



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Diversidad y ecología de los Mucorales

Dolores Pérez de Camino Cantos

Tesis Doctoral

Departamento de Genética

Universidad de Sevilla

2015

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar al Prof. Enrique Cerdá Olmedo el haber apostado por mí en los inicios de mi carrera científica y ofrecerme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en su grupo de investigación, donde me he formado como persona y como profesional. También quiero mostrar mi agradecimiento de una manera especial al Prof. Javier Ávalos Cordero por su disponibilidad y sus consejos, que han sido de gran ayuda en estos años.

Parte de los resultados aquí expuestos se obtuvieron bajo la supervisión del Prof. Alexander Idnurm en la Universidad de Misuri-Kansas City, cuya implicación y entusiasmo impulsaron mi trabajo. Las estancias en dicha Universidad no hubieran sido lo mismo sin la acogida de la Dra. Silvia Polaino Orts, a la que agradezco su apoyo incondicional en la carrera de fondo que ha significado esta Tesis.

Asimismo, quiero destacar la colaboración del Prof. Francisco Ramos Morales en la experimentación con ratones; de los Profes. Carlos Herrera Maliani y Gabriel Gutierrez Pozo en los análisis de datos y filogenéticos; y de las personas que nos facilitaron las muestras biológicas, en especial del Dr. Javier Ramos Guelfo, que además participó activamente en la caracterización de las nuevas estirpes españolas. En el último tramo de elaboración de esta Tesis han sido de gran ayuda las sugerencias y correcciones de las Dras. M^a Jesús Rodríguez Palero (Machupi) y Marta Castrillo, del Dr. Victor García Tagua y de Marta Pérez Alcántara, a los que agradezco el tiempo dedicado.

Han sido demasiados años los pasados en el Departamento de Genética para poder enumerar a todos los compañeros que me han ayudado, enseñado y compartido conmigo malos y, mucho más numerosos, buenos momentos. GRACIAS A TODOS porque en esta Tesis Doctoral hay un poco de CADA UNO. Es un privilegio formar parte de este Departamento, un lugar donde es posible formarse como científico y disfrutar haciéndolo.

El trabajo aquí presentado ha sido financiado por proyectos de varios Ministerios del Gobierno de España y de la Junta de Andalucía, así como, en su última etapa, por la Fundación Villar Mir.

Índice

Introducción

1. Los hongos	9
2. Los Mucorales	10
3. <i>Phycomyces</i>	13
3.1 Primeras descripciones	13
3.2 Ciclo de vida vegetativo	14
3.3 Ciclo de vida sexual	17
3.4 Las especies de <i>Phycomyces</i>	18
4. <i>Blakeslea</i>	20
4.1 Ciclos de vida de <i>Blakeslea</i>	21
5. Carotenos y apocarotenoides	22
5.1 Biosíntesis	23
5.2 Producción industrial	25
6. Sexualidad	26
6.1 Respuesta sexual	27
6.2 Genes del sexo	28

Resultados

Capítulo I

Vida silvestre de <i>Phycomyces</i>	31
1. Aislamiento de nuevas estirpes de <i>Phycomyces</i>	31
1.1 <i>Phycomyces</i> de La Saucedá, en la Serranía de Ronda	31
1.2 Otras búsquedas de <i>Phycomyces</i> en España	37
1.3 Otros aislamientos en España y Estados Unidos de América	38
2. Asociación de <i>Phycomyces</i> con pequeños roedores	40

Capítulo II

Diversidad fenotípica de las estirpes naturales de <i>Phycomyces</i>	45
1. Tamaño y forma de las esporas	46
2. Número de núcleos	47
3. Crecimiento micelial	48
4. Contenido de caroteno β	49
5. Fotosensibilidad de los esporangióforos	51

Capítulo III

Diversidad genética de las estirpes naturales de <i>Phycomyces</i>	53
1. ADN para ARN ribosómico de <i>Phycomyces</i>	53
2. Comportamiento sexual y alelomorfos sexuales de <i>Phycomyces</i>	55
3. Diversidad del genoma de estirpes naturales de <i>P. blakesleeanus</i>	60

Capítulo IV	
Diversidad genética de <i>Blakeslea trispora</i>	65
1. ADN para ARN ribosómico en <i>Blakeslea trispora</i>	65
2. Comportamiento sexual y alelomorfos sexuales de <i>Blakeslea trispora</i>	67
3. Duplicación reciente de los genes <i>carB</i> y <i>carRA</i> en <i>Blakeslea trispora</i>	68
Discusión	
1. El género <i>Phycomyces</i>	75
1.1 Especies de <i>Phycomyces</i>	75
1.2 Distribución geográfica	75
1.3 Poblaciones locales	76
1.4 Asociación de <i>Phycomyces</i> con pequeños mamíferos	77
2. El género <i>Blakeslea</i>	79
2.1 Géneros y especies	79
2.2 Genes de la carotenogénesis de <i>Blakeslea</i>	79
3. Los Mucorales	80
3.1 Determinación sexual	80
3.2 Organización del ADN para el ARN ribosómico	82
3.3 Cladogramas de los Mucorales	83
3.4 Ciclos de vida de los Mucorales	84
Materiales y métodos	
1. Materiales biológicos y cultivos	87
1.1 Estirpes de Mucorales	87
1.2 Cultivos de Mucorales	88
1.3 Cultivos de <i>Escherichia coli</i>	89
2. Aislamiento de estirpes de <i>Phycomyces</i>	89
3. Análisis morfológicos y fisiológicos	89
3.1 Morfología de las esporas de <i>Phycomyces</i>	89
3.2 Medida del crecimiento	90
3.3 Análisis del fototropismo	90
3.4 Análisis de carotenos	90
3.5 Activación química de la carotenogénesis de <i>P. nitens</i>	91
3.6 Análisis del comportamiento sexual	91
4. Manipulación de pequeños roedores	91
5. Genética molecular	91
5.1 Extracción de ADN	92
5.2 Electroforesis de ADN	92
5.3 Restricción enzimática	92
5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	93
5.4.1 Polimerasas	93

5.4.2 Cebadores	93
5.4.3 Purificación de ADN	96
5.5 Secuenciación	96
5.6 Transformación de <i>E. coli</i>	96
5.7 Hibridación de ADN con sonda radiactiva	96
5.7.1 Transferencia de ADN de geles de agarosa a membrana	96
5.7.2 Sondas radiactivas para la hibridación de ácidos nucleicos	97
5.7.3 Hibridación y revelado	98
6. Informática	98
6.1 Análisis de secuencias de ADN y proteínas	98
6.2 Análisis estadísticos	99
Bibliografía	101
Conclusiones	115

Introducción

1. Los hongos

Bajo la denominación de hongos se agrupan organismos muy diversos, cuya clasificación dentro de los seres vivos ha sido difícil de establecer. La mayoría de ellos son saprobios, aunque los hay simbioses (líquenes y micorrizas) y parásitos de otros hongos, algas o animales.

Los hongos son eucariontes no fotosintéticos cuyas paredes contienen quitina y glucanos, pero no celulosa. Producen unas estructuras de resistencia denominadas esporas, que pueden resultar de procesos sexuales o asexuales. En su mayoría carecen de flagelos, pero cuando los tienen no presentan mastigonemas.

Los hongos son conocidos desde la remota antigüedad como alimentos, venenos y alucinógenos. Se han usado inadvertidamente para producir bebidas y alimentos fermentados, como pan, cerveza, vino y queso. La industria moderna los usa como fuente de muchos compuestos útiles con variadas aplicaciones.

En la práctica se distinguen los hongos filamentosos de las levaduras. Los primeros están formados por filamentos, denominados hifas, que juntas componen un micelio, el cual tiene parte vegetativa y parte reproductiva. Las segundas son unicelulares y no se diferencian en ellas la parte vegetativa y la reproductiva. Esta distinción práctica no debe considerarse científica, ya que las dos formas pueden estar estrechamente emparentadas y muchos hongos son dimórficos, es decir, cambian de una a otra durante sus ciclos vitales o en respuesta a condiciones ambientales.

Los hongos no fueron oficialmente reconocidos como un reino aparte de las plantas y los animales hasta 1969 (Whittaker, 1969). Las herramientas moleculares aplicadas a la filogenia de los tres reinos confirmaron que son grupos monofiléticos separados (Wainright *et al.*, 1993) y sugirieron que los hongos están más cerca de los animales que de las plantas (Baldauf y Palmer, 1993).

La diversidad de los hongos ha hecho de su taxonomía una cuestión compleja a la que se han dedicado muchas investigaciones. En esta tesis adoptaremos nombres vulgares para designar en minúsculas los distintos grupos de organismos y evitar las

terminaciones correspondientes a los niveles taxonómicos atribuidos por diversos autores. Los hongos más conocidos son los ascomicetos (*Ascomycota*, *Ascomycetes*, *Ascomycotina*) y los basidiomicetos (*Basidiomycota*, *Basidiomycetes*, *Basidiomycotina*), que conjuntamente constituyen los *Dikarya* (Fig. 1). Esta denominación se debe a que presentan una fase dicariótica en su ciclo sexual que transcurre entre la fusión de células de sexo opuesto (plasmogamia) y la fusión nuclear (cariogamia). El resto de los hongos fueron denominados durante muchos años ficomicetos (*Phycomycetes*), agrupando bajo esta denominación organismos completamente distintos. Aún numerosos artículos científicos, generalmente dedicados a las infecciones con hongos filamentosos, continúan utilizando este término incorrecto (Mohanty *et al.*, 2010). La aplicación de los análisis moleculares a la filogenia ha permitido precisar los grupos basales del reino, entre ellos los cigomicetos (*Zygomycota*, *Zygomycetes*, *Zygomycotina*). Estos son hongos que se reproducen sexualmente mediante la fusión de dos hifas especializadas, llamadas gametangios, que dan lugar a unas estructuras sexuales cenocíticas de resistencia, denominadas cigosporas (Fig. 1).

2. Los Mucorales

Los Mucorales (*Mucoromycotina*, *Mucorales*, *Mucorineae*) son el grupo más extenso de los cigomicetos. Para su reproducción vegetativa desarrollan unas estructuras denominadas esporangióforos, en cuyos extremos se diferencian los esporangios en los que se producen las esporangiosporas, que llamaremos simplemente esporas. En muchos casos la forma y tamaño de estas estructuras reproductivas son claves para la determinación de las especies. Aunque muchos Mucorales son heterotálicos, los hay también homotálicos y otros en los que aún no se conoce el ciclo sexual.

Son organismos generalmente saprobios, que aparecen en los restos de materia orgánica, en los que suceden a las poblaciones de bacterias y se alimentan de ellas (Harper y Webster, 1964). Esta posición ecológica es debida a su crecimiento relativamente rápido y a su incapacidad para utilizar la celulosa y otros polisacáridos. Aunque los Mucorales son predominantemente saprobios, también los hay parásitos de plantas, hongos y animales (Ingold, 1978).

Son exclusivamente terrestres y se encuentran en multitud de sustratos, como frutos, flores, heces de vertebrados y cadáveres de insectos (Hoffmann *et al.*, 2013; Walther *et al.*, 2013). Muchos de ellos tienen esporas que se dispersan por el aire; algunos, como *Pilobolus*, poseen mecanismos de expulsión de las esporas, pero ninguno de ellos desarrolla esporas móviles.

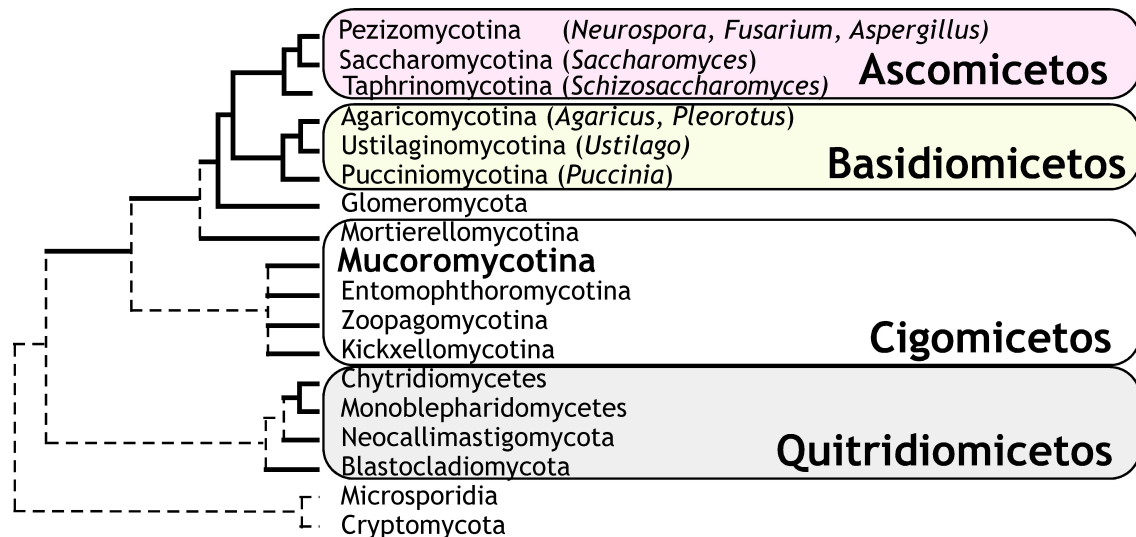


Fig. 1 Cladograma representativo de las relaciones entre los distintos grupos de hongos. Adaptación del cladograma elaborado por Hoffmann *et al.* (2013) a partir de los grupos propuestos por Hibett *et al.* (2007), James *et al.* (2006) y Schoch *et al.* (2012). Las líneas discontinuas indican relaciones poco seguras.

Varios Mucorales tienen cierta relevancia en la industria y la agricultura. Algunos producen alimentos fermentados (Hesseltine, 1991) y otros metabolitos útiles en alimentación, cosmética o farmacia. Algunas especies tienen una alta capacidad descomponedora y son peligrosas para la conservación de frutos y vegetales almacenados (Ray y Ravi, 2005).

Hay Mucorales que son parásitos facultativos de hongos, como es el caso de *Syzygites megalocarpus* y *Spinellus fusiger* (Zycha *et al.*, 1969). Incluso, los hay parásitos de otros Mucorales, como algunas especies de *Piptocephalis* y *Dimargaris*, parásitas de *Phycomyces blakesleeanus*.

Entre los Mucorales hay patógenos oportunistas de individuos inmunodeprimidos, lo que les da importancia clínica. Las infecciones humanas por Mucorales, denominadas mucormicosis, son producidas por algunas especies de los géneros *Rhizopus*, *Mucor* y *Absidia*, capaces de reproducirse a 37 °C, que acceden a sus hospedadores por inhalación de esporas (Ribes *et al.*, 2000). La pared de quitina los hace fácilmente detectables por el sistema inmune, de ahí que el riesgo se concentre en los enfermos con deficiencia inmunológica.

La taxonomía de los cigomicetos, basada tradicionalmente en criterios morfológicos, se ha enriquecido con criterios moleculares (White *et al.*, 2006; Liu y Voigt, 2010). El Fungal Barcoding Consortium había propuesto como marcador universal de los hongos, o “barcode”, la secuencia compuesta por los espaciadores transcribibles internos del ADN para el ARN ribosómico, ITS1 e ITS2, y el ADN para el ARN ribosómico,

ARNr 5.8S, situado entre ellos (O'Donnell *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2004; Schoch *et al.*, 2012). Se ha demostrado que esta secuencia, que abreviaremos ITS/5.8S, es útil para discriminar las especies de los Mucorales (Vitale *et al.*, 2012; Hoffmann *et al.*, 2013; Walther *et al.*, 2013).

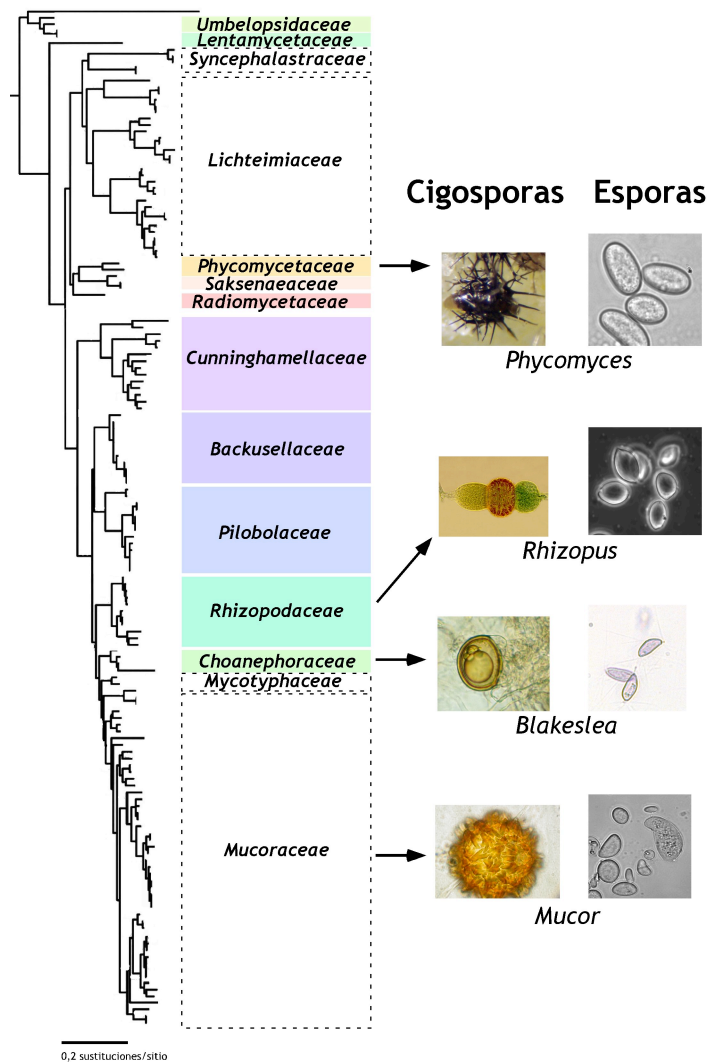


Fig. 2 Cladograma de los Mucorales realizado con la combinación de las secuencias de ADN para ARN ribosómico, la actina y el factor de elongación α (adaptación de Hoffmann *et al.*, 2013). Las familias que no están establecidas sólidamente se recuadran con líneas discontinuas. (Derecha) Imágenes de las cigosporas y las esporas de géneros relevantes en esta Tesis. Las cigosporas de *Phycomyces* son aproximadamente diez veces mayores que las de los otros géneros representados.

Los trabajos más recientes establecen con bastante robustez las relaciones filogenéticas de la mayoría de las especies de los Mucorales, delimitando con claridad algunas familias y tratando de explicar la complejidad de otras (Hoffmann *et al.*, 2013; Walther *et al.*, 2013). Se han propuesto catorce familias, 10 de las cuales se pueden considerar sólidamente establecidas (Fig. 2).

La familia *Mucoraceae*, sobre todo el género *Mucor*, incluye muchos organismos heterogéneos y poco o mal definidos. Esta situación ha hecho que la familia *Mucoraceae* aparezca como un “cajón de sastre” que reúne organismos muy diferentes y que está necesitada de nuevos estudios.

La diversidad interna de las especies de mucorales ha sido escasamente estudiada. Las especies implicadas en procesos patogénicos y las utilizadas en la industria han sido las únicas investigadas desde este punto de vista debido a su interés sanitario y económico (Roden *et al.*, 2005). En los análisis de las poblaciones locales han sido muy resolutivas las herramientas moleculares disponibles actualmente (Takó y Csernetics, 2005; Hermet *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2012).

3. *Phycomyces*

Este apartado se basa en gran parte en la revisión de Bergman *et al.* (1969) y en el libro “*Phycomyces*” (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987).

3.1 Primeras descripciones

Phycomyces fue descrito por primera vez por el botánico sueco Agardh a principios del siglo XIX (Agardh, 1817). Lo encontró en las paredes de un molino de aceite en Frugård (ahora Alikartano, Mäntsälä, Finlandia), en una finca propiedad de la familia Nordenskiöld, famosa por sus científicos y exploradores. En la descripción que hace del primer espécimen se destacan las principales características del organismo: “*Fronde aggregatæ, maxime nitentes, longitudine ultra palmares, diametro vix semilineæ, æquales, filiformes, olivaceo-virides, membrana tenuissima conflata. Exsiccatione collabitur, chartæ non adhæret, nitet, tamque tenuis est, ut minimo halitu moveatur*” (Agardh, 1817).

Su descubridor erró al designarlo como *Ulva nitens*, incluyéndolo en el grupo de las algas tubulares del género *Ulva*, más conocido por las “lechugas de mar” (*Ulva lactuca*). Este error no le impidió ser reconocido como experto botánico, rector de la Universidad de Lund y obispo de Karlstad.

Años más tarde, el botánico alemán Kunze lo halló en distintos lugares de Alemania (Kunze, 1823) y determinó que la especie *U. nitens* de Agardh era un hongo,

dándole el nombre de *Phycomyces nitens*. En él se recuerda el error, no sin riesgo de confusión, puesto que el nombre del género se compone de las palabras griegas usadas para “alga” (“φυκος”, “*phykos*”) y hongo (“μυκης”, “*mykes*”).

A lo largo del siglo XIX fueron numerosos los naturalistas, sobre todo en el norte de Europa, que encontraron nuevos especímenes de *Phycomyces* a los que asignaron nombres variados. Un ejemplo es Berkeley, que rechazó el nombre de *Phycomyces* y lo llamó *Mucor*, aunque le reconoció características que lo hacían destacar frente al resto : “*A gigantic mould...the prince of these powers of putrescence*” (Berkeley, 1860).

La estirpe de *Phycomyces* aislada más al sur fue la encontrada por Carnoy sobre heces humanas en una catacumba en Roma, denominándola *Mucor romanus*. En este texto, la asciende de “príncipe” a “rey”: “*Notre champignon, par la noblesse de son port, la richesse de ses teintes, les dimensions extraordinaires de ses tubes fructifères, de son sporange et de ses spores, pourrait être appelé à juste titre le roi des Mucor*” (Carnoy, 1870).

Carnoy fue quien investigó *Phycomyces* por primera vez en el laboratorio. Describió todo el ciclo vegetativo y con la tinción por cloruro de cinc yodado obtuvo los primeros resultados sobre la citología del organismo y su desarrollo. Desde este momento *Phycomyces* se convirtió en el organismo de trabajo utilizado en multitud de investigaciones.

3.2 Ciclo de vida vegetativo

Phycomyces es un hongo filamentoso, heterotálico, que presenta dos ciclos de vida, uno sexual y otro asexual o vegetativo (Fig. 3). Su micelio es un gran cenocito que extiende sus hifas radialmente por encima del sustrato sólido a una velocidad de ~20 mm al día. Cuando dos colonias de *Phycomyces* están a ~1 mm ralentizan su crecimiento hasta detenerse, pero no lo hacen cuando se acercan a colonias de otros Mucorales (Drinkard *et al.*, 1982). El micelio tiene un intervalo amplio de temperatura para crecer, de 4 °C a 30 °C; lo mismo ocurre con el pH, de 2,1 a 7,3 (Schopfer, 1937). En medio ácido el micelio limita su expansión y forma colonias restringidas.

La germinación de las esporas es el paso inicial del ciclo vegetativo a partir del cual empieza a desarrollarse el micelio (Fig. 3). Las estructuras de reproducción vegetativas, los esporangióforos, son hifas aéreas. Su contenido proviene del micelio, que se vacía dejando solo unas pequeñas masas citoplasmáticas dispersas, los propágulos. Estos funcionan de manera parecida a las esporas, puesto que emiten nuevas hifas si las condiciones ambientales lo permiten.

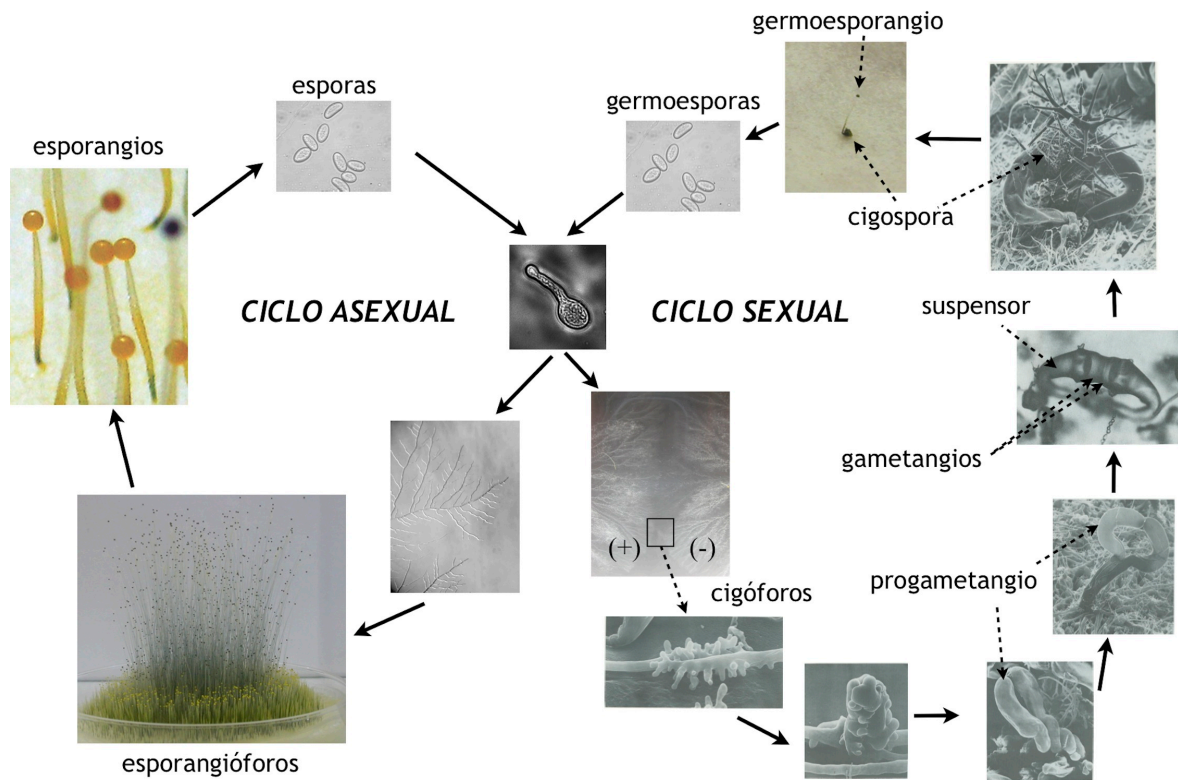


Fig. 3 Ciclos de vida de *Phycomyces*.

Los esporangi6foros se desarrollan en varias etapas, con periodos en los que crecen y otros en los que detienen su crecimiento (Errera, 1884; Bergman *et al.*, 1969). Inicialmente, el esporangi6foro se elonga por su 6pice y forma una esfera amarilla brillante que es el esporangio. En este se van acumulando n6cleos y citoplasma hasta que se forma un tabique, la columela, que separa al esporangio del resto del esporangi6foro. El contenido del esporangio se divide en compartimentos, que engloban grupos de n6cleos tomados al azar y se convierten en esporas (Heisenberg y Cerd6-Olmedo, 1968; Tu y Malhotra, 1976). El esporangio se vuelve de color negro metalizado y el esporangi6foro contin6a creciendo a velocidad constante ($\sim 1 \mu\text{m/s}$) durante varios d6as.

La robustez de la pared y la turgencia de su contenido permiten a los esporangi6foros de *Phycomyces* mantenerse erectos durante mucho tiempo a pesar de su altura. El agua constituye un 85 % de su masa y su pared est6 compuesta principalmente por quitina y quitosana. La conservaci6n de la presi6n interna del esporangi6foro requiere un complejo mecanismo de mantenimiento del equilibrio osm6tico que tiene como consecuencia el exudado de gotas de agua repletas de soluto que aparecen adheridas a la superficie de los esporangi6foros (Cosgrove *et al.*, 1987).

La esporulación en *Phycomyces* puede dar lugar a dos tipos de esporangióforos según las condiciones en las que se produzca. Unos, los macróforos, son de gran tamaño (hasta 20 cm de altura o más) y otros, los micróforos, más pequeños (1-3 mm). Los macróforos son los más comunes en las condiciones de trabajo en el laboratorio y nos referiremos a ellos como esporangióforos. Las altas concentraciones de esporas, el frío y la escasez de nutrientes estimulan el desarrollo de micróforos y la luz azul lo inhibe a partir de un umbral bajo (10^{-4} J/m²) (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1981; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990).

Los esporangióforos de *Phycomyces* responden a numerosos estímulos como la luz, la gravedad, los obstáculos o el viento, lo que los ha hecho el objeto de numerosas investigaciones (Cerdá-Olmedo, 2001).

Los esporangios, que contienen unas 10^5 esporas, como no se rompen espontáneamente ni poseen mecanismos de expulsión (Ingold y Zoberi, 1963), suelen liberarlas cuando entran en contacto con algún objeto. Las esporas se adhieren fácilmente a muchas superficies, pero no se dispersan eficazmente por el aire.

Las esporas son lisas y su pared está formada principalmente por polisacáridos (van Laere *et al.*, 1977). Son haploides y multinucleadas (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968), lo que permite la convivencia de genomas distintos en la misma célula. La proporción de genotipos en los heterocariontes se mantiene constante durante el crecimiento vegetativo y también en subcultivos obtenidos a partir de fragmentos de micelio. Esa proporción se puede calcular a partir de la distribución de fenotipos en los micelios obtenidos a partir de esporas (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968).

Varias técnicas permiten obtener heterocariontes en el laboratorio (Ootaki, 1973). Son especialmente fáciles de conseguir los heterocariontes sexuales, con núcleos de distinto sexo (Gauger *et al.*, 1980). Sus micelios no reaccionan con estirpes de ningún sexo, presentan una alta acumulación de carotenos y forman unas estructuras denominadas pseudóforos, que parecen estructuras abortivas del ciclo sexual.

Las esporas de *Phycomyces* permanecen en dormancia durante mucho tiempo, es decir, a diferencia de las de otros organismos, no germinan masivamente cuando encuentran condiciones apropiadas para el crecimiento vegetativo. En medio mínimo filtrado, no autoclavado, germinan diariamente el 0,1 % de las esporas. En medio autoclavado germina diariamente el 2 % porque la glucosa al calentarse se convierte en 5-hidroximetilfurfural, compuesto con cierta actividad sobre la germinación de las esporas (Rivero y Cerdá-Olmedo, 1994). Otros mecanismos modifican las bajas tasas de germinación; el más utilizado en el laboratorio es el choque térmico, que consiste en la incubación de las esporas en agua a 50 °C durante 3 min o a 48 °C durante 10 min (Robbins *et al.*, 1942; Halbsguth y Rudolph, 1959). Con este método germinan

prácticamente todas las esporas. Una activación similar es producida por ácidos carboxílicos de cadena corta, como el acetato (Rivero y Cerdá-Olmedo, 1987).

3.3 Ciclo de vida sexual

Cuando los extremos de las hifas de sexo opuesto se hallan a menos de 1 mm se ensanchan y desarrollan protuberancias irregulares, convirtiéndose en cigóforos (Fig. 3). Los cigóforos de sexos opuestos se encuentran como resultado de su crecimiento aleatorio y se entrelazan.

Los cigóforos apareados, o progametangios, se elevan sobre el sustrato proporcionando un aspecto característico a la superficie de los cultivos. Sus puntas continúan creciendo a ambos lados, formando como un par de pilares que luego se separan para formar un anillo parecido a unas tenazas cerradas con los ápices unidos.

En los extremos de los progametangios se desarrolla un septo transversal que los divide en gametangios y suspensores. Los septos mantienen la comunicación entre ambas partes a través de numerosos plasmodesmos. En los suspensores, cerca de los gametangios, aparecen apéndices similares a espinas, que se ramifican profusamente siguiendo patrones dicotómicos irregulares.

Los dos gametangios se funden por desaparición de las paredes que los separan y se mezclan sus contenidos para formar la cigospora. La cigospora joven contiene abundantes glóbulos de lípidos y miles de núcleos de ambos sexos. En las cigosporas jóvenes se produce una destrucción masiva de núcleos, que coincide con un aumento de nucleasas, quedando en la mayoría de los casos un solo núcleo de cada parental. En el proceso de maduración, la forma de la cigospora cambia de parecida a un reloj de arena a globular. La pared externa se rompe y una segunda pared se vuelve negra y desarrolla numerosas protusiones. Las cigosporas maduras miden de 0,2 a 0,5 mm de diámetro y están rodeadas por una sólida pared.

Las cigosporas permanecen en dormancia durante meses, dependiendo este periodo de las estirpes cruzadas. La cigospora necesita agua para germinar y no otros nutrientes. De cada cigospora emerge un germoesporangióforo, que forma un germoesporangio en el que se producirán hasta unas diez mil germoesporas. La morfología, comportamiento y desarrollo de estas estructuras es muy similar a las correspondientes del ciclo vegetativo. Bajo las condiciones apropiadas, las germoesporas germinan produciendo un micelio que inicia un nuevo ciclo vegetativo.

Las germoesporas difieren de las esporas vegetativas en que todos sus núcleos son idénticos. Esto se debe a que las germoesporas son inicialmente uninucleadas y se vuelven multinucleadas por divisiones mitóticas internas.

Las germoesporas de un germoesporangio son genéticamente heterogéneas, porque son recombinantes haploides de las estirpes parentales. La conjetura de que las germoesporas procedentes de una cigospora representan los productos de una sola meiosis (Burgeff, 1928) ha sido descartada. En cruzamientos con numerosos pares de alelos no se encuentran los cuatro productos meióticos previstos, sino muchos genotipos más, muy heterogéneos (Cerdá-Olmedo, 1975; Cerdá-Olmedo, 2001). En *Phycomyces* los núcleos diploides se convierten en haploides por pérdida aleatoria de cromosomas, acompañada de frecuentes recombinaciones mitóticas. Algunas germoesporas tienen dos ejemplares de algunos cromosomas porque la reducción a haploidía no se ha completado. Si son heterocigotos para los cromosomas sexuales, las colonias resultantes son intersexuales y tienen el mismo aspecto que los heterocariontes intersexuales (Blakeslee, 1906; Orban, 1919; Burgeff, 1924; Mehta y Cerdá-Olmedo, 2001).

El análisis de la descendencia de cruzamientos entre diferentes estirpes mutantes dio lugar al primer mapa genético de *Phycomyces*, en el que se localizaron 11 grupos de ligamiento (Orejas *et al.*, 1987).

3.4 Las especies de *Phycomyces*

Las estirpes de *Phycomyces* son prácticamente indistinguibles a simple vista. Burgeff (1925) se basó en las diferencias en el tamaño de sus esporas y cigosporas y en la fertilidad de los cruces para clasificar las estirpes de *Phycomyces* en dos especies, *P. nitens* y *P. blakesleanus* (Burgeff, 1925). Esta clasificación fue confirmada por Benjamin y Hesseltine (1959) y por Zycha (1969). Otros nombres de especies propuestos con anterioridad por varios autores no fueron retenidos porque no representaban formas diferentes o porque no podían confirmarse, al no haber ejemplares disponibles en ninguna colección. El género con dos especies ha sido aceptado hasta la actualidad.

Desde mediados del siglo XX se recomendó la estirpe NRRL1555 de *P. blakesleanus* como estirpe de laboratorio para facilitar la repetición y la integración de resultados. La mayoría de los trabajos publicados desde entonces están referidos a esta estirpe y a los mutantes derivados de ella. Las investigaciones realizadas con NRRL1555 han sido muy productivas científicamente, pero la carencia de transformantes estables (Obraztsova *et al.*, 2004) aconseja buscar estirpes alternativas transformables.

Hay una extensa bibliografía sobre la genética, fisiología y metabolismo de *P. blakesleanus* pero son muy escasos los datos sobre su vida silvestre. El conocimiento de la ecología, la distribución geográfica y la diversidad de *Phycomyces* interesa por sí mismo y ayudaría a dar sentido biológico a los conocimientos adquiridos en los laboratorios.

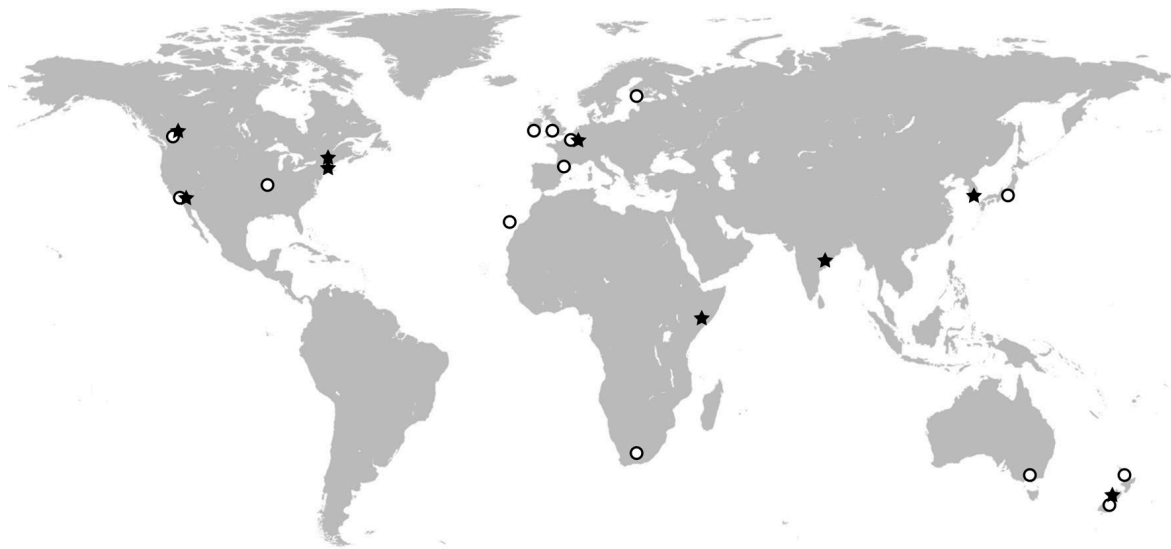


Fig. 4 Distribución mundial de las estirpes de *P. blakesleeanus* (estrella) y *P. nitens* (círculo) depositadas en colecciones.

