107,92	1,04	6,70
scaffold_8:891752-892285(+)	382,94	3,7	6,69
scaffold_4:3842486-3843068(-)	95,77	0,93	6,69

scaffold_2:3986963-3987698(+)	283,36	2,78	6,67
scaffold_7:208400-208838(-)	187,49	1,85	6,66
scaffold_7:195623-196059(+)	116,96	1,16	6,66
scaffold_8:1368639-1368992(-)	138,15	1,39	6,64
scaffold_1:2272747-2273033(-)	68,49	0,69	6,63
scaffold_6:1125070-1125658(-)	72,41	0,73	6,63
scaffold_6:1241223-1241662(+)	316,7	3,24	6,61
scaffold_1:141688-141881(+)	66,56	0,69	6,59
scaffold_7:1792947-1793777(+)	382,92	3,99	6,58
scaffold_9:1162881-1163279(+)	220,04	2,31	6,57
scaffold_10:1244037-1244474(-)	87,7	0,93	6,56
scaffold_7:1737557-1738078(-)	303,67	3,24	6,55
scaffold_19:3514-4305(-)	259,94	2,78	6,55
scaffold_5:2791759-2792121(+)	172,83	1,85	6,55
scaffold_13:523594-524166(-)	234,65	2,54	6,53
scaffold_1:4879186-4879774(+)	74,72	0,81	6,53
scaffold_4:3209239-3209827(-)	74,72	0,81	6,53
scaffold_5:2700838-2701426(-)	74,72	0,81	6,53
scaffold_10:206845-207520(+)	254,32	2,78	6,52
scaffold_5:1385520-1386187(-)	358,14	3,93	6,51
scaffold_5:1269793-1270195(-)	62,5	0,69	6,50
scaffold_1:3062334-3062715(+)	249,54	2,78	6,49
scaffold_10:480769-482154(-)	477,03	5,32	6,49
scaffold_4:1075046-1075856(+)	124,02	1,39	6,48
scaffold_10:478662-479450(-)	701,13	7,86	6,48
scaffold_7:202031-203362(+)	621,02	6,98	6,48
scaffold_1:5438029-5438439(+)	753,38	8,56	6,46
scaffold_1:5401597-5402614(+)	251,95	2,89	6,45
scaffold_2:1367350-1369052(+)	586,37	6,76	6,44
scaffold_12:412121-412755(-)	419,36	4,86	6,43
scaffold_8:1104133-1104555(+)	158,8	1,85	6,42
scaffold_5:579078-579439(-)	275,67	3,24	6,41
scaffold_1:2273087-2273423(-)	123,09	1,46	6,40
scaffold_1:693964-694616(-)	103,51	1,23	6,39
scaffold_2:1505433-1506736(-)	586,6	6,98	6,39
scaffold_6:1696446-1696810(+)	249,64	3,01	6,37
scaffold_10:698033-698745(+)	406,78	4,93	6,37
scaffold_4:4081808-4082279(-)	282,34	3,47	6,35
scaffold_6:1909821-1910088(-)	74,68	0,93	6,33
scaffold_1:1054791-1056179(-)	101,92	1,27	6,33
scaffold_9:1396263-1396750(+)	203,01	2,54	6,32
scaffold_3:155187-155833(-)	184,58	2,31	6,32
scaffold_6:262675-263007(+)	110,67	1,39	6,32
scaffold_19:4321-4600(-)	91,32	1,16	6,30
scaffold_9:1064948-1065522(-)	245,53	3,12	6,30
scaffold_10:1210339-1210752(+)	73,14	0,93	6,30
scaffold_8:1366997-1367586(-)	435,1	5,55	6,29
scaffold_8:1104658-1105011(+)	126,3	1,62	6,28
scaffold_3:1838134-1839573(-)	793,04	10,18	6,28
scaffold_1:4306555-4307445(+)	368,73	4,74	6,28
scaffold_3:2835438-2836250(+)	161,8	2,08	6,28
scaffold_3:942512-942677(-)	267,59	3,47	6,27
scaffold_3:3941319-3941570(-)	214,28	2,78	6,27
scaffold_5:1463171-1463412(-)	302,7	3,93	6,27
scaffold_8:1516222-1516515(-)	177,33	2,31	6,26
scaffold_1:860701-862188(-)	467,4	6,13	6,25

