

Facultad de Ciencias – UDELAR
Licenciatura en Bioquímica
Tesina de grado
Diciembre 2011

Análisis de expresión de parálogos del gen transportador de urea (*ureA*) de *Aspergillus nidulans* y delección de uno de ellos: ANID_02598.1

Lucía Carrau Eguía
Orientadora: Dra. Ana Ramón
Co-orientador: Lic. Manuel Sanguinetti
Sección Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Biología Celular y Molecular
Facultad de Ciencias, UdelaR

AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento va dirigido a mi tutora Ana. Primero que nada por aceptarme, y por recibirme con tan buena disposición. Por enseñarme tantas cosas y por preocuparse por mi siempre.

A Manu, por todo lo que me ayudó desde el primer momento. Por contestarme inagotables preguntas. Por sus diagramas y por sus respuestas.

A todos mis compañeros del laboratorio 313, pero en especial a Ali y Fer, que más allá de la cantidad de veces que me dieron grandes manos, siempre me escucharon y me aconsejaron.

A todos mis compañeros de la Sección Bioquímica.

A mis alumnos, por la motivación diaria.

A mi familia y amigas. Por su constante y permanente ayuda, curiosidad e interés. Por haber sido parte de éste mundo del cual no entienden nada, pero que aún así yo l@s sentí parte.

RESUMEN

La proteína codificada por el gen *ureA* ha sido identificada y caracterizada como el principal transportador de urea de *Aspergillus nidulans*. Aún así, cepas que contienen *ureA* suprimido presentan crecimiento residual en placas con urea como única fuente de nitrógeno. Esto podría ser explicado por la presencia de transportadores secundarios, o por transporte por difusión pasiva (Abreu *et al.*, 2010). Una búsqueda de secuencias homólogas a *ureA* en el genoma de *A. nidulans* nos permitió identificar tres parálogos, codificados por los genes ANID_02598.1, ANID_07373.1 y ANID_07557.1. Asimismo, es posible que los mismos codifiquen para transportadores de especificidad desconocida. En vistas de dichos hallazgos, el objetivo de este trabajo fue determinar si estos parálogos se expresan o no bajo determinadas condiciones cuidadosamente seleccionadas. Éstas fueron: condiciones de no represión, ausencia de nitrógeno y fase isotrópica de crecimiento. Además, en paralelo se realizó el ensayo de crecimiento en condiciones de represión catabólica por nitrógeno, con amonio como fuente de nitrógeno (fuente preferencial de nitrógeno). El estudio de expresión se realizó mediante RT-PCR (transcripción reversa-PCR) con primers específicos diseñados para amplificar los distintos parálogos. Luego, se realizó una segunda ronda de PCR, empleando cebadores anidados (“nested-PCR”). Se detectaron niveles de expresión para los tres parálogos en las condiciones de ausencia de fuente de nitrógeno y de represión catabólica por nitrógeno.

Con la finalidad de profundizar en nuestro estudio, decidimos como siguiente estrategia realizar la eliminación del gen de uno de los tres parálogos, el ANID_02598.1 y evaluar la capacidad de las cepas deletadas de crecer en urea como única fuente de nitrógeno. También se probó el crecimiento sobre su análogo tóxico tiourea, y sobre una fuente de nitrógeno no represora como prolina. Para ello se realizó un cassette génico, “ Δ 2598”, el cual fue insertado mediante la técnica de transformación, en el genoma de una cepa previamente obtenida por cruzamiento. A partir de este ensayo no se obtuvieron resultados concluyentes.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BrEt	Bromuro de Etidio
dNTPs	2-Deoxinucleótidos 5´ trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino-tetra-acético
Kb	Kilobases
MC	Medio completo
MM	Medio mínimo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PM	Peso molecular
MPM	Marcador de peso molecular
RPM	Revoluciones por minuto
TE	Buffer Tris EDTA
UV	Ultravioleta