Las numerosas estirpes presentes en colecciones de todo el mundo muestran una distribución cosmopolita del organismo (Fig. 4). Los orígenes geográficos de las estirpes conocidas de *Phycomyces* abarcan todos los continentes excepto Suramérica. Su ambiente ecológico preferido parecen ser los bosques húmedos, pero los aislamientos proceden de muy diferentes latitudes y temperaturas. Este hecho sugiere que la aparente ausencia de *Phycomyces* en Suramérica se debe a insuficientes muestreos en ese continente.

Las descripciones de los antiguos botánicos son las que más iluminan sobre la vida silvestre de *Phycomyces*. Estos lo encontraron creciendo al aire libre, en cuevas y en edificios. Muchos de los aislamientos se realizaron a partir de muestras de heces de mamíferos, lo que sugirió la posibilidad de que *Phycomyces* sirviera de alimento a animales que podrían confundirlos con hierba por sus robustos esporangióforos (Ingold, 1940; Ingold y Zoberi, 1963).

Si el conocimiento de la ecología y la distribución geográfica de *Phycomyces* es bastante escaso, su diversidad genética ha sido aún menos estudiada. La concentración en la investigación de la estirpe NRRL1555 implica el descuido de las demás.

El Joint Genome Institute (JGI) publicó en 2006 el genoma de *Phycomyces blakesleeanus*, estirpe NRRL1555, y ha secuenciado después el de otra estirpe de sexo opuesto, UBC21. La comparación de ambos genomas detectó diferencias de un solo nucleótido entre ambas estirpes que han sido utilizadas para elaborar un nuevo mapa genético, complementario con el mapa previo (Orejas *et al.*, 1987; Chaudhary *et al.*, 2013). Se han predicho 12 grupos de ligamiento que sugieren la presencia de 9 a 12

cromosomas en *Phycomyces*. Esto es lo poco que se sabe sobre los cromosomas de este organismo, ya que han sido infructuosos los métodos clásicos, como la tinción y la electroforesis en campo pulsante. Este último ha permitido separar los cromosomas de los Mucorales *Absidia glauca* y *Mucor circinelloides* (Kayser y Wöstemeyer, 1991; Díaz-Mínguez *et al.*, 1999), pero no los de *Phycomyces*.

4. *Blakeslea*

Los hongos de la familia *Choanephoraceae* son saprobios o parásitos oportunistas de plantas que se encuentran principalmente en regiones tropicales y subtropicales y causan daños en productos agrícolas cosechados. La familia está formada por los géneros *Blakeslea*, *Choanephora*, *Gilbertella* y *Poitrasia*. Los dos primeros presentan esporangios y esporangiolos y los otros dos solo esporangios (Fig. 5). La familia *Choanephoraceae* es cercana a la familia *Mucoraceae* y alejada de *Cunninghamellaceae*, contra lo que se creía (Zycha *et al.*, 1969; Kirk, 1984; Hoffmann *et al.*, 2013).

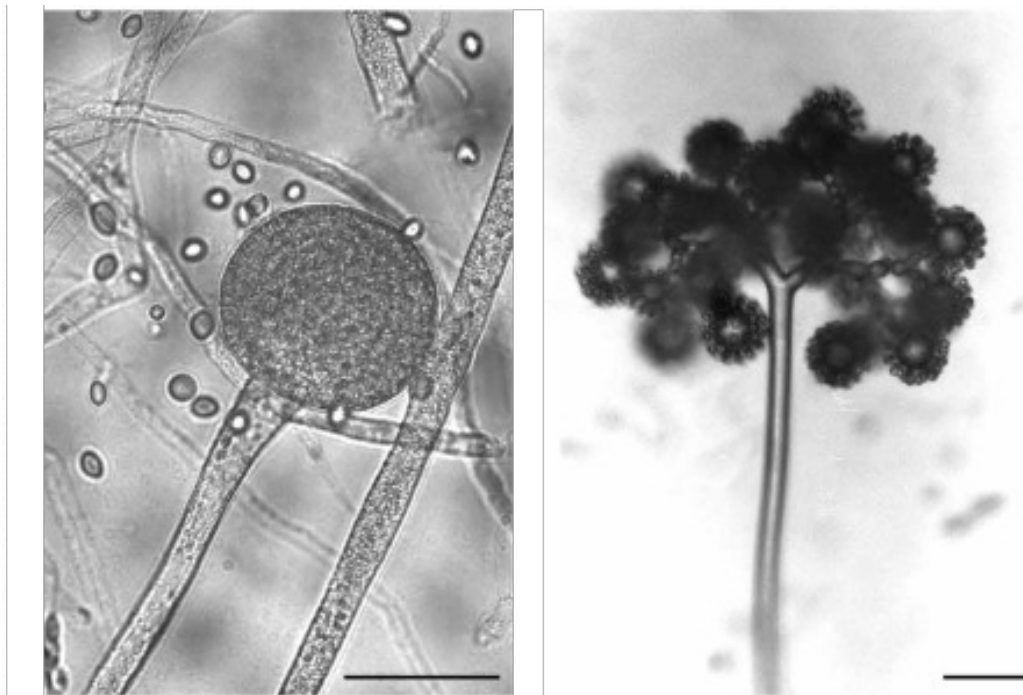


Fig. 5 (Izquierda) Esporangio de *Gilbertella persicaria*. (Derecha) Esporangiolos en un esporangio ramificado de *Blakeslea trispora* (Hoffmann *et al.*, 2013). La barra de escala indica 50 μm .

Los géneros *Blakeslea* (Thaxter, 1914) y *Choanephora* (Currey, 1873) fueron establecidos independientemente y se distinguen por el número de esporas producidas en cada esporangio y la presencia o ausencia de una sutura en la pared esporangiar, ambos criterios muy discutidos (Kirk, 1984). Hesseltine (1955) los reunió en el género *Choanephora* y Zycha (1969) los mantuvo separados.

Choanephora fue el primer hongo al que se atribuyó un papel indispensable en un fenómeno de mutualismo y polinización (Sakai *et al.*, 2000). Crece en el interior de las flores masculinas del árbol *Artocarpus integer* y su olor es muy similar al de las flores femeninas. De este modo atrae a unos dípteros (*Contarinia* sp.) que ovopositan en la flor masculina y que se alimentan del micelio. Los dípteros se cubren de polen y lo transportan a las flores femeninas, que son polinizadas.

4.1 Ciclos de vida de *Blakeslea*

Blakeslea trispora es un mucoral heterotálico, con ciclos de vida sexual y asexual o vegetativo. Las esporas de *B. trispora* miden 8-13 x 4-5 μm , son multinucleadas, fusiformes, estriadas y con prolongaciones fibrilares en sus extremos (Fig. 6). El ciclo vegetativo comienza con la germinación espontánea de la spora, que forma un nuevo micelio con hifas ramificadas, sin tabiques y multinucleadas. Hay dos tipos de esporangióforos, los que desarrollan en sus ápices esporangios y los que tienen esporangiolos. Los esporangios son únicos en su esporangióforo, miden 25-72 μm de diámetro y contienen numerosas esporas. Los esporangiolos, tienen un diámetro de 11 a 18 μm y nacen en pedúnculos que cubren la superficie de vesículas globosas. Tienen paredes muy finas y fáciles de romper y producen hasta 6 esporas.

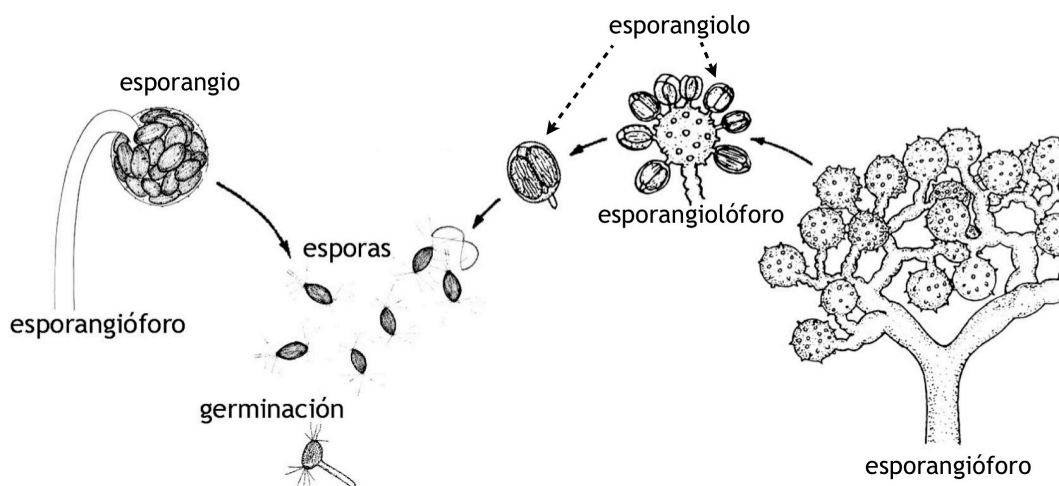


Fig. 6 Ciclo vegetativo de *Blakeslea trispora* (modificado de Zycha *et al.*, 1969).

Las cigosporas de *B. trispora* miden alrededor de 40 μm y sus paredes son lisas. No se ha descrito su germinación y por tanto su ciclo sexual no puede aprovecharse como herramienta en los laboratorios.

5. Carotenos y apocarotenoides

Los carotenos son terpenoides de 40 carbonos que contienen hidrógeno y que junto a las xantofilas, sus derivados oxigenados, forman la familia de los carotenoides (Isler *et al.*, 1971; Cerdá-Olmedo, 2001; Avalos y Limón, 2014).

El caroteno β es el caroteno más abundante en la naturaleza. Este compuesto juega un papel esencial en la vida de los vertebrados por sí mismo y como principal fuente de retinoides como el retinal, necesario para la visión, y el ácido retinoico, implicado en la morfogénesis. Los animales no son capaces de fabricar estos compuestos y deben adquirirlos con la dieta.

Phycomyces y *Blakeslea* son productores de caroteno β , al que deben el color amarillo de sus micelios jóvenes. Este compuesto está presente en distintas concentraciones según las condiciones externas y el momento del ciclo de vida en el que se encuentre el organismo. El contenido de caroteno β de las estirpes silvestres de *Phycomyces* es de unos 100 $\mu\text{g/g}$ de masa seca, en cultivos de cuatro días en oscuridad. En *Blakeslea trispora* la concentración de caroteno β varía mucho según la estirpe analizada, pero las más utilizadas en las investigaciones tienen un contenido de caroteno β entre 200-300 $\mu\text{g/g}$ de masa seca en las condiciones de cultivo antes citadas. Durante la interacción sexual estas concentraciones aumentan de cuatro a cinco veces en ambos géneros, incremento denominado carotenogénesis sexual (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986).

Los apocarotenoides son compuestos derivados de los carotenoides por fragmentación de la molécula y diversas modificaciones posteriores. Entre ellos se encuentran algunos de los aromas más apreciados de la naturaleza, como el safranal del azafrán y la damascenona de las rosas. Otros son hormonas, como el ácido abcísico y las estrigolactonas, fundamentales para el crecimiento de las plantas.

Fue en extractos de cultivos mixtos de *Blakeslea* donde se encontró el primer apocarotenoide producido por un mucoral, el ácido trispórico C (Caglioti *et al.*, 1966). Este compuesto de 18 carbonos produce la carotenogénesis sexual en cultivos simples. Desde entonces se han encontrado en *Phycomyces*, *Mucor* y *Blakeslea* muchos apocarotenoides, cuya presencia y concentración dependen de la especie, el sexo del micelio y momento del ciclo de vida en el que se encuentre el organismo (Sutter *et al.*,

1989; Barrero *et al.*, 2011; Barrero *et al.*, 2012; Polaino *et al.*, 2012; Medina, 2013; Sahadevan *et al.*, 2013; Alcalde, 2014).

5.1 Biosíntesis

La biosíntesis de caroteno β es común para *Phycomyces* (De la Guardia *et al.*, 1971; Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974; Aragón *et al.*, 1976; Bejarano *et al.*, 1988; Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Arrach *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2011), *Blakeslea* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995; Mehta y Cerdá-Olmedo, 1999; Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2004) y *Mucor* (Velayos *et al.*, 2000; Iturriaga *et al.*, 2001), aunque se ha estudiado más en el primero.

La carotenogénesis se desarrolla en un compartimento citoplasmático independiente de otros dedicados a la síntesis de terpenoides (Fig. 7), como los esteroides y la ubiquinona (Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1992; Kuzina *et al.*, 2006). En él se localizan los agregados enzimáticos encargados de la síntesis de caroteno β (De la Guardia *et al.*, 1971; Aragón *et al.*, 1976).

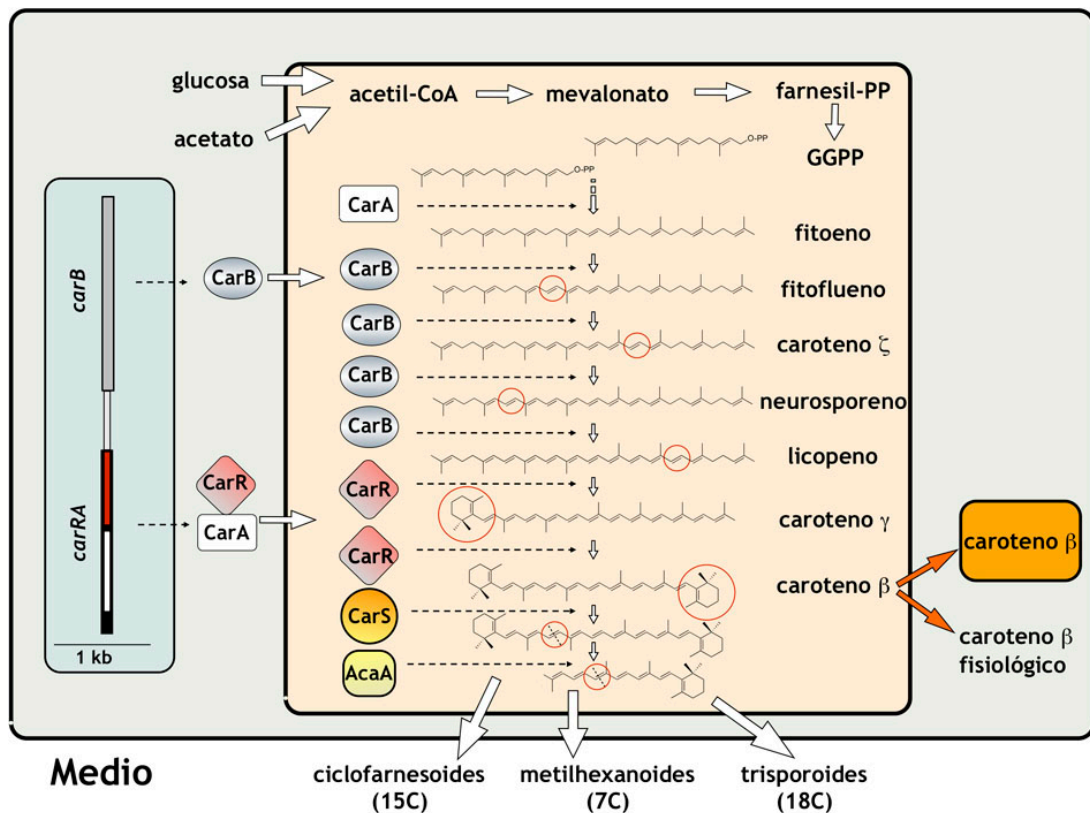


Fig. 7 Síntesis de caroteno β y apocarotenoides en Mucorales. La región del genoma representada contiene a los genes *carRA* y *carB* de *B. trispora*.

La ruta se inicia con la condensación de dos moléculas de pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP) que da lugar al fitoeno (Fig. 7). Este paso es catalizado por la sintasa del fitoeno, CarA, codificada por el dominio *carA* del gen *carRA*. Las mutaciones en el dominio *carA* dan lugar a micelio blanco por que carecen de carotenos casi por completo.

Después de cuatro deshidrogenaciones consecutivas, el fitoeno, un caroteno incoloro, se transforma en licopeno, de color rojo. Estas reacciones son catalizadas por cuatro ejemplares de la deshidrogenasa del fitoeno, CarB y producen tres intermediarios, fitofluoeno, caroteno ζ y neurosporeno. Codifica esta enzima el gen *carB*, contiguo a *carRA*, del que lo separa una región intergénica que contiene el promotor bidireccional de ambos. Las mutaciones que afectan al gen *carB* producen un fenotipo blanco por acumulación de fitoeno en los micelios.

El licopeno sufre dos ciclaciones consecutivas dando lugar al caroteno β y produciendo como intermediario el caroteno γ . La enzima que cataliza estas dos reacciones es la ciclasa del licopeno, CarR, codificada por el dominio *carR* del gen *carRA*, en cuyo producto génico se encuentra una secuencia conservada que corresponde a una diana para la proteasa que separaría los dominios (Arrach *et al.*, 2001; Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2004). Las mutaciones que afectan a *carR* dan lugar a micelios de color rojo por acumulación de licopeno.

Una cantidad pequeña del caroteno β producido ($\sim 0,1$ mg/l en cultivos de *Phycomyces* incubados 5 días en oscuridad) sale del compartimento de síntesis y pasa al citoplasma donde es utilizada para distintas funciones fisiológicas y se acumula en glóbulos (Ripley y Bramley, 1976; Alcalde, 2014). Casi todo el flujo de caroteno β se dedica a la producción de apocarotenoides (~ 30 mg/l en los mismos cultivos). Dos oxigenasas, CarS y AcaA, rompen la molécula de caroteno β en tres fragmentos de 15, 18 y 7 carbonos (Polaino *et al.*, 2010; Medina y Cerdá-Olmedo, 2011; Tagua *et al.*, 2012). Los mutantes del gen *carS* son superproductores de caroteno β porque son incapaces de romperlo.

Los fragmentos del caroteno β son los precursores de tres subfamilias de apocarotenoides, los metilhexanoides, de 7 carbonos, los ciclofarnesoides, de 15 carbonos, y los trisporoides, de 18 carbonos. Estos apocarotenoides no se acumulan en el micelio sino que son excretados al medio. Los mutantes carentes de caroteno β y, por tanto, también de apocarotenoides han sido útiles en los ensayos de biotransformación y se han aplicado como controles en los análisis bioquímicos.

El caroteno β presente en el micelio no se utiliza para la síntesis de apocarotenoides, como se deduce de que el caroteno de cultivos incubados previamente

con mevalonato radiactivo y posteriormente con mevalonato no radiactivo conserva su radiactividad (Murillo *et al.*, 1981; Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1992).

La demostración de que el flujo de caroteno β es mínimamente utilizado para la producción de este, ya que se dedica en su mayoría a la formación de apocarotenoides, ha modificado la visión clásica de esta ruta (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976; Alcalde, 2014). Esto no convierte al caroteno β en un mero intermediario metabólico, ya que los mutantes carentes de él son deficientes en algunas funciones fisiológicas, como la morfogénesis (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990), e incapaces de completar el ciclo sexual (Sutter, 1975).

5.2 Producción industrial

Los carotenoides, entre ellos el caroteno β y el licopeno, son muy valorados por sus efectos benéficos para la salud y por sus colores llamativos. Como compuestos industriales purificados tienen numerosas aplicaciones en la alimentación humana y animal, en cosmética y en farmacia, donde se emplean como antioxidantes, suplementos alimentarios y colorantes (Lee y Schmidt-Dannert, 2002; Fraser y Bramley, 2004).

Los carotenoides han sido extraídos tradicionalmente de los productos naturales que los acumulan. El caroteno β abunda en frutas y verduras, como en la zanahoria, la batata o la calabaza, mientras que el licopeno es mucho menos común y se encuentra mayoritariamente en los tomates.

En 1930 Karrer dilucidó la molécula de caroteno β , lo que le hizo merecedor del premio Nobel; esta era la primera vez que se describía la estructura de una vitamina o una provitamina (Isler *et al.*, 1971). Hasta 1950 no se consiguió la síntesis completa de este compuesto y en 1954 la empresa Roche comenzó a fabricarlo a gran escala. La mayoría del caroteno β producido y comercializado en la actualidad es de origen sintético.

El creciente interés de los consumidores por los productos naturales frente a los fabricados artificialmente motivó la búsqueda de nuevos métodos de producción de carotenos mediante microorganismos. La carotenogénesis sexual de *Phycomyces* y *Blakeslea* hizo a estos dos organismos candidatos para la obtención industrial de caroteno β .

Los métodos de producción de caroteno β en cultivos mixtos de *Blakeslea* fueron desarrollados en Estados Unidos (Ciegler, 1965), perfeccionados en Francia (Ninet y Renault, 1979) y aplicados en industrias especializadas en la Unión Soviética. Su primera aplicación fue compensar la pérdida de carotenos en el heno con el que se alimenta al

ganado en invierno. Actualmente son empresas europeas y chinas las que producen más caroteno β por medio de cultivos mixtos de *Blakeslea*.

Uno de los medios de cultivo más convenientes en esta industria contiene restos de cítricos de las fábricas de zumos. Su efecto sobre la carotenogénesis probablemente se deba a la presencia de terpenoides de tipo aromático que activan la producción (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986). La adición de ciertos compuestos químicos a los cultivos mixtos activa la carotenogénesis, pero no suelen tener interés industrial (Ciegler, 1965; Eslava *et al.*, 1974; Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986).

En nuestro laboratorio se obtuvieron mutantes de *Phycomyces* superproductores de caroteno β que han mejorado a los cultivos mixtos. Las estirpes que contienen mutaciones de los genes *carS* (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976) y *carF* (Mehta *et al.*, 1997) acumulan unas 100 veces más caroteno β que los silvestres, tanto en cultivos sencillos como en cultivos mixtos. En este último caso la estimulación sexual de la carotenogénesis requiere que al menos una de las estirpes lleve una mutación *carS* rezumante. Los mutantes superproductores de caroteno β de *Blakeslea* no tienen los mismos fenotipos que los de *Phycomyces*, lo que sugiere diferentes regulaciones en cada organismo (Mehta *et al.*, 1997; Mehta *et al.*, 2003; Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2004).

Los mutantes en el dominio *carR* del gen *carRA* (Meissner y Delbrück, 1968; Torres-Martínez *et al.*, 1980; Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995) también se pueden aplicar en cultivos mixtos (Murillo *et al.*, 1978) y se usan industrialmente para la producción de este caroteno (Marcos *et al.*, 2001).

Los métodos de cultivo industrial de *Blakeslea* y *Phycomyces* son diferentes debido a las condiciones óptimas de crecimiento de cada organismo. Con *Blakeslea* se usan cultivos sumergidos, en grandes tanques de fermentación aireados, refrigerados y removidos. *Phycomyces* prefiere cultivos superficiales en bateas, como los utilizados con *Aspergillus niger* para la producción industrial de ácido cítrico (Papagianni, 2007).

La mezcla de dos estirpes en los cultivos mixtos impone limitaciones que se obviarían con cultivos simples que presentaran carotenogénesis sexual. Para ello se pueden utilizar heterocariontes intersexuales, diploides intersexuales y trisporoides (Murillo *et al.*, 1978; Mehta y Cerdá-Olmedo, 2001; Mehta *et al.*, 2003). Ninguno de estos procedimientos parece ser usado industrialmente.

6. Sexualidad

Ehrenberg describió por primera vez las cigosporas de un hongo en *Syzygites megalocarpus* (Ehrenberg, 1820) y sugirió que podrían ser estructuras sexuales por su parecido con las de algunas algas. Estas estructuras se encontraron después en otros

Mucorales y se sugirieron otras funciones, como el almacenamiento de nutrientes en sustratos ricos y la resistencia en condiciones de escasez y de bajas temperaturas (van Tieghem y le Monnier, 1873; Bainier, 1882).

El problema fue resuelto por Blakeslee enfrentando micelios de estirpes purificadas de *Phycomyces*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Absidia* (Blakeslee, 1904). Estos Mucorales se denominan heterotálicos porque las estirpes se pueden clasificar en dos sexos, de tal manera que las estirpes del mismo sexo no reaccionan entre sí y las de sexo distinto forman cigosporas, si son de la misma especie, o al menos estructuras modificadas, si son de distintas especies. Blakeslee llamó a los sexos (+) y (-) porque solo pudo reconocerlos por sus respuestas.

6.1 Respuesta sexual

Los dos procesos iniciales más significativos de la respuesta sexual de *Blakeslea* y *Phycomyces* son la cigoforogénesis y la carotenogénesis sexual. La primera consiste en la formación de los cigóforos y la segunda en la acumulación de caroteno β . Estos son procesos separados, ya que el extracto de papa y los ácidos carboxílicos de cadena corta, como el acetato, aumentan la cigoforogénesis e inhiben la carotenogénesis sexual (Kuzina y Cerdá-Olmedo, 2006). El componente activo del extracto de papa es desconocido.

Las respuestas cigoforogénica y carotenogénica son similares en todas las estirpes de *P. blakesleanus* investigadas, pero no lo son en las de *Blakeslea*, ya que su ocurrencia y su intensidad varía según las parejas enfrentadas (Mehta *et al.*, 2003; Vereshchagina *et al.*, 2012).

Otros procesos celulares se ven afectados durante la interacción sexual. En *Phycomyces* se activa la respiración (Burnett, 1953) y se inhibe la esporulación vegetativa (Blakeslee, 1904). También se ve afectada la transcripción, ya que aumenta la de cientos de genes y disminuye la de algunos (Schmidt *et al.*, 2005; Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008; Kuzina *et al.*, 2008; Medina y Cerdá-Olmedo, 2011). El hecho de que las hifas se transforman en cigóforos sin necesidad de contacto sugirió que los sexos se reconocen intercambiando compuestos difusibles, a los que se denominó gamonas (Orban, 1919; Burgeff, 1924; Plempel, 1957) y ahora feromonas sexuales. Las reacciones sexuales incompletas en cruzamientos interespecíficos indican que las hormonas sexuales de distintas especies deben ser iguales o parecidas, pero que en todo caso en las respuestas intervienen compuestos exclusivos de cada especie.

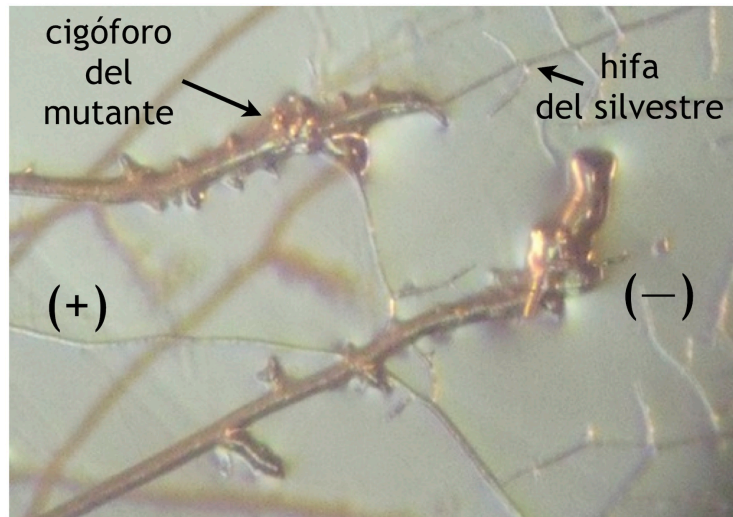


Fig. 8 Enfrentamiento de dos estirpes de *P. blakesleeanus*, una silvestre y otra mutante del gen *carB*, carente de caroteno β .

La actividad carotenogénica y cigoforogénica de varios trisporoides (Caglioti *et al.*, 1966; Sutter *et al.*, 1973; Sutter y Whitaker, 1981; Govind y Cerdá-Olmedo, 1986) y la esterilidad de los mutantes carentes de caroteno β (Sutter, 1975), sugieren que las feromonas sexuales son apocarotenoides y más concretamente trisporoides, pero aún no se ha determinado precisamente cuáles.

Las sustancias que provocan las respuestas cigoforogénica y carotenogénica no deben ser las mismas, ya que en presencia de acetato cuando la primera aumenta la segunda se inhibe. Los factores cigoforogénicos son simétricos, puesto que los mutantes *carB* de ambos sexos desarrollan cigóforos al enfrentarse a las estirpes silvestres de sexo opuesto (Fig. 8). No se sabe si ocurre lo mismo con los compuestos carotenogénicos.

6.2 Genes del sexo

El primer mucoral en el que se describió el gen que determina el sexo fue *P. blakesleeanus*. Este tiene dos alelos, *sexM*, de “minus”, presente en las estirpes (-), y *sexP*, de “plus”, presente en las estirpes (+) (Idnurm *et al.*, 2008). Sus homólogos se han descrito en *Mucor circinelloides* (Lee *et al.*, 2008), *Rhizopus oryzae* (Gryganskyi *et al.*, 2010), *Mucor mucedo* (Wetzel *et al.*, 2012) y *Syzygites megalocarpus* (Idnurm, 2011b). La esterilidad de los mutantes de *M. circinelloides* defectuosos en *sexM* confirmó la necesidad de este gen para el cruzamiento (Li *et al.*, 2011). Los genes del sexo de las estirpes investigadas corresponden con los sexos establecidos a principios del siglo pasado.

Las proteínas SexM y SexP contienen un dominio HMG (“High Mobility Group”) que se encuentra en muchas proteínas reguladoras de la transcripción (Czaja *et al.*,

2014) y entre ellas las que determinan el sexo de *Homo sapiens* (SRY, Berta *et al.*, 1990), *Schizosaccharomyces pombe* (MAT-Mc, Dooijes *et al.*, 1993) y *Neurospora crassa* (MAT-A3 y MAT-a1, Staben y Yanofsky, 1990).

Los genes *sexM* y *sexP* están flanqueados por secuencias exclusivas de sexo y especie, que componen con ellos los respectivos alelomorfos sexuales (Fig. 9). Los genes contiguos están bastante conservados en los Mucorales. En *Phycomyces* a un lado de los alelomorfos sexuales está el gen *rnhA*, para una presunta helicasa de ARN, y al otro el gen *tptA*, para una presunta transportadora de fosfato de triosas. Esta situación se repite en todos los Mucorales investigados excepto en *Mucor mucedo*, en el que *tptA* no aparece junto a los alelomorfos sexuales. El orden de los genes se conserva mejor que su orientación. Los genes *sexM* y *sexP* de *P. blakesleeanus* se transcriben en direcciones opuestas y los de *R. oryzae* lo hacen en la misma dirección que sus vecinos.

Las secuencias no génicas de los alelomorfos sexuales son específicas de sexo y especie. En los de sexo (+) se conserva un presunto motivo de unión a factor de transcripción en la región inmediatamente anterior a *sexP* (Wetzel *et al.*, 2012).

Poco se sabe del papel de SexM y SexP en la respuesta sexual. La única información disponible hasta el momento se refiere a la transcripción de los genes *sex*. Los extractos de cultivos mixtos de *Blakeslea* aplicados sobre cultivos simples de *M. mucedo* incrementan el número de transcritos de *sexM* y no los de *sexP* (Wetzel *et al.*, 2012). En *Phycomyces* la transcripción de estos mismos genes aumentan durante la interacción sexual (Idnurm *et al.*, 2008).

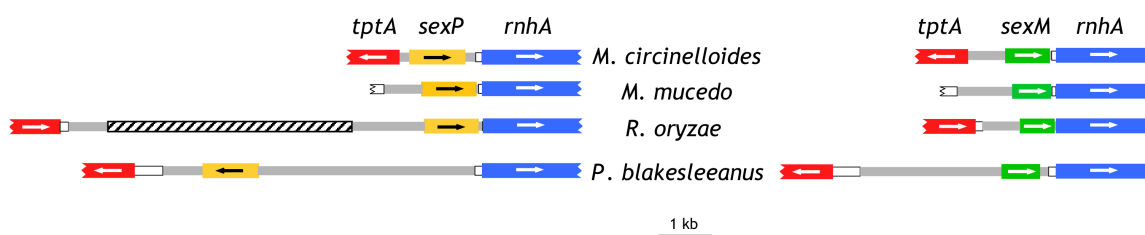


Fig. 9 Los alelomorfos sexuales de varios Mucorales y sus secuencias flanqueantes. Las barras coloreadas indican los genes *tptA*, *rnhA*, *sexP* y *sexM*. Las barras blancas indican las secuencias intergénicas presentes en ambos sexos y conservadas en las especies. Las barras grises indican las secuencias intergénicas diferentes entre los sexos y las especies. La barra rayada indica una larga secuencia con varias fases abiertas de lectura. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Resultados

Capítulo I

Vida silvestre de *Phycomyces*

La posibilidad de que la dormancia de las cigosporas de *Phycomyces* sea una adaptación a los inviernos fríos hacía suponer que las estirpes de lugares sin invierno podrían carecer de dormancia, lo que facilitaría el análisis genético. En febrero de 1978 el Prof. Cerdá Olmedo recogió heces de pequeños mamíferos y muestras de materia orgánica en descomposición en veinte lugares de Tenerife con ambientes muy variados, desde desiertos a bosques lluviosos y de las costas a 2500 metros sobre el nivel del mar. Las muestras se incubaron en el laboratorio y se aisló *Phycomyces* en tres de ellas, tomadas en el bosque de Las Mercedes, junto a La Laguna, a unos 1000 metros sobre el nivel del mar, en un entorno de laurisilva. Se conservaron ocho clones, estirpes S254 a S261. Los cruzamientos de las nuevas estirpes con otras de *Phycomyces* no produjeron cigosporas, por lo que no volvieron a usarse en las investigaciones.

1. Aislamiento de nuevas estirpes de *Phycomyces*

1.1 *Phycomyces* de La Saucedá, en la Serranía de Ronda

En febrero de 2003, el Prof. Enrique Cerdá Olmedo encontró *Phycomyces* casualmente en un prado junto a la casa forestal “Diego Duro” (Fig. 10), en la comarca de La Saucedá, en la Serranía de Ronda. Formaba masas densas de esporangióforos sobre varios metros cuadrados de heces de perro. Ni el día del hallazgo ni en otras ocasiones se encontraron otros ejemplares creciendo al aire libre en esa zona.

Se tomaron numerosas muestras que se procesaron en el laboratorio y se identificaron inequívocamente como *Phycomyces*, pero no se observaron estructuras sexuales que sugirieran la presencia de los dos sexos. Se conservó un solo clon, la estirpe S606, porque todas las muestras y sus subcultivos parecían idénticos (Tablas 1 y 2).

Tabla 1 Coordenadas geográficas de los lugares de recolección de las estirpes aisladas en España.

Estirpe	Provincia/Isla	Municipio	Coordenadas (grados)	
			Latitud	Longitud
S256	Tenerife	La Laguna	28.5295	-16.2811
S257	Tenerife	La Laguna	28.5295	-16.2811
S606	Cádiz	Cortes de la Fra.	36.5240	-5.5330
S607	Cádiz	Jerez	36.5511	-5.4983
S608	Cádiz	Jerez	36.5511	-5.4983
S609	Cádiz	Jerez	36.5511	-5.4983
S642	La Palma	El Paso	28.6543	-17.8500
S643	La Gomera	Hermigua	28.1245	-17.2223
S644	La Gomera	Hermigua	28.1235	-17.2242
S645	Asturias	Navia	43.5555	-6.7225
S646	Cádiz	Los Barrios	36.2171	-55.732
S651	Sevilla	El Garrobo	37.6352	-6.1432
S653	Málaga	Ardales	36.8725	-4.8289
S654	Málaga	Ardales	36.8725	-4.8289
S655	Málaga	Ardales	36.8725	-4.8289
S656	Málaga	Ardales	36.8725	-4.8289
S657	Huelva	Aracena	37.8911	-6.5659
S658	Huelva	Cortegana	37.9132	-6.8343
S659	Sevilla	Cazalla	37.9371	-5.7176
S660	Sevilla	C. de las Guardas	37.6840	-6.2600

El lugar donde se encontró S606 había sido abonado con murcielaguina de la cueva Higueral-Guardia (Torres *et al.*, 2013), a 4,3 km en línea recta a través de terreno abrupto, por el que fluye el río Hozgarganta, afluente del Guadiaro (Fig. 10). El agente de medio ambiente Juan Pino Palma nos ayudó en la exploración de la cueva.

Esta tiene tres bocas de difícil acceso y para el muestreo se accedió por la boca del Guardia y se salió por la del Higueral. Estas entradas están separadas por unos 185 m de cueva, de suelo casi llano (Fig. 10). El techo es muy bajo en unos tramos y en otros está formado por altas chimeneas ciegas, habitadas todo el año por quirópteros cavernícolas de los géneros *Myotis* (murciélago ratonero) y *Rhinolopus* (murciélago de herradura). En los muestreos se evitaron las horas de actividad de los quirópteros y se tomaron medidas para no alterar su hábitat. Se recolectaron muestras de murcielaguina, de heces de cabra y de heces de cánido. En esta última y en algunas de murcielaguina se observaron esporangióforos.

Tabla 2 Estirpes de *Phycomyces* utilizadas en esta tesis.