scaffold_5:1225644-1227101(+)	467,4	6,13	6,25
scaffold_1:3976853-3976968(+)	70,48	0,93	6,24
scaffold_5:671457-672308(-)	165,8	2,2	6,24
scaffold_13:113085-113370(+)	104,48	1,39	6,23
scaffold_8:1160742-1161010(+)	138,15	1,85	6,22
scaffold_1:1081086-1081463(+)	155,17	2,08	6,22
scaffold_5:1703889-1704440(+)	479,19	6,44	6,22
scaffold_4:3488671-3489699(-)	160,72	2,16	6,22
scaffold_4:3482338-3483366(+)	160,72	2,16	6,22
scaffold_1:4735879-4736422(-)	154,25	2,08	6,21
scaffold_3:724311-724801(-)	154,01	2,08	6,21
scaffold_13:786547-787554(-)	134,76	1,85	6,19
scaffold_5:770918-771475(+)	672	9,25	6,18
scaffold_4:1723003-1723293(-)	100,71	1,39	6,18
scaffold_2:2800703-2801268(+)	383,29	5,32	6,17
scaffold_4:590435-591070(-)	100,13	1,39	6,17
scaffold_5:541524-541892(+)	123,68	1,73	6,16
scaffold_7:1557627-1557731(-)	66,04	0,93	6,15
scaffold_5:1232933-1233287(-)	103,61	1,5	6,11
scaffold_6:1035197-1035960(-)	158,61	2,31	6,10
scaffold_8:1158944-1159311(+)	141,82	2,08	6,09
scaffold_7:208137-208385(-)	157,5	2,31	6,09
scaffold_1:4195276-4195774(+)	252,06	3,7	6,09
scaffold_2:1345771-1347165(-)	149,63	2,2	6,09
scaffold_10:908257-908829(+)	78,41	1,16	6,08
scaffold_8:560127-560715(-)	262,73	3,89	6,08
scaffold_10:1159093-1160364(+)	134,91	2	6,08
scaffold_7:1556364-1556890(-)	426,2	6,36	6,07
scaffold_10:380803-381465(-)	1017,01	15,22	6,06
scaffold_9:866120-866442(-)	154,01	2,31	6,06
scaffold_3:1142121-1142864(+)	396,4	6,01	6,04
scaffold_7:1557907-1558038(-)	90,94	1,39	6,03
scaffold_1:4571983-4572828(+)	367,86	5,67	6,02
scaffold_2:1011686-1011870(+)	87,94	1,39	5,98
scaffold_2:1654828-1655468(+)	379,61	6,01	5,98
scaffold_1:3654410-3654815(+)	73,19	1,16	5,98
scaffold_3:877162-877947(+)	173,7	2,78	5,97
scaffold_4:98233-98744(-)	201,8	3,24	5,96
scaffold_1:4880123-4880627(-)	244,48	3,93	5,96
scaffold_1:3176104-3178107(+)	129,37	2,08	5,96
scaffold_2:4401629-4402084(-)	693,15	11,22	5,95
scaffold_6:431301-432410(+)	70,98	1,16	5,94
scaffold_8:1517145-1517723(+)	141,1	2,31	5,93
scaffold_1:3714910-3715365(-)	253,7	4,16	5,93
scaffold_8:1696813-1697542(-)	56,59	0,93	5,93
scaffold_4:871849-872545(+)	357,13	5,9	5,92
scaffold_9:1397600-1398069(-)	335,6	5,55	5,92
scaffold_1:689628-690463(+)	179,89	3,01	5,90
scaffold_7:1739400-1739807(+)	317,41	5,32	5,90
scaffold_1:5325916-5326458(-)	302,06	5,09	5,89
scaffold_4:4254335-4254765(-)	101,77	1,73	5,88
scaffold_3:1039369-1039910(-)	101,61	1,73	5,88
scaffold_6:2090101-2090266(-)	67,46	1,16	5,86
scaffold_13:5884-6047(+)	95,48	1,65	5,85
scaffold_1:3517472-3518170(+)	475,15	8,33	5,83
scaffold_4:2942169-2942519(-)	79,13	1,39	5,83

scaffold_10:568235-568855(-)	419,47	7,4	5,82
scaffold_2:1012203-1012388(+)	78,36	1,39	5,82
scaffold_3:3257954-3258378(+)	168,77	3,01	5,81
scaffold_4:869830-870258(+)	71,15	1,27	5,81
scaffold_2:1972074-1973272(-)	83,73	1,5	5,80
scaffold_13:169909-170206(+)	128,47	2,31	5,80
scaffold_4:44011-44666(-)	782,59	14,11	5,79
scaffold_2:2517721-2517834(+)	76,72	1,39	5,79
scaffold_6:1408653-1408923(+)	55,14	1	5,79
scaffold_12:381044-381493(-)	292,84	5,32	5,78
scaffold_9:378995-379313(-)	133,62	2,43	5,78
scaffold_1:4736719-4737143(-)	177,96	3,24	5,78
scaffold_6:177400-177483(+)	54,76	1	5,78
scaffold_4:876070-876666(-)	136,79	2,54	5,75
scaffold_9:866505-866706(-)	53,69	1	5,75
scaffold_8:195603-196031(+)	67,86	1,27	5,74
scaffold_8:528115-528346(+)	86,2	1,62	5,73
scaffold_8:723362-723813(+)	53,16	1	5,73
scaffold_3:878109-878714(-)	54,92	1,04	5,72
scaffold_8:153294-153408(+)	52,72	1	5,72
scaffold_2:2681154-2681873(+)	401,09	7,63	5,72
scaffold_1:5769-6417(-)	54,58	1,04	5,71
scaffold_11:701013-701644(+)	169,06	3,24	5,71
scaffold_5:1116318-1116685(+)	66,25	1,27	5,71
scaffold_6:2607773-2608127(+)	119,81	2,31	5,70
scaffold_5:2699985-2700489(+)	170,21	3,31	5,68
scaffold_6:1124217-1124721(+)	170,21	3,31	5,68
scaffold_1:4760136-4760667(+)	50,98	1	5,67
scaffold_3:3150334-3150771(+)	235,18	4,63	5,67
scaffold_7:170360-170747(-)	93,94	1,85	5,67
scaffold_2:4513187-4513768(+)	140,9	2,78	5,66
scaffold_4:3208386-3208890(+)	167,38	3,31	5,66
scaffold_8:723873-724404(+)	478	9,48	5,66
scaffold_3:942165-942452(-)	126,92	2,54	5,64
scaffold_8:1526775-1527563(+)	195,76	3,93	5,64
scaffold_13:113555-113838(+)	138,05	2,78	5,63
scaffold_2:4054027-4054572(+)	296	6,01	5,62
scaffold_6:2169946-2170141(+)	67,82	1,39	5,61
scaffold_5:976799-977180(+)	112,7	2,31	5,61
scaffold_2:2084733-2086976(+)	524,43	10,75	5,61
scaffold_2:612598-613924(-)	137,76	2,89	5,57
scaffold_8:1842895-1843293(-)	228,36	4,86	5,55
scaffold_8:851578-851909(+)	54,27	1,16	5,55
scaffold_2:2494686-2495393(-)	204,12	4,39	5,54
scaffold_14:130263-130337(+)	64,28	1,39	5,53
scaffold_10:1202192-1202472(-)	69,22	1,5	5,53
scaffold_10:419884-420078(+)	68,72	1,5	5,52
scaffold_2:2053866-2053979(+)	63,56	1,39	5,51
scaffold_1:5402801-5403559(+)	52,6	1,16	5,50
scaffold_8:197621-198326(+)	204,46	4,51	5,50
scaffold_2:1960672-1960735(+)	82,89	1,85	5,49
scaffold_5:1705057-1705938(+)	330,61	7,4	5,48
scaffold_6:2608182-2608596(+)	440,95	10,29	5,42
scaffold_4:4081436-4081756(-)	165,52	3,93	5,40
scaffold_8:997021-997518(-)	308,46	7,4	5,38
scaffold_2:3869561-3869834(+)	77,01	1,85	5,38