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABREVIATURAS	4
1- INTRODUCCIÓN	7
1.1 Presentación del modelo utilizado	7
1.1.1 <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de célula eucariota	8
1.2 Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i>	9
1.3 Fuentes de nitrógeno utilizadas por <i>A. nidulans</i>	12
1.3.1 Urea como fuente de nitrógeno	12
1.4 Sistemas de transporte a través de las membranas	14
1.4.1 Permeasas en <i>A. nidulans</i>	16
1.4.2 Transporte de urea en <i>A. nidulans</i>	16
1.5 Regulación de la expresión de transportadores de sustancias nitrogenadas	18
1.5.1 Regulación a nivel de la transcripción en relación a la fuente de nitrógeno disponible	19
1.5.2 Regulación a nivel de la transcripción durante la germinación	20
1.5.3 Regulación a nivel del tráfico y endocitosis	21
1.5.4 Regulación del gen <i>ureA</i>	22
2- OBJETIVOS	23
3- ESTRATEGIA	23
3.1 Análisis de expresión	23
3.2 Deleción de ANID_02598.1	24
3.2.1 Fusion PCR (Szewczyk <i>et al.</i> , 2007)	25
4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1 Análisis de expresión de los genes parálogos de <i>ureA</i>	26
4.2 Deleción del gen ANID_02598.1	33
4.2.1 Construcción del cassette 5'ANID_02598.1::pabaA::3'ANID_02598.1	33
4.2.2 Transformación de la construcción "Δ2598" en la cepa MVD26	36
4.2.3 Rol de ANID_02598.1 en el transporte de urea	37
5- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	40

6- MATERIALES Y MÉTODOS	43
6.1 - Cepas empleadas	43
6.1.1 Genotipos de las cepas empleadas	43
6.1.2 Descripción de los genotipos y fenotipos	43
6.2 - Medios de cultivo	44
6.3 - Técnicas empleadas	47
6.3.1 Condiciones de cultivo	47
6.4 Análisis de expresión génica	48
6.5 PCR de fusión	52
6.6 - Generación de la cepa MVD 26 <i>γA2 riboB2 pyroA4 pabaA1 Δnku::argB</i> por cruzamiento de la cepa MVD 13A x P002 (Todd <i>et al.</i>, 2007)	55
6.7 - Transformación de <i>A. nidulans</i>	58
6.8 - Análisis electroforético ADN	60
6.9 - Purificación de bandas de ADN	61
7- BIBLIOGRAFÍA	62
8- ANEXO	67

INTRODUCCIÓN

1.1 Presentación del modelo utilizado

El reino fungi, comprende un número muy elevado de organismos (aproximadamente 1.5 millones de especies). Sus principales características, que los diferencian de otros reinos son tres: son organismos eucariotas sencillos, presentan pared celular y son heterótrofos no fotosintéticos. El filo Ascomycete abarca aproximadamente al 40% de las especies; son hongos filamentosos con micelio tabicado y levaduras. Incluye organismos industrialmente útiles, patógenos de plantas, animales y humanos, y organismos modelo como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* (Scazzocchio, 2006). La principal característica que define a este filo se encuentra en la presencia de un asco que contiene las esporas resultantes de la cariogamia y meiosis. El asco es una célula en forma de saco que contiene en general 8 ascosporas. Otras características de este filo son:

- No presentan células flageladas.
- Presentan un micelio septado (en las formas miceliales), con los septos perforados por el centro por un poro septal, que divide las hifas en segmentos uninucleados, binucleados y multinucleados, de modo que el protoplasma de células adyacentes es continuo. Los núcleos y demás organelos pueden pasar a través de las perforaciones de los septos y viajar por todo el micelio.
- Las paredes de las hifas contienen una gran proporción de quitina y, con muy pocas excepciones, están exentas de celulosa.
- La reproducción asexual es típicamente por conidias, esporas formadas en hifas reproductivas especializadas (conidióforos).
- Como resultado de la reproducción sexual, muchas especies forman cuerpos fructíferos (ascocarpos), que contienen los ascos.