Estirpe*	Origen	Recolector	Aislador y año	Sex.	Ref.#	Comentarios
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>						
1	C168	Santa Cruz, CA, USA	Burke, 1971	(+)	(1)	
2	Carmichael666	Alberta, Canadá	Carmichael, 1959	(-)	(1)	Heces de ratón
	Carmichael667	Alberta, Canadá	Carmichael, 1959	(-)	(1)	Heces de ciervo
3	CBS142.22	Utrecht, Holanda	Wassink, 1922	(-)	(1)	
4	CBS189.27	USA	Blakeslee, 1927	(-)	(1)	
5	CBS282.35	Utrecht, Holanda	Wassink, 1922	(-)	(1)	
6	G5	Worcester, MA, USA	Lougee, 1952	(+)	(1)	Sobre hojas
7	K1	Alemania		(+)	(4)	
8	KACC46094	Corea		(-)	(3)	Semillas de soja
	KACC46095	Corea		(-)	(3)	Semillas de soja
9	KC1	Charleston, SC, USA	M. Powell	Idnurm, 2010	(+)	Vómito de perro
10	KC2	Charleston, SC, USA	M. Powell	Idnurm, 2010	(+)	Vómito de perro
11	KC3	Charleston, SC, USA	M. Powell	Idnurm, 2010	(+)	Vómito de perro
12	KC4	Charleston, SC, USA	M. Powell	Idnurm, 2010	(+)	Vómito de perro
13	KC5	Charleston, SC, USA	M. Powell	Idnurm, 2010	(+)	Vómito de perro
14	KC6	Charleston, SC, USA	M. Powell	Idnurm, 2010	(+)	Vómito de perro
15	KC7	Houston, TX, USA	B.W. Wallace	Idnurm, 2010	(-)	Materia orgánica
16	KC8	Houston, TX, USA	B.W. Wallace	Idnurm, 2010	(+)	Materia orgánica
17	KC9	Houston, TX, USA	B.W. Wallace	Idnurm, 2010	(+)	Materia orgánica
18	KC10	Houston, TX, USA	B.W. Wallace	Idnurm, 2011	(+)	Materia orgánica
19	KC11	Houston, TX, USA	B.W. Wallace	Idnurm, 2011	(+)	Materia orgánica
20	KC12	Houston, TX, USA	B.W. Wallace	Idnurm, 2011	(-)	Materia orgánica
21	KC13	Dallas, TX, USA	E. Goodale	Idnurm, 2012	(-)	Heces de gato
22	KC14	Dallas, TX, USA	E. Goodale	Idnurm, 2012	(-)	Heces de gato
23	KC15	Dallas, TX, USA	E. Goodale	Idnurm, 2012	(-)	Heces de gato
24	KC16	Fairfax, VA, USA	D. Johnston	Idnurm, 2012	(-)	Heces de mapache
25	KC17	Fairfax, VA, USA	D. Johnston	Idnurm, 2012	(+)	Heces de mapache
26	KC18	Fairfax, VA, USA	D. Johnston	Idnurm, 2012	(-)	Heces de mapache
27	KC19	Fairfax, VA, USA	D. Johnston	Idnurm, 2012	(-)	Heces de mapache
28	KC20	Fairfax, VA, USA	D. Johnston	Idnurm, 2012	(+)	Heces de mapache
29	KC21	Fairfax, VA, USA	D. Johnston	Idnurm, 2012	(-)	Heces de mapache
30	KC22	Howell, MI, USA	M. y S. Bowen	Idnurm, 2013	(+)	Semillas
31	KC23	Howell, MI, USA	M. y S. Bowen	Idnurm, 2013	(+)	Semillas
32	KC24	Nashville, TN, USA	C. McAlister	Idnurm, 2013	(+)	Semillas
33	KC25	Nashville, TN, USA	C. McAlister	Idnurm, 2013	(-)	Semillas
34	KC26	Sarasota, FL, USA	Familia Wall	Idnurm, 2013	(-)	Vómito de gato
35	KC27	Sarasota, FL, USA	Familia Wall	Idnurm, 2013	(-)	Vómito de gato
36	KC28	Sarasota, FL, USA	Familia Wall	Idnurm, 2013	(-)	Vómito de gato
37	KC29	Sarasota, FL, USA	Familia Wall	Idnurm, 2013	(-)	Vómito de gato
38	KC30	Sarasota, FL, USA	Familia Wall	Idnurm, 2013	(-)	Vómito de gato
39	NRRL1464				(-)	(1 y 2)
40	NRRL1465		1903	(+)	(1 y 2)	Heces de conejo
41	NRRL1554			(+)	(1 y 2)	
42	NRRL1555			(-)	(1 y 2)	
43	NRRL2565	Alemania	Burgeff, 1920	(+)	(1 y 2)	<i>Piloboloides</i>
44	NRRL2566	Alemania	Zycha, 1935	(-)	(1 y 2)	<i>Piloboloides</i>
45	NRRL6737			(-)	(1)	
46	NRRL6740			(-)	(1)	
47	RSA499	Peterborough, NH, USA	Benjamin, 1956	(-)	(1)	Heces de roedor
48	RSA531	Claremont, CA, USA	Benjamin, 1957	(-)	(1)	Heces de rata

Estirpe*	Origen	Recolector	Aislador y año	Sex.	Ref.#	Comentarios
RSA537	Claremont, CA, USA		Benjamin, 1957	(-)	(1)	Heces de ratón
49 RSA1739	Montreal, Canadá		Lewis, 1961	(+)	(1)	Heces de ardilla
50 S271	British Columbia, Canadá		Bandoni	(+)		Heces de gato
51 UBC1	British Columbia, Canadá		Bandoni, 1970s	(+)	(1)	<i>Namus</i>
52 UBC21				(+)	(1)	
53 UBC24				(-)	(1)	
54 UBC25				(+)	(1)	
55 UBC31				(+)	(1)	
56 UBC33				(-)	(1)	

Phycomyces nitens

57 Anastasiou538	Claremont, CA, USA		Benjamin, 1960	(+)	(1)	Heces de ratón
58 ATCC16327	Japón		Indoh	(-)	(1)	Heces de cerdo
59 CBS149.24	Alemania		Burgeff, 1924	(+)	(2)	
60 ICMP10093	Auckland, N. Zelanda		McKenzie	(+)		Sobre una alfombra
61 ICMP16924	Christchurch, N. Zelanda		Cooper, 2007	(-)		Heces
62 IMI051077	Avon, Inglaterra		Parry, 1952	(+)	(1 y 2)	En carne de coco
63 Indoh1521	Gunma, Japón		Takasaki, 1963	(-)	(1)	Heces de cerdo
64 KC31	Howell, MI, USA	M. y S. Bowen	Idnurm, 2013	(+)		Semillas en un comedero
65 KC32	Howell, MI, USA	M. y S. Bowen	Idnurm, 2013	(+)		Semillas en un comedero
66 KC33	San Jose, CA, USA	J. Epler	Idnurm, 2013	(-)		Heces de gato
67 NRRL2444	Surrey, Inglaterra		Martin	(+)	(2)	Heces de conejo
68 NRRL2678	Chiba, Japón			(-)	(1)	
69 NRRLA7595	Blue Rapids, KA, USA		C.T. Rogerson	(+)	(2)	Heces en una mina
70 S256	La Laguna, Tenerife, España	E. Cerdá Olmedo	Cerdá Olmedo, 1978	(+)		Heces
71 S257	La Laguna, Tenerife, España	E. Cerdá Olmedo	Cerdá Olmedo, 1978	(+)		Heces
72 S270	British Columbia, Canadá		Bandoni	(+)		Heces de gato
73 S465	Exeter, Inglaterra		Webster	(-)		Heces de conejo
74 S466	Exeter, Inglaterra		Webster	(-)		Heces de conejo
75 S605	Aracena, Huelva, España	Flores, 1999		(-)		Heces de mamífero
76 S606	Cortes, Málaga, España	E. Cerdá Olmedo	Camino, 2003	(-)		Heces de perro
77 S607	Jerez, Cádiz, España	J. Ramos Guelfo	Camino, 2003	(+)		Heces de cánido en cueva
78 S608	Jerez, Cádiz, España	J. Ramos Guelfo	Camino, 2003	(+)		Heces de cánido en cueva
79 S609	Jerez, Cádiz, España	J. Ramos Guelfo	Camino, 2003	(-)		Heces de cánido en cueva
80 S642	El Paso, La Palma, España	E. Cerdá Olmedo	Camino, 2003	(-)		Heces de conejo
81 S643	Hermigua, Gomera, España	E. Cerdá Olmedo	Camino, 2007	(+)		Materia orgánica
82 S644	Hermigua, Gomera, España	E. Cerdá Olmedo	Camino, 2007	(+)		Materia orgánica
83 S645	Navia, Asturias, España	E. Rubio Domínguez	Rubio, 2007	(+)		Heces de perro
84 S646	Los Barrios, Cádiz, España	E. Cerdá Olmedo	Camino, 2008	(+)		Heces de rata
85 S651	El Garrobo, Sevilla, España	J. Ramos Guelfo	Camino, 2010	(+)		Heces de mamífero
86 S653	Ardales, Málaga, España	V. Jurado Lobo	Jurado Lobo, 2011	(-)		Materia orgánica en cueva
87 S654	Ardales, Málaga, España	I. Domínguez Moñino	Domínguez, 2011	(-)		Heces en cueva
88 S655	Ardales, Málaga, España	I. Domínguez Moñino	Domínguez, 2011	(-)		Heces en cueva
89 S656	Ardales, Málaga, España	I. Domínguez Moñino	Domínguez, 2011	(-)		Heces en cueva
90 S657	Aracena, Huelva, España	I. Domínguez Moñino	Domínguez, 2011	(-)		Materia orgánica en cueva
91 S658	Cortegana, Huelva, España	M. Alvarado Cordobés	Camino, 2011	(-)		Heces de mamífero
92 S659	Cazalla, Sevilla, España	M. Alvarado Cordobés	Camino, 2012	(-)		Heces de mamífero
93 S660	C. Guardas, Sevilla, España	I.López Calderón	Camino, 2012	(-)		Heces de gato
94 UBC39	British Columbia, Canadá		Spencer, 1963	(-)		Basura
95 UBC67				(+)		
96 UBC149	British Columbia, Canadá		Reid, 1972	(-)		Heces de gato

* El número a la izquierda es la abreviatura utilizada en las Figuras; las tres estirpes sin numerar son idénticas a las que las preceden. Los nombres de las estirpes se refieren al laboratorio donde fue aislada o la colección en la que se depositó: C, laboratorio de M. Delbrück, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA; S, laboratorio de E. Cerdá-Olmedo, Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España; KC, A. Idnurm, ahora en la University of Melbourne, Australia; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands; G, Indoh, Anastasiou y Carmichael: University of Saskatchewan, Saskatoon, Canadá; NRRL, Northern Regional Research Laboratory, USDA, Peoria, IL, USA; RSA, R.K. Benjamin, Claremont, CA, USA; K, B. Furch, Universität Kiel, Alemania; UBC, R. J. Bandoni, University of British Columbia, Canadá; KACC, Korean Agricultural Culture Collection, Swon, Korea; ATCC, American Type Culture Collection, USA; ICMP, International Collection of Microorganisms from Plants, Nueva Zelanda; IMI, International Mycological Institute, Kew, Reino Unido.

(1) (Ootaki y Miyazaki, 1993) (2) (Benjamin y Hesseltine, 1959) (3) (Hong et al., 2012) (4) (van Laere, 1983)

La muestra de heces de cánido fue la única que contuvo *Phycomyces* y de ella se aislaron tres estirpes, S607, S608 y S609. La zona de recolección era bastante oscura, a 35 m de la boca del Higueral y las heces se encontraban bajo el borde de una chimenea ciega de 25 m de altura. Las tres estirpes aisladas diferían en sus reacciones sexuales frente a *P. blakesleeanus*. S608 y S609 tuvieron una respuesta sexual parcial y opuesta, ya que S609 reaccionó frente a UBC21, de sexo (+), y S608 reaccionó frente a NRRL1555, de sexo (-). S608 y S609 cruzaron produciendo germosporas viables. El micelio de S609 creció inicialmente de forma pobre en agar mínimo y muy bien en agar nutritivo con 1 g/l de extracto de levadura. Después de pocos ciclos vegetativos sucesivos no necesitó suplemento para crecer.

La estirpe S607 no presentó reacción sexual frente a ninguna estirpe de las probadas, pero se determinó que era de sexo (+) por amplificación mediante PCR del gen del sexo.

A 1 m aproximadamente del lugar del aislamiento de *Phycomyces*, en una de las muestras de murcielaguina, crecía otro mucoral que por sus esporangióforos, más cortos y más finos que los de *Phycomyces*, por sus esporas, y por sus secuencias ITS/5.8S se asignó al género *Mucor*.

En prospecciones posteriores de la cueva se tomaron otras 51 muestras y no se encontró *Phycomyces*, pero sí otros Mucorales. Las visitas sistemáticas hubieran permitido relacionar la presencia de *Phycomyces* con el ciclo anual, la meteorología y la actividad de animales, pero las dificultades prácticas y burocráticas para acceder a la cueva lo impidieron.

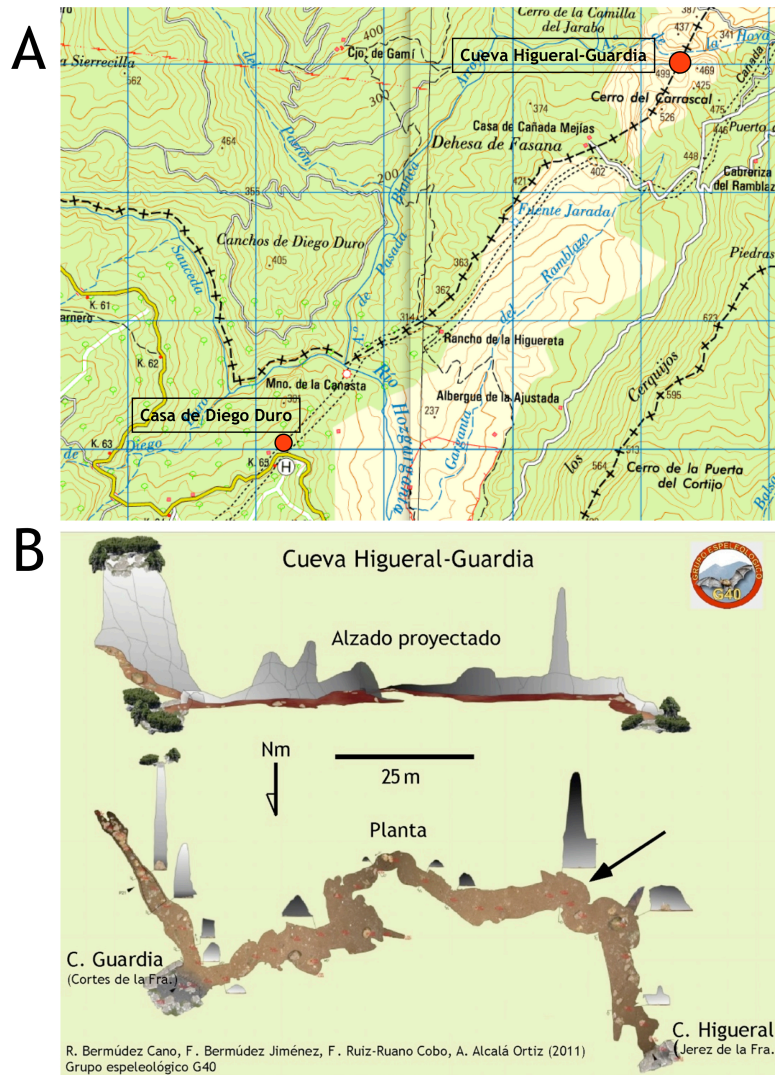


Fig. 10 (A) Lugares de aislamiento de *Phycomyces* en la Saucedá (Mapa Topográfico Nacional, MTN50 1063-4, Instituto Geográfico Nacional. Los cuadrados miden 1 km de lado. (B) Plano de la cueva del Higueral-Guardia (Torres *et al.*, 2013). La flecha indica el lugar de localización de la muestra de la que se aisló *Phycomyces*.

Con el fin de determinar si la murcielaguina era un sustrato óptimo para el crecimiento de *Phycomyces* se cultivó en el laboratorio la estirpe S606 sobre medio elaborado con agar, 20 g/l de glucosa y distintas concentraciones de murcielaguina. En todos los casos se podujeron micelios ralos y pocos y finos esporangióforos, lo que sugiere que la murcielaguina es un sustrato pobre para el crecimiento de *Phycomyces*.

1.2 Otras búsquedas de *Phycomyces* en España

La recogida de muestras se extendió a otros lugares de la Península Ibérica y a las islas La Gomera, La Palma, Tenerife, El Hierro y Lanzarote, en Canarias. De todas las muestras analizadas, solo se consiguió aislar *Phycomyces* en dos de La Gomera, una de La Palma y otra de Cádiz (Fig. 11, Tablas 1 y 2). Dos nuevas visitas al bosque de las Mercedes dieron resultados negativos.

La muestra de la Isla de La Palma fue recogida en un campo contiguo al Centro de Visitantes de la Caldera de Taburiente, a unos 2 km de la entrada al Parque Nacional del mismo nombre, en el municipio de El Paso. Eran heces de conejo sobre las que no se observó micelio o esporangióforos. Todas las colonias de *Phycomyces* que se obtuvieron parecían idénticas, por lo que solo se conservó un clon, la estirpe S642. En la misma muestra se encontró un ejemplar que se identificó morfológicamente como *Rhizopus*.

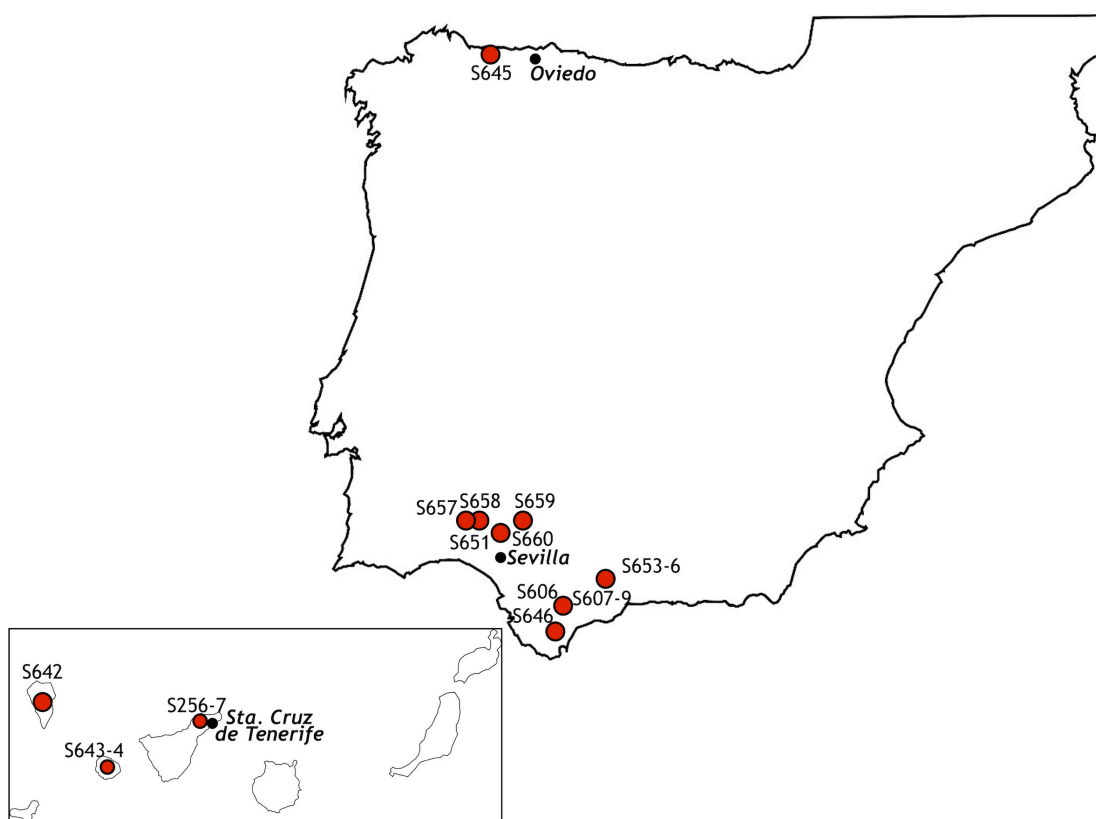


Fig. 11 Lugares de origen de las estirpes de *Phycomyces* aisladas en España, círculos grandes, y principales ciudades vecinas.

Las estirpes de La Gomera se encontraron en la laurisilva del Parque Nacional de Garajonay, en el municipio de Hermigua. La estirpe S643 se recogió junto a la ermita de Lourdes y la estirpe S644 a 0,5 km de allí, junto al arroyo del Cedro. Ambas se encontraban en materia orgánica sin identificar y en ningún caso se observaron esporangióforos o micelio que pudieran indicar la presencia de *Phycomyces*. Inicialmente S644 creció en medio mínimo desarrollando micelios y esporangióforos finos, que se volvieron más robustos en los subcultivos siguientes. Aplicando el criterio de uniformidad morfológica y sexual no se conservaron otros clones. Junto a *Phycomyces* se aislaron ejemplares identificados morfológicamente como *Mucor*.

En otros muestreos realizados en las Islas Canarias y en la Península Ibérica (Asturias, Cantabria, ambas Castillas, Extremadura, Valencia y Andalucía) se utilizaron trampas Sherman que se colocaban al anochecer y eran recogidas a la mañana siguiente, liberando a los animales capturados. Así se favorecía la recogida directa de heces de pequeños mamíferos noctívagos.

El único resultado positivo conseguido con este método fue el aislamiento de la estirpe S646 en Cádiz. La trampa fue colocada junto al arroyo Valdeinfierno, municipio de Los Barrios, a unos 36 km de la cueva del Higueral-Guardia. Se capturaron tres individuos del género *Rattus* en una misma noche y de las heces y el cebo de uno de ellos se obtuvieron cultivos con esporangióforos de Mucorales. Las esporas recolectadas de esporangios independientes permitieron el aislamiento de colonias identificadas morfológicamente como de *Phycomyces*, *Mucor* y *Rhizopus*. Las colonias de *Phycomyces* eran indistinguibles entre ellas, por lo que se conservó un solo clon, la estirpe S646. Esta estirpe presentó un crecimiento inicial en medio mínimo muy pobre, que mejoró en sucesivos ciclos vegetativos.

1.3 Otros aislamientos en España y Estados Unidos de América

Se solicitó a personas aficionadas a la Naturaleza el envío de muestras que tuvieran esporangióforos similares a los de *Phycomyces*. Tuvo mucho éxito la llamada del Prof. Idnurm en el foro electrónico de los jardines botánicos de la University of British Columbia, ya que a través de ella se consiguieron numerosas muestras de Estados Unidos de América (USA).

Las muestras recibidas fueron muy parecidas, asociadas de una manera u otra a animales domésticos o salvajes, vómitos o heces de mamíferos y semillas de comederos de pájaros. Se encontraron tanto al aire libre como en edificios y cuevas, y en la mayoría de los casos en lugares relacionados con actividades humanas.

Se aislaron 10 nuevas estirpes en la Península Ibérica (Fig. 11, Tablas 1 y 2), de las que cinco procedían de cuevas y el resto crecía al aire libre. Dos cuevas visitables de Andalucía, la cueva de Ardales (Málaga) y la cueva de Aracena (Huelva), fueron el origen de las muestras aportadas por el grupo de investigación del Dr. Cesáreo Sáiz-Jiménez, del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), que investigaba los organismos colonizadores de cuevas visitables y su repercusión en la conservación del patrimonio de las mismas (Fernández-Cortes *et al.*, 2011). Sus investigaciones han demostrado que hay una estrecha relación entre las colonizaciones de Mucorales y las actividades humanas realizadas en las cuevas (Jurado *et al.*, 2010).

Las demás estirpes españolas se encontraron en playas, jardines o dehesas. Varias de ellas fueron descritas por los recolectores como difíciles de distinguir del resto de hierbas circundantes. Todas las estirpes aisladas en España han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia).

El Prof. Gutiérrez Pozo, de la Universidad de Sevilla, encontró recientemente en un alcorque de la calle Antonio Maura Montaner, de Sevilla, una eclosión de *Phycomyces* y otros Mucorales sobre numerosas heces de perro (Fig. 12). De este hallazgo no se aislaron estirpes, pero sirvió para observar al organismo en su medio natural. *Phycomyces* ocupaba una porción menor y dispersa de la superficie micelial total presente en el terreno y destacaba por el tamaño y la robustez de sus esporangióforos. Los esporangios de *Phycomyces* se mantienen intactos durante más tiempo que los de los demás Mucorales.



Fig. 12 *Phycomyces* y otros Mucorales sobre heces de perro en Sevilla. (Izquierda) Vista general de la distribución de los hongos y detalle de los esporangióforos de *Phycomyces*. (Derecha) Esporangios inmaduros de *Phycomyces*, junto a los de otros Mucorales.

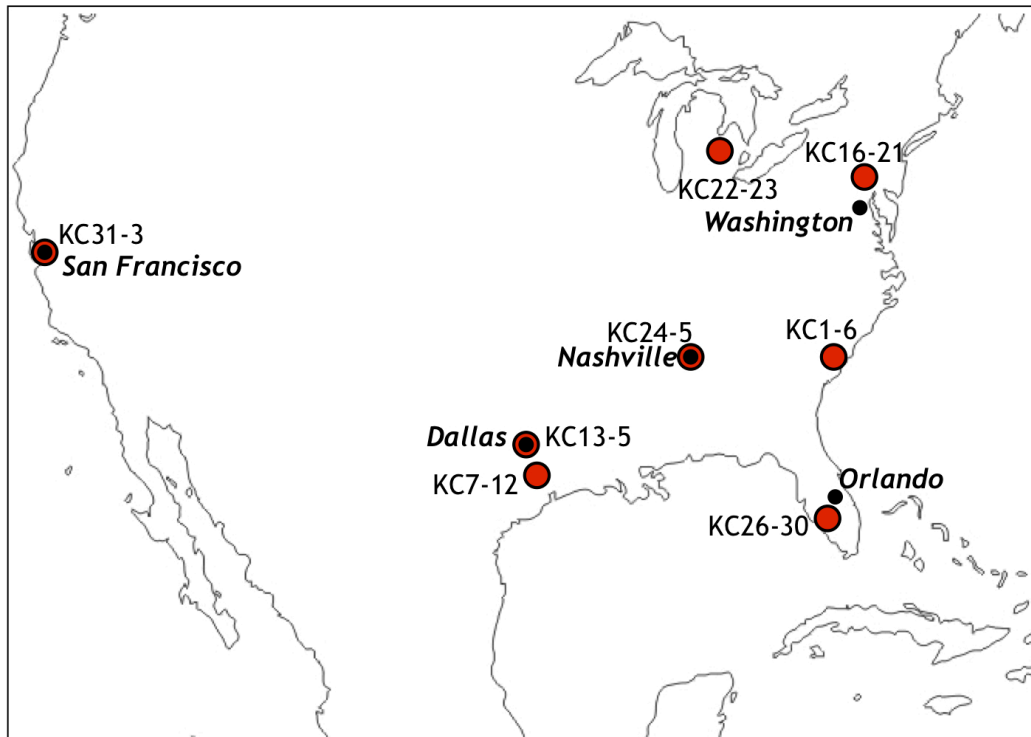


Fig. 13 Lugares de origen de las estirpes de *Phycomyces* aisladas en USA.

Treinta y tres estirpes fueron aisladas por el Prof. Idnurm de 10 muestras independientes procedentes de siete de los Estados Unidos (Fig. 13, Tabla 2). La mayoría de los sustratos eran restos orgánicos de mamíferos, tanto vómitos como heces. Dos de las muestras procedían de comederos de pájaros en Michigan y Tennessee. En este caso *Phycomyces* no crecía sobre heces, sino sobre semillas en un comedero de pájaros, pero se observaron ciervos y ratones que se acercaban a alimentarse en ellos.

La muestra recogida en Fairfax, VA, presentaba esporangióforos de *Phycomyces* vacíos y con las paredes colapsadas que sugerían la actividad de algún mamífero capaz de succionar su contenido. La misma situación se observó en una muestra recogida en Tallahassee, FL, de la que se están aislando nuevas estirpes (Fig. 14) y que además contenía cigosporas. Esta es la única muestra en la que se encontraron estructuras sexuales.

2. Asociación de *Phycomyces* con pequeños roedores

Dos indicios sugerían que *Phycomyces* podía ser parte de la dieta de pequeños mamíferos: la presencia frecuente en sus heces y la observación de esporangióforos vacíos en algunas muestras naturales (Fig. 14).



Fig. 14 (Arriba) Aspecto de los esporangi6foros de *Phycomyces* sobre heces de mapache en Fairfax, VA, USA (Fotograf1a recibida de D. Johnston). (Abajo) Cigosporas de *Phycomyces* en una muestra recogida en Tallahassee, FL, USA (Fotograf1a recibida de A. Idnum).

A dos individuos de la especie *Mus musculus*, uno criado en cautividad desde su nacimiento y otro salvaje, se les ofreci6 micelio esporulado de la estirpe S606 de *P. nitens*. Ambos roedores extrajeron 6vidamente su contenido y dejaron vac1os los esporangi6foros. Los ratones no ingirieron las paredes de los esporangi6foros sino que las usaron para acondicionar sus nidos. Los roedores alternaron la ingesta del contenido de los esporangi6foros con la de pienso y agua, sin mostrar preferencias por ninguno de ellos.

El n6mero de experimentos fue reducido, dos por individuo. No se observaron efectos perjudiciales en los ratones que ingirieron *Phycomyces*.

La inoculaci6n directa de esporas en la boca del rat6n permite verlas directamente en sus heces mediante microscop1a (Fig. 15). En los cultivos en medio 6cido de las heces de las 12 primeras horas germinaron pr6cticamente todas las esporas inoculadas, en los de las 24 horas siguientes, unas 1000, y en los de las 48 horas, ninguna. Se concluye que el tr6nsito intestinal de las esporas es r6pido y no afecta a su viabilidad.

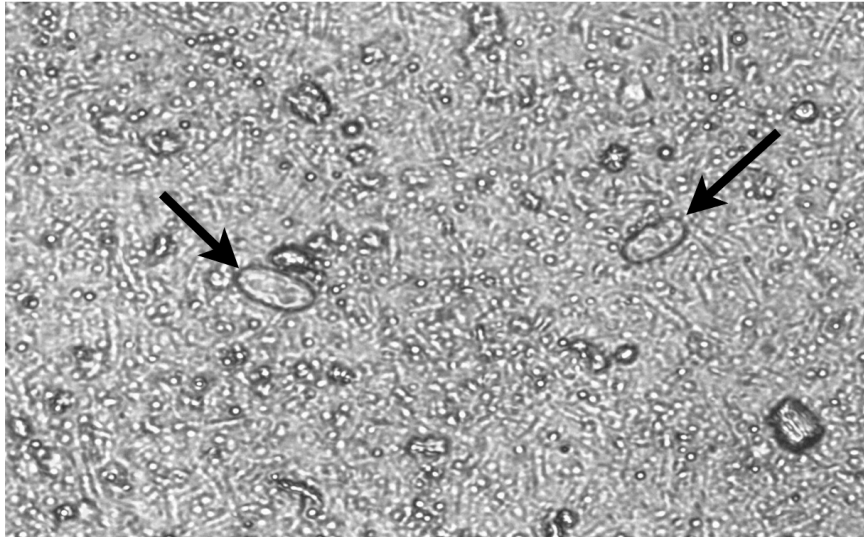


Fig. 15 Esporas de *P. blakesleeanus* (flechas) en heces de ratón. Se inoculó directamente en la boca de un ratón una suspensión de 5×10^5 esporas de *Phycomyces* de la estirpe NRRL1555 y se recogieron sus heces en las horas posteriores. Microscopía en contraste de fase de una suspensión de las heces depositadas durante las 12 horas siguientes a la inoculación.

En otros experimentos se dio acceso a los ratones a micelios esporulados de *Phycomyces* durante 12 horas, además de su alimento normal. Los resultados fueron variables, pero en general se encontraron algo más de 1 espora/ μg en las heces del primer día, con disminución gradual hasta 1 espora/mg en las del octavo día y ninguna en las del noveno día. Estos valores relativos se mantuvieron en ambos individuos. Teniendo en cuenta los resultados del párrafo anterior y el peso de las heces se puede estimar que en estos experimentos los ratones ingirieron del orden de medio millón de esporas.

La comparación de ambos experimentos indica que las esporas, aunque permanecen poco tiempo en el intestino del ratón, pueden presentarse en sus heces durante varios días más. Las esporas se adhieren al cuerpo del animal, que puede ingerirlas en sus rutinas de aseo o dispersarlas directamente en su entorno.

La situación descrita hace que los mamíferos que han estado en contacto con *Phycomyces* no sólo sean sus vectores, sino que propicien encuentros entre diferentes estirpes. Si estas estirpes son de diferente sexo podrían cruzar y recombinar en las heces. Los cruzamientos entre estirpes de distinto sexo ingeridas por el ratón incrementaron la producción de cigosporas respecto a los cultivos sin heces (Fig.16). El paso de las esporas por el tracto digestivo no es necesario para que se produzca el aumento de la producción de cigosporas, aunque parece que lo mejora. Los cultivos de esporas de ambos sexos sobre heces de ratón presentaron produjeron más cigosporas

que los que no tenían heces, pero menos que cuando las esporas habían sido ingeridas previamente por el ratón (Fig. 16).

Las cigosporas producidas sobre heces no acortaron su periodo de dormancia, ya que germinaron a los 162 días en un experimento y 176 días en otro. Las cigosporas producidas en las condiciones usuales de laboratorio germinaron a los 74 días, dormancia observada en muchos experimentos. En ambos casos germinaron casi todas las cigosporas.

Las heces pueden carecer del hierro necesario para el desarrollo de *Phycomyces*. Solo la incorporación de nitrato férrico permitió el crecimiento del hongo en ellas. La adición de glucosa o de fosfato potásico no tuvo efecto.

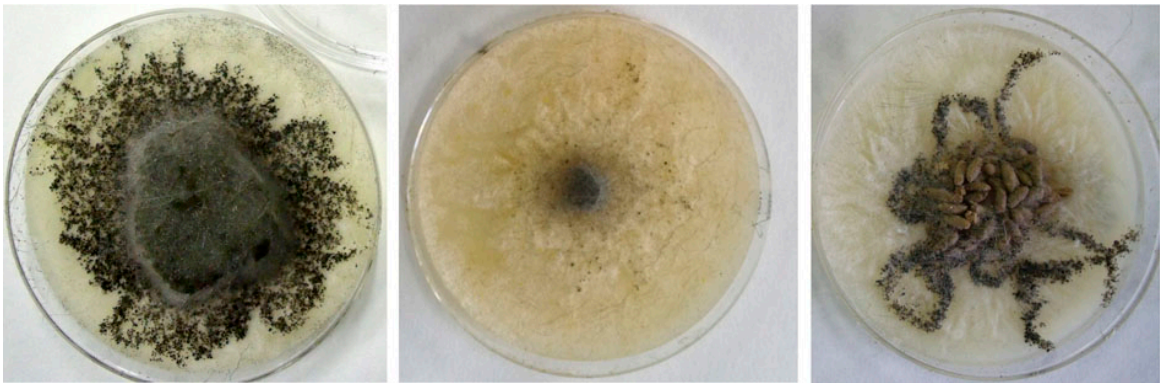


Fig. 16 Producción de cigosporas de *Phycomyces*. (Izquierda) En heces de ratón alimentado con pienso impregnado con esporas de ambos sexos. (Centro) En agar nutritivo sin heces a partir de esporas depositadas en el centro de la caja. (Derecha) En heces de ratón inoculadas con esporas. En todos los casos el número de esporas de cada estirpe fue aproximadamente 5×10^3 . Los cultivos se hicieron sobre agar nutritivo y se incubaron a 16°C durante 8 días.

Capítulo II

Diversidad fenotípica de las estirpes naturales de *Phycomyces*

Se reunió una colección de 96 estirpes del género *Phycomyces* procedentes de diversos lugares del mundo (Tabla 2), que incluía desde las utilizadas en investigaciones históricas (Benjamin y Hesseltine, 1959) hasta las aisladas más recientemente. La variedad de orígenes ha posibilitado el estudio de diversidad más amplio jamás realizado sobre un género del orden de los Mucorales.

Este capítulo presenta observaciones sobre morfología y fisiología de las estirpes, con atención a los rasgos que pudieran hacerlas interesantes para la industria o la investigación.

Las dos especies del género son indistinguibles a simple vista. Entre las estirpes conservadas en las colecciones solo tres de *P. blakesleeanus* presentan modificaciones morfológicas que las hacen diferentes al resto. Los esporangióforos de las estirpes NRRL2565 y NRRL2566 están ensanchados en la base del esporangio, por lo que recuerdan a los del género *Pilobolus* (Fig. 17). Burgeff y Zycha aislaron ejemplares con estas características en Alemania, que fueron depositados en colección con quince años de diferencia (Benjamin y Hesseltine, 1959). El aislamiento de Burgeff fue a partir de un heterocarionte natural (Burgeff, 1928) del que se purificaron dos estirpes estables con fenotipos diferentes y a las que llamó variedad *piloboloides*.