scaffold_2:3987729-3988516(+)	330,6	7,98	5,37
scaffold_1:1229435-1231969(-)	74,78	1,85	5,34
scaffold_8:1513700-1514116(-)	260,53	6,48	5,33
scaffold_3:1576827-1577282(-)	333,55	8,33	5,32
scaffold_4:293271-293521(-)	70,52	1,85	5,25
scaffold_5:2217921-2218282(-)	55,14	1,46	5,24
scaffold_8:1056348-1056794(+)	78,07	2,08	5,23
scaffold_11:496712-497601(+)	56,08	1,5	5,22
scaffold_11:701954-702426(-)	182,65	4,97	5,20
scaffold_10:1093573-1094667(-)	92,68	2,54	5,19
scaffold_1:4760885-4761330(+)	235,71	6,48	5,18
scaffold_5:1533459-1534490(+)	50,4	1,39	5,18
scaffold_1:3725858-3726466(-)	368,63	10,18	5,18
scaffold_8:34629-35427(-)	57,74	1,62	5,16
scaffold_3:4614063-4614312(+)	173,14	4,86	5,15
scaffold_7:120965-121366(+)	81,5	2,31	5,14
scaffold_1:4092560-4093255(-)	156,48	4,51	5,12
scaffold_1:5687850-5688568(+)	62,35	1,85	5,07
scaffold_5:1120412-1121026(-)	72,89	2,19	5,06
scaffold_4:3207902-3208330(+)	123,53	3,78	5,03
scaffold_1:4880683-4881111(-)	120,92	3,78	5,00
scaffold_5:2699501-2699929(+)	120,92	3,78	5,00
scaffold_5:975873-976423(+)	85,3	2,67	5,00
scaffold_6:1123733-1124161(+)	117,47	3,7	4,99
scaffold_1:5210533-5210844(+)	151,5	4,86	4,96
scaffold_4:1076134-1076462(+)	64,09	2,08	4,95
scaffold_4:130174-130365(+)	70,86	2,31	4,94
scaffold_9:1193514-1194184(-)	99,37	3,24	4,94
scaffold_10:971414-971814(+)	85,13	2,78	4,94
scaffold_2:4640022-4640976(-)	409,99	13,64	4,91
scaffold_3:1284618-1285148(+)	54,71	1,85	4,89
scaffold_3:4055502-4056289(-)	92,05	3,12	4,88
scaffold_3:2179529-2179845(+)	155,03	5,32	4,86
scaffold_14:129930-130067(+)	52,77	1,85	4,83
scaffold_4:3855158-3855884(+)	143,27	5,12	4,81
scaffold_1:5688627-5689083(+)	54,9	2,08	4,72
scaffold_8:1244389-1244862(-)	52,56	2,08	4,66
scaffold_11:491736-491947(+)	154,53	6,24	4,63
scaffold_2:1171640-1171764(+)	59,54	2,54	4,55
scaffold_7:879625-880732(-)	101,12	4,39	4,53
scaffold_1:3977229-3977974(+)	94,74	4,16	4,51
scaffold_3:3577108-3577421(-)	105,03	4,7	4,48
scaffold_8:1514417-1514603(-)	51,42	2,31	4,48
scaffold_1:5210111-5210312(+)	78,12	3,58	4,45
scaffold_5:974886-975284(+)	58,83	2,85	4,37
scaffold_9:936397-937529(+)	84,79	4,39	4,27
scaffold_5:462830-463557(+)	68,98	3,58	4,27
scaffold_6:2426515-2427800(+)	90,21	5,67	3,99
scaffold_7:1062007-1062295(-)	62,24	3,93	3,99
scaffold_5:824729-825746(+)	101,43	6,48	3,97
scaffold_5:461882-462748(+)	73,06	4,97	3,88
scaffold_7:737712-738401(+)	169,02	11,91	3,83
scaffold_5:659756-661368(+)	62,98	4,74	3,73
scaffold_2:4447229-4448602(-)	54,32	4,16	3,71
scaffold_4:1287595-1287760(+)	58,53	4,63	3,66
scaffold_6:2110855-2111066(+)	84,65	6,74	3,65