(Bold, Alexopoulos y Delevoryas, 1987)

1.1.1 *Aspergillus nidulans* como modelo de célula eucariota

A. nidulans es un hongo filamentoso, homotático y saprofita perteneciente al filo recién mencionado. Fue descrito hace ya varios años (Pontecorvo, 1953) como un organismo excelente para el trabajo en el laboratorio. Es ampliamente utilizado debido a la gran cantidad de ventajas que presenta: es de fácil y segura manipulación, crece rápidamente (48 hs a 37°C) produciendo una gran cantidad de biomasa. Sus requerimientos nutricionales son simples y presenta una gran versatilidad metabólica que le permite metabolizar gran cantidad de compuestos. Es especialmente adecuado para realizar ensayos de crecimiento en placas de Petri, que permiten detectar con gran sensibilidad fenotipos intermedios de crecimiento, inferiores al del tipo salvaje, característicos, por ejemplo, de mutantes de transportadores (capaces de incorporar metabolitos por sistemas secundarios de transporte), además del crecimiento normal o la ausencia total de crecimiento. El desarrollo de técnicas de transformación de protoplastos (Tilburn *et al.*, 1983; Yelton *et al.*, 1984; Ballance *et al.*, 1983; Fincham, 1989; Koukaki, 2003; Szewczyk *et al.*, 2007) con alta eficiencia permite clonar genes por complementación, sobre-expresar genes, expresar proteínas mutantes y genes heterólogos. Por otra parte, este hongo presenta una alta tasa de recombinación homóloga lo que permite realizar reemplazos génicos e inactivar genes. Estas características, sumadas a su genoma haploide y de pequeño tamaño, facilitan el estudio de diversos fenómenos biológicos entre los que se destaca el de la regulación génica. La presencia de ciclos de reproducción sexual y parasexual constituyen ventajas adicionales, ya que posibilitan la ocurrencia de fenómenos de recombinación.

El genoma de *A. nidulans*, de aproximadamente 3.1×10^7 pb, está organizado en 8 cromosomas de estructura similar a la de los eucariotas superiores, con presencia de histonas y se encuentra contenido en el núcleo, que presenta una membrana nuclear. En el año 2005 la secuencia completa de su genoma fue publicada (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>), facilitando así una nueva herramienta para estudios a nivel genético. También se dispone de una gran colección de cepas mutantes con marcadores auxotróficos.

Las ya mencionadas características del organismo, junto con el amplio conocimiento a nivel fisiológico, genético y bioquímico a disposición, hacen de

este organismo un modelo eucariota a tener en cuenta en muchas de las áreas de investigación biológica actual.

El desarrollo de la investigación en este organismo ha sido alentado también por su estrecha relación filogenética con especies que son de interés desde el punto de vista industrial y sanitario. Algunos de estos procesos industriales son los de obtención de productos, ya sean metabolitos primarios como ácidos orgánicos, aminoácidos, polisacáridos y vitaminas, así como metabolitos secundarios como antibióticos, hormonas o enzimas industriales como la glucoamilasa, α -amilasa, celulasa, lipasa y proteasa (Bodie *et al.*, 1994). *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* son claros ejemplos, ya que están involucrados en la producción de algunas de éstas (Braaksma y Punt, 2007). Desde el punto de vista sanitario, su interés radica en su relación con aquellos grupos de hongos filamentosos que son agentes causales de enfermedades en plantas, animales y seres humanos. Tal es el caso de *Aspergillus fumigatus*, causante de la enfermedad humana conocida como aspergillosis, la cual afecta principalmente a pacientes inmunodeprimidos. Otros pueden ser empleados como agentes de control biológico a fin de prevenir daños agrícolas causados por diversos insectos y hongos.

1.2 Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*

El ciclo de vida se caracteriza por la presencia de 3 formas de reproducción: sexual, asexual y parasexual (ver Figura 1). Durante la reproducción asexual se genera el estado haploide, el cual es el comúnmente usado con fines experimentales. Durante esta fase de la reproducción, también conocida como vegetativa, el micelio es filamentosos e incoloro, conformado por hifas, compuestas de células vegetativas multinucleadas y haploides. Algunas de estas hifas se especializan en una función reproductiva, produciendo conidióforos, los cuales producen las esporas asexuales, también conocidas como conidias. Los conidióforos se extienden verticalmente y forman vesículas multinucleadas en sus extremos. Es en éstas vesículas donde se desarrollan los esterigmas primarios y secundarios, los cuales darán lugar a las conidias mediante

múltiples divisiones nucleares. Todas las conidias provenientes de un mismo esterigma primario son genéticamente idénticas y haploides, ya que cada uno de éstos recibe un solo núcleo, representando así otra ventaja adicional para estudios de mutagénesis y para la obtención de cepas mutantes, en las cuales se pueden analizar los efectos provocados por mutaciones recesivas.