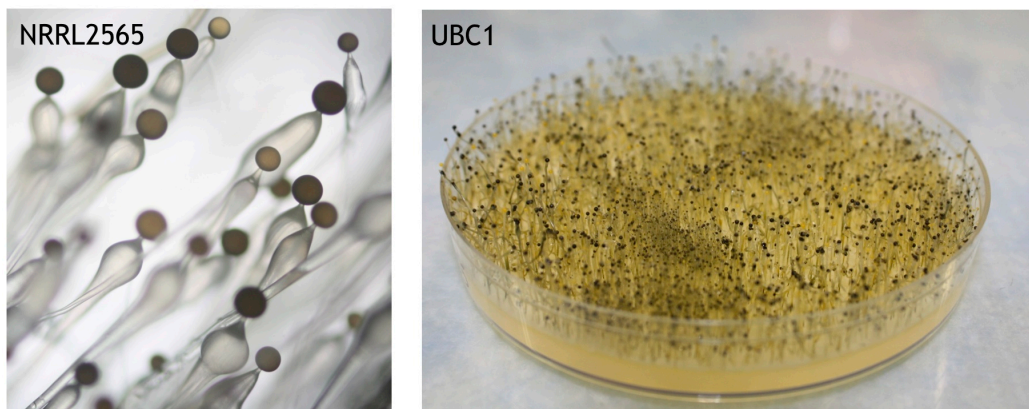


Fig. 17 Mutantes naturales de *P. blakesleeanus*. (Izquierda) Aspecto de los esporangióforos del mutante *piloboloides*, NRRL2565. (Derecha) Aspecto del tamaño de los esporangióforos de la estirpe UBC1.

Otra estirpe natural con características morfológicas diferentes al silvestre es UBC1, aislada por Bandoni en los años 70. Tiene macróforos funcionales que no superan el centímetro (Fig. 17), como otras estirpes descritas por Burgeff y a las que denominó *nanus*.

Las dos variedades descritas a pesar de su modificación morfológica no deben asignarse a especies diferentes de *P. blakesleanus*, como se demostrará más adelante, ya que son mutantes dentro de la misma.

1. Tamaño y forma de las esporas

Las estirpes naturales de *Phycomyces* difieren notablemente en las dimensiones de sus esporas (Anejo 1), que permiten reconocer dos grupos correspondientes a las dos especies, *P. nitens* y *P. blakesleanus* (Fig. 18).

Las esporas de *P. blakesleanus* son más pequeñas, redondeadas y uniformes que las de *P. nitens*. Las nuevas estirpes se insertan en los mismos grupos y las españolas, todas en *P. nitens*. La representación gráfica de la longitud frente a la excentricidad discrimina mejor las dos especies de *Phycomyces* que otras representaciones de las dimensiones de las esporas.

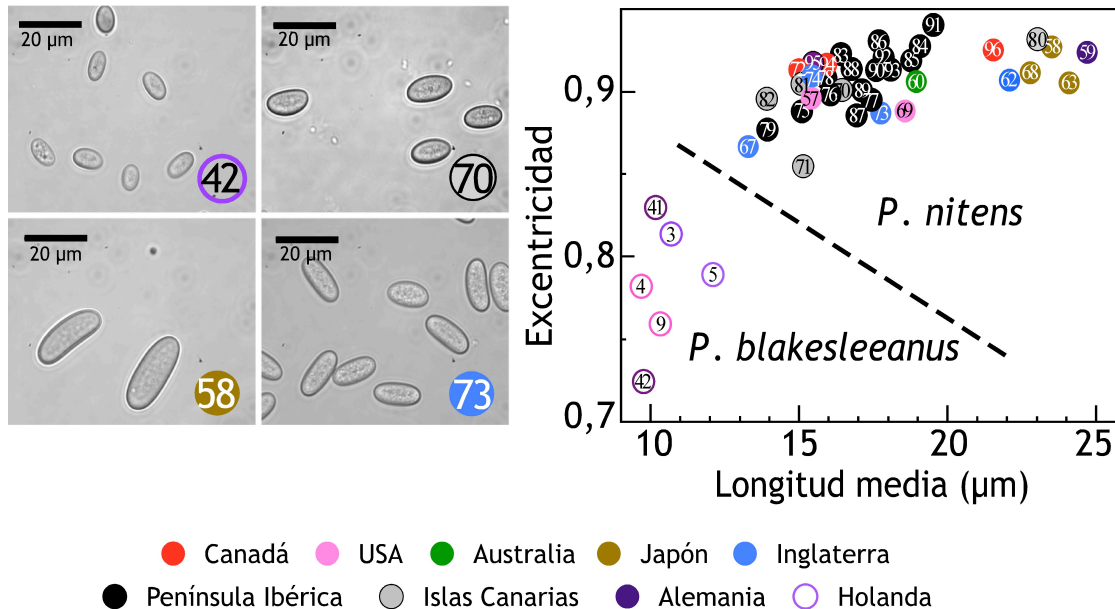


Fig. 18 Tamaño de las esporas de *Phycomyces*. Para la identificación de las estirpes ver la Tabla 2. Los símbolos vacíos indican las estirpes de *P. blakesleanus* y los rellenos, las de *P. nitens*. (Izquierda) Micrografías en contraste de fase de ejemplos de esporas de cuatro estirpes representativas. (Derecha) Longitud (eje mayor) y excentricidad de las imágenes microscópicas de 42 estirpes (medias de al menos 20 esporas de cada una).

La media de la longitud de las esporas tomadas de un solo esporangio sería un criterio suficiente para determinar la especie de una nueva estirpe, pero una sola espora no aseguraría la identificación, porque se solapan los tamaños extremos.

El tamaño de las esporas no correlaciona con el origen geográfico de las estirpes. Las esporas más grandes fueron las aisladas en Japón, en el condado de Avon (Inglaterra), en Alemania y en la isla canaria de La Palma. Las esporas más pequeñas de *P. nitens* fueron encontradas en las cercanías de las más grandes, en el condado de Surrey (Inglaterra) y en la isla canaria de La Gomera.

2. Número de núcleos

La distribución del número de núcleos por espora varía ampliamente de unas estirpes a otras (Anejo 2), siendo más diversas las de *P. nitens*. El coeficiente de variación de la distribución de núcleos por espora fue de 0,34 en la estirpe S644 a 0,20 en la estirpe NRRL1555.

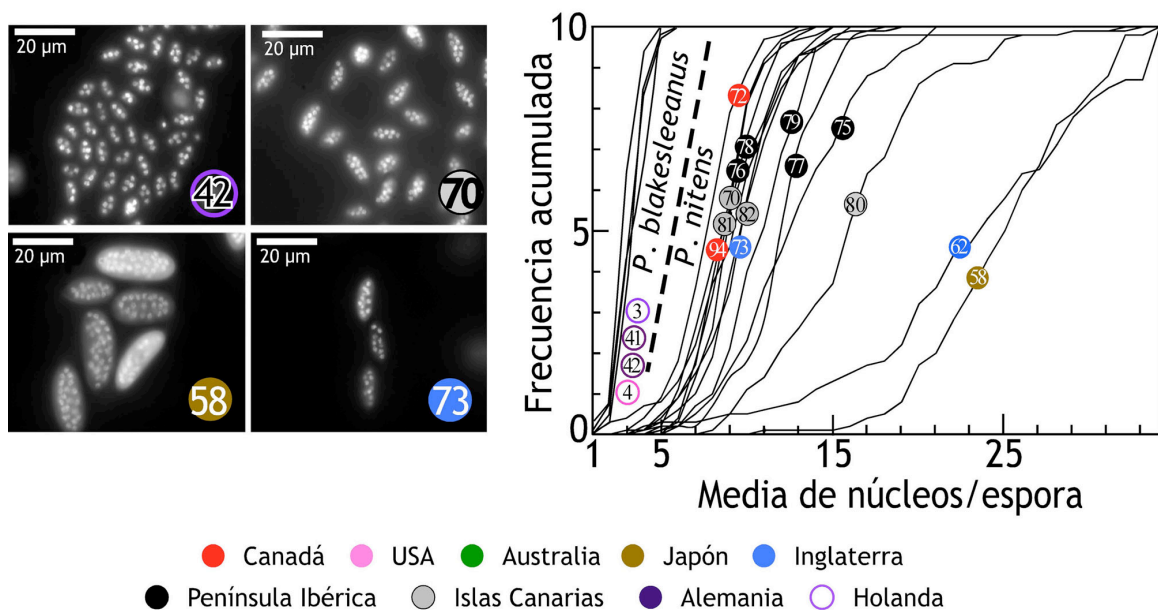


Fig. 19 Número de núcleos de las esporas de *Phycomyces*. Para la identificación de las estirpes ver la Tabla 2. Los símbolos vacíos indican las estirpes de *P. blakesleanus* y los rellenos, las de *P. nitens*. (Izquierda) Micrografías de ejemplos de esporas de cuatro estirpes representativas con los núcleos teñidos con DAPI. (Derecha) Frecuencia acumulada del número de núcleos por espora de 18 estirpes.

El número de núcleos por espora separa las estirpes en dos grupos que corresponden a las dos especies de *Phycomyces* (Fig. 19). La media es un excelente criterio para discriminarlas, siendo inferior a cuatro núcleos para *P. blakesleeanus* y mayor que ocho para *P. nitens*. El análisis confirmó que todas las estirpes españolas eran de la especie *P. nitens*. Los valores más extremos se encontraron en algunas esporas uninucleadas de estirpes de *P. blakesleeanus* y en otras de *P. nitens* con más de 30 núcleos. Una espora con más de ocho núcleos debería ser asignada a *P. nitens*, pero valores menores serían ambiguos. La estirpe más usada en el laboratorio, NRRL1555, destaca por el bajo número de núcleos y la baja excentricidad de sus esporas.

3. Crecimiento micelial

A simple vista, el crecimiento de las estirpes de *P. nitens* era bastante uniforme y similar al de *P. blakesleeanus*. No se observó relación entre los valores cuantitativos del crecimiento de algunas estirpes a distintas temperaturas y su procedencia geográfica (Fig. 20).

Respecto a la masa micelial tras seis días de incubación, aproximadamente la mitad de las estirpes prefirieron 22 °C y la otra mitad 16 °C. Todas las estirpes desarrollaron micelios a 30 °C, pero la masa seca producida fue menor que a temperaturas más bajas; las estirpes procedentes de las Islas Canarias fueron las que crecieron peor a 30 °C.

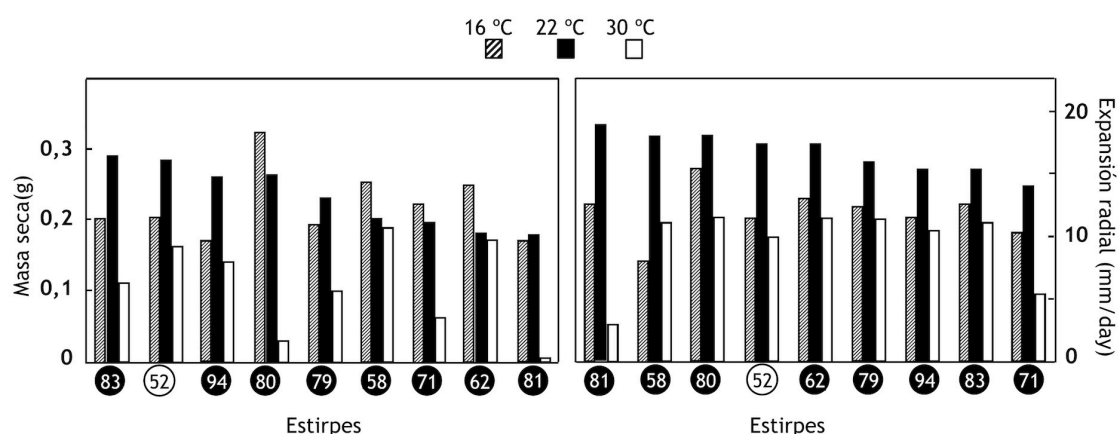


Fig. 20 Crecimiento de *Phycomyces* a diferentes temperaturas. Masa seca después de seis días de incubación y expansión radial de la colonia durante el tercer día de crecimiento. Para la identificación de las estirpes ver Tabla 2; los símbolos vacíos se utilizan para *P. blakesleeanus* y los rellenos para *P. nitens*.

A los seis días de incubación a 16, 22 y 30 °C, las estirpes estudiadas habían alcanzado el límite de la caja de Petri o estuvieron muy cerca de él. La mayor expansión radial ocurrió a 22 °C y fue cercana a 17 mm/día en todas esas estirpes, con un coeficiente de variación de solo el 0,10, el más bajo encontrado en nuestras medidas cuantitativas.

A 22 y 16 °C la masa seca por superficie de la colonia fue muy parecida en todas las estirpes analizadas, 43 µg/mm². A 30 °C se observó una mayor diversidad en el crecimiento micelial, aunque la mayoría de las estirpes presentaron valores de al menos 26 µg de masa por mm².

A 4 °C algunas estirpes de la Península Ibérica, las Islas Canarias y Canadá (S257, S609, S642, S645 y UBC39) produjeron un fino micelio que tras cinco días de incubación alcanzaron 5 mm de diámetro. Las esporas de las otras estirpes analizadas no germinaron nunca o produjeron solamente germínulas.

La estirpe S642 destacó por la rápida expansión de su micelio, que creció sumergido en el agar tanto a 30 °C como a 16 °C. A esta última temperatura esporuló tan abundantemente que mantuvo el valor de la masa seca total por superficie.

A 30 °C las estirpes de Canarias presentaron una gran diversidad. La estirpe S257, de Tenerife, tuvo un crecimiento muy lento y no alcanzó más de 30 mm de diámetro a los seis días, pero llegó a producir hasta 55 µg de masa seca por mm². La estirpe S643 de La Gomera también retrasó su crecimiento y desarrolló un micelio extremadamente fino, de 3 µg de masa seca por mm². Otra estirpe de las Islas Canarias, S642, creció más rápido a 30 °C pero a los seis días tenía solo 5 µg de masa seca por mm².

4. Contenido de caroteno β

Ninguna de las 96 estirpes destacaba por una coloración que sugiriera la producción elevada de caroteno β, que hubiera sido interesante por su aplicación industrial.

A los cuatro días de cultivo en la oscuridad la mayoría de las estirpes contenía unos 100 µg de caroteno β por gramo de masa seca (Tabla 3). Cuatro presentaron concentraciones más altas, entre 140 y 150 µg/g de masa seca, valores mucho menores que los de las estirpes mutantes superproductoras ya disponibles. El contenido de caroteno β de las estirpes analizadas de *P. nitens* fue independiente de su origen y similar a los de NRRL1555, usada para la mejora de la producción de este compuesto (Murillo *et al.*, 1978).

Tabla 3 Contenido de caroteno β de 13 estirpes silvestres de *P. nitens*, la estirpe silvestre NRRL1555 de *P. blakesleeanus*, su mutante superproductor S276 y una estirpe del género *Mucor*, SM3, aislada de la misma muestra que S643. Los cultivos fueron incubados durante cuatro días en oscuridad. Los datos muestran las medias de los valores de dos cultivos. El error relativo medio de estas determinaciones fue 0.08.

Especie	Estirpe	Masa seca (g)	caroteno β ($\mu\text{g/g ms}$)
<i>P. nitens</i>	ATCC16327	0.25	126
<i>P. nitens</i>	IMI1077	0.25	85
<i>P. nitens</i>	S256	0.27	120
<i>P. nitens</i>	S270	0.24	145
<i>P. nitens</i>	S605	0.27	120
<i>P. nitens</i>	S606	0.25	146
<i>P. nitens</i>	S607	0.24	131
<i>P. nitens</i>	S608	0.27	92
<i>P. nitens</i>	S609	0.26	108
<i>P. nitens</i>	S642	0.18	194
<i>P. nitens</i>	S643	0.25	108
<i>P. nitens</i>	S644	0.16	158
<i>P. nitens</i>	UBC39	0.25	151
<i>P. blakesleeanus</i>	NRRL1555	0.28	90
<i>P. blakesleeanus</i>	S276	0.24	5292
<i>Mucor</i>	SM3	0.35	14

Las semejanzas en la carotenogénesis de las dos especies se extendieron a la activación por compuestos químicos como el retinol y el ftalato de dimetilo (Fig. 21).

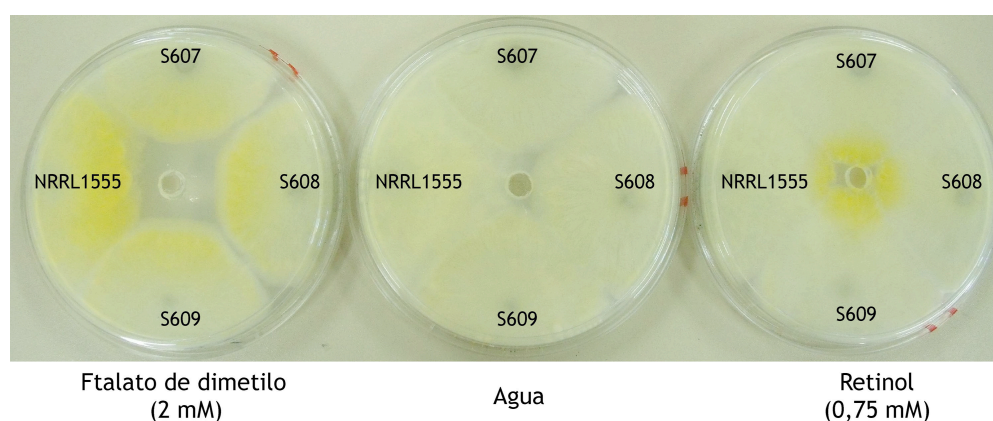


Fig. 21 Activación química de la carotenogénesis en *P. nitens*. Aspecto de los micelios de tres estirpes de *P. nitens* y una de *P. blakesleeanus*, NRRL1555, a los cuatro días de incubación en oscuridad y en presencia de retinol, ftalato de dimetilo y agua. Los compuestos se dispensaron en los pocillos situados en el centro de la caja.

5. Fotosensibilidad de los esporangióforos

Todas las estirpes españolas respondieron fototrópicamente a intensidades de luz blanca a las que el mutante ciego C4 era insensible (Foster y Lipson, 1973; Bergman *et. al*, 1973) y todas produjeron micróforos y macróforos en oscuridad, pero no micróforos en la luz.

En algunos cultivos de estirpes de *P. nitens* se observó un fenómeno de esporulación rítmica bajo iluminación continua, nunca descrito en *Phycomyces* (Fig. 22). Durante la expansión del micelio se observaban anillos concéntricos de esporulación entre los que quedaban anillos de micelio sin esporular. Este fenómeno ocurría irregularmente y no se consiguió fijar las condiciones que lo hicieran reproducible. Algunas estirpes de *P. nitens* procedentes de colecciones se comportaron de la misma manera y ninguna de *P. blakesleanus* lo hizo. La incubación en oscuridad nunca produjo este efecto.

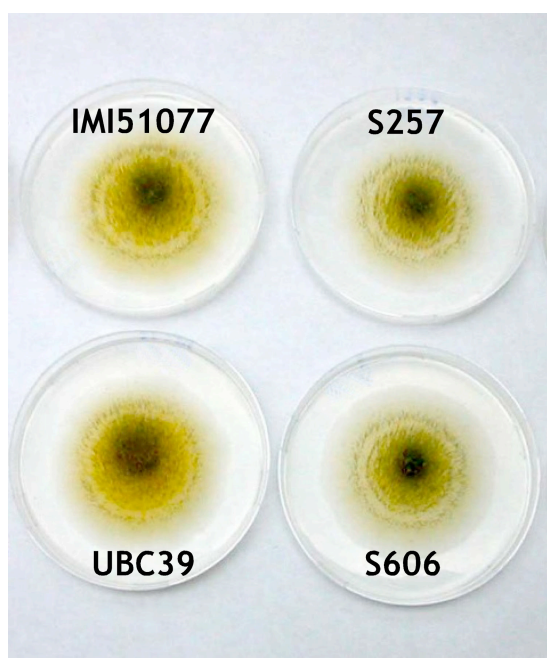


Fig. 22 Esporulación de varias estirpes silvestres de *P. nitens* incubadas a 22 °C bajo iluminación blanca continua (~5 W/m²).

Capítulo III

Diversidad genética de las estirpes naturales de *Phycomyces*

1. ADN para ARN ribosómico en *Phycomyces*

El ADNr de los eucariotas codifica los ARN de las subunidades mayor y menor del ribosoma. Las secuencias para los genes ribosómicos 18S, 5.8S y 28S, los espacios intergénicos IGS1 e IGS2 y las secuencias internas ITS1 e ITS2 se encuentran contiguas en el orden IGS2-18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S-IGS1. Esta unidad se repite en tándem en el genoma de los eucariotas, de 40 a 19.300 veces en animales y de 150 a 26.000 veces en plantas (Prokopowich *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2008), agrupados en un solo bloque o en varios, repartidos en uno o más cromosomas, como ocurre en la especie humana (Worton *et al.*, 1988). El gen ribosómico 5S en algunos organismos forma parte de las repeticiones, localizado entre las dos IGS, pero siempre se transcribe independientemente (Bergeron y Drouin, 2008). La organización del ADNr, su disposición en los genomas y su secuencia han sido herramientas valiosas para el estudio evolutivo de los organismos (Ganley y Kobayashi, 2007).

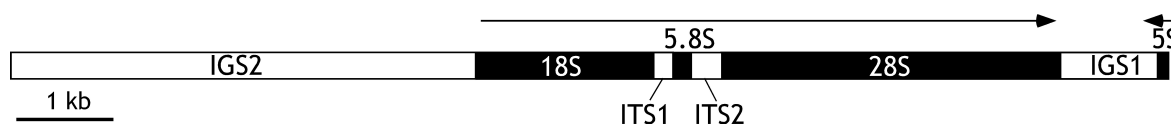


Fig. 23 Organización y tamaño de las unidades del ADNr de la estirpe NRRL1555 de *P. blakesleeanus*. Las barras negras son secuencias para los cuatro genes ribosómicos; las barras vacías son secuencias intergénicas (IGS) e ITS. Estructura obtenida localizando en el genoma de *Phycomyces*, mediante la herramienta BLAST, secuencias similares a las de los genes ribosómicos (Tabla 12). Las flechas indican el sentido y el alcance de la transcripción.

Se conocían las secuencias de los genes para los ARNs ribosómicos de *Phycomyces*, pero no su organización en unidades, ni el tamaño, ni la situación de estas. A partir de los datos del genoma publicado de *Phycomyces* se ha recopilado ahora la información que se presenta en la Fig. 23.

Hay cuatro unidades de ADNr secuenciadas casi completas en el genoma de *Phycomyces*: una es una secuencia de ~10 kb (scaffold 64:9882-1) que no contiene otros materiales; otra se encuentra sola en una secuencia de ~1.300 kb (scaffold 15:333869-322009), que es un artefacto producido por un obvio error del ensamblaje automático; otras dos se localizan en una secuencia que contiene otros ejemplares de los genes ribosómicos (scaffold 17:779374-802508). En total, se encuentran en el genoma publicado cinco ejemplares completos de los genes 5.8S, 18S, 28S y de las regiones intergénicas ITS e IGS2, ocho del gen 5S y seis de IGS1. El método utilizado en la secuenciación y ensamblaje del genoma elimina las secuencias repetidas, lo que explica que se hayan encontrado tan pocos de ejemplares. Por el mismo motivo el genoma publicado no refleja la diversidad real del ADNr.

A pesar de estas limitaciones se puede concluir que el ADNr de *Phycomyces* se encuentra en el grupo de ligamiento VII (Chaudhary *et al.*, 2013) e incluye el gen 5S, transcrito de la cadena opuesta al resto de genes ribosómicos. El tamaño del tándem de ADNr varía, entre 11 y 13 kb por diferencias de secuencia en IGS2 (4723, 6096 y 4704 pb). El resto de la unidad de ADNr tiene un tamaño fijo (7051 pb) y su secuencia es homogénea.

Las 93 estirpes de *Phycomyces* analizadas tenían idénticas secuencias del gen 5.8S, pero variaban en las ITS. El cladograma de parsimonia elaborado con estas diferencias agrupó a las estirpes en dos bloques claramente diferenciados, correspondientes a las especies *P. nitens* y *P. blakesleeanus* previamente establecidas por su morfología (Fig. 24). Las dos especies difieren en un 15 % de los 614 nucleótidos de la secuencia ITS/5.8S.

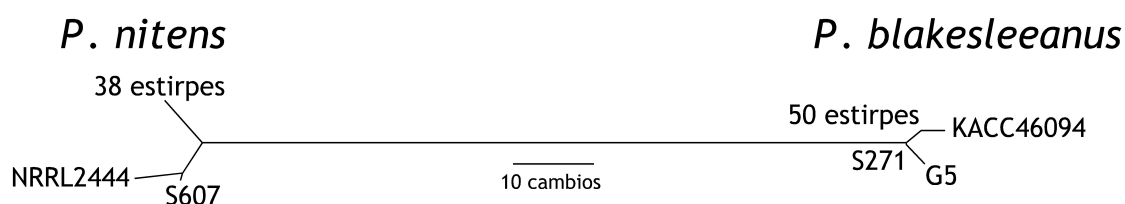


Fig. 24 Cladograma de parsimonia de las secuencias ITS/5.8S de 40 estirpes de *P. nitens* y 53 estirpes de *P. blakesleeanus*. El árbol está dibujado a escala según el número de cambios de nucleótido en cada rama.

Las secuencias ITS/5.8S eran notoriamente uniformes en todas las estirpes, con algunas excepciones. Cincuenta estirpes de *P. blakesleeanus*, incluida NRRL1555, tenían la misma secuencia y otras tres divergían de estas en uno a cinco nucleótidos. La estirpe CBS188.27 tenía una heterogeneidad en el nucleótido 15 de la secuencia ITS1, que podía ser adenina o citosina. Treinta y ocho estirpes de *P. nitens* compartían la misma secuencia o diferían en el nucleótido 17, que podía ser adenina, guanina o ambos. La estirpe NRRL2444 y S607 de *P. nitens* divergían de la secuencia mayoritaria en 14 y 10 nucleótidos respectivamente. S607 fue aislada de la misma muestra que las estirpes S608 y S609, que tenían la secuencia mayoritaria.

Los mutantes naturales de la especie *P. blakesleeanus* NRRL2565 y NRRL2566 (*piloboloides*) y UBC1 (*nanus*), tenían la secuencia 5.8S/ITS mayoritaria de su especie.

2. Comportamiento sexual y alelomorfos sexuales de *Phycomyces*

Todas las estirpes de *P. blakesleeanus*, con la excepción de la estirpe UBC1, reaccionaron sexualmente en condiciones de laboratorio y pudieron ser clasificadas como de sexo (+) o de sexo (-). A lo largo de la línea de contacto entre los micelios de sexos opuestos aparecía una banda amarilla brillante con cigosporas abundantes.

La estirpe UBC1, mutante *nanus*, presentó un comportamiento sexual diferente al resto. La reacción sexual fue incompleta y no se llegaron a formar nunca cigosporas maduras (Fig. 25). El desarrollo de las estructuras sexuales de las dos estirpes enfrentadas era asimétrico. Las dos estirpes inducen la formación de cigóforos, pero una de ellas, presuntamente la mutante, es incapaz de inducir la carotenogénesis sexual en la otra. Además en una estirpe, presuntamente la mutante, falla una etapa posterior del desarrollo del gametangio.

En condiciones de laboratorio algunas de las estirpes de *P. nitens* reaccionaron débilmente frente a otras de su misma especie o de *P. blakesleeanus* y muchas no lo hicieron en ningún caso. La respuesta sexual interespecífica se reflejó en un ligero aumento del color en las bandas de interacción y nunca produjo cigosporas.

De las estirpes españolas, solo seis mostraron reacción sexual, lo que permitió asignar las estirpes S605, S606, S609 y S642 al sexo (-) y S257 y S608 al sexo (+). En todos los cruzamientos se produjeron germosporas viables y el periodo de dormancia fue similar al de *P. blakesleeanus*. El número de cigosporas producidas y su germinabilidad presentaron grandes diferencias (Fig. 26). Estas variables no correlacionaron entre sí, ni parecen tener relación con el origen de las estirpes.



Fig. 25 Estadios del desarrollo de las estructuras sexuales producidas durante el cruzamiento entre UBC1 (+) y NRRL1555 (-). (1-3) Aspecto de los progametangios con acumulación diferente de caroteno. (4-6) Desarrollo de uno solo de los gametangios y formación de una cigospora imperfecta.

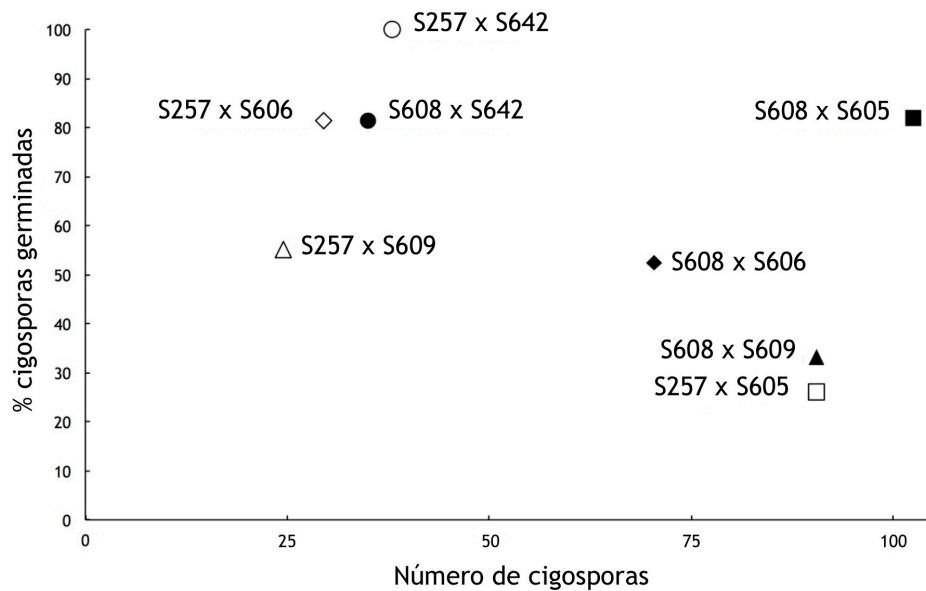


Fig. 26 Cruzamientos de *P. nitens*. Media del número de cigosporas recogidas de dos enfrentamientos independientes y su tasa de germinación a los 90 días.

Se conocían las secuencias de los alelomorfos sexuales de *P. blakesleeanus*, pero no las de *P. nitens*. Se obtuvieron estas mediante paseo cromosómico por el método de PCR inversa a partir de secuencias conservadas del gen *rnhA* de *P. blakesleeanus*. El alelomorfo sexual de sexo (+) de *P. nitens* tiene 3716 pb y el de sexo (-), 2084 pb; ambos son un tercio más pequeños que los correspondientes de *P. blakesleeanus* (Fig. 27). Las secuencias de los alelomorfos sexuales contiguas a los genes *sex* no se conservan ni entre especies ni entre sexos, salvo en la proximidad inmediata de los genes (Fig. 28).

En *P. nitens* el gen *tptA* no es contiguo a los alelomorfos sexuales, a diferencia de lo que ocurre en *P. blakesleeanus*. Se obtuvo una secuencia de unas 4,5 kb, que incluía parte del gen *tptA* (1,4 kb) y la secuencia inmediatamente anterior, que debe estar lejos de la región sexual porque nunca se pudieron amplificar conjuntamente.

El gen *sexP* de *P. nitens* tiene 952 pb, contiene un intrón de 58 pb y se transcribe de la cadena opuesta a la del gen *rnhA* (Fig. 27). Como ocurre en *P. blakesleeanus*, tiene un dominio HMG y dos posibles inicios de transcripción, que darían lugar a dos proteínas ligeramente distintas. Ochenta y un pares de bases antes del inicio del gen *sexP* se localiza la secuencia “GATCgtccAcCCAAT”, similar a las que se encuentran en esta región del genoma en otros Mucorales (Wetzels *et al.*, 2012) y a motivos conservados de unión a factores de transcripción (Mantovani, 1999). Difiere de la secuencia homóloga de *P. blakesleeanus* en un nucleótido.

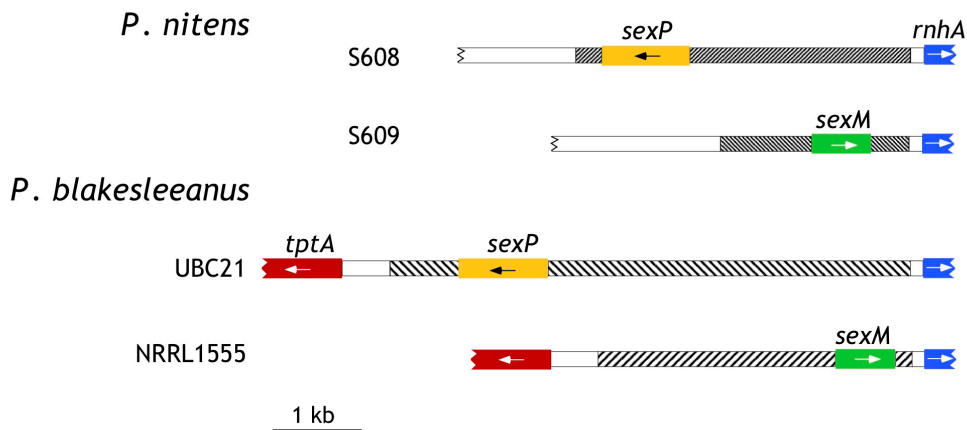


Fig. 27 Alelomorfos sexuales de *P. nitens* comparados con los de *P. blakesleeanus* (Idnurm *et al.*, 2008). Las barras con flechas indican los genes *rnhA*, *sexP* y *sexM* y su sentido de lectura. Las barras vacías indican las secuencias no codificantes y homólogas en cada especie y las rayadas, las secuencias no codificantes específicas de sexo y especie.

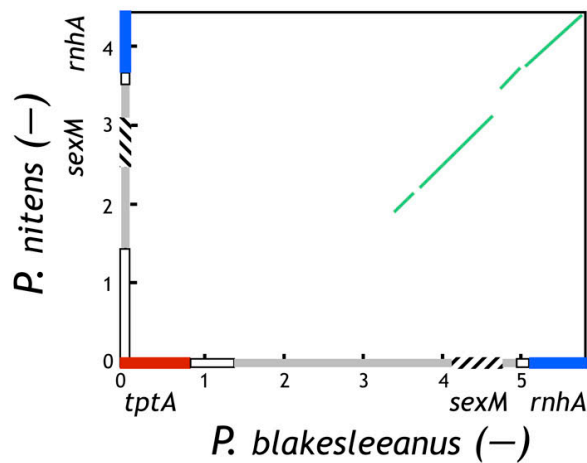
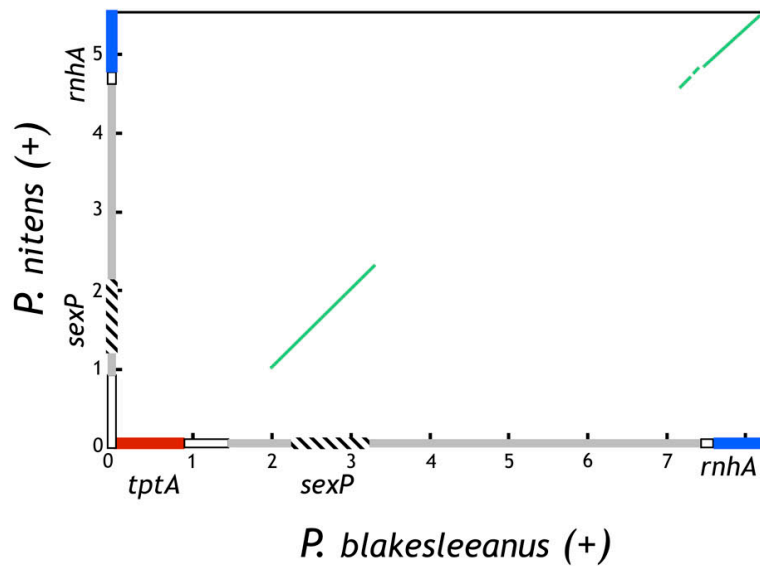


Fig. 28 Parecido de las secuencias de los alelomorfos sexuales y segmentos adyacentes de *P. nitens* y *P. blakesleeanus*. El gráfico (“dot plot”) fue generado con el programa YASS (Noe y Kucherov, 2005) usando un filtro de entropía de 4.4 y el resto de parámetros por omisión.

El gen *sexM* de *P. nitens* tiene 633 pb, no presenta intrones, es transcrito de la misma cadena que el gen *rnhA* y contiene un dominio HMG (Fig. 27).

Las proteínas SexM de ambas especies de *Phycomyces* coinciden en un 75 % de sus aminoácidos y las SexP en un 73 %, mientras que los valores respectivos para sus dominios HMG son 88 % en y 91,5 % (Fig. 29).