scaffold_8:866523-866959(+)	71,86	5,78	3,64
scaffold_7:738548-739126(+)	69,96	5,9	3,57
scaffold_3:3576478-3577050(-)	160,75	13,61	3,56
scaffold_6:763703-764469(+)	59,75	5,55	3,43
scaffold_5:2605783-2606079(+)	103,59	9,94	3,38
scaffold_6:1537237-1537954(+)	89	8,56	3,38
scaffold_3:1635410-1635657(+)	59,69	5,78	3,37
scaffold_4:1476634-1477442(-)	59,61	5,78	3,37
scaffold_2:4318833-4319390(-)	106,73	10,79	3,31
scaffold_9:1210953-1212272(+)	72,93	7,55	3,27
scaffold_1:504374-504867(+)	66,69	7,03	3,25
scaffold_3:2646784-2647434(+)	72,62	8,46	3,10
scaffold_2:3572093-3572977(-)	78,44	9,71	3,01
scaffold_67:1965-2393(+)	173,26	22,43	2,95
scaffold_3:1633841-1634375(+)	76,38	11,1	2,78
scaffold_6:1536567-1537180(+)	79,18	12,49	2,66
scaffold_2:2579478-2580562(-)	70,02	11,68	2,58
scaffold_6:823302-823831(-)	53,38	9,31	2,52
scaffold_1:5005031-5005348(+)	106,66	19,77	2,43
scaffold_1:4024085-4024422(+)	50,79	9,71	2,39
scaffold_7:826891-827671(-)	67,59	13,07	2,37
scaffold_4:4204171-4205042(+)	104,46	22,91	2,19
scaffold_1:3484245-3485076(-)	121,71	28,21	2,11
scaffold_4:2162743-2165211(+)	63,08	15,03	2,07
scaffold_7:487926-488447(-)	70,07	17,31	2,02
scaffold_13:505315-507633(+)	158,03	39,16	2,01
scaffold_12:782492-784158(-)	114,67	29,01	1,98
scaffold_4:3497941-3498484(-)	71,4	18,69	1,93
scaffold_7:2033129-2033995(-)	54,82	16,59	1,72
scaffold_3:4312988-4313857(+)	57,91	18,88	1,62

Tabla S3. Lecturas normalizadas de los ex-siRNAs en las fracciones enriquecidas en Ago-1 de la estirpe silvestre y el mutante *ago-1*⁻. Se incluye el log₂ de la tasa de cambio de los ex-siRNAs en la estirpe silvestre (WT) respecto al mutante *ago-1*⁻. Los datos están ordenados por el valor de la tasa de cambio. Los signos (+) y (-) señalan la dirección de transcripción del gen respecto a la secuencia genómica de *M. circinelloides*. Sólo se consideraron para el análisis loci con un número de lecturas normalizadas en la estirpe silvestre mayor de 50.