El ciclo de reproducción sexual se caracteriza por la formación de un cleistotecio o cuerpo de fructificación y la producción de células de Hülle, las cuales se cree que proveerían de un soporte nutritivo al cleistotecio. Los cleistotecios contienen las esporas sexuales conocidas como ascosporas. El proceso de formación de un cleistotecio comienza cuando dos núcleos haploides se congregan en un ensanchamiento apical dando lugar a una hifa ascogénica. Luego ocurre la fusión nuclear, generando una célula diploide, conocida como asco primordial (Pontecorvo, 1953). Luego de este evento de fertilización, una meiosis y una división mitótica se suceden para dar lugar a la formación del asco. El asco en formación contiene 8 núcleos haploides que se dividen de nuevo para dar lugar al asco maduro con 8 ascosporas binucleadas. Dentro de cada cleistotecio, luego de 10-12 días es posible encontrar cerca de miles de ascos, con sus correspondientes ascosporas provenientes de un único evento de fecundación.

A. nidulans es homotálico, es decir, puede desarrollar un ciclo sexual completo en un solo micelio, sin necesidad de un compañero sexual, lo que permite evaluar la estabilidad meiótica de ciertas alteraciones cromosómicas. Sin embargo, si dos cepas de *A. nidulans* entran en contacto, se anastomosarán dando como resultado células heterocarióticas. De formarse un cleistotecio en esta área, la fusión nuclear podría tener lugar entre dos núcleos genéticamente diferentes, conocido como cleistotecio cruzado. De esta manera, es posible estudiar la segregación y recombinación de los genes de una manera clásica. La utilización de cepas con auxotrofías complementarias aumenta radicalmente la proporción de cleistotecios provenientes de la fecundación de núcleos distintos (Scazzocchio, 2007).

Por último, el ciclo parasexual, se presenta con alternancia de fases haploides y diploides. El micelio heterocariótico puede dar lugar espontáneamente a una espora diploide con una frecuencia de 10^{-7} (Roper, 1952). El micelio diploide crece como la cepa haploide, pero no es una forma estable y sobre medio de

cultivo no selectivo vuelve fácilmente al estado haploide, siendo este proceso aún no del todo comprendido. La utilización del ciclo parasexual permite entre otras cosas, la cartografía por recombinación mitótica, la determinación de grupos de complementación, y del carácter de dominancia o recesividad de las mutaciones (Käfer, 1958; McCully y Forbes, 1965; Clutterbuck, 1974).