SexP

P. b MKTKQVHHLQRPYQRPYIKPRLQLAP^TLSVQQ^ISVIYIKGKTALRIYPSQAFVYARDLITMVD
P. n MKAKQTPHLPYQRPYIKPRL^LLAPKLSVQQ^ISVIYIKGKTALRIYPSQAFVYARDLITMVD

P. b EKRDIYITVNTGSSVERKDLFSAECLLRKEIYPDNSSKDEPMSTAQDKIFRTSPEQMPKR
P. n EKRDIYITVNTGSSVERKDLFSAECLLRKQMC^TESSTGVSI^SKGQENPYQASPEQV^PKR

P. b **PSNAFMIYSSTLRKRIKSTFPEY^TNSDI^SSKLLGAMWKNAGSDVKKEYMEKANEVREWHKE**
P. n **PSNAFMIYSATLRKRIKSTFPEY^TNSDI^SSKLLGAMWKNAGAEVKKEYMEKANEVREWHKE**

P. b RYPDYEYNSRK-TPKGRDSLIRMDLPCTNFMASEDEWIGQLNALLSQNSATSLLTGTQED
P. n RYPDYEYNSRKQSTKERDSMPRTDFSNQDFITADDEWIRQLNDLLSQNPMTALHGSSQEN

P. b IAIDFSFLPGFYSPSNEMASGDLKIEEWKNMYNGVTD^FDLRYSDQNVLLDESFWARF
P. n FAIDYTSTPYFISSPSNDISLGLKLEEWQDFC^NNWTEHDSRYLDQN-FLDESFWARF

SexM

P. b MNSFMFVNEFKNSYQPSDNIITENILSSSVRNKSM^TSAVKIRRPKNAFMLYRQAVHPRI
P. n MESFMFVNEFKNSYQPPSDILTESISSTPVRQKCIISSTVKIRRPKNAFMLYRQAVHPSI

P. b **LSANSSLHNKDI^SSRTAGEMWRNEKEEVRKY^EERKADEERLYH^SSKKFPGYI^YKPQQRKTRR**
P. n **LSSNSTIH^NKEI^SSRTAGM^WKNEKEEVRKY^EERKADEEKLYH^SSKKFPGYI^YKPQQRKTRR**

P. b LRTGSFNSLLRSSTDIQLIYHKAESIPTSDKINMKTQNYIIQSQNESTNEDDILNTPPTQ
P. n PQSTVCKPFLRSTSDIQLIYQKTESKSPSEKLSATSQDYIIHCRDESTNEDEILNTPPTQ

P. b CLDDSI^LKTFLDDLNFDIFSPVDELIFSLCS
P. n CLDDSI^LKTFLDDLSFDIFSPIDELIFSLCS

Fig. 29 Alineamiento de las secuencias de SexM y SexP de las especies *P. blakesleeanus* (línea superior) y *P. nitens* (línea inferior). Los aminoácidos conservados se indican en fondo gris y la secuencia del dominio HMG en negrita.

Todas las estirpes que no cruzaron en condiciones de laboratorio tenían genes *sex* aparentemente funcionales. Las estirpes ICMP10093, S270, S607, S643, S644, S645, S646, S651 y UBC7 son de sexo (+) y las estirpes S466, S653, S654, S655, S656, S657 y UBC149 de sexo (-). Ninguna estirpe tenía ambos genes *sex*. Aproximadamente la mitad de las estirpes de sexo (-) tienen la secuencia mayoritaria de la especie y las que no, difieren en una mutación silenciosa en el dominio HMG y en otra sustitución y un indel de tres nucleótidos en la región no codificante entre *sexM* y *rnhA*.

Solo la estirpe S607 tiene una secuencia de *sexP* diferente al resto de estirpes de su sexo; presenta once sustituciones de nucleótidos que implican siete cambios de aminoácidos, todos ellos fuera del dominio HMG (9 leu-ile; 38 lys-arg; 106 cys-ser; 135 gly-asp; 140 ile-met; 146 phe-ser; 169 lys-gln, donde se cita primero la secuencia mayoritaria).

3. Diversidad del genoma de estirpes naturales de *P. blakesleeanus*

Las secuencias *sex* e ITS/5.8S discriminan perfectamente las especies de *Phycomyces*, pero son muy similares dentro de cada una de ellas. Se disponía de marcadores repartidos a lo largo del genoma de *P. blakesleeanus*, con los que se había obtenido su mapa genético (Chaudhary *et al.*, 2013). Estos marcadores son diferencias de un nucleótido entre las secuencias genómicas de NRRL1555 y UBC21 que implican ganancia o pérdida de una diana de restricción. El análisis con 27 de ellos (Tabla 4) sirvió para determinar la diversidad genética de 72 estirpes de *P. blakesleeanus*, entre las que se encontraban algunos clones aislados de una misma muestra de biomasa. Se intentó extender el análisis a las estirpes de *P. nitens* usando los mismos cebadores, pero las secuencias de los respectivos genomas difieren demasiado para obtener resultados coherentes.

De las 72 estirpes iniciales se descartaron 16 que coincidían con otras en los 27 marcadores y en el sexo y habían sido aisladas de la misma muestra que ellas. Se conservaron las estirpes KC17 y KC22, aisladas en Virginia y Michigan respectivamente, aunque coincidían en los 28 alelos. Las estirpes CBS189.27 y CBS282.35, que se sospechaban idénticas (Ootaki y Miyazaki, 1993), resultaron diferentes. Del total de 1512 análisis de restricción aplicados a las 56 estirpes restantes no se obtuvo amplificación del fragmento en un 2,6 %, pero esto no afectó significativamente a las conclusiones, ya que su distribución fue aleatoria en toda la muestra.

Un análisis sencillo de los alelos compartidos por cada estirpe con UBC21 revela las estrechas relaciones entre las poblaciones locales y la separación entre las estirpes de América del Norte (Tabla 5).

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis multidimensional no métrico (NMDS) para representar las relaciones de las estirpes en una gráfica bidimensional (Fig. 30). Las poblaciones locales aparecen agrupadas y las estirpes de Europa, Este de Norteamérica y Oeste de Norteamérica se sitúan en diferentes grupos significativamente ($\sigma^2 = 0,05$, $p < 0,001$) diferentes según el análisis de la varianza molecular (AMOVA). Las estirpes de ambos sexos se distribuyen por toda gráfica ($p > 0,5$), al igual que las tres con secuencias ITS diferentes al resto. Los mutantes naturales *piloboloides* aparecen separados del resto de los grupos, pero en la región cercana a las estirpes europeas. El mutante *nanus* aparece junto a otras estirpes procedentes, en su mayoría, del Oeste de Norteamérica.

Tabla 4 Genotipo de 56 estirpes de *P. blakesleeanus* descritas en la Tabla 2 según el análisis de 27 fragmentos de restricción. Los encabezamientos indican el grupo de ligamiento donde se encuentran los marcadores, que están colocados en el mismo orden que en la Tabla 11. El 1 indica restricción y el 0, no restricción.

Strain	I	II	III	IV	Va	Vb	VI	VII	VIII	IXa
1 C168	1 0 1 0	0 1 1 0 0	0 1 0	1 1	1	1 0 1	1 1 0	1 0	1 1 0	1
2 Carmichael666	1 0 1 1	0 1 1 0 0	0 1 0	1 1	1	1 0 1	1 1 0	1 0	1 1 0	1
3 CBS142.22	0 0 1 0	1 1	1 0 1	1 0		0 1 0	1	0 1	0 0	0
4 CBS189.27	0 1 0 1	0 0 1 1 1	1 0 1	1 0	0	0 1 0	0 1 1	0 1	0 0 1	0
5 CBS282.35	0 0 1 0	1 1	1 0 1	1 0		0 1 0	0 1	0 1	0 0	0
6 G5	1 0 1 0	1 1 0 0 0	0 1 0	0 1	1	1 0 1	1 0 0	1 0	1 1 0	1
7 K1	1 0	0 1 1 0 0	0 1 0	1 1	1	1 1 1	1 1 0	1 0	1 1 0	0
8 KACC46094	1 1 0 1	0 1 0 0 0	0 1 1	1 0	1	0 1 1	1 1 1	1 0	0 1 1	0
9 KC1	1 1 1 0	0 0 0 1 1	1 0 1	1 0	0	0 1 1	1 1 1	1 1	1 1 1	0
10 KC2	1 1 1 0	0 0 1 1 1	0 1	1 0	0	0 1 1	1 1 1	1 1	1 0 1	1
11 KC3	1 1 1 0	0 0 1 1 1	1 0 1	1 0	0	0 1 1	1 1 1	1	1 0 1	1
12 KC4	1 1 1 0	0 0 1 1 1	1 0 1	1 0	0	0 1 1	1 1	1 1	1 0 1	1
13 KC5	1 1 1 0	0 0 1 1 1	1 0 1	1 0	0	0 1 1	1 1 1	1 1	1 0 1	1
14 KC6	1 1 1 0	0 0 1 1 1	1 0 1	0	0	0 1 1	1 1 1	1 1	1 0 1	1
15 KC7	1 1 1 0	0 0 1 1 1	1 0 1	1 0	0	0 0 1	0 1 1	1 0	1 0 0	1
16 KC8	1 1 0 0	0 0 1 1 0	1 0 0	1 0	0	0 1 1	0 1 1	1 0	1 0 0	1
17 KC9	1 1 1 0	0 0 1 1 1	1 0 0	0 0	0	0 0 1	0 1 0	1 0	1 0 0	1
18 KC10	1 1 1 0	0 0 0 1 1	1 0 0	1 0	0	0 1 1	0 1 1	1 0	1 1 1	0
19 KC11	1 1 1 0	0 1 1 1 1	1 0 1	1 0	0	0 0 0	0 1 1	1 0	1 0 1	1
20 KC12	1 1 0 0	0 0 0 1 0	1 0 0	1 0	0	0 0 1	0 1 0	1 0	1 1 1	0
21 KC13	1 1 1 0	0 0 0 1 1	1 0 0	1 0	0	0 1 1	1 0 1	1 1	1 1 0	0
22 KC14	1 1 1 0	0 0 0 1 1	1 0 0	1 0	0	0 0 1	1 1 1	1 1	1 0 0	0
23 KC15	1 1 1 0	0 0 0 1 1	1 0 0	1 0	0	0 0 1	1 1	1 1	1 0 0	0
24 KC16	1 0 1 0	1 0 0 0	0 1 1	1 1	1	1 1 1	1 1 0	1 1	1 1 0	0
25 KC17	1 0 1 0	0 1 0 0 0	0 1 0	1 1	1	1 1 1	1 1 0	1 0	1 1 0	0
26 KC18	1 0 1 0	0 1 0 0 0	0 1 0	1 1	1	1 1 1	1 1 0	1 1	1 1 0	0
27 KC19	1 0 1 0	0 1 0 0 0	0 1 1	1 1	1	1 1 1	1 1 0	1 1	1 1 0	0
28 KC20	1 0 1 0	0 1 0 0 0	0 1 1	1 1	1	1 1 1	1 0 0	1 1	1 1 0	0
29 KC21	1 0 1 0	0 1 0 0 0	0 1 0	1 1	1	1 1 1	1 1 0	1 0	1 1 0	0
30 KC22	1 0 1 0	0 1 0 0 0	0 1 0	1 1	1	1 1 1	1 1 0	1 0	1 1 0	0
31 KC23	1 0 1 0	1 0 0 0	0 1 0	1 1	1	1 1 1	1 1 0	1 0	1 1 0	0
32 KC24	1 1 0 0	0 0 0 0 0	1 0 0	1 1	1	0 0 1	1 1 0	1 1	1 0 0	0
33 KC25	1 1 1 0	0 0 0 0 0	1 0 0	1 1	1	1 0 1	1 1 0	1 1	1 0 0	0
34 KC26	1 1 0 1	0 0 0 0 1	0 1	1 0	0	0 0 1	0 1 1	1 1	0 0 0	0
35 KC27	1 1 0 1	0 0 0 0 0	1 0 1	1 0	0	0 1 1	0 1 1	1 1	0 0 0	0
36 KC28	1 1 0 1	0 0 0 0 0	1 0 1	1 0	0	0 1 1	0 1 1	1 1	0 0 0	0
37 KC29	1 1 0 1	0 0 0 0 0	0 1	1 0	0	0 1 1	0 1 1	1 1	0 0 0	0
38 KC30	1 1 0 1	0 0 0 0 1	1 0 1	1 0	0	0 0 1	0 1 1	1 1	0 0 0	0
39 NRRL1464	1 1 0 1	0 0 0 1 0	0 0 0	1 0	0	1 1 1	0 0 0	0 1	0 0 1	1
40 NRRL1465	1 1 0 1	0 0 0 0 0	0 0 0	1 0	0	1 1 1	1 0 0	0 1	0 0 1	0
41 NRRL1554	1 1 0 1	0 0 1 1	1 0 1	1 0		0 1 0	1 0 1	0 1	0 0 1	0
42 NRRL1555	0 1 0 1	0 0 0 1 1	1 0 1	1 0	0	0 0 1	0 1 1	0 1	0 1 1	1
43 NRRL2565	1 0 1 0	0 0 1 0 0	0 0 0	1 0	0	1 0 1	1 0 0	0 1	0 1 1	0
44 NRRL2566	1 0 0 1	0 0 1 0 0	0 0 0	1 0	1	1 0 1	1 0 0	1 0	0 1 1	0
45 NRRL6737	0 0 0 1	0 0 1 1 1	1 0 1	1 0	0	1 1 0	0 1 1	0 1	0 0 1	0
46 NRRL6740	0 0 0 1	0 0 1 1 1	1 0 1	0	0	1 0	0 1 1	0 1	0 0	0
47 RSA499	1 1 1 0	0 1 1 0 0	0 1 0	1 1		1 0 1	1 0 0	1 0	1 1 0	1
48 RSA531	1 1 1 0	0 1 1 0 0	0 1 0	1 1	1	1 0 1	1 0 0	1 0	1 1 0	1
49 RSA1739	1 1 0 0	0 0 1 1 1	0 1 1	1 1	1	0 1 1	1 0 1	1 1	1 0 1	1
50 S271	0 1 1 1	0 0 1 0 0	0 1 0	0 1	0	0 0 1	1 0 1	1 0	0 0 1	1
51 UBC1	1 1 1 0	0 1 1 0 0	0 1 0	1 1	1	1 1 1	1 0 0	1 0	1 1 0	1
52 UBC21	1 0 1 0	1 1 1 0 0	0 1 0	0 1	1	1 1 0	1 0 0	1 0	1 0 0	0
53 UBC24	1 0 0 1	0 0 0 1	1 1	1 1		0 1 0		0 1	0 0 1	0
54 UBC25	1 1 1	0 0 1 0 0	0 0 0	1 0	0	1 1 1	1 0 0	0 1	0 0 1	0
55 UBC31	1 1 1	0 0 1 1 0	0 0 0	1 0	0	1 1 1	1 0 0	0 1	0 0 1	0
56 UBC33	1 0 0 1	0 0 1 0 1	1 0 1	0	0	0 1 0	0 1	0 1	0 0 1	0

Tabla 5 Proporción de los 27 alelos que cada estirpe comparte con UBC21. Las abreviaturas de una o dos mayúsculas indican las provincias de Cánada y los estados de USA.

	Estirpe	Sexo	Coincidencia	Origen
42	NRRL1555	(-)	0	Desconocido
4	CBS189.27	(-)	0,19	USA
38	KC30	(-)	0,22	USA FL
34	KC26	(-)	0,23	USA FL
5	CBS282.35	(-)	0,24	Europa
3	CBS142.22	(-)	0,25	Europa
45	NRRL6740	(-)	0,25	Desconocido
46	NRRL6737	(-)	0,26	Desconocido
9	KC1	(+)	0,30	USA SC
35	KC27	(-)	0,30	USA FL
36	KC28	(-)	0,31	USA FL
37	KC29	(-)	0,31	USA FL
11	KC3	(+)	0,31	USA SC
41	NRRL1554	(+)	0,32	Desconocido
56	UBC33	(-)	0,32	Desconocido
18	KC10	(+)	0,32	USA TX
20	KC12	(-)	0,33	USA TX
15	KC7	(-)	0,33	USA TX
13	KC5	(+)	0,33	USA SC
39	NRRL1464	(-)	0,33	Desconocido
10	KC2	(+)	0,35	USA SC
12	KC4	(+)	0,35	USA SC
14	KC6	(+)	0,35	USA SC
53	UBC24	(-)	0,36	Desconocido
23	KC15	(-)	0,38	USA TX
19	KC11	(+)	0,40	USA TX
22	KC14	(-)	0,40	USA TX
21	KC13	(-)	0,41	USA TX
16	KC8	(+)	0,41	USA TX
17	KC9	(+)	0,44	USA TX
8	KACC46094	(-)	0,44	Asia
40	NRRL1465	(+)	0,44	Desconocido
55	UBC31	(+)	0,46	Desconocido
49	RSA1739	(+)	0,48	Canadá Q
54	UBC25	(+)	0,50	Desconocido
43	NRRL2565	(+)	0,52	Europa
50	S271	(+)	0,52	Canadá BC
32	KC24	(+)	0,52	USA TN
44	NRRL2566	(-)	0,56	Europa
33	KC25	(-)	0,59	USA TN
2	CAr666	(-)	0,7	Canadá AL
27	KC19	(-)	0,7	USA VA
24	KC16	(-)	0,73	USA VA
47	RSA499	(-)	0,73	USA NH
1	C168	(+)	0,74	USA CA
48	RSA531	(-)	0,74	USA CA
26	KC18	(-)	0,74	USA VA
28	KC20	(+)	0,74	USA VA
25	KC17	(+)	0,78	USA VA
51	UBC1	(+)	0,78	Canadá BC
30	KC22	(+)	0,78	USA MI
7	K1	(+)	0,8	Desconocido
31	KC23	(+)	0,81	USA MI
29	KC21	(-)	0,81	USA VA
6	G5	(+)	0,81	USA MA
52	UBC21	(+)	1	Desconocido

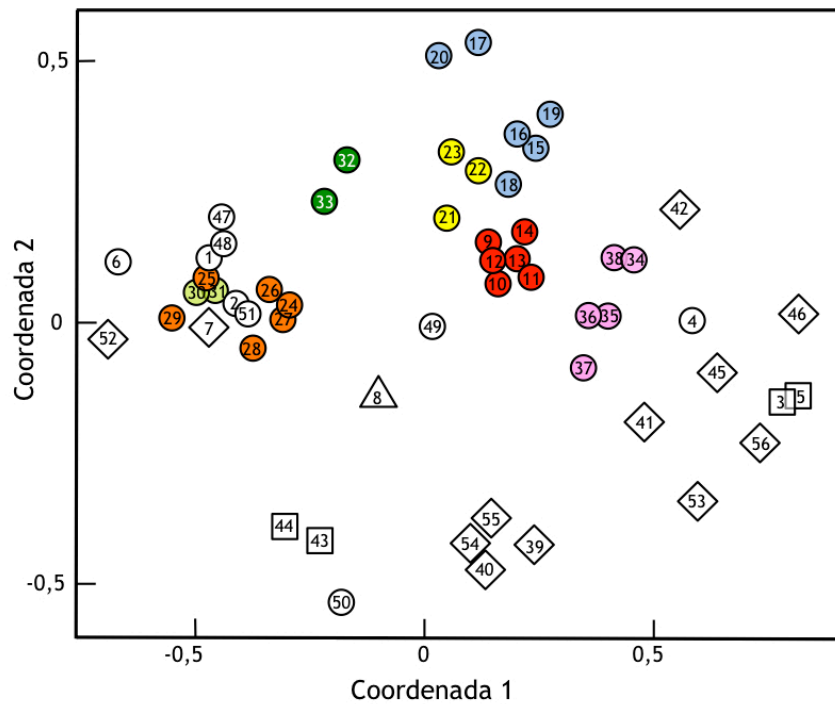


Fig. 30 Relaciones genómicas de 56 estirpes de *P. blakesleeanus* descritas en la Tabla 2. Los cuadrados representan las estirpes de Europa; los círculos, las de Norteamérica; los triángulos, las de Asia; y los rombos, las de origen desconocido. Las siete poblaciones locales analizadas se marcaron de diferentes colores: Florida, rosa; Carolina del Sur, rojo; Houston, Texas, azul; Dallas, Texas, amarillo; Tennessee, verde; Virginia, naranja; Michigan, verde claro. La representación bidimensional se obtuvo por análisis NMDS de las distancias entre las estirpes establecidas mediante una matriz de disimilitud de Jaccard elaborada con los datos de 27 marcadores de restricción.

Capítulo IV

Diversidad genética de *Blakeslea trispora*

1. ADN para ARN ribosómico en *Blakeslea trispora*

Las secuencias analizadas del gen 5.8S de 31 estirpes de la familia Choanephoraceae (Tabla 9) varían muy poco entre sí, ya que todas las estirpes de *Blakeslea* y *Poitrasia* tienen la misma secuencia y las de *Choanephora* y *Gilbertella* difieren de esta en un solo nucleótido.

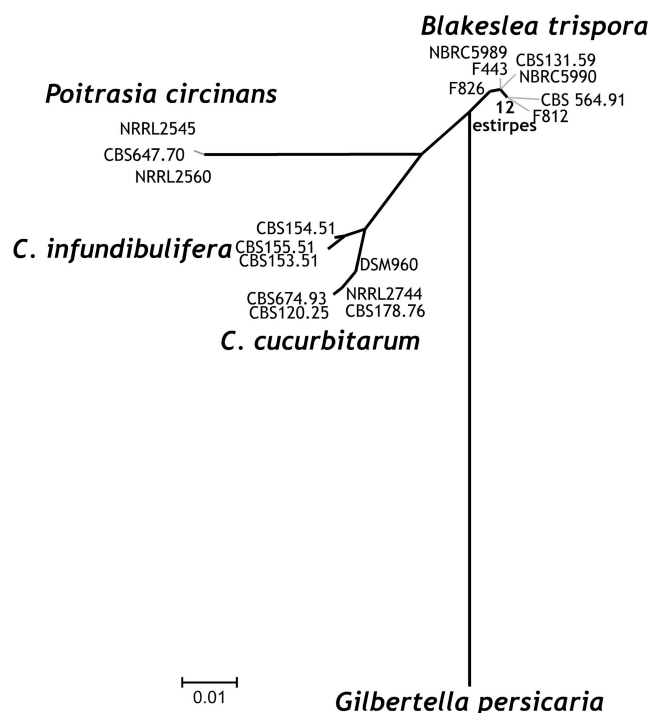


Fig. 31 Cladograma de máxima verosimilitud de las secuencias ITS/5.8S de 33 estirpes de la familia Choanephoraceae obtenido con el programa MEGA 5.2.2. Dibujo a escala con la longitud de las ramas referida al número de sustituciones por nucleótido sin tener en cuenta los huecos. Las ramas con valores de “bootstrap” inferiores al 50% se representan en trazos finos. La asignación de las estirpes a las especies se tomaron de Walther *et al.* (2013).

El cladograma de máxima verosimilitud de sus secuencias ITS/5.8S agrupó a las estirpes en los cuatro géneros estudiados de esta familia (Fig. 31). Todas las estirpes analizadas se agruparon como preveía su taxonomía, excepto las estirpes NRRL2545 de *Choanephora circinans* y NRRL2560 de *Choanephora conjuncta* que se agruparon con *Poitrasia circinans*, especie a la que deberían ser transferidas.

De las 19 estirpes de *B. trispora* incluidas en este análisis, 12 tienen la misma secuencia ITS/5.8S y el resto, secuencias que no se diferencian de la mayoritaria en más de tres nucleótidos. Las secuencias ITS de las estirpes F811, NRRL2457, F921, son iguales y difieren en tres nucleótidos de la de de CBS131.59, considerada en las colecciones como idéntica a las anteriores.

En términos cuantitativos de las secuencias ITS/5.8S, las dos especies del género *Phycomyces* distan más entre sí que los géneros *Blakeslea*, *Choanephora* y *Poitrasia* de la familia Choanephoraceae (Fig. 32).

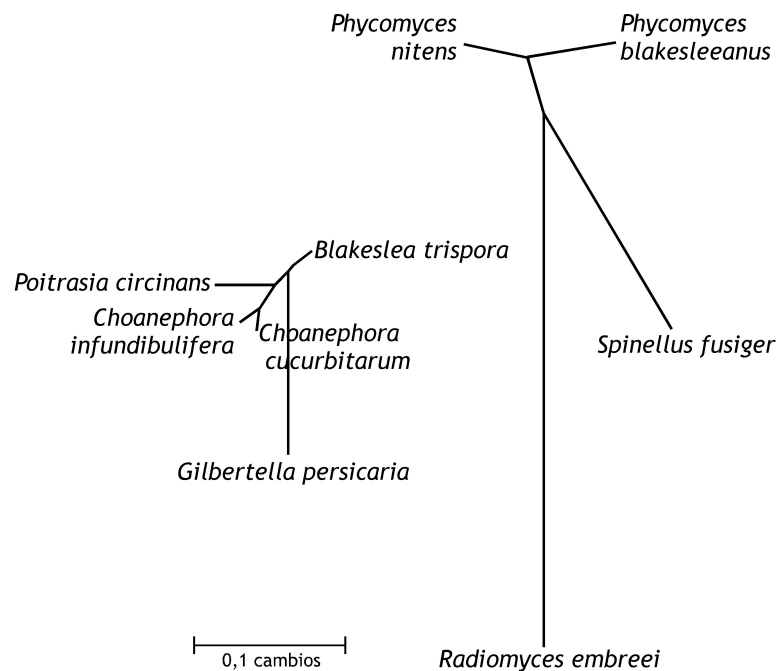


Fig. 32 Cladogramas de máxima verosimilitud de las secuencias ITS/5.8S de nueve especies de Mucorales de las familias Choanephoraceae, Radiomycetaceae y Phycomycetaceae. Para detalles ver la leyenda de la Fig. 31.

2. Comportamiento sexual y alelomorfos sexuales de *Blakeslea trispora*

Se obtuvieron las secuencias de los alelomorfos sexuales de *B. trispora* mediante paseo cromosómico por el método de PCR inversa a partir de secuencias conservadas en los genes *tptA* y *rnhA* de *Mucor* y *Phycomyces*. Los alelomorfos sexuales de *B. trispora* son contiguos a los genes *tptA* y *rnhA* (Fig. 33). El alelomorfo de sexo (+) tiene 1145 pb, y el de sexo (-) 993 pb, los más pequeños descritos en los Mucorales.

Los genes *sex* de *B. trispora* tienen un dominio HMG, no presentan intrones y su tamaño es similar al del resto de genes *sex* de los Mucorales, 627 pb el gen *sexM* y 927 pb el gen *sexP*. En la región promotora de este último no se localizó ninguna secuencia de unión a factor de transcripción similar a las encontradas en los otros Mucorales. Ambos genes se transcriben de la misma cadena que *rnhA* y en la opuesta a *tptA* (Fig. 33).

Las secuencias intergénicas situadas entre los alelomorfos sexuales y los genes adyacentes no superan los diez nucleótidos, lo que sugiere que las regiones promotoras de estos últimos se encuentran dentro de los primeros, como ocurre en *M. circinelloides*, *R. oryzae* y *S. megalocarpus* (Idnurm *et al.*, 2008; Gryganskyi *et al.*, 2010; Idnurm, 2011b).

Las estirpes silvestres de *B. trispora* difieren mucho en su producción de cigosporas y en su carotenogénesis sexual (Tabla 7), pero los análisis de sus secuencias ITS/5.8S las asignan sin duda a la misma especie (Fig. 31).

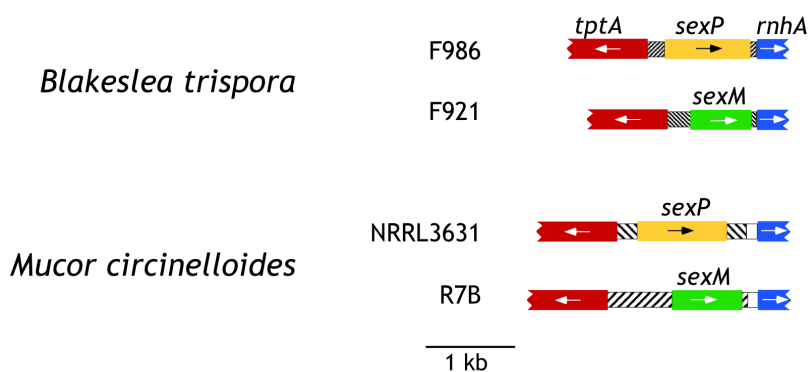


Fig. 33 Alelomorfos sexuales de *B. trispora* y *M. circinelloides*. Las barras vacías indican las secuencias no codificantes homólogas entre las especies y las barras rayadas, las secuencias no codificantes específicas de sexo y especie.

Tabla 7 Producción de cigosporas y carotenogénesis sexual en enfrentamientos de varias estirpes silvestres de *B. trispora*. Se indica la presencia o ausencia de cigosporas y una estimación subjetiva del incremento de color en la zona de interacción (Irina Obratzsova y Enrique Cerdá-Olmedo, informe industrial no publicado, año 2000).

Estirpes de sexo (+)	Estirpes de sexo (-)			
	F921		F826	
	Carotenogénesis sexual	Cigosporas	Carotenogénesis sexual	Cigosporas
F986	+++	+	+++	-
NRRL1348	+++	+	+++	-
F812	++	-	-	-
F902	++	-	++	-
DSM1254	++	+	-	-
F904	++	-	+	-
F1021	++	-	+	-

Las dos estirpes de sexo (-) diferían en un nucleótido de *sexM*, que no modificaba la secuencia de aminoácidos, y en otro nucleótido de la región intergénica *tptA-sexM*. Se encontraron tres alelos de *sexP* en las estirpes de sexo (+). F812, F902 y NRRL1348 comparten la misma secuencia, que difiere en un nucleótido con la de DSM1254, F904 y F1021. Este cambio sustituye un aminoácido en SexP (26 leu-ser). El tercer alelo encontrado entre las estirpes de *Blakeslea* es exclusivo de F986 y difiere del de F812 en seis sustituciones silenciosas. Las estirpes que comparten secuencias tienen distinta conducta sexual.

3. Duplicación reciente de los genes *carB* y *carRA* en *Blakeslea*

La obtención de varios mutantes blancos y rojos, carentes de caroteno β , de la estirpe NRRL2457 de *Blakeslea* y el análisis de su contenido (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995) estableció que en la carotenogénesis de este mucoral participaban enzimas muy parecidas a las de *Phycomyces* (ver Introducción pág. 17). Esto se confirmó con las secuencias de los genes estructurales implicados en esta ruta (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2004).

Las estirpes silvestres F921 y F986 de *Blakeslea* habían sido seleccionadas entre otras 25 para la mejora de la carotenogénesis, ya que en cultivos simples y en cultivos mixtos eran las que contenían más caroteno β (Mehta *et al.*, 2003). De estas estirpes no

se obtuvieron mutantes blancos o rojos, que contuvieran solo fitoeno, solo licopeno o carecieran de carotenos, pero sí otros mutantes con mezclas de carotenos coloreados. La distribución de los carotenos se mantenía constante en subcultivos a través de esporas, lo que excluía que el fenotipo se debiera a heterocariosis. A partir de estas observaciones y de las conclusiones sobre heterocariontes de *Phycomyces* con mezclas de carotenos (De la Guardia *et al.*, 1971) se propuso la hipótesis de que F921 y F986 tienen una duplicación de los genes estructurales de la carotenogénesis y el mutante SB34, un ejemplar mutado y otro silvestre (Mehta *et al.*, 2003). Esta propuesta predice que un nuevo paso de mutagénesis produciría mutantes rojos, con licopeno como único caroteno coloreado.

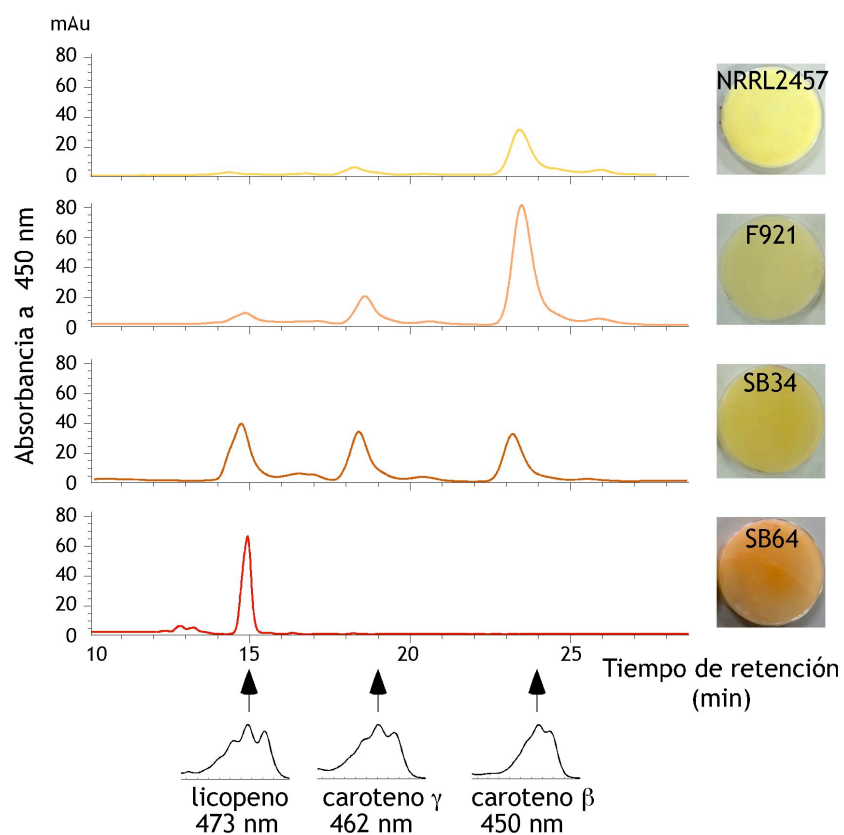


Fig. 34 Cromatograma de los carotenos coloreados acumulados en las estirpes silvestres de *B. trispora* NRRL2457 y F921 y de las estirpes mutantes SB34 y SB64. Los extractos utilizados para el análisis mediante HPLC se obtuvieron de micelios incubados durante cuatro días en oscuridad. Abajo se muestran los espectros de los compuestos detectados y la longitud de onda de máxima absorción de cada uno de ellos. A la derecha, aspecto de los micelios de las estirpes analizadas.

Tabla 8 Contenido de carotenos de las estirpes F921, SB34 y SB64. Los datos son el resultado de dos o tres análisis por estirpe. La media del coeficiente de variación fue 0,18.

	Estirpes		
	F921	SB34	SB64
Masa seca (mg/caja)	184	192	168
Carotenos (µg/g ms)			
Fitoeno	103	154	47
Licopeno	53	222	105
Caroteno γ	125	186	0
Caroteno β	457	147	0
Total coloreados	635	555	105

De la estirpe SB34, obtenida de F921 y que contiene una mezcla de carotenos coloreados con cierto predominio de licopeno, se obtuvo un mutante, SB64, que solo producía licopeno. El fenotipo de esta estirpe se explicaría por mutación de los dos ejemplares de la ciclasa de licopeno y su aislamiento confirma la hipótesis de la duplicación (Fig. 34).

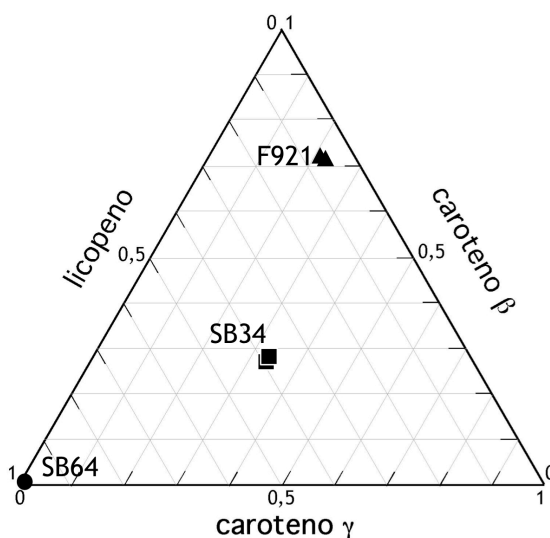


Fig. 35 Carotenos coloreados acumulados en la estirpe silvestre de *B. trispora* F921 y de sus mutantes SB34 y SB64 (Tabla 8). Los extractos utilizados para el análisis de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se obtuvieron de micelios incubados durante cuatro días en oscuridad. Las tres coordenadas homogéneas representan las proporciones de licopeno y carotenos β y γ respecto a su suma. Se representan los valores de dos determinaciones independientes por estirpe.

En nuestras condiciones experimentales todas las estirpes alcanzaban masas similares a los cuatro días de crecimiento, aunque la masa de SB64 era más variable. Las estirpes F921 y SB34 acumulaban más carotenos que SB64 (Tabla 8 y Fig. 35).

Se confirmó la duplicación del gen *carRA* en la estirpe F921 por comparación de su secuencia con las de sus mutantes (Fig. 36).