Tabla S4

ID del transcrito	Coordenadas del locus	log ₂ de la tasa de cambio WT vs ago-1 ⁻ de sRNAs unidos a Ago-1	log ₂ de la tasa de cambio ago-1 ⁻ vs WT
80452	scaffold_3/3981817-3982026	9,34	-3,58
80794	scaffold_4/221727-222345	7,31	-8,34
80452	scaffold_3/3981208-3981332	8,39	-4,07
80794	scaffold_4/222499-223296	8,15	-13,71
82197	scaffold_5/531317-531406	7,69	-4,21
82372	scaffold_5/1078207-1078423	8,27	-31,92
80452	scaffold_3/3980953-3981152	9,50	-5,32
80452	scaffold_3/3980645-3980889	8,67	-6,74
85302	scaffold_9/356928-358271	7,47	-4,14
77442	scaffold_1/5124037-5124438	8,54	-5,12
83462	scaffold_6/1408981-1409119	8,82	-3,47
83987	scaffold_7/173394-173798	#N/A	-2,09
86881	scaffold_14/36463-36761	8,45	-6,26
77020	scaffold_1/3654843-3654911	#N/A	-7,99
82926	scaffold_5/2791759-2792121	6,55	-7,95
84406	scaffold_7/1557627-1557731	6,15	-4,83
80649	scaffold_3/4614063-4614312	5,15	-1,95
77050	scaffold_1/3768890-3769513	6,73	-7,14
86467	scaffold_12/343883-344588	#N/A	-3,86
86354	scaffold_11/902332-902555	#N/A	-7,30
83611	scaffold_6/1910377-1910660	7,46	-4,25
84460	scaffold_7/1737557-1738078	6,55	-2,76
86022	scaffold_10/1160379-1161128	#N/A	-3,95
82518	scaffold_5/1533459-1534490	5,18	-5,97
83098	scaffold_6/117553-120449	7,51	-5,77
79776	scaffold_3/1783458-1784549	6,79	-4,68
76230	scaffold_1/1082263-1082508	7,04	-3,62
84929	scaffold_8/1056348-1056794	5,23	-3,67
77527	scaffold_1/5438029-5438439	6,46	-3,95
84406	scaffold_7/1557038-1557444	6,99	-2,84
81030	scaffold_4/983106-985686	7,71	-6,46
80938	scaffold_4/713508-714012	7,15	-4,10
79278	scaffold_3/124858-125136	7,46	-3,74
85623	scaffold_9/1396263-1396750	6,32	-3,30
85642	scaffold_9/1466049-1466356	7,09	-7,26
84958	scaffold_8/1160742-1161010	6,22	-3,84
82471	scaffold_5/1385520-1386187	6,51	-4,33
84406	scaffold_7/1556364-1556890	6,07	-3,05
79493	scaffold_3/887762-888202	7,18	-3,96
83227	scaffold_6/597550-597630	#N/A	-7,24
86627	scaffold_13/5884-6047	5,85	-3,19
76229	scaffold_1/1081086-1081463	6,22	-3,04
76403	scaffold_1/1640877-1641371	#N/A	-4,51
78466	scaffold_2/2517721-2517834	5,79	-4,77
83695	scaffold_6/2169946-2170141	5,61	-2,10

81492	scaffold_4/2473055-2473493	7,30	-2,69
78304	scaffold_2/1982995-1983659	#N/A	-1,04
12058	scaffold_14/170597-170684	#N/A	-5,88
78304	scaffold_2/1982174-1982848	#N/A	-2,62
78325	scaffold_2/2063997-2064857	7,34	-3,34
83973	scaffold_7/120965-121366	5,14	-3,08
83735	scaffold_6/2299412-2299851	#N/A	-2,32
76941	scaffold_1/3394456-3394653	#N/A	-4,94
85423	scaffold_9/724950-726074	6,85	-4,32
79285	scaffold_3/155187-155833	6,32	-4,20
84944	scaffold_8/1104658-1105011	6,28	-2,34
86787	scaffold_13/523594-524166	6,53	-3,09
12058	scaffold_14/191369-191524	#N/A	-4,99
84646	scaffold_8/153294-153408	5,72	-5,87
83826	scaffold_6/2608182-2608596	5,42	-2,40
85223	scaffold_9/103157-103529	7,34	-2,10
85857	scaffold_10/603983-604549	6,99	-4,10
84944	scaffold_8/1104133-1104555	6,42	-4,54
79511	scaffold_3/942512-942677	6,27	-4,88
86335	scaffold_11/829803-830513	7,26	-4,58
82833	scaffold_5/2511750-2512073	6,99	-3,26
83411	scaffold_6/1241223-1241662	6,61	-1,76
81899	scaffold_4/3843333-3844379	6,91	-4,22
78926	scaffold_2/3986963-3987698	6,67	-3,45
84773	scaffold_8/559478-559878	#N/A	-4,04
83986	scaffold_7/171315-171894	7,20	-3,87
80992	scaffold_4/871849-872545	5,92	-1,76
77205	scaffold_1/4306555-4307445	6,28	-3,24
94382	scaffold_3/877162-877947	5,97	-1,83
86261	scaffold_11/594283-595659	6,95	-4,19
83353	scaffold_6/1031039-1031890	6,85	-1,60
84657	scaffold_8/197621-198326	5,50	-1,88
77020	scaffold_1/3653999-3654359	7,21	-4,64
78887	scaffold_2/3868791-3868871	#N/A	-8,33
76982	scaffold_1/3517472-3518170	5,83	-1,67
85309	scaffold_9/378459-378911	7,57	-3,72
84773	scaffold_8/560127-560715	6,08	-3,61
81795	scaffold_4/3482338-3483366	6,22	-3,36
81796	scaffold_4/3488671-3489699	6,22	-3,36
76077	scaffold_1/596743-597906	7,02	-3,69
81619	scaffold_4/2940973-2941407	7,49	-1,92
84461	scaffold_7/1739400-1739807	5,90	-1,71
77036	scaffold_1/3714910-3715365	5,93	-2,39
83986	scaffold_7/170791-171256	6,93	-3,06
76488	scaffold_1/1902838-1904074	7,92	-4,87
83187	scaffold_6/431301-432410	5,94	-2,69
84912	scaffold_8/997021-997518	5,38	-3,15
84406	scaffold_7/1557907-1558038	6,03	-3,36
76230	scaffold_1/1082753-1083250	6,83	-5,10
83986	scaffold_7/168910-169627	7,66	-4,12