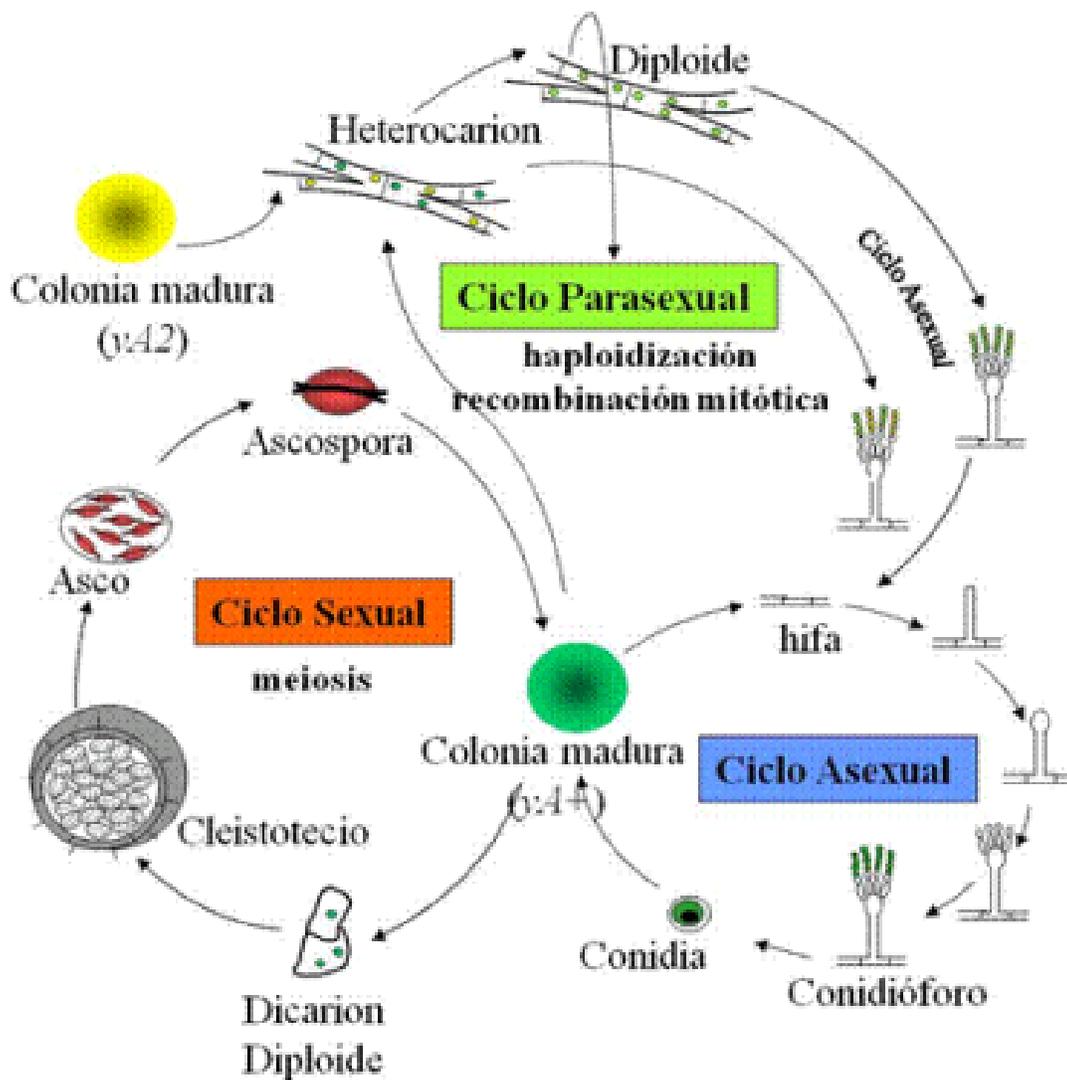


Figura 1 - Ciclo de vida de *A. nidulans*. Se muestran los tres ciclos: el ciclo asexual, el sexual y el parasexual [tomado de: (Scazzocchio, 2007)].

1.3 Fuentes de nitrógeno utilizadas por *A. nidulans*

A. nidulans es un microorganismo saprofita que crece en la naturaleza sobre desechos orgánicos, donde la naturaleza y la cantidad de fuentes de nitrógeno está en continuo cambio. Éstas incluyen amonio, glutamina (siendo estas las fuentes preferenciales de nitrógeno), iones nitrito y nitrato, así como compuestos orgánicos tales como aminoácidos y nucleótidos (fuentes secundarias de nitrógeno o no preferenciales). *A. nidulans* es capaz de utilizar todas las purinas naturales (adenina, guanina, hipoxantina, xantina, ácido úrico) y sus metabolitos (alantoína, ácido alantoico o urea) como única fuente de nitrógeno. Las características genéticas, moleculares y bioquímicas de la asimilación de nitrógeno y de su regulación en *A. nidulans* han sido extensamente estudiadas en los últimos años. El gen que codifica para los reguladores claves en el catabolismo de nitrógeno (*areA*) fue el primero con tal función en ser descrito en un organismo eucariota (Arst y Cove, 1973).