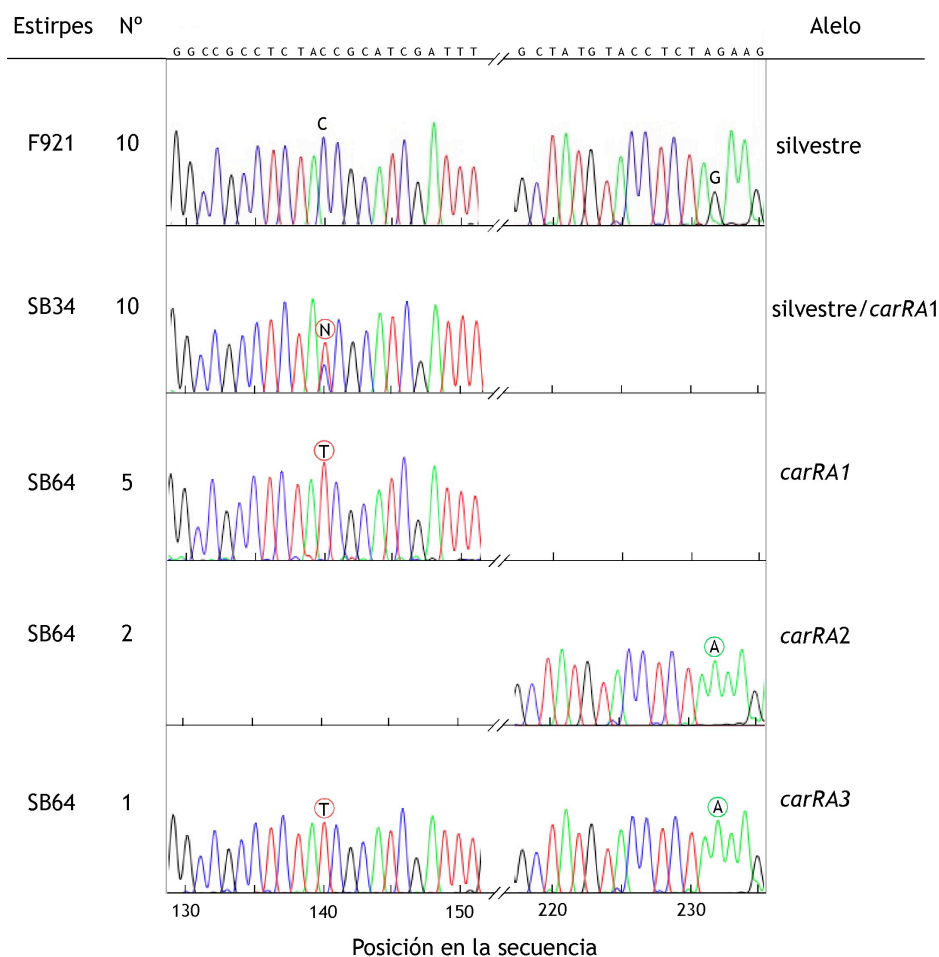


Fig. 36 Secuenciación de los alelos de *carRA* de la estirpe silvestre de *Blakeslea* F921 y de sus mutantes SB34 y SB64. Los espacios en blanco contienen resultados idénticos al silvestre. Las columnas de la izquierda indican el número de secuencias iguales obtenidas en cada estirpe. Los fragmentos obtenidos por PCR tenían 1025 pb y comprendían el dominio de la ciclasa de licopeno y parte del dominio de la sintasa de fitoeno. Las secuencias de las estirpes F921 y SB34 se obtuvieron directamente de los productos de PCR y las de SB64, de fragmentos producidos en distintas reacciones de PCR y clonados en plásmidos.

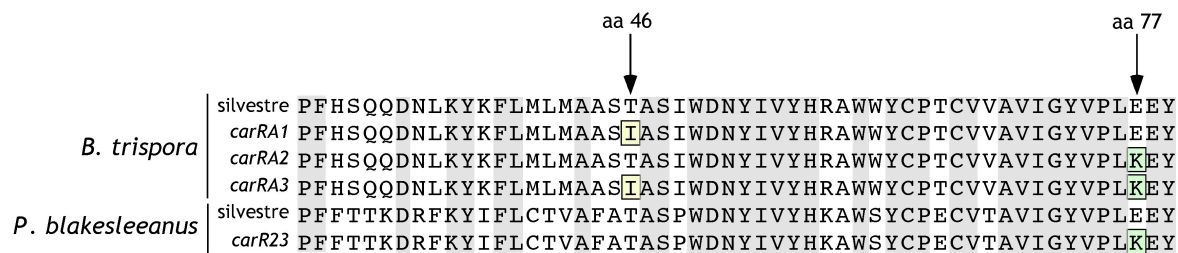


Fig. 37 Modificaciones de la ciclasa de licopeno predichas para los alelos *carRA1*, *carRA2* y *carRA3*, de *B. trispora* y *carR23*, de *P. blakesleeanus*. En gris se destacan los aminoácidos conservados y con recuadros los aminoácidos modificados en los mutantes.

Las diez secuencias de F921 obtenidas de dos experimentos independientes tenían citosina en la posición 140 y guanina en la posición 232. La estirpe SB34 difería de la silvestre en que en la posición 140 tenía citosina o guanina, en proporciones iguales. Por tanto, el genoma de SB34 tenía dos alelos de *carRA*, uno silvestre y otro mutante que se denominó *carRA1*. De los ocho clones secuenciados de SB64, cinco presentaban el alelo *carRA1*; dos tenían un nuevo alelo, *carRA2*, con adenina en la posición 232; y otro, una secuencia recombinante con las dos mutaciones anteriores. El alelo que porta las dos mutaciones se denominó *carRA3*. La aparición de este alelo doble mutante refuerza la conclusión de que los dos ejemplares de *carRA* están en el mismo núcleo.

Las mutaciones de SB34 y SB64 se localizan en el dominio de la ciclasa de licopeno e implican cambios en la cadena polipeptídica (Fig. 37). La sustitución en el nucleótido 140 cambia el aminoácido 46 de treonina a isoleucina y la sustitución en la posición 232 cambia el aminoácido 77 de glutamina a lisina. Esta mutación es la misma que tiene la proteína CarRA de la estirpe mutante C11 de *P. blakesleeanus* (Arrach *et al.*, 2001).

Se exploró la duplicación en el genoma de F921, SB34 y SB64 analizando los fragmentos de su ADN genómico obtenidos con varias restrictasas (Fig. 38). Las digestiones con *EcoRI* y *BamHI* tuvieron idéntico resultado en todas las estirpes, una banda de unas 12 kb con la primera y otra mayor con la segunda. La presencia de bandas únicas sugería que la duplicación incluía al gen *carB* y que su tamaño superaba las 12 kb.

Las digestiones con *XbaI* de las estirpes F921 y SB34 dieron los dos fragmentos esperados de 3,2 kb y 2,8 kb. En el caso de SB64 se obtuvieron tres fragmentos de 3,2 kb, 2,8 kb y 6 kb. Este último refleja la pérdida de una diana *XbaI* por el cambio de un nucleótido en el alelo *carRA2*. El resultado obtenido confirma la presencia de dos ejemplares de *carRA* en SB64 y por lo tanto en sus antecesoras, F921 y SB34 (Fig. 38).

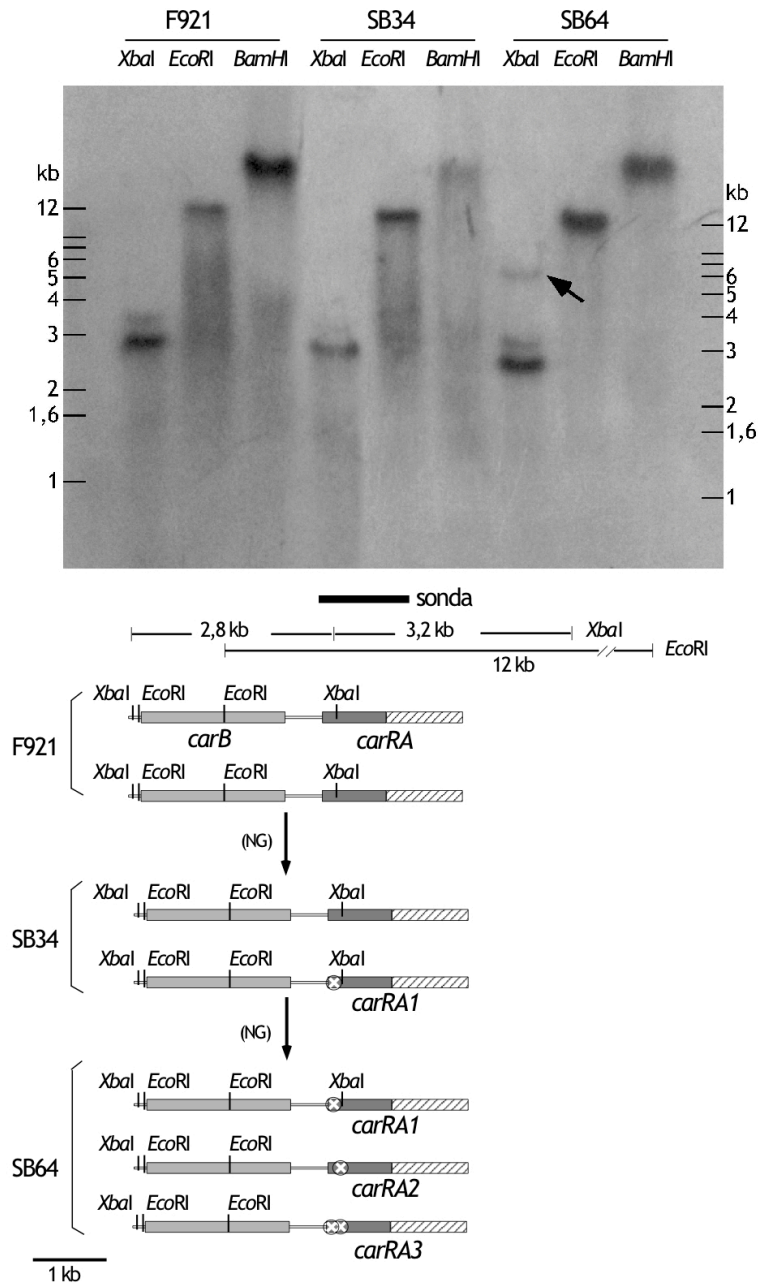


Fig. 38 (Arriba) Fraccionamiento electroforético de los fragmentos de ADN genómico de la estirpe silvestre de *B. trispora* F921 y los mutantes SB34 y SB64 detectados con la sonda radiactiva que se indica en el mapa de abajo. La flecha señala la banda exclusiva de SB64 por la pérdida de una diana XbaI en *carRA*. A ambos lados se indica la posición de fragmentos de ADN de tamaños conocidos. (Abajo) Mapa de restricción de la región analizada. Las letras NG se refieren al tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina que dio origen a las mutaciones que se indican con una cruz.

La duplicación detectada deber ser muy reciente, aun más que la diversificación de la mayoría de las estirpes de *Blakeslea* y *Phycomyces* estudiadas en esta Tesis. En efecto, la secuenciación de un fragmento de 7502 pb que incluye los genes *carB* y *carRA* encontró solo ocho nucleótidos polimórficos, todos ellos situados fuera de los genes *car* de la estirpe F921.

Discusión

1. El género *Phycomyces*

1.1 Especies de *Phycomyces*

Las especies *P. nitens* y *P. blakesleeanus* se distinguen claramente por la morfología de las esporas, el número de núcleos por espora, el comportamiento sexual, los alelomorfos sexuales, las secuencias ITS/5.8S y las diferencias en pequeñas secuencias aleatorias de ADN usadas como marcadores. La longitud y la anchura de unas pocas esporas son suficientes para asignar a las nuevas estirpes una u otra especie. Ninguna estirpe, nueva o antigua, justifica la creación de una nueva especie.

No se conocen las fuerzas selectivas que separaron las dos especies de *Phycomyces* y que las mantienen fijas y aisladas, como muestran las secuencias ITS (Fig. 24). Sus nichos ecológicos deben coincidir al menos en parte, como indica la presencia de ambas en una misma muestra de campo.

La estirpe NRRL1555, la más usada de *P. blakesleeanus*, representa a la mayoría de las estirpes de la especie en todo menos en el número de núcleos por espora que es particularmente bajo, lo que facilita la obtención de mutantes. La estirpe NRRL2444, utilizada en experimentos de sexualidad (Benjamin y Hesseltine, 1959), difiere mucho de las demás de *P. nitens*, por ejemplo, en el tamaño de sus esporas y en sus secuencias ITS/5.8S, por lo que es la menos representativa de su especie.

1.2 Distribución geográfica

Se ha encontrado *Phycomyces* en el Viejo y el Nuevo Mundo y en Oceanía. A pesar de tener orígenes tan alejados las estirpes no se distinguen a simple vista y fisiológicamente no se han descrito diferencias significativas entre ellas. Un ejemplo es que las temperaturas óptimas de crecimiento son parecidas en todas las estirpes analizadas y las pequeñas diferencias observadas no se relacionan con sus orígenes geográficos, que van desde Finlandia y Canadá a los trópicos. Esto sugiere que el hongo crece en cada lugar en períodos de clima favorable y la durabilidad de sus esporas y cigosporas le permite sobrevivir a los periodos adversos.

Phycomyces se encuentra siempre en ambientes húmedos. Los muestreos en las Islas Canarias abarcaron desde desiertos a bosques húmedos, de la costa a las montañas y todas las estirpes se encontraron aproximadamente a 1 km sobre el nivel del mar y en bosques de laurisilva o sus cercanías.

Los microambientes de *Phycomyces* son relativamente uniformes. Ocho de las estirpes españolas se encontraron en profundas cuevas calcáreas y la mayoría de las otras en terrenos volcánicos y kársticos donde las cuevas son abundantes. *Phycomyces* no evita la proximidad humana; la mayoría de las muestras enviadas por voluntarios se tomaron dentro de casas o cerca de ellas.

Las estirpes más diversas se recolectaron en las Islas Canarias, a menos de 150 km unas de las otras y en ambientes muy similares. Esta es una extensión al mundo de los hongos de muchas observaciones sobre la diversidad biológica de las islas, por ejemplo, de los fringílicos de las Galápagos (Darwin, 1845) y de las lagartijas *Gallotia* de las Canarias (Cox *et al.*, 2010). La divergencia de las estirpes de las islas indica que *Phycomyces* no se dispersa rápidamente entre ellas. Esto era de esperar, ya que las esporas vegetativas y las cigosporas son difícilmente dispersables en el aire o el agua y no parecen estar asociadas a los pájaros; por el contrario, son pegajosas y fácilmente transportables por los mamíferos.

1.3 Poblaciones locales

El conocimiento de la diversidad de las poblaciones locales, escaso en los hongos, salvo en algunos Dikarya, es necesario para entender la ecología y la evolución y útil para solucionar problemas emergentes, como el descenso del número de anfibios en el mundo a causa del quitridio *Batrachochytrium dendrobatidis* (Rosenblum *et al.*, 2013) y la epidemia de mucormicosis causada por *Apophysomyces trapeziformis* en las víctimas de un tornado (Weddle *et al.*, 2012). Además, el conocimiento de la diversidad natural debería ser el primer paso en la selección de organismos para la aplicación industrial o la investigación.

Las poblaciones locales analizadas fueron genéticamente heterogéneas, como se demostró en *P. blakesleanus* mediante el análisis de restricción de polimorfismos y en *P. nitens* por las diferencias en el sexo, la morfología de las esporas y las secuencias de ADN. Es llamativo el caso de tres estirpes encontradas en la misma muestra de biomasa en la cueva del Higueral, que diferían en el sexo, vigor sexual, 10 nucleótidos de las secuencias ITS/5.8S y 15 nucleótidos del gen *sexP*. Dos de ellas eran similares en la morfología de sus esporas y en las secuencias analizadas, pero tenían sexos opuestos. La otra era muy distinta de las anteriores, aunque coincidía en el sexo con una de ellas.

El análisis cuantitativo de 27 marcadores de restricción en las estirpes de *P. blakesleeanus* permitió distinguir las poblaciones locales y agruparlas en grandes áreas geográficas. Estos análisis se limitaron a diferencias entre las estirpes de referencia NRRL1555 y UBC21, de las que se tenía la información del genoma completo. Desafortunadamente, no se conoce el origen de estas estirpes.

La estirpe UBC21 procede de la colección de Bandoni (University of British Columbia, Canadá) y NRRL1555 probablemente proceda de Blakeslee (Benjamin y Hesseltine, 1959), quien trabajó muchos años en Cold Spring Harbor (NY, USA). Los resultados obtenidos con los marcadores de restricción son razonables si las estirpes UBC21 y NRRL1555 son autóctonas de América, la primera del oeste de Canadá y la segunda del este de USA. La representación del análisis multivariante obliga a las estirpes originarias de Asia y Europa a situarse entre las dos tomadas como referencia. Si en el análisis se hubieran considerado diferencias no presentes entre NRRL1555 y UBC21, las estirpes europeas y asiáticas presumiblemente se situarían alejadas de ellas. Los resultados obtenidos hacen improbable que ambas estirpes de referencia provengan de Europa y casi imposible que vengan de continentes diferentes.

1.4 Asociación de *Phycomyces* con pequeños mamíferos

Durante esta Tesis se encontró que *Phycomyces* es atractivo para los ratones y se obtuvieron pruebas de que estos extraían e ingerían el contenido de los esporangióforos. Por su tamaño y hábitos alimenticios, los roedores y lagomorfos deben ser los consumidores primarios de *Phycomyces* y la presencia de esporas en heces de otros mamíferos de mayor tamaño estaría justificada por depredación o contaminación.

Phycomyces suele encontrarse en lugares donde puede escasear el agua para beber, como las cuevas de zonas kársticas o volcánicas, donde los pequeños mamíferos aprovecharían sus jugosos esporangióforos. Con el agua ingerirían otros nutrientes bastante abundantes en *Phycomyces*, especialmente en sus esporangios, como la ferritina, similar a la de animales y plantas (Peat y Banbury, 1968; David y Easterbrook, 1971); varios lípidos, entre ellos el caroteno β y el ácido linolénico γ ; antioxidantes, como ácido gálico (Haslam, 1988); aminoácidos, como la asparragina y la glutamina (Cohen y Farnham, 1976); y vitaminas como la biotina (Eisenberg, 1963).

Los pequeños mamíferos dispersan las esporas de *Phycomyces* porque las ingieren junto con los esporangios y además las arrastran adheridas pasivamente a su cuerpo. Sus hábitos de aseo hacen que contaminen su tubo digestivo con esporas, que pueden aparecer en las heces bastantes días después del encuentro con el hongo. *Phycomyces* se ha adaptado evolutivamente a estos mecanismos de dispersión con sus esporangios

indehiscentes, adherentes y muy resistentes mecánicamente, mucho más que los de otros Mucorales como *Mucor* y *Rhizopus* (Schickmann *et al.*, 2012).

La morfología y sensibilidad de los esporangióforos de *Phycomyces* son también adaptaciones evolutivas a la espera del paso de animales, aunque sea infrecuente. La conveniencia para *Phycomyces* de sobresalir y estar disponible para ellos explicaría el gran tamaño y la extrema sensibilidad de sus esporangióforos, características investigadas desde el siglo XIX. Las observaciones directas en la naturaleza realizadas durante esta Tesis han revelado que *Phycomyces* vive en lugares donde son numerosos los obstáculos para que sus esporangios accedan a un espacio abierto. Se encuentra frecuentemente rodeado de hierbas, en lugares cerrados y acompañado de otros Mucorales con los que se mezcla. La sensibilidad de los esporangióforos a umbrales de luz bajísimos (10^{-9} W/m²), la rápida evitación de los obstáculos, el anemotropismo y el mecanotropismo (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987) son adaptaciones de *Phycomyces* asociadas a su entorno y a sus dispersadores. La producción de micróforos condicionada por la luz (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990) sería otra ventaja natural, ya que ahorraría materiales y energía en circunstancias donde la salida es imposible (Cerdá-Olmedo, 2001). El mantenimiento de estas características en las dos especies del género indica su éxito evolutivo y la adaptación de ambas a ambientes similares.

Las esporas de *Phycomyces* sobreviven al pasar por el tubo digestivo de los ratones y los resultados obtenidos durante esta Tesis sugieren que este proceso activa su germinación. La temperatura corporal del ratón, unos 38 °C, no sería suficiente, pero sí ciertas sustancias, como el ácido acético y otros ácidos grasos de cadena corta producidos por la fermentación bacteriana.

Las heces son un sustrato natural complejo, pero escaso en hierro, por lo que se recomienda para el aislamiento de estirpes a partir de muestras de heces enriquecerlas con medio nutritivo o al menos con hierro.

Los roedores y los lagomorfos, al portar las esporas de unos lugares a otros, posibilitan el encuentro de estirpes alejadas y el cruzamiento entre ellas cuando son de sexos opuestos. Se pueden ver como adaptaciones evolutivas del hongo la abundante producción de cigosporas cuando la interacción sexual se produce en las heces de los roedores y las llamativas espinas que envuelven a las cigosporas y que favorecerían su dispersión por los animales.

Algunos detalles fisiológicos de *Phycomyces* y del comportamiento de los ratones respecto a él demuestran que existe un beneficio mutuo que va más allá de su uso como fuente de hidratación y de la dispersión de las esporas. El hongo ha desarrollado unas características condicionadas por su asociación con pequeños mamíferos, que probablemente comparte con otros hongos. Algunos Mucorales que crecen con

Phycomyces, como ciertas especies de *Mucor* y *Rhizopus*, han evolucionado desarrollando estrategias diferentes de relación con los mamíferos, como la capacidad patogénica.

2. El género *Blakeslea*

2.1 Géneros y especies

Las distancias evolutivas dentro de la familia Choanephoraceae (Fig. 31) indican que su reparto en géneros es más que discutible, ya que *Blakeslea*, *Choanephora* y *Poitrasia* pueden considerarse un solo género. Las diferencias morfológicas apoyarían su asignación a géneros independientes, pero no las comparaciones de secuencias.

Varias estirpes asignadas a la especie *B. trispora* por las secuencias de sus alelomorfos sexuales y sus ITS tienen comportamientos sexuales heterogéneos que no permiten establecer grupos de cruzamiento. Los genes *sex* son fundamentales para la determinación sexual, pero la interacción depende también de otros genes que rigen los procesos fisiológicos y morfológicos de la sexualidad y su dependencia de factores ambientales.

2.2 Genes de la carotenogénesis de *Blakeslea*

La estirpe silvestre F921 de *Blakeslea* tiene dos ejemplares del tándem *carB-carRA*, resultado de una duplicación reciente, como demuestra la presencia de un gen *carRA* mutado y otro silvestre en el mutante SB34 de F921. La duplicación explicaría (Mehta *et al.*, 2003) que F921 tenga cantidades de caroteno β superiores a las de otras estirpes de su especie; que de ella no se hubieran podido obtener mutantes sin caroteno β ; y que la distribución de carotenos coloreados encontrada en SB34 sea similar a la de un heterocarionte de *Phycomyces* con cantidades iguales de ciclase de licopeno activa e inactiva (De la Guardia *et al.*, 1971). Este resultado es extensible a la estirpe F986, con características carotenogénicas similares y de la que tampoco se consiguieron mutantes sin caroteno β . El efecto de dosis génica se extiende a otros mucorales: el contenido de caroteno β en *Mucor circinelloides* aumentó al introducirle el gen *carRA* de *Blakeslea*, pero no al introducir *carB* (Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2004).

Como SB64, el doble mutante de *carRA*, acumula solamente licopeno, la estirpe silvestre F921 no puede tener una ciclase alternativa, como la monociclase que se había propuesto para la estirpe silvestre NRRL2457 de *Blakeslea* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1999).

La estirpe F921 acumula caroteno γ al igual que NRRL2457 por lo que puede que la ciclasa de licopeno actúe como dímero y como monómero. Alternativamente, la enzima podría funcionar sólo como dímero, pero permitiendo la liberación y transferencia del sustrato intermedio. Estos procesos en *Phycomyces* dependen del entorno genético (mutación *carA*) y de la presencia de detergentes (Murillo *et al.*, 1981)

El mutante SB64, que acumula solo licopeno y fitoeno, tiene una cantidad de carotenos totales inferior a la de la estirpe silvestre F921 y a la del mutante SB34, del que procede. Sabemos que en *Phycomyces* los mutantes de las enzimas de la carotenogénesis y apocarotenogénesis aumentan la concentración de carotenos porque dejan de fabricar apocarotenoides. La relativa escasez de licopeno en SB64 sugiere que se estén produciendo apolicoponoides, lo que ocurriría si es sensible a las oxigenasas que rompen el caroteno β (Medina *et al.*, 2011).

3. Los Mucorales

3.1 Determinación sexual

Los alelomorfos sexuales de los Mucorales difieren mucho en tamaño (Fig. 39), siendo el de sexo (+) de *Rhizopus* el mayor (7792 pb) y el de *Blakeslea* de sexo (–) el menor (993 pb).

Los alelomorfos sexuales tienen cuatro características que inhiben la recombinación con el sexo opuesto: los genes *sex* son pequeños; la homología de sus secuencias es muy baja; están rodeados por secuencias únicas específicas de sexo y especie; y en algunos casos se transcriben desde cadenas opuestas. Las dos primeras son prácticamente constantes en los Mucorales heterotálicos estudiados. Las dos últimas están particularmente marcadas en *Phycomyces* y, de hecho, con tanto éxito que todas las estirpes analizadas de este hongo pueden ser asignadas inequívocamente como de sexo (+) o al sexo (–) y tienen un gen *sexP* o *sexM* completo y presumiblemente funcional. La situación en *Blakeslea* parece más propicia para la recombinación interna y sería útil conocer la frecuencia en este hongo de estirpes naturales con un gen *sex* recombinante disfuncional.

Los genes *sex* de los Mucorales, a diferencia de los alelomorfos sexuales, son muy parecidos en tamaño. Si se comparan los genes de *Phycomyces*, *Blakeslea* y *M. circinelloides*, la longitud de *sexP* es 958 ± 24 pb y de *sexM*, 668 ± 69 pb (media y desviación típica). Todos los genes *sex* se transcriben en la misma dirección que *rnhA*, excepto el *sexP* de las dos especies de *Phycomyces*, con lo que se convierte en una característica del género.

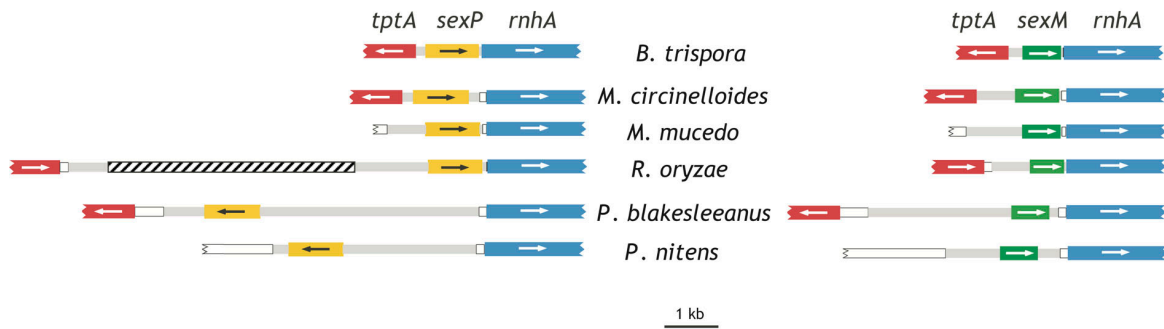


Fig. 39 Alelomorfos sexuales y su entorno. Los genes *tptA*, *rnhA*, *sexP* y *sexM*, indicados por sus nombres y el sentido de transcripción, están separados por las secuencias no codificantes específicas de sexo y especie (barras grises) y las secuencias no codificantes homólogas entre las especies (barras blancas). La barra rayada indica una posible zona de codificación para una proteína.

Los genes *sexP* y *sexM* están relacionados uno con el otro y han divergido en los diferentes Mucorales de una forma similar. En las especies *M. circinelloides*, *B. trispora*, *P. nitens* y *P. blakesleeanus* las secuencias de estos genes coinciden en un $39,1 \pm 1,4$ % de los nucleótidos (media y desviación típica). Esto sugiere que todos estos organismos han llegado a un equilibrio parecido entre dos presiones selectivas contrarias: mantener su función como factores generales de la transcripción y mantener sus funciones exclusivas de cada sexo.

Estas presiones selectivas han actuado en los dominios HMG de los genes *sex* de los Mucorales, que evolucionaron bajo condicionamientos generales, como evidencia la conservación de siete aminoácidos en SexP y SexM, y bajo condicionamientos específicos de sexo, como evidencia la conservación de doce aminoácidos en SexP y uno en SexM (Fig. 40). Los aminoácidos de unión al ADN en el dominio HMG han sido identificados a partir de estructuras tridimensionales de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* (Bell *et al.*, 1977) y *Mus musculus* (Love *et al.*, 1995). Los aminoácidos conservados en los Mucorales coinciden con los que se unen al ADN en esos organismos o son contiguos a ellos.

Las regiones intergénicas de los alelomorfos sexuales de distintas estirpes de *B. trispora* y las de los genes *sexM* y *rnhA* de varias estirpes de *P. nitens* están bastante conservadas. Esto sugiere una presión selectiva sobre estas secuencias que se explicaría, al menos en parte, por la regulación de *rnhA*, *tptA*, *sexM* y *sexP*, cuyos promotores están presumiblemente en estas regiones. De hecho, una diana para factores de transcripción está presente delante de *sexP* en todos los Mucorales estudiados, excepto en *Blakeslea*, que podría tener otras.

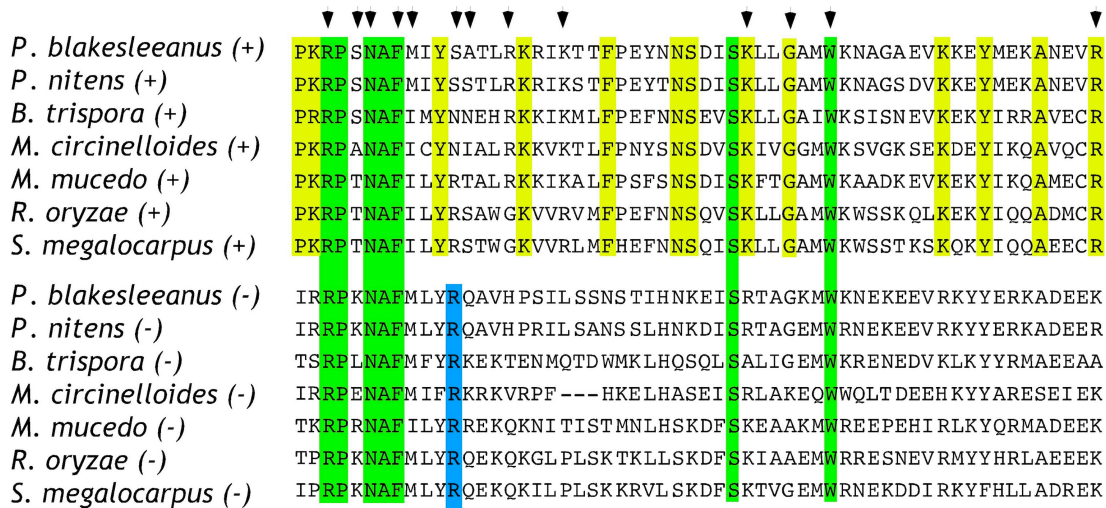


Fig. 40 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos predichas para los dominios HMG de SexM y SexP, de siete especies de Mucorales. Sombreados en amarillo y azul, los aminoácidos conservados en SexP y SexM respectivamente; sombreados en verde los conservados en ambos. Las flechas indican los lugares de unión al ADN en dominios HMG de otros organismos.

En *Phycomyces* no se han encontrado barreras intraespecíficas a la reproducción sexual, tales como las incompatibilidades vegetativas descritas en muchos hongos y plantas. Tales barreras podrían explicar los resultados con *Blakeslea* (Tabla 7, pág. 72)

Las secuencias presuntamente intergénicas de los alelomorfos sexuales podrían tener una participación en el proceso sexual, como podría ser la codificación de ARNs pequeños. La diferencia de tamaño de los alelomorfos sexuales de *Phycomyces* y de *Blakeslea* podría reflejar mecanismos diferentes en estos géneros.

3.2 Organización del ADN para el ARN ribosómico

En los hongos hay tres tipos de organización de las secuencias de ADN encargadas de codificar el ARN ribosómico. En uno de los tipos, encontrado en especies de todos los grupos principales de hongos, el gen 5S no es parte de las repeticiones en tándem que incluyen los otros genes de ARNr (Bergeron y Drouin, 2008). Cuando el gen 5S forma parte de las repeticiones, se puede transcribir en dirección opuesta a los otros genes, como ocurre en los Mucorales *P. blakesleeanus*, *M. racemosus* (Cihlar y Sypherd, 1980), *Rhizomucor miehei* (Maicas *et al.*, 2000), *Absidia glauca* y en la mayoría de los ascomicetos (Aarstad y Oyen, 1975). En *R. oryzae* y en la mayoría de los basidiomicetos el gen 5S se transcribe en la misma dirección que los otros genes.

Aunque las secuencias ITS han sido confirmadas como las más fiables para la identificación de estirpes y la filogenia en los hongos, su multiplicidad en los genomas hace que exista una cierta heterogeneidad interna. Se ha descrito esta situación en

algunos organismos (O'Donnell y Cigelnik, 1997; Wang y Yao, 2005; Ganley y Kobayashi, 2007), incluido el mucoral *Rhizopus microsporus* (Woo *et al.*, 2010). Esto debe tenerse en cuenta al utilizar estas secuencias para la identificación molecular de especies y estirpes.

3.3 Cladogramas de los Mucorales

Los cladogramas elaborados con las secuencias de los genes *sex* y *rnhA* y las ITS/5.8S de varios Mucorales presentan la misma topología, pero en algunos casos difieren en la distancia internodal (Fig. 41). Las siete especies se distribuyen siempre en tres grupos: uno para *Phycomyces*; otro, difícil de resolver, para *Blakeslea* y *Mucor*; y el tercero para *Rhizopus* y *Syzygites*. Según este análisis los genes *sexM* y *sexP* divergieron de su común ancestro antes de la separación de los Mucorales y han evolucionado en paralelo después.

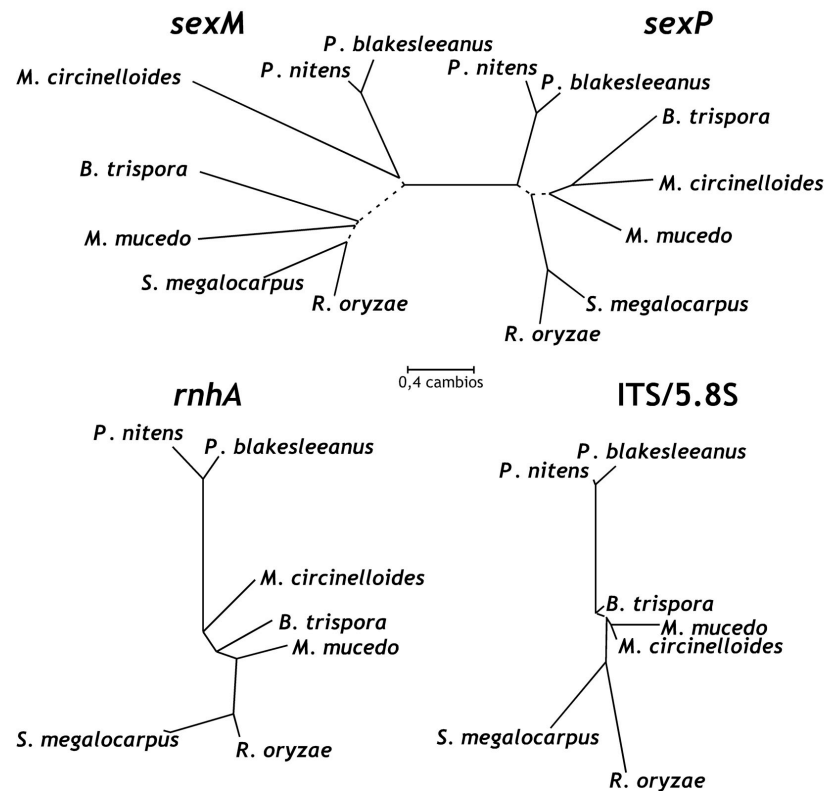


Fig. 41 Cladograma de máxima verosimilitud de las secuencias *sexM*, *sexP*, *rnhA*, e ITS/5.8S de siete Mucorales. La longitud de las ramas es proporcional al número de sustituciones por sitio. Las ramas representadas con líneas discontinuas tienen valores de “bootstrap” inferiores a 0,5.

Las diferencias en las distancias internodales indican variaciones en la velocidad de divergencia de las secuencias. En comparación con la distancia entre los dos *Phycomyces*, las secuencias ITS/5.8S del segundo grupo han divergido muy lentamente y sus genes del sexo muy rápidamente. Esto sugiere que *Blakeslea* y los dos *Mucor* son parte de un clado joven con una intensa presión para diferenciar los genes del sexo. Estos deben jugar un importante papel en la especiación (Idnurm, 2011a) y podrían haber facilitado la variedad morfológica que permite el reconocimiento de muchos géneros y especies. Sería recomendable el estudio de los genes *sexM* y *sexP* para la determinación de especies, particularmente para *Mucor*, *Blakeslea* y otros Mucorineae, pobremente resueltos filogenéticamente por comparación de otras secuencias (Hoffmann *et al.*, 2013; Walther *et al.*, 2013).

Los genes *sex* de *R. oryzae* y de *S. megalocarpus* han divergido más lentamente que sus secuencias ITS/5.8S, una sorprendente observación, ya que la primera es heterotálica y la segunda es homotálica. En la familia Rhizopodaceae las especies homotálicas *S. megalocarpus* y *R. homothallicus* están mezcladas con especies heterotálicas de *Rhizopus* y de otros géneros (Walther *et al.*, 2013). La presencia de *sexP* y *sexM* en especies homotálicas puede deberse a recombinación asimétrica o translocaciones durante el ciclo sexual (Idnurm, 2011a). Los diploides parciales intersexuales (Mehta y Cerdá-Olmedo, 2001) y los heterocariontes intersexuales (Murillo *et al.*, 1978) de *Phycomyces*, que contienen ambos genes *sex*, muestran reacciones sexuales parciales y pseudóforos, pero no son homotálicos. La producción de cigosporas requeriría otras mutaciones, aunque no numerosas, puesto que en la familia Rhizopodaceae se dan ambos modos de vida.

3.4 Ciclos de vida de los Mucorales

Los resultados sobre la diversidad local de las poblaciones y las secuencias de los genes *sex* sugieren que las poblaciones naturales de *Phycomyces* son mucho más activas sexualmente de lo que se creía. Una sexualidad activa explicaría la dificultad para encontrar heterocariontes naturales. El ciclo sexual favorece la homocariosis porque los núcleos en cada germospora derivan normalmente de un genoma haploide producido por recombinación de un par de núcleos, cada uno de un parental (Cerdá-Olmedo, 1975). En sentido opuesto, los micelios y las esporas multinucleados del ciclo vegetativo facilitan el mantenimiento y la transmisión de mutaciones espontáneas (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968).