77325	scaffold_1/4737163-4737339	7,18	-2,70
77038	scaffold_1/3725858-3726466	5,18	-3,73
76158	scaffold_1/860701-862188	6,25	-4,17
82415	scaffold_5/1225644-1227101	6,25	-4,17
84406	scaffold_7/1556113-1556219	#N/A	-7,86
83549	scaffold_6/1695393-1695862	6,75	-4,35
84826	scaffold_8/723873-724404	5,66	-3,24
86260	scaffold_11/586459-587172	7,02	-3,70
86330	scaffold_11/808707-809099	6,80	-2,77
78207	scaffold_2/1654828-1655468	5,98	-1,80
85624	scaffold_9/1397600-1398069	5,92	-1,87
80938	scaffold_4/714079-715358	7,03	-1,93
84919	scaffold_8/1023557-1024216	6,84	-2,93
77142	scaffold_1/4092560-4093255	5,12	-1,15
84945	scaffold_8/1106093-1106927	6,94	-3,87
95230	scaffold_5/2699985-2700489	5,68	-1,60
95350	scaffold_6/1124217-1124721	5,68	-1,60
94937	scaffold_4/3208386-3208890	5,66	-1,60
85309	scaffold_9/378995-379313	5,78	-1,70
76071	scaffold_1/576695-577080	7,55	-1,60
83115	scaffold_6/177828-177954	#N/A	-6,43
78520	scaffold_2/2681154-2681873	5,72	-2,59
80750	scaffold_4/46056-46615	7,03	-2,71
79511	scaffold_3/942165-942452	5,64	-1,17
77620	scaffold_1/5748217-5748461	6,77	-2,05
78345	scaffold_2/2139284-2140603	6,70	-2,76
77620	scaffold_1/5748514-5748766	7,08	-3,14
82247	scaffold_5/671457-672308	6,24	-2,57
86417	scaffold_12/198534-198891	7,25	-2,04
84880	scaffold_8/891752-892285	6,69	-3,56
79798	scaffold_3/1838134-1839573	6,28	-3,94
77325	scaffold_1/4736719-4737143	5,78	-2,23
80110	scaffold_3/2832513-2833293	6,78	-1,74
82337	scaffold_5/974886-975284	4,37	-1,34
85526	scaffold_9/1064948-1065522	6,30	-3,26
77503	scaffold_1/5325916-5326458	5,89	-1,60
79713	scaffold_3/1574919-1575739	7,57	-2,12
13790	scaffold_11/701013-701644	5,71	-3,08
82579	scaffold_5/1705057-1705938	5,48	-1,43
82472	scaffold_5/1386278-1386946	6,92	-2,28
84478	scaffold_7/1792947-1793777	6,58	-3,01
78553	scaffold_2/2800703-2801268	6,17	-4,87
85021	scaffold_8/1366997-1367586	6,29	-2,96
93912	scaffold_1/4880123-4880627	5,96	-1,67
85822	scaffold_10/478662-479450	6,48	-2,20
80749	scaffold_4/44011-44666	5,79	-3,41
85421	scaffold_9/713690-714001	7,60	-2,55
79753	scaffold_3/1704439-1705752	6,87	-3,20
81619	scaffold_4/2942169-2942519	5,83	-5,39
81974	scaffold_4/4081808-4082279	6,35	-1,96

92875	scaffold_8/527049-528043	7,33	-3,30
77039	scaffold_1/3726747-3728591	6,91	-1,69
75923	scaffold_1/89768-90466	6,74	-3,33
80762	scaffold_4/98233-98744	5,96	-2,64
84987	scaffold_8/1244913-1245597	7,31	-4,44
94937	scaffold_4/3207902-3208330	5,03	-4,78
93912	scaffold_1/4880683-4881111	5,00	-4,85
95230	scaffold_5/2699501-2699929	5,00	-4,85
95350	scaffold_6/1123733-1124161	4,99	-4,90
77620	scaffold_1/5748823-5748960	#N/A	-6,95
78952	scaffold_2/4054027-4054572	5,62	-2,30
78302	scaffold_2/1972074-1973272	5,80	-2,94
81974	scaffold_4/4081436-4081756	5,40	-0,67
82337	scaffold_5/975873-976423	5,00	-1,81
85972	scaffold_10/971414-971814	4,94	-1,40
82208	scaffold_5/579078-579439	6,41	-2,25
76601	scaffold_1/2273087-2273423	6,40	-4,56
85468	scaffold_9/866120-866442	6,06	-3,88
78011	scaffold_2/1011977-1012132	#N/A	-5,05
77392	scaffold_1/4949308-4950310	6,88	-1,67
86665	scaffold_13/113555-113838	5,63	-4,54
85823	scaffold_10/480769-482154	6,49	-2,82
82026	scaffold_4/4254335-4254765	5,88	-2,34
85066	scaffold_8/1517145-1517723	5,93	-1,65
86930	scaffold_19/3514-4305	6,55	-4,28
76838	scaffold_1/3062334-3062715	6,49	-3,30
78926	scaffold_2/3987729-3988516	5,37	-2,13
86476	scaffold_12/381044-381493	5,78	-2,28
85556	scaffold_9/1162881-1163279	6,57	-0,51
77282	scaffold_1/4571983-4572828	6,02	-2,10
78743	scaffold_2/3368696-3369199	7,01	-1,82
75939	scaffold_1/141945-142387	#N/A	-3,46
86485	scaffold_12/412121-412755	6,43	-2,55
85742	scaffold_10/206845-207520	6,52	-1,62
84203	scaffold_7/868046-868696	7,30	-2,59
85731	scaffold_10/171393-172046	7,28	-5,10
77203	scaffold_1/4299268-4300776	7,07	-3,00
83994	scaffold_7/202031-203362	6,48	-1,98
80623	scaffold_3/4533270-4533629	6,88	-3,33
86022	scaffold_10/1159093-1160364	#N/A	-2,45
76330	scaffold_1/1396153-1396563	#N/A	-2,82
82275	scaffold_5/770918-771475	6,18	-2,97
77171	scaffold_1/4195276-4195774	6,09	-2,30
84957	scaffold_8/1158944-1159311	6,09	-3,80
85642	scaffold_9/1465434-1466006	7,16	-2,73
77520	scaffold_1/5401597-5402614	6,45	-2,40
85164	scaffold_8/1842895-1843293	5,55	-1,45
86260	scaffold_11/587613-587843	#N/A	-2,85
82417	scaffold_5/1232933-1233287	6,11	-2,65
78167	scaffold_2/1505433-1506736	6,39	-1,71