1.3.1 Urea como fuente de nitrógeno

La urea o carbamida es uno de los compuestos nitrogenados que *A. nidulans* puede usar como fuente de nitrógeno. Puede ser incorporado desde el exterior hacia el medio intracelular a través de dos sistemas de captación distintos: uno de baja afinidad y otro de alta afinidad (Pateman *et al.*, 1982). Por otro lado, la urea es uno de los productos de la vía de degradación de las purinas (Figura 2), resultando de la acción de la enzima alantoicasa, que degrada el ácido alantoico en amonio y urea o ureidoglicolato (Scazzocchio y Darlington, 1968). Éste último puede ser convertido en urea por la ureidoglicolasa. En el interior celular la urea es degradada a amonio, por acción de la ureasa. En este proceso están

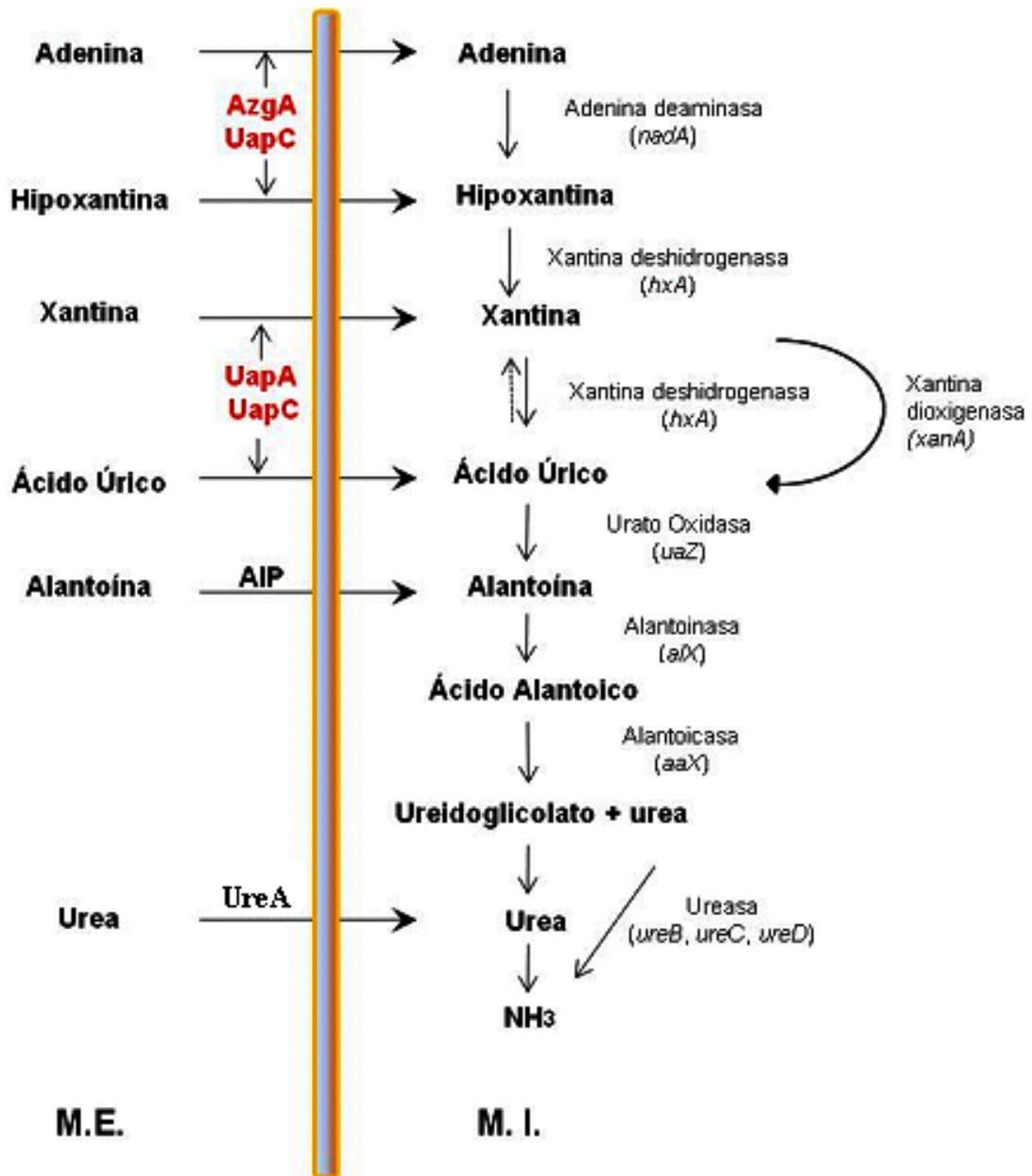


Figura 2: Vía de degradación de las purinas en *A. nidulans*. Adaptado de Gorfinkiel (1994). M.E.: Medio Extracelular; M.I.; Medio Intracelular. En la figura se observan las diferentes enzimas involucradas en la vía de degradación, así como los genes que las codifican (entre paréntesis), y también se muestran las permeasas por donde ingresan los compuestos nitrogenados.

involucrados tres genes: *ureB*, *ureC* y *ureD*. Posiblemente *ureB* sea el gen estructural de la enzima y los genes *ureC* y *ureD* codifiquen para un cofactor que contenga níquel o que intervenga en la incorporación de níquel en la molécula (Scazzocchio y Darlington, 1986; Pateman y Kinghorn, 1977; Pateman y Mackay, 1982). Según estudios previos (Arst y Cove, 1973; Pateman *et al.*, 1982), la ureasa y probablemente el sistema de captación de urea de baja afinidad estén débilmente regulados por amonio, mientras que el transporte de específico de alta afinidad está fuertemente regulado.

1.4 Sistemas de transporte a través de las membranas

Todas las membranas celulares poseen sistemas de transporte conocidos como permeasas que permiten internalizar una gran diversidad de compuestos esenciales, que de otra manera, no tendrían acceso al medio intracelular. Es clara entonces, la vital importancia de estos sistemas de transporte. Muy pocas moléculas entran o salen de la célula sin necesidad de un mecanismo de transporte específico que incluya proteínas especializadas. Incluso moléculas pequeñas e indispensables como el agua, que pueden difundir a través de la bicapa lipídica, son en ocasiones transportadas por proteínas transportadoras.