Existe un claro paralelismo entre el ciclo de vida de *Phycomyces* y otros Mucorales con el de *Homo sapiens*. Casi todas las replicaciones del genoma ocurren en los ciclos vegetativos de ambos organismos y dan lugar a grandes colonias o individuos,

lo que ocupa la mayoría del tiempo de vida. El ciclo sexual juega un papel esencial en la estructura de las poblaciones, pero está sometido a poderosos “relojes” que, lo frenan, en un caso manteniendo las cigosporas en dormancia durante meses y en el otro retrasando la madurez sexual por años. El ciclo vegetativo acumula diversidad genética, muchas veces en forma de mutaciones potencialmente deletéreas, que no llegan a hacer daño porque conviven con alelos normales en los cenocitos de unos y los diploides de otros. Esta protección es mucho más eficaz en los primeros que en los segundos, porque aquellos contienen muchos más núcleos en cada célula. En los animales, ejemplo de diploides, esta protección se completa con la aparición de la línea germinal, que limita la descendencia a un linaje especialmente protegido contra mutaciones.

La sexualidad purifica la diversidad acumulada en el ciclo vegetativo en ambos casos, al mismo tiempo, que introduce nuevas variaciones en forma de recombinantes y nuevos mutantes.

Los ciclos de vida de los Mucorales son más flexibles que los nuestros, puesto que permiten un crecimiento vegetativo ilimitado y clonal, pero también son más estrictos en la eliminación de mutaciones deletéreas, las cuales no sobreviven a la haploidía de las gemosporas, pero son mantenidas por nuestra diploidía.

Materiales y métodos

1. Materiales biológicos y cultivos

1.1 Estirpes de Mucorales

Las estirpes de *Phycomyces* utilizadas en esta Tesis se describen en la Tabla 2 (pág. 36). La nomenclatura aplicada es la de Demerec *et al.*, 1966.

Tabla 9 Estirpes de la familia Choanephoraceae utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Especie	Estirpe	Especie
F1201	<i>Blakeslea trispora</i>	NRRL1348*	<i>Blakeslea trispora</i>
F443	<i>Blakeslea trispora</i>	DSM1254*	<i>Blakeslea trispora</i>
F826	<i>Blakeslea trispora</i>	F904*	<i>Blakeslea trispora</i>
F902	<i>Blakeslea trispora</i>	CBS564.91 ⁺	<i>Blakeslea trispora</i>
F903	<i>Blakeslea trispora</i>	SB34*	<i>Blakeslea trispora</i>
F921	<i>Blakeslea trispora</i>	SB64*	<i>Blakeslea trispora</i>
F811	<i>Blakeslea trispora</i>	CBS120.25	<i>Choanephora cucurbitarum</i>
F812	<i>Blakeslea trispora</i>	CBS178.76 ⁺	<i>Choanephora cucurbitarum</i>
F986	<i>Blakeslea trispora</i>	CBS674.93	<i>Choanephora cucurbitarum</i>
NRRL2457	<i>Blakeslea trispora</i>	DSM960	<i>Choanephora cucurbitarum</i>
NRRL1254	<i>Blakeslea trispora</i>	NRRL2744	<i>Choanephora infundibulifera</i>
NRRL2896	<i>Blakeslea trispora</i>	CBS153.51	<i>Choanephora infundibulifera</i>
CBS130.59	<i>Blakeslea trispora</i>	CBS154.51	<i>Choanephora infundibulifera</i>
CBS198.80 ⁺	<i>Blakeslea trispora</i>	CBS155.51 ⁺	<i>Choanephora infundibulifera</i>
CBS137.49 ⁺	<i>Blakeslea trispora</i>	NRRL2545	<i>Choanephora circinans</i>
NBRC5989 ⁺	<i>Blakeslea trispora</i>	NRRL2560	<i>Choanephora conjuncta</i>
NBRC5990 ⁺	<i>Blakeslea trispora</i>	CBS647.70 ⁺	<i>Pitrasia circinans</i>
CBS131.59 ⁺	<i>Blakeslea trispora</i>	CBS264.59 ⁺	<i>Gilbertella persicaria</i>

*Estirpes que no se incluyeron en el análisis filogenético

+Estirpes de las que se tomaron las secuencias ITS/5.8S del GenBank.

1.2 Cultivos de Mucorales

Tanto *Phycomyces* como *Blakeslea* se cultivaron en agar mínimo (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987) que contenía 20 g/l de glucosa como fuente de carbono, 2 g/l de L-asparagina como fuente única de nitrógeno y adicional de carbono, 5 g/l de KH_2PO_4 , 0.5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de una solución que provee al medio una concentración final de 2.8 g/l de CaCl_2 , y 10 ml de una solución que provee al medio 1 mg/l de tiamina; 2 mg/l de ácido cítrico; 1,5 mg/l de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$; 1 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 mg/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,05 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; y 0,05 mg/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Las soluciones concentradas se mantuvieron más de un año a temperatura ambiente en presencia de unas gotas de cloroformo. El pH del medio mínimo era 5.4 ± 0.1 . Para el medio nutritivo se añadió al medio mínimo 1 g/l de extracto de levadura. Para la obtención de colonias los medios se acidificaron a pH 3.3 añadiendo ácido clorhídrico al medio autoclavado antes de dispensarlo.

Para algunos cruzamientos entre estirpes de *Phycomyces* se utilizó agar papa. Para preparar 1 l 200 g de papas frescas peladas y cortadas en dados se hirvieron durante 1 h y se filtró el líquido, al que se añadieron 20 g de glucosa, 15 g de agar y 2 mg de tiamina antes de autoclavar.

Las esporas de *Phycomyces* se recogieron frescas (cultivos de 4-5 días de edad) lavando las tapas de las cajas de Petri con agua destilada estéril. En el caso de *P. blakesleeanus* las esporas se activaron por calentamiento durante 10 min a 48 °C antes de sembrarlas. Las esporas de *Blakeslea* se recogieron de cultivos de 1 semana de edad con una solución acuosa estéril de glicerol (250 ml/l), raspándolas de la superficie del micelio con una pipeta de vidrio, y se sembraron sin activación previa.

Cada caja de Petri (8.5 cm de diámetro interno), que contenía 25 ml de agar, se inoculó con una suspensión que contenía 10^4 esporas. Las esporas se extendieron por toda la superficie del agar con un asa de acero o suspendidas en agar de cobertera (8 g/l agar). Los cultivos se incubaron durante 4 días en oscuridad (salvo que se indique lo contrario), los de *Phycomyces* a 22 °C y los de *Blakeslea* a 30 °C. En los cultivos mixtos cada sexo constituía la mitad de las esporas. En algunos experimentos se inocularon fragmentos de micelio de aproximadamente 2 x 2 mm en vez de esporas. Para la incubación en luz los cultivos se expusieron a luz blanca (5 W/m²) bajo una batería de cinco lámparas fluorescentes (Philips TLD 36 W/54 CE) instaladas sobre una lámina de vidrio difusora.

Los cultivos a partir de heces se realizaron, siempre que no se especifique lo contrario, a partir de deposiciones disgregadas en 5 ml de agua destilada estéril, que se sembraron en cajas de agar mínimo o mínimo ácido según el objetivo del experimento.

1.3 Cultivos de *Escherichia coli*

E. coli se cultivó a 37° C en medio de Luria y Bertani, abreviado LB (Maloy, 1990). Cuando se indica, el medio contenía 100 mg/l ampicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 40 mg/l 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal, USB Corporation, Santa Clara, CA, USA), predisoluto en N-N-dimetilformamida (20 g/l); o 20 mg/l isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los cultivos líquidos se incubaron en un incubador Gallenkamp IN R 250 con agitación orbital a 2,5 rev/s.

2. Aislamiento de estirpes de *Phycomyces*

Para el aislamiento de estirpes de *Phycomyces* se incubaron en el laboratorio muestras de material orgánico muy diverso. En bastantes casos se observaban estructuras propias de mucorales, como micelio y esporangióforos, y en otros no había rastro de hongos. Debido a esta gran diversidad se aplicaron diferentes métodos para el aislamiento.

Las muestras fueron disgregadas e incubadas a 22 °C, en medio y agar nutritivos, bajo una batería de luces. Se facilitó el espacio suficiente para que los esporangióforos no tuvieran obstáculos y crecieran lo más posible. Los esporangios se recolectaron individualmente aplastándolos con unas pinzas con las puntas humedecidas para facilitar la salida de las esporas y su contenido se suspendió en 1 ml de agua destilada estéril. Estas esporas se sembraron en agar mínimo y nutritivo, se incubaron hasta que esporuló el micelio y se seleccionó un nuevo esporangio maduro para recolectar sus esporas como se describe anteriormente. Ocho esporangios diferentes fueron aislados de cada muestra. Las esporas de los esporangios seleccionados se conservaron a –20 °C en solución acuosa estéril de glicerol (200 ml/l).

3. Análisis morfológicos y fisiológicos

3.1 Morfología de las esporas de *Phycomyces*

Las dimensiones de las esporas fueron medidas con un microscopio equipado con un micrómetro o mediante fotografía microscópica calibrada con una cámara de Bürker (Blau Brand, Germany).

Se tiñeron las esporas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Mehta *et al.*, 2003) y se contaron los núcleos con un microscopio de fluorescencia Leica DMR.

3.2 Medida del crecimiento

El crecimiento micelial de *Phycomyces* fue medido por la expansión radial de la colonia en intervalos de 24 horas (media de tres diámetros aleatorios) y por la masa seca de micelios de seis días obtenida pesando micelios liofilizados (Virtis Freezemobile, Warminster, PA, USA).

3.3 Análisis del fototropismo

Los micelios de las estirpes silvestres de *P. nitens* y de las estirpes de *P. blakesleeanus* NRRL1555 silvestre y su mutante C47 (*madA35*) se incubaron en una caja oscura hecha a mano con una ventana lateral que dejaba pasar luz tenue. La intensidad de luz blanca con la que se iluminaron los micelios no estimulaba el fototropismo de los esporangióforos del mutante, pero era suficiente para estimular a los de la estirpe silvestre. Los cultivos se hicieron con las cajas destapadas a partir del tercer día de incubación para favorecer el crecimiento de los esporangióforos.

3.4 Análisis de carotenos

Se analizaron los carotenos de micelios liofilizados de cultivos de cuatro días de *Phycomyces* y *B. trispora* (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986) extrayéndolos con éter de petróleo (punto de ebullición 40-60 °C). El producto de las extracciones se evaporó a 40-50 °C (rotaevaporador R-200, Büchi Labortechnik, Flawil, Switzerland, conectado a una bomba de vacío Gast Manufacturing, IL, USA). Se resuspendió el material obtenido en 1 ml de *n*-hexano para su posterior análisis espectrofotométrico. A fin de minimizar la oxidación y la isomerización de los terpenoides, las manipulaciones se realizaron, siempre que fue posible, en recipientes rodeados de hielo, con luz indirecta y bajo una atmósfera de nitrógeno.

El contenido de caroteno β de las estirpes de *Phycomyces* se analizó en un espectrofotómetro DU640 (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA). Se analizaron los carotenos de *B. trispora* por HPLC de fracciones de 10 o 20 μ l en *n*-hexano (Cromatógrafo líquido Serie 1100, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA, equipado con un detector G1315A, un inyector automático de muestras G1313A, un degasificador G1322A y una bomba cuaternaria G1311). Las muestras se eluyeron a temperatura ambiente con una mezcla de metanol:acetonitrilo:cloroformo (47:47:6 v/v/v) a un flujo de 1 ml/min y se separaron en una columna analítica (ProntoSIL Spheribond ODS2, gel de sílice de 5 μ m recubierto de octadecilsilano, de dimensiones 250 x 4,6 mm, Bischoff Chromatography, Leonberg, Alemania). Los tiempos de retención aproximados para el licopeno, el caroteno γ , el caroteno β y el fitoeno fueron 15, 18, 23 y 30 min, respectivamente. Se obtuvieron espectros de absorción que incluían las longitudes de

onda de máxima absorción de los compuestos (268, 473, 462 y 450 nm) y se calibraron con patrones puros de los carotenos a analizar.

3.5 Activación química de la carotenogénesis de *P. nitens*

Se dispusieron fragmentos de micelio en agar mínimo, alejados entre sí y a unos 2,5 cm del centro de la caja, donde se practicó un pocillo de unos 4 mm en el que se dispensaron 50 µl de los compuestos a probar disueltos en etanol. La concentración de retinol fue de 0,7 mmol/l y la de ftalato de dimetilo de 2 mmol/l (Eslava *et al.*, 1974 y Bejarano *et al.*, 1988). La incubación de los micelios se hizo en oscuridad a 22 °C durante cuatro días.

3.6 Análisis del comportamiento sexual

Se dispusieron fragmentos de micelio de sexo opuesto a una distancia de unos 5 cm en cajas de agar papa. Los cruzamientos se incubaron en oscuridad a 16 °C o 22 °C, según el experimento. Las cigosporas producidas en los cruzamientos se transfirieron sobre papel de filtro estéril y húmedo en cajas de Petri y se incubaron a 16 °C el tiempo que fue necesario hasta su germinación, evitando la desecación y manteniendo la esterilidad.

4. Manipulación de pequeños roedores

En los casos en los que se capturaron pequeños roedores salvajes se siguieron las normas establecidas por la American Society of Mammalogists (ASM) (Sikes y Gannon, 2011) utilizando trampas plegables tipo Sherman de aluminio con puertas, plataforma y puente de acero galvanizado (LFG, 76 x 89 x 300 mm, Oryx, Barcelona, España). Los roedores capturados durante la noche fueron puestos en libertad a la mañana siguiente excepto en un caso en el que se capturó un macho joven de *Mus musculus*. Otros representantes de esta especie fueron hembras de la estirpe 129Sv2 (Charles Rivers Laboratories, Santa Perpetua de Mogoda, España).

Los ratones se mantuvieron en el laboratorio en jaulas individuales (1264 CP, Tecniplas, Varese, Italia). Solo se modificaron las jaulas para experimentos puntuales y en periodos inferiores a un día.

5. Genética molecular

Los métodos no referenciados están en el manual "*Molecular cloning. A laboratory manual*" (Sambrook y Russell, 2001), con las modificaciones que se indican en los apartados correspondientes.

5.1 Extracción de ADN

El ADN de los Mucorales se extrajo de micelios cultivados en medio o agar mínimos o en medio peptona-dextrosa con extracto de levadura (YPG) por tres métodos distintos. Para obtener ADN en alta concentración se utilizó el método desarrollado en nuestro laboratorio por Weinkove (Weinkove *et al.*, 1998). Las minipreparaciones (GenElute Plant Genomic DNA Miniprep, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) partieron de micelios ultracongelados con nitrógeno líquido y pulverizados con un mortero. El protocolo CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), adaptado de Pitkin (Pitkin *et al.*, 1996) se aplicó sobre micelios liofilizados.

El ADN plasmídico se extrajo mediante el método de lisis alcalina con dodecilsulfato sódico (Birnboim, 1983) de cultivos en LB de clones bacterianos transformados (5 ml, 37 °C, agitación durante 8-12 h).

5.2 Electroforesis de ADN

Los fragmentos de ADN se separaron por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa (6 a 8 g/l) de baja electroendósmosis (Pronadisa) en presencia de bromuro de etidio (0,5 mg/l) en bandejas de electroforesis con peine (Lagoplast y Ecogen) con una fuente de alimentación (LKB, Pharmacia). Sirvieron como patrones de tamaño los fragmentos *HindIII* del ADN bacteriófago λ y una mezcla de fragmentos de tamaños conocidos (1-kb Plus DNA Ladder, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). La fluorescencia del ADN en los geles se observó con una lámpara manual ultravioleta (λ máx 312 nm) o con un transiluminador ultravioleta (λ máx 302 nm, Fotodyne Incorporated, Hartland, WI, USA) y se registró fotográficamente (ImageStore 5000, Ultraviolet Products, San Gabriel, CA, USA).

5.3 Restricción enzimática

Las restrictasas empleadas para caracterizar los alelomorfos sexuales (New England Bio Labs, Ipswich, MA, USA) se incubaron con ADN plasmídico (30 μ g en unos 50 μ l) durante una noche a 37 °C.

Las restrictasas empleadas para detectar marcadores de restricción (Tabla 10) se aplicaron a volúmenes de 15 μ l de ADN durante al menos 2 h a 37 °C.

En el experimento de hibridación (pág. 72) se digirió el ADN genómico incubando las restrictasas correspondientes con 3 μ g de ADN genómico durante una noche a 37 °C.

En todos los casos se siguieron las condiciones recomendadas para la incubación por los distintos fabricantes.

5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

5.4.1 Polimerasas

Para amplificar fragmentos de ADN se utilizaron varias polimerasas termoestables de ADN según el objetivo de la amplificación y parejas de oligonucleótidos que sirven como cebadores de la reacción. Para las reacciones que exigían mayor fidelidad se empleó Expand High Fidelity Plus (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), con su tampón High Fidelity (7,5 mmol/l Mg²⁺); para fragmentos de más de 10 kb, TakaRa LA Taq (Takara Bio, Shiga, Japan); y para las demás, ExTaq DNA polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) y EcoTaq (Ecogen, Barcelona, España), siguiendo las recomendaciones del fabricante según los tamaños de los fragmentos y las temperaturas requeridas por los cebadores.

Para el análisis por restricción de fragmentos cortos de ADN genómico (Capítulo III, apartado 3, pág. 59) se siguió Chaudhary *et al.* 2013.

Los alelomorfos sexuales de *P. nitens* y *B. trispora* se obtuvieron por una combinación de PCR directa e inversa. Las reacciones de PCR inversa se hicieron sobre fragmentos de ADN genómico, producto de digestiones en paralelo con doce restrictasas (*Bam*HI, *Bgl*III, *Cl*al, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Nco*I, *Pst*I, *Sal*I, *Spe*I, *Xba*I y *Xho*I), circularizados por autoligación con la ligasa de ADN T4 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). La polimerasa usada en estos experimentos fue ExTaq (Takara Bio, Shiga, Japan). Las reacciones se incubaron 2 min a 94 °C, seguidos por 32 ciclos de 15 s a 94 °C, 20 s a 52-55 °C y 3 min a 72 °C, y finalmente 5 min a 72 °C en termocicladores (Techne FTC3/02, Bibby Scientific, Stone, Reino Unido o Mastercycler ep gradient de 96 pocillos, Eppendorf, Hamburg, Alemania).

5.4.2 Cebadores

Se usaron los cebadores universales ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) para la amplificación de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 y T7 y SP6 para la amplificación de secuencias insertadas en pGEM-T.

La amplificación de los fragmentos de restricción se realizó con una selección de cebadores de los utilizados en Chaudhary *et al.*, 2013 (Tabla 10).

Los oligonucleótidos producidos durante esta Tesis se diseñaron con la ayuda de la herramienta online Oligo Calc (Oligonucleotide Properties Calculator; Kibbe, 2007).

Tabla 10 Cebadores y enzimas utilizadas en los análisis de restricción. Tomados de Chaudhary *et al.* (2013).

Cebador	Secuencia 5'-3'	Restriictasa	Grupo de ligamiento y "scaffold"
ALID1323	CATCACCTTGGATACAACGC	<i>EcoRV</i>	I, 9
ALID1324	AGCTGTTTCCTTGACGTAGCC		
ALID0531	GTAGTCTTGCCTGTAGC	<i>EcoRI</i>	I, 3
ALID0532	GACACATACAGACCTTCG		
ALID0604	ACCTTGGATCTCTGAACG	<i>XbaI</i>	I, 12
ALID0605	ATCTTGCCTCACCAAGAC		
ALID0606	ATCAGCAGCAAATCCAGC	<i>NdeI</i>	I, 3
ALID0607	TCAACTGACATACGAAGC		
ALID1327	ACCGAGTTCGTGATAACGTG	<i>HindIII</i>	Ila, 24
ALID1328	GCTTGTCTGATGCTCATGC		
ALID0639	CAAGAGGTGGACATTTGG	<i>EcoRV</i>	Ila, 26
ALID0640	GGCTGGTGCAAATTCTAC		
ALID0312	TTAGCTATGGCAACACTC	<i>EcoRV</i>	Ila, 2
ALID0313	CAAGTTATCGAATGTCTG		
ALID0458	AGATAAGTTCGTTGGCTC	<i>HindIII</i>	Ila, 2
ALID0459	AGTCATAGAATACGTGTG		
ALID0730	GTTTCGCAAGCCCACTGAGCC	<i>HindIII</i>	Ila, 10
ALID0731	ACAGCGAGAGCAGGACTGAAGGT		
ALID0319	TACTTTGGCTACATCATC	<i>BamHI</i>	III, 21
ALID0320	TCCAATCCATGAATACGG		
ALID0321	TAAGGTGTTTACCAGTGC	<i>KpnI</i>	III, 21
ALID0322	ACTCATGCTACACCTACG		
ALID0868	AGAAGTCTTCCTGAACGACG	<i>XhoI</i>	III, 19
ALID0869	TTCTTGGCAACCACAAGATC		
ALID0403	TGGACCGTTATGACCAGG	<i>EcoRV</i>	IV, 33
ALID0404	TCTATAAGATGGCAGGTG		
ALID1017	CTGGCTCGCTCAAGGTCGAG	<i>XhoI</i>	IV, 45
ALID1018	AACTCAAGATCGTTATGCTG		
ALID0211	GCCGAGAAGACTGAGTTC	<i>EcoRI</i>	Va, 42
ALID0212	GAGTGTCTATGTCTAATAC		
ALID0485	AACGTTTGTGGCAAGTGG	<i>BamHI</i>	Vb, 1
ALID0486	TTGCAAGGCGACGATCAG		
ALID0720	TCTCCGACATTTGATTGG	<i>XhoI</i>	Vb, 15
ALID0721	TGCACAGACACGCATACG		
ALID1019	AGTTTCTCGGGTTCAGGGGCG	<i>EcoRI</i>	Vb, 1
ALID1020	GGCAACCACAAAGATTG		
ALID0412	TAGAATTGAGCTGTCTGC	<i>EcoRI</i>	VI, 18
ALID0413	AGAGGTGCTATGGCACAC		
ALID0643	AATACTATCCCTCCCGAG	<i>XbaI</i>	VI, 18
ALID0644	TAAATCGTCAATGGGCTC		
ALID0732	AGCCGCATTGTTGTCTATGGTTCG	<i>XbaI</i>	VI, 7
ALID0733	CAGCGTCTGGCACTGGCAT		
ALID0251	AGTTGAACTTACTTACGC	<i>EcoRV</i>	VII, 17
ALID0252	TCTAGAACTAGAAGACTC		
ALID0734	ATCCACAGCCAAGCTCTCGGT	<i>XbaI</i>	VII, 15
ALID0735	ACTGCAAATGCAAAGCCTCAGGT		
ALID1325	GTAGCCTCTGTAAAGATCCG	<i>XhoI</i>	VIII, 13
ALID1326	TGTACAGAATGGTCACACGC		
ALID0302	AGCCATTGAGATCCAAGC	<i>PstI</i>	VIII, 13
ALID0303	GACCAAAGTCTACACAG		
ALID0306	TATTACCTGGTAAAAGCC	<i>EcoRV</i>	VIII, 11
ALID0307	ACCACCGATTATACCATC		
ALID0247	TCTTGCTGGTTACTTCCG	<i>BamHI</i>	IXa, 43
ALID0248	TCATCTTCATGGACATGG		

Las secuencias iniciales para la caracterización de los alelomorfos de las estirpes S608 y S609 de *P. nitens* se obtuvieron por amplificación de un fragmento interno del gen *tptA* con los cebadores 5'-AT(C/T)AACAT(C/T)TGCATGTGGTA-3' y 5'-CA(A/G)GT(C/T)CA(C/T)TA(C/T)AC(C/T)CC(C/T)AA-3'. Estos se diseñaron a partir de dos oligopéptidos de TptA conservados en varios mucorales, INICMW y QVHYTP. Otro fragmento que incluía partes de los genes *sexM* y *rnhA* y su secuencia intermedia se obtuvo de la estirpe S609 con los cebadores 5'-GACCAAAGAACGCATTCATGC-3' y 5'-GTATTTGCCAGACCAACCATG-3', diseñados a partir de oligopéptidos de SexM y RnhA de *P. blakeleeanus*, respectivamente.

Las secuencias iniciales para la caracterización de los alelomorfos de las estirpes F921 y F986 de *B. trispora* se obtuvieron por amplificación de un fragmento interno del gen *rnhA*, utilizando la mezcla de cebadores descrita por Idnurm (2011).

Las secuencias de ADN obtenidas de las amplificaciones iniciales, tanto en *Blakeslea* como en *P. nitens*, se utilizaron para el diseño de nuevos cebadores que se usaron en las siguientes reacciones PCR para la obtención de las regiones sexuales.

El fragmento secuenciado del gen *carRA* de las estirpes F921, SB34 y SB64 de *B. trispora* se obtuvo utilizando los cebadores CARRAB1F: 5'-ATGTTGACATAGCGTGATG-3' y CARRAB2R: 5'-GTTGATGATCTTACTATCAGC-3'. Los fragmentos secuenciados de la región comprendida por el tándem *carB-carRA* y su secuencia adyacente se obtuvieron con 8 parejas de cebadores diseñados a partir de las secuencias publicadas de distintas estirpes de *B. trispora*: L25 (F744) (GenBank: AY176662) ; ATCC14272 (GenBank: AY884174.1) y NRRL2457 (GenBank: AY176663.1) (Tabla 11).

Tabla 11 Cebadores para un fragmento del genoma de *B. trispora* F921 que incluye los genes *carRA* y *carB*.

Cebador	Secuencia
car1D	GATCGGGCTCACTTGTATC
car2D	GGCTATTCAGCATAATGCAAG
car3D	CTATATTGCTTGACAAAGGGC
car4D	GAATTGTCTGTCCTACCAAAC
car5D	GATGGAACGTTGACATAGAATGA
car6D	CACAGCGAAGCAAATCCAAATGAT
car7D	CTCACAGCAAGACAATCTCAAG
car8D	GTGCGATGATGAATCCAAATC
car1I	GCCCTTTGTCAAGCAATATAG
car2I	GTTTGGTAGGACAGACAATTC
car3I	TCATTCTATGTCAACGTTCCATC
car4I	ATCATTTGGATTTGCTTCGCTGTG
car5I	CTTGAGATTGTCTTGCTGTGAG
car6I	GATTTGGATTCATCATCGCAC
car7I	CTTAATCTTTCTAGCTTGACGG
car8I	CTCGAGTTTGGTGATGAAGC

5.4.3 Purificación de ADN obtenido por PCR

Tanto para la purificación directa como para la purificación a partir de banda se utilizó la preparación comercial Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK; Vogelstein y Gillespie, 1979; Marko *et al.*, 1982). El proceso de purificación desnatura las proteínas y la agarosa, si está presente, es eliminada. Se utiliza una matriz de fibra de vidrio que se une al ADN, el cual se eluye posteriormente en 30-50 µl de agua milli-Q o en un tampón de Tris-HCl 10mM, pH 8.0, según el objetivo de la purificación sea la secuenciación o la conservación a largo plazo del ADN para su uso.

5.5 Secuenciación

Todas las secuencias presentadas en esta Tesis fueron obtenidas por empresas externas que aplicaron el método Sanger y se depositaron en el European Nucleotide Archive (Tabla 12).

5.6 Transformación de *E. coli*

Para la transformación se usaron procedimientos habituales en los que las células competentes de la estirpe DH5α preparadas según Hanahan (1983) con las modificaciones de Inoue *et al.* (1990) produjeron de 50 a 100 transformantes por pg de ADN plasmídico.

Para la clonación de los fragmentos de ADN se utilizó el plásmido lineal pGEM-T Easy A1360 (Promega Corporation, Madison, WI, USA) que confiere resistencia a ampicilina por contener el gen *bla* de *Salmonella paratyphi*. La clonación de productos de PCR es facilitada por la presencia de colas de timina en el plásmido. Los plásmidos recombinantes se detectan en presencia de Xgal e IPTG, ya que el lugar de clonación interrumpe el gen *lacZ* para la β-galactosidasa.

5.7 Hibridación de ADN con sonda radiactiva

5.7.1 Transferencia de ADN de geles de agarosa a membrana

Una vez finalizada la electroforesis, el gel de agarosa se sumergió en HCl (0,25 mol/l) durante 15 min para despurinizar el ADN y en NaOH (0,4 mol/l) durante 30 min para desnaturalizarlo. El gel se mantuvo en agitación suave y se lavó, entre cada solución, con agua destilada. El ADN fraccionado en el gel se transfirió por capilaridad ascendente a una membrana de nailon (Hybond N+, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) en NaOH (0,4 mol/l) durante 2 a 16 h.

Tabla 12 Números de acceso de las secuencias utilizadas en este trabajo. Las obtenidas durante esta tesis tienen las iniciales LN y HG.

Estirpe	Especie	Sexo	ITS/5.8S	5S	<i>tptA</i>
NRRL1555	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	EU009461	AY997071	V01120	
UBC21	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	EU009462			
G5	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>		LN554890		
S271	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>		LN554888		
C168	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>		LN554889		
KACC46094	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>		JN315020		
CBS188.27	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>		JN206304		
CBS270.32	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>		HM849662		
S607	<i>Phycomyces nitens</i>	LN554893	LN554886		
S608	<i>Phycomyces nitens</i>	LN554892	LN609580		LN554892
S609	<i>Phycomyces nitens</i>	LN554894	LN609579		LN554895
NRRL2444	<i>Phycomyces nitens</i>		LN554887		
S646	<i>Phycomyces nitens</i>		LN554885		
CBS109.16	<i>Mucor mucedo</i>	JN587498	AF412289		
CBS144.24	<i>Mucor mucedo</i>	JN587499			
R7B	<i>Mucor circinelloides</i>	FJ009106	HM754260		
NRRL3631	<i>Mucor circinelloides</i>	FJ009107	HM754259		
CBS112.07	<i>Rhizopus oryzae</i>	HQ450312	HQ435055		
CBS346.36	<i>Rhizopus oryzae</i>	HQ450315	HQ435047		
ATCC11807	<i>Syzygytes megalocarpus</i>	JN112239			
ATCC11807	<i>Syzygytes megalocarpus</i>	JN112240			
CBS372.39	<i>Syzygytes megalocarpus</i>		JN206369		
F921	<i>Blakeslea trispora</i>	HG939558	LN609581		
F986	<i>Blakeslea trispora</i>	HG939557	LN609582		
CBS198.80	<i>Blakeslea trispora</i>		JN206228		
CBS137.49	<i>Blakeslea trispora</i>		JN206229		
NBRC5989	<i>Blakeslea trispora</i>		AB470638		
NBRC5990	<i>Blakeslea trispora</i>		AB470639		
CBS131.59	<i>Blakeslea trispora</i>		AJ278367		
CBS564.91	<i>Blakeslea trispora</i>		JN206230		
CBS178.76	<i>Choanephora cucurbitarum</i>		JN206235		
CBS 178.76	<i>Choanephora cucurbitarum</i>	JN206235			
CBS155.51	<i>Choanephora infundibulifera</i>		JN206237		
CBS647.70	<i>Poitrasia circinans</i>		JN206240		
CBS264.59	<i>Gilbertella persicaria</i>		JN206222		
CBS205.77	<i>Radiomyces embreei</i>		JN206291		
CBS633.80	<i>Spinellus fusiger</i>		JN206295		

5.7.2 Sondas radiactivas para la hibridación de ácidos nucleicos

La secuencia de la sonda, de 1025 pb, es la del fragmento del gen *carRA* del ADN genómico de la estirpe F921 de *B. trispora* obtenido con los cebadores CARRAB1F y CARRAB2R (ver apartado 5.4.2 de Materiales y métodos). El tamaño de la sonda fue de 1025 pb.

Las sondas de ADN se marcaron por cebado aleatorio. Se desnaturalizó el ADN (entre 50 ng y 100 ng en 36,5 µl de agua) calentándolo a 100° C durante 10 min, se enfrió inmediatamente en agua con hielo, se añadieron 5 µl de una solución de dATP, dGTP y dTTP (0,5 mmol/l cada uno), 5 µl de solución de hexadesoxirribonucleótidos (Hexanucleotide Mix 10x, Roche Diagnostics, Barcelona, España); 2 unidades de la polimerasa de ADN de Klenow (Roche Diagnostics, Barcelona, España) y 2,5 µl de [α -³²P] dCTP (370 GBq/l, 110 PBq/mol) y se incubó a 37° C durante 1 h. Se eliminaron los nucleótidos no incorporados haciendo pasar la mezcla de reacción por una columna de dextrano (Sephadex G-50 Fine, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). La radiactividad incorporada en la sonda se midió en un contador de centelleo (Wallac 1409, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) diluyendo 1 µl del producto en 5 ml de líquido de centelleo (Scharlau Chemie, Barcelona, España).

5.7.3 Hibridación y revelado

La membrana de nailon con el ADN fijado se incubó con solución de hibridación bajo agitación suave y constante en un horno de hibridación a 65° C durante al menos 1 h. La membrana lavada se envolvió con celofán para evitar que se secase y se incubó a -80° C con una película (Biomax, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) entre pantallas que reflejan la radiación (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). La película se reveló con el procesador automático X-OMAT 1000 (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA).

6. Informática

6.1 Análisis de secuencias de ADN y proteínas

En el análisis de secuencias de ADN y proteínas se utilizaron los programas: Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA), para el ensamblaje de secuencias; DNA Strider 1.4 (Marck, 1988), para la predicción de proteínas; Clustal (Thompson *et al.*, 1997), para todas las comparaciones de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos, excepto las utilizadas para la elaboración de cladogramas en las que se aplicó MUSCLE (Edgar, 2004); Yass (Noe y Kucherov, 2005), para la representación gráfica (“dot plot”) de la comparación de secuencias; Mega5 (Tamura *et al.*, 2011), para los análisis evolutivos de secuencias mediante búsquedas heurísticas; BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para la comparación de secuencias y localización de dominios; y 4Peaks 1.7.1 (por A. Griekspoor y Tom Groothuis, mekentosj.com), para el análisis de los cromatogramas de las secuenciaciones.

Las bases de datos de los genomas de *P. blakesleeanus*, *R. oryzae* y *M. circinelloides* están disponibles en <http://genome.jgi.doe.gov/Phyl2/Phyl2.home.html>, <http://genome.jgi.doe.gov/Rhior3/Rhior3.home.html> y <http://genome.jgi-psf.org/Mucci1/Mucci1.home.html>, respectivamente.

6.2 Análisis estadísticos

Para la mayoría de los análisis estadísticos presentados se usaron hojas de cálculo (Numbers 2.1, Apple, USA y Excel 14.4.4, Microsoft, USA).

Los análisis computacionales de los datos de presencia o ausencia de los marcadores de restricción se hicieron en R (R Core Team, 2013). Se calculó una matriz de distancias construida según el índice de disimilitud de Jaccard y se sometió a un análisis multidimensional no métrico (NMDS) (Excoffier et al., 1992) mediante el paquete “vegan” (Oksanen et al., 2012). El resultado se representó adaptando la figura obtenida con “ggplot2” (Wickham, 2009). Para el análisis no se tuvieron en cuenta los datos perdidos, ya que, tanto si se incluían o no, los resultados eran similares (coeficiente estadístico de correlación de Mantel, $r = 0,986$; significancia, $p < 0,001$).

Con el análisis de la varianza molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) se evaluó la significancia estadística y el agrupamiento de estirpes en tres áreas geográficas (Europa, este de Norteamérica y oeste de Norteamérica), partiendo de la matriz arriba mencionada y usando la función “amova” del paquete “pegas” para R (Paradis, 2010). El método de distancias fue adaptado a euclídeo, como requiere AMOVA.