78424	scaffold_2/2389587-2390063	7,40	-2,82
85892	scaffold_10/698033-698745	6,37	-2,18
85565	scaffold_9/1194439-1195285	6,90	-2,16
79577	scaffold_3/1142121-1142864	6,04	-4,15
82385	scaffold_5/1120412-1121026	5,06	-1,88
86685	scaffold_13/169909-170206	5,80	-3,31
83142	scaffold_6/262675-263007	6,32	-2,68
80443	scaffold_3/3941319-3941570	6,27	-3,38
78011	scaffold_2/1012203-1012388	5,82	-2,09
77331	scaffold_1/4760885-4761330	5,18	-1,62
80061	scaffold_3/2703221-2706571	6,72	-2,67
79134	scaffold_2/4622978-4623681	7,02	-2,13
85793	scaffold_10/380803-381465	6,06	-1,23
76105	scaffold_1/689628-690463	5,90	-2,21
79714	scaffold_3/1576827-1577282	5,32	-1,92
78120	scaffold_2/1345771-1347165	6,09	-2,33
79907	scaffold_3/2179529-2179845	4,86	-2,09
79959	scaffold_3/2368958-2370289	7,37	-3,15
85846	scaffold_10/568235-568855	5,82	-0,14
83695	scaffold_6/2170419-2171438	7,17	-3,58
83652	scaffold_6/2033515-2034074	6,99	-3,02
86294	scaffold_11/701954-702426	5,20	-3,50
79183	scaffold_2/4804199-4804775	7,31	-1,60
76941	scaffold_1/3395233-3395554	7,62	-3,08
94870	scaffold_4/2430874-2431477	7,07	-4,89
86048	scaffold_10/1244037-1244474	#N/A	-3,64
80244	scaffold_3/3257954-3258378	5,81	-4,20
80211	scaffold_3/3150334-3150771	5,67	-1,82
85168	scaffold_8/1862310-1862470	#N/A	-3,99
82578	scaffold_5/1703889-1704440	6,22	-0,79
79061	scaffold_2/4401629-4402084	5,95	-0,93
16281	scaffold_3/2835438-2836250	6,28	-2,44
85794	scaffold_10/382317-383973	7,18	-2,19
85973	scaffold_10/971898-972629	7,19	-1,34
85565	scaffold_9/1193514-1194184	4,94	-1,27
86602	scaffold_12/857249-857737	7,61	-1,10
92716	scaffold_7/1275720-1276037	#N/A	-7,25
51581	scaffold_11/91274-92019	#N/A	-5,83
51423	scaffold_10/410047-410184	#N/A	-32,45
74643	scaffold_6/2729235-2729275	#N/A	-7,71
48689	scaffold_4/1252257-1253194	#N/A	-6,84
92980	scaffold_8/1564394-1564475	#N/A	-29,72
72854	scaffold_3/1273720-1274159	#N/A	-9,70
95577	scaffold_7/1416581-1416786	#N/A	-6,65
85223	scaffold_9/102724-103103	6,96	-1,35
89225	scaffold_8/130841-131393	#N/A	-4,90
22967	scaffold_3/3643147-3643280	#N/A	-6,77
51876	scaffold_13/120191-121221	#N/A	-6,25
85168	scaffold_8/1863231-1863332	#N/A	-13,36
88244	scaffold_4/476836-477179	#N/A	-8,11