De acuerdo a sus requerimientos energéticos y a los mecanismos empleados, los sistemas de transporte pueden ser clasificados en distintos grupos. Por un lado, los canales, que no requieren energía para su funcionamiento, transportan agua o iones a favor de un gradiente electroquímico mediante la formación de poros acuosos de difusión. El transporte a través de canales ocurre de manera extremadamente veloz, vinculándose este tipo de transporte a funciones esenciales, por ejemplo en el sistema nervioso y la contracción muscular. Algunos de éstos están continuamente abiertos, mientras que otros pueden permanecer tanto abiertos como cerrados, dependiendo de señales del entorno, tales como el potencial eléctrico. Por otro lado, encontramos los transportadores dependientes de energía, conocidos como bombas o transportadores activos primarios, que catalizan el transporte de metabolitos contra un gradiente electroquímico, acoplado a hidrólisis de ATP. Finalmente se encuentran los

transportadores activos secundarios, también llamados facilitadores o “porters”, que transportan metabolitos contra un gradiente electroquímico. Estas proteínas unen una, o unas pocas moléculas de sustrato por vez y deben experimentar un cambio conformacional reversible para permitir el pasaje de las mismas. Se han encontrado tres tipos de porters: “uniporters”, “simporters” y “antiporters”. Los “uniporters” son los implicados en el proceso conocido como difusión facilitada; estos son capaces de transportar una única molécula por vez a favor de su gradiente de concentración. Los “simporters” y “antiporters” actúan de manera similar, transportando el soluto en contra de su gradiente electroquímico utilizando el movimiento de otras especies iónicas tales como H^+ , Na^+ o K^+ , las cuales se mueven a favor de su gradiente electroquímico. En el caso de los “simporters” el movimiento de ambas especies es en el mismo sentido, mientras que en el caso de los “antiporters” el movimiento se realiza en sentidos opuestos. En general, los transportadores activos se encargan del transporte de metabolitos tales como aminoácidos, azúcares, vitaminas, nucleósidos, compuestos nitrogenados, etc. (Diallinas, 2007).