Bibliografía

- Aarstad K, Oyen TB (1975) On the distribution of 5s RNA cistrons on the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 51: 227-231
- Agardh CA (1817) *Synopsis algarum scandinaviae, adjecta dispositione universali algarum*. Ex. *Officina Berlingiana*, Lund, Suecia
- Alcalde E (2014) *Apocarotenoides de los hongos mucorales*. Tesis Doctoral, Universidad Sevilla, Sevilla
- Almeida ERA, Cerdá-Olmedo E (2008) Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr. Genet.* 53: 129-137
- Aragón CM, Murillo FJ, de la Guardia MD, Cerdá-Olmedo E (1976) An enzyme complex for the dehydrogenation of phytoene in *Phycomyces*. *Eur. J. Biochem.* 63: 71-75
- Arrach N, Fernández-Martín R, Cerdá-Olmedo E, Avalos J (2001) A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 1687-1692
- Avalos J, Carmen Limon M (2014) Biological roles of fungal carotenoids. *Curr. Genet.* DOI 10.1007/s00294-00014-00454-x
- Bainier G (1882) *Etude sur les mucorinées*. *Ecole pharm.*, Paris, Francia
- Baldauf SL, Palmer JD (1993) Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 11558-11562
- Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P, Gil J, Gonzalez JA, Alcalde E, Cerdá-Olmedo E (2011) New apocarotenoids and beta-carotene cleavage in *Blakeslea trispora*. *Org. Biomol. Chem.* 9: 7190-7195
- Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P, Gonzalez JA, Arteaga JF (2012) A minor dihydropyran apocarotenoid from mated cultures of *Blakeslea trispora*. *Molecules.* 17: 12553-12559
- Bejarano ER, Cerdá-Olmedo E (1992) Independence of the carotene and sterol pathways of *Phycomyces*. *FEBS Lett.* 306: 209-212
- Bejarano ER, Parra F, Murillo FJ, Cerdá-Olmedo E (1988) End-product regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Arch. Microbiol.* 150: 209-214
- Bell GI, DeGennaro LJ, Gelfand DH, Bishop RJ, Valenzuela P, Rutter WJ (1977) Ribosomal RNA genes of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Physical map of the repeating unit and location of the regions coding for 5S, 5.8S, 18S, and 25S ribosomal RNAs. *J. Biol. Chem.* 252: 8118-8125
- Benjamin CR, Hesseltine CW (1959) Studies on the genus *Phycomyces*. *Mycology.* 51: 751-771

- Bergeron J, Drouin G (2008) The evolution of 5S ribosomal RNA genes linked to the rDNA units of fungal species. *Curr. Genet.* 54: 123-131
- Bergman K, Burke PV, Cerdá-Olmedo E, David CN, Delbruck M, Foster KW, Goodell EW, Heisenberg M, Meissner G, Zalokar M, Dennison DS, Shropshire W (1969) *Phycomyces*. *Bacteriol. Rev.* 33: 99-157
- Bergman K, Eslava AP, Cerdá-Olmedo E (1973) Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Mol. Gen. Genet.* 123: 1-16
- Berkeley MJ (1860) *Outlines of British fungology*. Lovell Reeve, London, Inglaterra
- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature.* 348: 448-450
- Birnboim HC (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods. Enzymol.* 100: 243-255
- Blakeslee AF (1904) Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proceed. Am. Acad. Arts. Sci.* 40: 205-319
- Blakeslee AF (1906) Zygospor germinations in the Mucorineae. *Ann. Mycol.* 4: 1-28
- Burgeff H (1912) Über sexualität, Variabilität und Vererbung bei *Phycomyces nitens*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 30: 679-685
- Burgeff H (1924) Untersuchungen über Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen. *Bot. Abh.* 4: 1-135
- Burgeff H (1925) Über Arten und Artkreuzung in der Gattung *Phycomyces* Kunze. *Flora.* 118: 40-46
- Burgeff H (1928) Variabilität, Vererbung und Mutation bei *Phycomyces Blakesleeanus* Bgff. *Z. Vererbungslehre.* 49: 26-94
- Burnett J (1953), Oxygen consumption during sexual reproduction of some *Mucoraceae*. *New. Phytol.* 52: 58-64
- Caglioti L, Cainelli G, Camerino B, Mondelli R, Prieto A (1966) The structure of trisporic-C acid. *Tetrahedron.* 7: 175-187
- Carnoy JB (1870) Recherches anatomiques et physiologiques sur les champignons. *Bull. Soc. R. Bot. Belg.* 9: 157-321
- Cerdá-Olmedo E (1975) The genetics of *Phycomyces blakesleeanus*. *Genet. Res.* 25: 285-296
- Cerdá-Olmedo E, Hüttermann A (1986) Förderung und Hemmung der Carotinsynthese bei *Phycomyces* durch Aromaten. *Angew. Bot.* 60: 59-70
- Cerdá-Olmedo E, Lipson ED (1987) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Cerdá-Olmedo E (2001) *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 503-512

- Chaudhary S, Polaino S, Shakya VP, Idnurm A (2013) A new genetic linkage map of the zygomycete fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *PLoS One*. 8: e58931
- Ciegler A (1965) Microbial carotenogenesis. *Adv. Appl. Microbiol.* 7: 1-34
- Cihlar RL, Sypherd PS (1980) The organization of the ribosomal RNA genes in the fungus *Mucor racemosus*. *Nucleic Acids Res.* 8: 793-804
- Cohen RJ, Farnham W (1976) Free amino acids in *Phycomyces blakesleeanus* during development. *Phytochemistry.* 15: 251-253
- Corrochano LM, Cerdá-Olmedo E (1988) Photomorphogenesis in *Phycomyces*: Dependence on environmental conditions. *Planta.* 174: 309-314
- Corrochano LM, Cerdá-Olmedo E (1990) Photomorphogenesis in behavioural and colour mutants of *Phycomyces*. *J. Photochem. Photobiol.* 6: 325-335
- Cosgrove DJ, Ortega JK, Shropshire W, Jr. (1987) Pressure probe study of the water relations of *Phycomyces blakesleeanus* sporangiophores. *Biophys. J.* 51: 413-423
- Cox SC, Carranza S, Brown RP (2010) Divergence times and colonization of the Canary Islands by *Gallotia lizards*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56: 747-757
- Currey J (1873) *Choanephora*. *Linn. Soc. Bot.* 13: 578
- Czaja W, Miller KY, Skinner MK, Miller BL (2014) Structural and functional conservation of fungal MatA and human SRY sex-determining proteins. *Nat. Commun.* 5: 5434
- Darwin C (1839) *Voyages of the Adventure and Beagle Vol III*. Henry Colburn, London, Reino Unido
- David CN, Easterbrook K (1971) Ferritin in the fungus *Phycomyces*. *J. Cell. Biol.* 48: 15-28
- Demerec M, Adelberg EA, Clark AJ, Hartman PE (1966) A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics.* 54: 61-76
- Díaz-Mínguez JM, López-Matas MA, Eslava AP (1999) Complementary mating types of *Mucor circinelloides* show electrophoretic karyotype heterogeneity. *Curr. Genet.* 36: 383-389
- Dooijes D, van de Wetering M, Knippels L, Clevers H (1993) The *Schizosaccharomyces pombe* mating-type gene *mat-Mc* encodes a sequence-specific DNA-binding high mobility group box protein. *J. Biol. Chem.* 268: 24813-24817
- Drinkard L, Nelson G, Sutter R (1982) Growth arrest: A prerequisite for sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Exp. Mycol.* 6: 52-59
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797
- Ehrenberg CG (1820) *Syzygites*, eine neue Schimmelgattung, nebst Beobachtungen über sichtbare Bewegung in Schimmeln. *Verh. Ges. Naturf. Freunde Berlin.* 1: 98-109
- Eisenberg MA (1963) Biotin biosynthesis. I. Biotin yields and biotin vitamers in cultures of *Phycomyces blakeleeanus*. *J. Bacteriol.* 86: 673-680

- Errera L (1884) Die grosse Wachstumsperiode bei den Fruchtträgern von *Phycomyces*. *Bort. Zeit.* 42: 497-566
- Eslava AP, Alvarez MI, Cerdá-Olmedo E (1974) Regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* by Vitamin A and β -ionone. *Eur. J. Biochem.* 48: 617-623
- Eslava AP, Cerdá-Olmedo E (1974) Genetic control of phytoene dehydrogenation in *Phycomyces*. *Plant. Sci. Lett.* 2: 9-14
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 131: 479-491
- Fernandez-Cortes A, Cuezva S, Sanchez-Moral S, Cañaveras JC, Porca E, Jurado V, Martin-Sanchez PM, Saiz-Jimenez C (2011) Detection of human-induced environmental disturbances in a show cave. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 18: 1037-1045
- Foster KW, Lipson ED (1973) The light growth response of *Phycomyces*. *J. Gen. Physiol.* 62: 590-617
- Fraser PD, Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid. Res.* 43: 228-265
- Galland P, Russo VE (1984) Light and dark adaptation in *Phycomyces* phototropism. *J. Gen. Physiol.* 84: 101-118
- Ganley AR, Kobayashi T (2007) Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Res.* 17: 184-191
- Gauger W, Peláez MI, Álvarez MI, Eslava AP (1980) Mating type heterokaryons in *Phycomyces blakesleeanus*. *Exp. Mycol.* 4: 56-64
- Govind N, Cerdá-Olmedo E (1986) Sexual activation of carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2775-2780
- Gryganskyi AP, Lee SC, Litvintseva AP, Smith ME, Bonito G, Porter TM, Anishchenko IM, Heitman J, Vilgalys R (2010) Structure, function, and phylogeny of the mating locus in the *Rhizopus oryzae* complex. *PLoS ONE.* 5: e15273
- de la Guardia MD, Aragón CM, Murillo FJ, Cerdá-Olmedo E (1971) A carotenogenic enzyme aggregate in *Phycomyces*: evidence from quantitative complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68: 2012-2015
- Halbgsuth W, Rudolph H (1959) Untersuchungen über die Wärmeaktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. *Arch. Mikrobiol.* 32: 296-308
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580
- Harper JE, Webster J (1964) An experimental analysis of the coprophilous fungus succession. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 47: 511-530

- Haslam E (1988) Plant polyphenols (syn. vegetable tannins) and chemical defense—A reappraisal. *J. Chem. Ecol.* 14: 1789-1805
- Heisenberg M, Cerdá-Olmedo E (1968) Segregation of heterokaryons in the asexual cycle of *Phycomyces*. *Mol. Gen. Genet.* 102: 187-195
- Hermet A, Meheust D, Mounier J, Barbier G, Jany JL (2012) Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biol.* 116: 692-705
- Hesseltine CW (1955) Genera of Mucorales with notes on their synonymy. *Mycologia.* 47: 344-363
- Hesseltine CW (1991) Zygomycetes in food fermentation. *Mycologist.* 5: 162-169
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Køljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüssler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 509-547
- Hoffmann K, Pawlowska J, Walther G, Wrzosek M, de Hoog GS, Benny GL, Kirk PM, Voigt K (2013) The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia.* 30: 57-76
- Hong SB, Kim DH, Lee M, Baek SY, Kwon SW, Houbraken J, Samson RA (2012) Zygomycota associated with traditional meju, a fermented soybean starting material for soy sauce and soybean paste. *J. Microbiol.* 50: 386-393
- Idnurm A, Walton FJ, Floyd A, Heitman J (2008) Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature.* 451: 193-196
- Idnurm A (2011a) Sex and speciation: the paradox that non-recombining DNA promotes recombination. *Fungal. Biol. Rev.* 25: 121-127
- Idnurm A (2011b) Sex determination in the first-described sexual fungus. *Eukaryot. Cell.* 10: 1485-1491
- Ingold CT (1940) Note on spore liberation in the *Mucoraceae*. *New Phytol.* 39: 423-425
- Ingold CT, Zoberi M (1963) The asexual apparatus of *Mucorales* in relation to spore liberation. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46: 115-134
- Ingold C (1978) *The biology of Mucor and its allies*. Edward Arnold, London, Inglaterra

- Inoue K, Akita N, Yamashita S, Shiba T, Fujita T (1990) Constitutive and inducible expression of a transgene directed by heterologous promoters in a trout liver cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 1311-1316
- Isler O (1971) *Carotenoids*. Birkhäuser, Basel, Suiza
- Iturriaga EA, Velayos A, Eslava AP, Álvarez MI (2001) The genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis in *Mucor*. *Recent Res. Dev. Genet.* 1: 79-92
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung G-H, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature.* 443: 818-822
- Jurado V, Porca E, Cuezva S, Fernandez-Cortes A, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C (2010) Fungal outbreak in a show cave. *Sci. Total Environ.* 408: 3632-3638
- Kayser T, Wöstemeyer J (1991) Electrophoretic karyotype of the zygomycete *Absidia glauca*: evidence for differences between mating types. *Curr. Genet.* 19: 279-284
- Kibbe WA (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35: W43-46
- Kirk PM (1984) A monography of the *Choanephoraceae*. *Mycol. Paper.* 152: 1-61
- Kunze G (1823) *Phycomyces*. Mykologische Hefte, Leipzig, Alemania
- Kuzina V, Domenech C, Cerdá-Olmedo E (2006) Relationships among the biosyntheses of ubiquinone, carotene, sterols, and triacylglycerols in Zygomycetes. *Arch. Microbiol.* 186: 485-493
- Kuzina V, Cerdá-Olmedo E (2006) Modification of sexual development and carotene production by acetate and other small carboxylic acids in *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleeanus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4917-4922
- Kuzina V, Ramírez-Medina H, Visser H, van Ooyen AJ, Cerdá-Olmedo E, van den Berg JA (2008) Genes involved in carotene synthesis and mating in *Blakeslea trispora*. *Curr. Genet.* 54: 143-152
- van Laere AJ, Carlier AR, van Assche LA (1977) Cell wall carbohydrates in *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. *Arch. Microbiol.* 115: 303-306

- van Laere AJ (1983) Stimulation of phosphofructokinase from *Phycomyces blakesleeanus* and some other fungi by micromolar concentrations of fructose 2, 6-biphosphate. *J. Gen. Microbiol.* 129: 3281-3285
- Lee PC, Schmidt-Dannert C (2002) Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *App. Microbiol. Biotechnol.* 60: 1-11
- Lee SC, Corradi N, Byrnes EJ, Torres-Martinez S, Dietrich FS, Keeling PJ, Heitman J (2008) Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Curr. Biol.* 18: 1675-1679
- Li CH, Cervantes M, Springer DJ, Boekhout T, Ruiz-Vazquez RM, Torres-Martinez SR, Heitman J, Lee SC (2011) Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* 7: e1002086
- Liu X, Voigt K (2010) *Molecular Identification of Fungi*. Springer, Berlin, Alemania
- López-Díaz I, Cerdá-Olmedo E (1981) light controlled phorogenesis and mycelial growth in *Phycomyces* mutants. *Curr. Genet.* 3: 23-26
- Love JJ, Li X, Case DA, Giese K, Grosschedl R, Wright PE (1995) Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature.* 376: 791-795
- Maicas S, Adam AC, Polaina J (2000) The ribosomal DNA of the *Zygomycete* *Mucor miehei*. *Curr. Genet.* 37: 412-419
- Maloy SR (1990) *Experimental techniques in bacterial genetics*. Jones & Bartlett, Boston, MA, USA
- Mantovani R (1999) The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene.* 239: 15-27
- Marck C (1988) 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic. Acids. Res.* 16: 1829-1836
- Marcos AT, Estrella de Castro A, Mehta BJ, Díez García B, Costa Pérez J, Rodríguez Otero C, Peiro Cezón E, Cerdá-Olmedo E, Collados de la Vieia AJ, Salto Maldonado F (2002) *Procedimiento de producción de licopeno*. Patente ES2156735, Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid, España
- Marko MA, Chipperfield R, Birnboim HC (1982) A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal. Biochem.* 121: 382-387
- Medina HR, Cerdá-Olmedo E (2011) Cleavage oxygenases for the biosynthesis of trisporoids and other apocarotenoids in *Phycomyces*. *Mol. Microbiol.* 82: 199-208
- Medina HR, Cerdá-Olmedo E, Al-Babili S (2011) Cleavage oxygenases for the biosynthesis of trisporoids and other apocarotenoids in *Phycomyces*. *Mol. Microbiol.* 82: 199-208

- Medina HR (2013) *Biosíntesis de apocarotenoides en Phycomyces blakesleeanus*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla
- Mehta BJ, Cerdá-Olmedo E (1995) Mutants of carotene production in *Blakeslea trispora*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 836-838
- Mehta BJ, Salgado LM, Bejarano ER, Cerdá-Olmedo E (1997) New mutants of *Phycomyces blakesleeanus* for (beta)-carotene production. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3657-3661
- Mehta B, Cerdá-Olmedo E (1999) Lycopene cyclization in *Blakeslea trispora*. *Mycoscience.* 40: 307-310
- Mehta BJ, Cerdá-Olmedo E (2001) Intersexual partial diploids of *Phycomyces*. *Genetics.* 158: 635-641
- Mehta BJ, Obraztsova IN, Cerdá-Olmedo E (2003) Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4043-4048
- Meissner G, Delbrück M (1968) Carotenes and retinal in *Phycomyces mutants*. *Plant. Physiol.* 43: 1279-1283
- Mohanty D, Dhar M, Dwivedi S (2010) Mucormycosis. *Trop. Doct.* 40: 127-128
- Murillo FJ, Cerdá-Olmedo E (1976) Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*. *Mol. Gen. Genet.* 148: 19-24
- Murillo FJ, Calderón IL, López-Díaz I, Cerdá-Olmedo E (1978) Carotene-superproducing strains of *Phycomyces*. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 639-642
- Murillo FJ, Torres-Martínez S, Aragón CM, Cerdá-Olmedo E (1981) Substrate transfer in carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Eur. J. Biochem.* 119: 511-516
- Ninet L, Renaut J (1979) *Carotenoids*. Academic Press, New York, USA
- Noe L, Kucherov G (2005) YASS: enhancing the sensitivity of DNA similarity search. *Nucleic Acids Res.* 33: 540-543
- O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7: 103-116
- O'Donnell K, Lutzoni F, Ward TJ, Benny GL (2001) Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia.* 93: 286-296
- Obraztsova IN, Prados N, Holzmann K, Avalos J, Cerdá-Olmedo E (2004) Genetic damage following introduction of DNA in *Phycomyces*. *Fungal. Genet. Biol.* 41: 168-180
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, O'Hara B, Simpson GL, Solymos P, Stevens HH, Wagner H (2011) Vegan: Community Ecology Package. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>

- Ootaki T (1973) A new method for heterokaryon formation in *Phycomyces*. *Mol. Gen. Genet.* 121: 49-56
- Ootaki T, Miyazaki A (1993) *Genetic nomenclature and strain catalogue of Phycomyces*. Tohoku University, Sendai, Japan
- Orban G (1919) Untersuchungen über die Sexualität von *Phycomyces nitens*. *Beih. Bot. Centralbl.* 36: 1-59
- Orejas M, Peláez MI, Álvarez MI, Eslava AP (1987) A genetic map of *Phycomyces blakesleeanus*. *Mol. Gen. Genet.* 210: 69-76
- Papagianni M (2007) Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol. Adv.* 25: 244-263
- Paradis E (2010) pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics.* 26: 419-420
- Peat A, Banbury G (1968) Occurrence of ferritin-like particles in a fungus. *Planta.* 79: 268-270
- Pitkin JW, Panaccione DG, Walton JD (1996) A putative cyclic peptide efflux pump encoded by the TOXA gene of the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Microbiology.* 142: 1557-1565
- Plempel M (1957) Die Sexualstoffe der *Mucoraceae*. Ihre Abtrennung und die Erklärung ihrer Funktion. *Arch. Mikrobiol.* 26: 151-174
- Polaino S, Herrador MM, Cerdá-Olmedo E, Barrero AF (2010) Splitting of beta-carotene in the sexual interaction of *Phycomyces*. *Org. Biomol. Chem.* 8: 4229-4231
- Polaino S, González-Delgado JA, Arteaga P, Herrador MM, Barrero AF, Cerdá-Olmedo E (2012) Apocarotenoids in the sexual interaction of *Phycomyces blakesleeanus*. *Org Biomol Chem.* 10: 3002-3009
- Prokopowich CD, Gregory TR, Crease TJ (2003) The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome.* 46: 48-50
- R Core Team (2013) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Ray RC, Ravi V (2005) Post harvest spoilage of sweetpotato in tropics and control measures. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 45: 623-644
- Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ (2000) Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 236-301
- Richard GF, Kerrest A, Dujon B (2008) Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 686-727
- Ripley GJ, Bramley PM (1976) The subcellular distribution of carotenoids in *Phycomyces blakesleeanus* C115 car-42 mad-107. *Biochim. Biophys. Acta.* 450: 429-440

- Rivero F, Cerdá-Olmedo E (1987) Spore activation by acetate, propionate and heat in *Phycomyces* mutants. *MGG*. 209: 149-153
- Rivero F, Cerdá-Olmedo E (1994) Spore germination in *Phycomyces blakesleeanus*. *Mycologia*. 86: 781-786
- Robbins W, Kavanagh V, Kavanagh F (1942) Growth substances and dormancy of spores of *Phycomyces*. *Bot. Gaz.* 104: 224-242
- Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ (2005) Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin. Infect. Dis.* 41: 634-653
- Rodríguez-Sáiz M, Paz B, de la Fuente JL, López-Nieto MJ, Cabri W, Barredo JL (2004) *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5589-5594
- Rosenblum EB, James TY, Zamudio KR, Poorten TJ, Ilut D, Rodriguez D, Eastman JM, Richards-Hrdlicka K, Joneson S, Jenkinson TS, Longcore JE, Parra Olea G, Toledo LF, Arellano ML, Medina EM, Restrepo S, Flechas SV, Berger L, Briggs CJ, Stajich JE (2013) Complex history of the amphibian-killing chytrid fungus revealed with genome resequencing data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110: 9385-9390
- Ruiz-Hidalgo MJ, Benito EP, Sandmann G, Eslava AP (1997) The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol. Gen. Genet.* 253: 734-744
- Sahadevan Y, Richter-Fecken M, Kaerger K, Voigt K, Boland W (2013) Early and late trisporoids differentially regulate beta-carotene production and gene transcript levels in the mucoralean fungi *Blakeslea trispora* and *Mucor mucedo*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 7466-7475
- Sakai S, Kato M, Nagamasu H (2000) *Artocarpus* (Moraceae)-gall midge pollination mutualism mediated by a male-flower parasitic fungus. *Am. J. Bot.* 87: 440-445
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sanz C, Velayos A, Álvarez MI, Benito EP, Eslava AP (2011) Functional analysis of the *Phycomyces carRA* gene encoding the enzymes phytoene synthase and lycopene cyclase. *PLoS One*. 6: e23102
- Schickmann S, Urban A, Krautler K, Nopp-Mayr U, Hacklander K (2012) The interrelationship of mycophagous small mammals and ectomycorrhizal fungi in primeval, disturbed and managed Central European mountainous forests. *Oecologia*. 170: 395-409

- Schmidt AD, Heinekamp T, Matuschek M, Liebmann B, Bollschweiler C, Brakhage AA (2005) Analysis of mating-dependent transcription of *Blakeslea trispora* carotenoid biosynthesis genes *carB* and *carRA* by quantitative real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 549-555
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Consortium FB (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 6241-6246
- Schopfer WH (1937) Recherches sur le métabolisme de l'azite d'un microorganisme acellulaire (*Phycomyces blakesleeanus* Bgf.) Le rôle des facteurs de croissance. *Protoplasma.* 382-431
- Sikes RS, Gannon WL (2011) Guidelines of the American society of mammalogists for the use of wild mammals in research. *J. Mammal.* 88: 235-253
- Staben C, Yanofsky C (1990) *Neurospora crassa* a mating-type region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4917-4921
- Sutter RP, Capage DA, Harrison TL, Keen WA (1973) Trisporic acid biosynthesis in separate plus and minus cultures of *Blakeslea trispora*: Identification by *Mucor* assay of two mating-type-specific components. *J. Bacteriol.* 114: 1074-1062
- Sutter RP (1975) Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 127-130
- Sutter RP, Whitaker JP (1981) Zygophore-stimulating precursors (pheromones) of trisporic acids active in (–)-*Phycomyces blakesleeanus*. Acid-catalyzed anhydro derivatives of methyl 4-dihydrotrisporate-C and 4-dihydrotrisporate-C. *J. Biol. Chem.* 256: 2334-2341
- Sutter RP, Dadok J, Bothner-By AA, Smith RR, Mishra PK (1989) Cultures of separated mating types of *Blakeslea trispora* make D and E forms of trisporic acids. *Biochem.* 28: 4060-4066
- Tagua VG, Medina HR, Martín-Domínguez R, Eslava AP, Corrochano LM, Cerdá-Olmedo E, Idnurm A (2012) A gene for carotene cleavage required for pheromone biosynthesis and carotene regulation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal. Genet. Biol.* 49: 398-404
- Takó M, Csernetics Á (2005) Genotypic analysis of variability in Zygomycetes. A mini-review. *Acta. Biol. Hung.* 56: 345-357
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739

- Tanabe Y, Saikawa M, Watanabe MM, Sugiyama J (2004) Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1a and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30: 438-449
- Thaxter R (1914) New or peculiar Zygomycetes. 3: *Blakeslea*, *Dissophora*, and *Haplosporangium*, nova genera. *Bot. Gaz.* 58: 353-366
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882
- van Tieghem P, Le Monnier G (1873) Recherches sur les mucorinées. *Ann. Sci. Nat. Bot. Ser.* 5: 261-399
- Torres C, Baena J, Morgado A, Lozano JA, Alcaráz M (2013) Un enclave solutrense en las cordilleras Béticas Occidentales: La cueva del Higueral-Guardia. *Espacio Tiempo y Forma.* 1: 223-233
- Torres-Martinez S, Murillo FJ, Cerdá-Olmedo E (1980) Genetics of lycopene cyclization and substrate transfer in beta-carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Genet. Res.* 36: 299-309
- Tu JC, Malhotra SK (1976) The formation of sporangiospores in *Phycomyces*. *Microbios.* 15: 15-25
- Velayos A, Eslava AP, Iturriaga EA (2000) A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.* 267: 5509-5519
- Vereshchagina OA, Memorskaia AS, Kochkina GA, Tereshina VM (2012) Trisporoids and carotenoids in *Blakeslea trispora* strains differing in capacity for zygote formation. *Mikrobiologiya.* 81: 561-569
- Vitale RG, de Hoog GS, Schwarz P, Dannaoui E, Deng S, Machouart M, Voigt K, van de Sande WW, Dolatabadi S, Meis JF, Walther G (2012) Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the order mucorales. *J. Clin. Microbiol.* 50: 66-75
- Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 615-619
- Wainright PO, Hinkle G, Sogin ML, Stickel SK (1993) Monophyletic origins of the metazoa: an evolutionary link with fungi. *Science.* 260: 340-342
- Walther G, Pawlowska J, Alastruey-Izquierdo A, Wrzosek M, Rodríguez-Tudela JL, Dolatabadi S, Chakrabarti A, de Hoog GS (2013) DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia.* 30: 11-47
- Wang DM, Yao YJ (2005) Intrastrain internal transcribed spacer heterogeneity in *Ganoderma* species. *Can. J. Microbiol.* 51: 113-121

- Weddle G, Gandy K, Bratcher D, Pahud B, Jackson MA (2012) *Apophysomyces trapeziformis* infection associated with a tornado-related injury. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31: 640-642
- Weinkove D, Poyatos JA, Greiner H, Oltra E, Avalos J, Fukshansky L, Barrero AF, Cerdá-Olmedo E (1998) Mutants of *Phycomyces* with decreased gallic acid content. *Fungal. Genet. Biol.* 25: 196-203
- Wetzel J, Burmester A, Kolbe M, Wöstemeyer J (2012) The mating-related loci *sexM* and *sexP* of the zygomycetous fungus *Mucor mucedo* and their transcriptional regulation by trisporoid pheromones. *Microbiology.* 158: 1016-1023
- White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J (2006) Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia.* 98: 872-884
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, pp. 315-322. San Diego: Academic Press, San Diego, CA, USA
- Whittaker RH (1969) New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science.* 163: 150-160
- Wickham H (2009) *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer, New York, USA
- Woo PC, Leung SY, To KK, Chan JF, Ngan AH, Cheng VC, Lau SK, Yuen KY (2010) Internal transcribed spacer region sequence heterogeneity in *Rhizopus microsporus*: implications for molecular diagnosis in clinical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 48: 208-214
- Worton RG, Sutherland J, Sylvester JE, Willard HF, Bodrug S, Dube I, Duff C, Kean V, Ray PN, Schmickel RD (1988) Human ribosomal RNA genes: orientation of the tandem array and conservation of the 5' end. *Science.* 239: 64-68
- Zycha H, Siepmann R, Linnemann G (1969) *Mucorales*. J. Cramer, Lehre, Alemania

Conclusiones

1. Se han confirmado las dos especies del género *Phycomyces* establecidas desde el siglo XIX, *P. nitens* y *P. blakesleeanus*, por la morfología de las esporas, el número de núcleos por espora, el comportamiento sexual, los alelomorfos sexuales, las secuencias ITS/5.8S y las diferencias en pequeñas secuencias aleatorias de ADN usadas como marcadores. Ninguna de las 96 estirpes analizada, 45 de ellas nuevas, justifica la creación de una nueva especie.
2. La gran diversidad genética y la escasez de heterocariosis observada en las poblaciones locales de *Phycomyces* sugieren una sexualidad muy activa en el género.
3. *Phycomyces* se encuentra en todos los continentes y en todas las latitudes, preferiblemente en lugares con cierta humedad relativa, asociados a la actividad humana y en terrenos con abundancia de oquedades, como terrenos kársticos y volcánicos.
4. *Phycomyces* atrae a los ratones que ingieren el contenido de sus cuerpos fructíferos y dispersan sus esporas junto con las heces.
5. Varias características distintivas de *Phycomyces*, como su sensibilidad a estímulos externos, la morfología de sus cuerpos fructíferos y la resistencia de sus esporas a los jugos gástricos de los roedores, son adaptaciones asociadas a su entorno y a la dispersión de sus esporas.
6. Los animales que ingieren *Phycomyces* favorecen el intercambio genético entre estirpes de distinto sexo que crezcan en lugares alejados. *Phycomyces* parece estar adaptado a este proceso ya que las heces de los ratones incrementan la producción de cigosporas.
7. Las regiones intergénicas de los alelomorfos sexuales de distintas estirpes de *B. trispora* y *P. nitens* están bastante conservadas, lo que sugiere una presión selectiva sobre estas secuencias, las cuales podrían tener una participación en el proceso sexual.
8. Las comparaciones de secuencias dentro de la familia Choanephoraceae indican que *Blakeslea*, *Choanephora* y *Poitrasia* pueden considerarse un solo género. Las diferencias morfológicas apoyarían su asignación a géneros independientes. La

diversificación morfológica correlaciona con una evolución relativamente rápida de los genes del sexo.

9. La estirpe silvestre de *Blakeslea trispora* F921 tiene dos ejemplares del tándem *carB-carRA*, resultado de una duplicación reciente y no tiene otros genes que pudieran contribuir a la función de ciclación del licopeno.

Anejo 1 Dimensiones y excentricidad medias de 20 esporas de 42 estirpes de *Phycomyces*. La excentricidad de las esporas se calculó como $\sqrt{1 - b^2/a^2}$, donde a y b son los semiejes mayor y menor. La media del coeficiente de variación de la longitud fue 0,12, de la anchura 0,12 y de la excentricidad 0,05.

Estirpe	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Excentricidad
57 Anastasiou538	15,4	6,7	0,90
58 ATCC16327	23,4	8,5	0,93
59 CBS149.24	24,6	9,2	0,92
61 ICMP10093	18,9	8	0,91
62 IMI51077	22	9	0,91
63 Indoh1521	24	9,7	0,90
70 S256	16,4	6,9	0,90
71 S257	15,1	7,5	0,86
72 S270	15,1	6,1	0,91
73 S465	17,7	7,6	0,89
74 S466	15,2	6,3	0,91
75 S605	15,1	6,8	0,89
76 S606	16,1	6,9	0,90
77 S607	17,4	7,7	0,89
78 S608	15,4	6,4	0,91
79 S609	13,9	6,5	0,88
80 S642	23	8,3	0,93
81 S643	15,1	6,3	0,91
82 S644	13,9	6,1	0,90
83 S645	16,4	6,3	0,92
84 S646	19	7	0,93
85 S651	18,7	7,3	0,92
86 S653	17,6	6,5	0,93
87 S654	16,9	7,4	0,89
88 S655	15,9	6,1	0,92
89 S656	17,1	7,1	0,90
90 S657	17,7	7,1	0,91
91 S658	19,5	6,6	0,94
92 S659	17,8	7	0,92
93 S660	17,9	7,2	0,91
94 UBC39	16,7	6,7	0,91
95 UBC67	15,5	6,2	0,91
96 UBC149	21,5	8,1	0,92
67 NRRL2444	13,3	6,6	0,87
68 NRRL2678	22,7	9,2	0,91
69 NRRLA-7595	18,5	8,3	0,89
42 NRRL1555	9,8	6,4	0,72
3 CBS142.22	10,6	6,1	0,81
41 NRRL1554	10,2	5,6	0,83
4 CBS189.27	9,8	6,1	0,78
9 KC1	10,3	6,2	0,76
5 CBS282.35	12,1	7,2	0,79

Anejo 2 Distribución del número de núcleos por espora de 18 estirpes de *Phycomyces*. La media de los coeficientes de variación fue 0,24.

Nº núcleos	ATCC	IMI	S256	S270	S465	S605	S606	S607	S608	S609	S642	S643	S644	UBC39	CBS	CBS	NRRL	NRRL
	16327	051077													189.27	142.22	1554	1555
	58	62	70	72	73	75	76	77	78	79	80	81	82	94	4	3	41	42
1															1		3	1
2														3	10	5	6	2
3				1	1				1				1	1	52	40	67	34
4		2		3						1				4	35	45	35	57
5		1	2	5	2			1	3	1		1	6	1	50	14	7	13
6			8	9	3	2	4	1	5			3	5	5		3		2
7			14	18	5	3	14		8	5		12	8	10				
8		1	14	21	9	4	16	5	21	3	1	13	11	17				
9		1	12	22	22	7	22	7	20	11	4	30	16	10				
10		1	16	10	20	7	25	4	24	20	6	16	30	20				
11	1	1	12	8	16	14	10	10	10	11	3	10	24	12				
12		1	9	1	12	9	4	23	5	18	7	13	15	11				
13		1	1	2	10	11	3	20	2	12	5	4	7	7				
14		3	1		5	9	2	9	1	15	6	1	3	5				
15		2	1		3	6		9		3	5	3	3	3				
16	1	2				12		8		1	15	3		1				
17	2	3				6		2			12		1					
18	1	1				2				1	4							
19	3	4				4		1			10			1				
20	9	11				2					8							
21	3	5				4					3							
22	8	8									2							
23	7	4																
24	8	6									1							
25	8	8									5							
26	10	4									1							
27	6	2																
28	10	6																
29	3	8									1		1					
30	5	4																
31	4	4																
32	10	2											1					
33											1							
34	2	3																
Media	25.3	24.2	9.1	8.1	10.2	13.2	9.2	12.4	9.2	11.3	16.5	9.7	10.2	9.6	3.8	3.7	3.3	3.8
C.V.	0.18	0.33	0.23	0.24	0.22	0.27	0.19	0.20	0.20	0.21	0.28	0.23	0.34	0.32	0.26	0.21	0.19	0.21

Resumen

El género *Phycomyces* (Mucoromycotina, Mucorales) ha sido revisado analizando 96 estirpes recibidas de colecciones o recién aisladas en diferentes entornos. La morfología, la sexualidad, las secuencias de ADN y la estructura de las poblaciones identifican sin ambigüedad al género y lo distinguen del resto de los Mucorales. El tamaño de las esporas, las reacciones sexuales, las secuencias de los genes *sexM* y *sexP*, que determinan la identidad sexual, y el ADN para el ARN ribosómico validan las especies previamente establecidas *P. blakesleeanus* y *P. nitens*, así como la familia Phycomycetaceae. Las estirpes aisladas de una misma muestra de biomasa a menudo difieren en el tamaño de las esporas, el sexo, las secuencias de ADN y los marcadores de restricción. La mayor diversidad se encontró en ambientes similares en tres de las Islas Canarias, lo que implica que las esporas tienen dificultades para dispersarse entre islas. Todas las estirpes tienen genes del sexo aparentemente funcionales y todas, excepto algunas de *P. nitens*, completan el ciclo sexual en el laboratorio. La diversidad genética de *P. blakesleeanus* correlaciona con la distribución geográfica de las estirpes.

Se ha confirmado que *Phycomyces* es atractivo para pequeños mamíferos, que extraen e ingieren el contenido de los esporangióforos, aprovechando el agua que acumulan y otros nutrientes. Estos animales dispersan las esporas de *Phycomyces* llevándolas adheridas a su cuerpo o estando presentes en sus heces. Al portar las esporas de unos lugares a otros, posibilitan el encuentro de estirpes alejadas y el cruzamiento entre ellas si son de sexos opuestos. *Phycomyces* se ha adaptado evolutivamente a estos mecanismos de dispersión con sus esporangios indehiscentes, adherentes y muy resistentes mecánicamente, mucho más que los de otros Mucorales como *Mucor* y *Rhizopus*. La morfología y sensibilidad de los esporangióforos de *Phycomyces* pueden interpretarse también como adaptaciones evolutivas a la espera del paso de animales.

Algunos detalles fisiológicos de *Phycomyces* y del comportamiento de los ratones respecto a este Mucoral demuestran que existe un beneficio mutuo que va más allá de su uso como fuente de hidratación y de dispersión de las esporas. El hongo ha desarrollado unas características condicionadas por su asociación con pequeños mamíferos, que probablemente comparte con otros hongos. Algunos Mucorales que comparten sus hábitats con *Phycomyces*, como ciertas especies de *Mucor* y *Rhizopus*, han evolucionado desarrollando estrategias diferentes de relación con los mamíferos, como la capacidad patogénica.

Las distancias evolutivas encontradas dentro de la familia Choanephoraceae indican que su reparto en géneros es más que discutible, ya que *Blakeslea*, *Choanephora* y *Poitrasia* se pueden considerar un solo género. Las diferencias morfológicas apoyarían su asignación a géneros independientes, pero no las comparaciones de secuencias.

Se ha demostrado la presencia de dos ejemplares del tándem *carB-carRA* en la estirpe silvestre F921 de *Blakeslea trispora*, debido a una duplicación reciente. El doble mutante de *carRA*, SB64, acumula solamente licopeno, lo que demuestra que la estirpe

F921, de la que procede, no tiene una monoclasa alternativa a la ciclasa de licopeno CarRA, como se ha propuesto para la estirpe silvestre de *Blakeslea* NRRL2457.

Varias comparaciones de secuencias, incluyendo las de los genes del sexo de *P. nitens* y *Blakeslea trispora* caracterizados en esta Tesis, aclaran las relaciones filogenéticas entre los Mucorales y hacen recomendables los alelomorfos sexuales para el estudio de la especiación.