91077	scaffold_3/1288206-1288596	#N/A	-8,95
95922	scaffold_10/633425-634769	#N/A	-10,09
94043	scaffold_2/976328-976736	#N/A	-9,52
90193	scaffold_1/3838489-3839674	#N/A	-8,78
93857	scaffold_1/3992924-3992966	#N/A	-9,61
93203	scaffold_10/195731-195897	#N/A	-7,47
24857	scaffold_1/702120-702316	#N/A	-9,52
46499	scaffold_1/4749123-4750048	#N/A	-7,34
93645	scaffold_1/1053113-1054103	#N/A	-10,64
29038	scaffold_6/605338-605904	#N/A	-8,69
92041	scaffold_5/729937-730268	#N/A	-9,50
33552	scaffold_2/422848-422919	#N/A	-11,76
48455	scaffold_3/4670515-4670911	#N/A	-6,53
91402	scaffold_3/4117638-4117778	#N/A	-8,07
92570	scaffold_6/2760005-2760624	#N/A	-7,03
36390	scaffold_3/4296474-4296740	#N/A	-8,80
94536	scaffold_3/2643999-2644281	#N/A	-8,38
77956	scaffold_2/833114-833305	#N/A	-10,86
80654	scaffold_3/4629093-4629267	#N/A	-9,10
86368	scaffold_11/938859-939465	#N/A	-2,00
47807	scaffold_3/1419586-1420132	#N/A	-9,27
86166	scaffold_11/257376-257712	#N/A	-8,11
93062	scaffold_9/424451-424559	#N/A	-7,25
37397	scaffold_3/136174-136288	#N/A	-5,66
96051	scaffold_12/369713-370797	#N/A	-6,72
31141	scaffold_1/752396-752498	#N/A	-9,87
85828	scaffold_10/502786-502979	#N/A	-10,06
90818	scaffold_2/3893535-3893918	#N/A	-10,43
32849	scaffold_1/3239157-3239235	#N/A	-29,54
94604	scaffold_3/3519451-3520227	#N/A	-7,31
68938	scaffold_1/4746767-4749128	#N/A	-6,50
73988	scaffold_5/815750-816240	#N/A	-7,39
84706	scaffold_8/344075-345596	#N/A	-6,58
30166	scaffold_8/1879318-1879423	#N/A	-30,46
95149	scaffold_5/1784359-1784758	#N/A	-6,35
82648	scaffold_5/1952247-1953638	#N/A	-29,39
81516	scaffold_4/2558370-2558802	#N/A	-9,15
77956	scaffold_2/833364-833655	#N/A	-11,95
38503	scaffold_4/574133-574320	#N/A	-11,04
27316	scaffold_3/3108420-3108834	#N/A	-10,90
77956	scaffold_2/832264-832379	#N/A	-29,51
71324	scaffold_1/454420-455337	#N/A	-9,36
47486	scaffold_2/4479725-4480705	#N/A	-7,55
87857	scaffold_3/668768-668985	#N/A	-11,24
81072	scaffold_4/1112288-1112426	#N/A	-9,69
87086	scaffold_1/1875448-1875577	#N/A	-10,07
46499	scaffold_1/4750110-4750958	8,57	-8,39
27973	scaffold_4/2067164-2067348	#N/A	-8,48
78571	scaffold_2/2853958-2854357	#N/A	-9,10
88271	scaffold_4/776350-776959	#N/A	-8,25

83918	scaffold_6/2858471-2859364	#N/A	-7,29
93062	scaffold_9/423721-424269	#N/A	-4,59
93062	scaffold_9/423194-423655	#N/A	-4,76
94953	scaffold_4/3404947-3405505	#N/A	-4,41
88145	scaffold_3/4069661-4070267	#N/A	-10,38
94043	scaffold_2/975955-976278	#N/A	-6,02
46975	scaffold_2/1686635-1686748	#N/A	-8,85
68860	scaffold_1/3433294-3433702	#N/A	-29,94
95149	scaffold_5/1783237-1783640	#N/A	-5,65
94247	scaffold_2/3976958-3977505	#N/A	-8,55
95149	scaffold_5/1784832-1785233	#N/A	-6,14
79017	scaffold_2/4259822-4260259	#N/A	-9,26
83860	scaffold_6/2713097-2713201	#N/A	-9,04
94525	scaffold_3/2502239-2502569	#N/A	-8,62
95149	scaffold_5/1783703-1784287	#N/A	-6,33
90885	scaffold_2/4478570-4478892	#N/A	-10,07
45670	scaffold_1/543290-543626	#N/A	-6,57
73657	scaffold_4/2592958-2594773	#N/A	-9,93
91508	scaffold_4/315603-316078	#N/A	-8,98
45935	scaffold_1/1755176-1755426	#N/A	-8,86
93776	scaffold_1/2712159-2712637	#N/A	-7,18
13065	scaffold_5/2626372-2627244	#N/A	-8,16
77853	scaffold_2/520771-522126	#N/A	-4,93
73807	scaffold_4/3682880-3683403	#N/A	-10,83
45585	scaffold_38/2409-3386	1,25	0,21
27711	scaffold_4/652566-652815	#N/A	-7,38
76922	scaffold_1/3325236-3325340	#N/A	-8,94
90826	scaffold_2/3973228-3973298	#N/A	-8,02
29653	scaffold_7/1176028-1176141	#N/A	-8,74

Tabla S4. Distribución de siRNAs unidos a Ago-1 entre las diferentes clases de ex-siRNAs. Se indica el \log_2 de la tasa de cambio de los siRNAs unidos a Ago-1 en la estirpe silvestre respecto al mutante *ago-1⁻*, para las clases I, II, III y IV de ex-siRNAs. Se muestra también el \log_2 de la tasa de cambio de los ex-siRNAs en el mutante *ago-1⁻* respecto al silvestre, para comparación. Las clases I, II, III y IV se señalan con fondo amarillo, blanco, azul y gris, respectivamente. N/A: no detectado.