La similitud estructural de muchas permeasas se encuentra bien conservada tanto para procariotas como eucariotas, de acuerdo con sus funciones esenciales que han perdurado a lo largo de la evolución. Son estructuras altamente modulares, usualmente compuestas por hélices α hidrofóbicas, suficientemente largas como para atravesar la membrana lipídica (hélices transmembrana). El número de veces que la proteína atraviesa la membrana varía entre los diferentes transportadores, pero en general este número se encuentra entre 10 y 14 hélices transmembrana.

La importancia de las permeasas para todos los organismos queda bien evidenciada si consideramos que los genes que codifican para ellas representan un 20-30% de las secuencias codificantes de genomas secuenciados, tanto procariotas como eucariotas (Liu y Rost, 2001). Además, bien es sabido que un elevado número de enfermedades que afectan a los seres humanos, están originadas por defectos en transportadores. En muchos casos, mutaciones en los transportadores son los responsables de defectos en estructura, función o localización subcelular, generándose así la enfermedad. En otros casos, estas mutaciones son las causantes de la resistencia a drogas, ya que estas no pueden

ser incorporadas al interior celular. A modo de ejemplo, la enfermedad conocida como fibrosis quística, es causada por una deficiencia en el canal de cloruro ubicado en la membrana apical de células epiteliales (también conocido como Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator o CFTR). Se encontró que algunos pacientes que portan un fenotipo característico de la enfermedad, presentan mutaciones sinónimas en el gen CFTR (Castellani *et al.*, 2008).

1.4.1 Permeasas en *A. nidulans*

Los eucariotas inferiores, como *A. nidulans*, poseen múltiples permeasas de aminoácidos y moléculas pequeñas que exhiben diferentes propiedades respecto a la especificidad, afinidad por el sustrato, capacidad y regulación. Esto les permite captar solutos a diferentes velocidades, condiciones fisiológicas y bajo condiciones extremas de concentración (Sophianopoulou y Diallinas, 1994).

Varios sistemas de transporte y canales han sido identificados en *A. nidulans*. Se estima que más de 700 genes, que en su conjunto corresponden al 7.1% del genoma total de *A. nidulans*, codifican para proteínas que catalizan el transporte de solutos e iones a través de las membranas. De los 703 transportadores o canales putativos de *A. nidulans*, 81.5% son transportadores activos secundarios, 11.8% son transportadores activos primarios y 4.4% son canales, mientras que el restante 1% aún no ha sido clasificado.

Dentro de la variedad de sistemas de transporte investigados al momento, se encuentran transportadores de amonio, aminoácidos, glucosa, galactosa, fructosa, nitrato, sulfato y purinas, así como la H⁺/ATPasa de la membrana plasmática (Diallinas, 2007).

1.4.2 Transporte de urea en *A. nidulans*

En el correr de los últimos años el estudio de los transportadores de urea ha ganado gran importancia en diversos organismos en vistas de los posibles roles fisiológicos que ésta puede cumplir dentro de los organismos. En el caso de *A. nidulans* ya en 1982 que Pateman *et al.* pusieron en evidencia la existencia de dos sistemas de transporte de urea. El primero de éstos es un sistema de alta afinidad mediado por la permeasa específica UreA, que actúa cuando la

concentración extracelular de urea es baja (menor a 3 mM). El otro, de baja afinidad, media un fenómeno de transporte pasivo cuando las concentraciones de urea extracelular son altas (mayores a 3 mM). El sistema de captación activo de urea sigue una cinética de Michaelis-Menten, siendo dependiente de la concentración de sustrato y saturable (Pateman y Mackay, 1982). Los autores aislaron una serie de mutaciones en el locus *ureA*, el cual sería el gen estructural que codifica para la proteína UreA, única encargada de transportar urea con alta afinidad. Los mutantes (por ejemplo *ureA1*) carecen de actividad de transporte normal y presentan un crecimiento residual, el cual posiblemente es llevado a cabo por los transportadores de baja afinidad o por canales. Estas mutaciones fueron aisladas por su resistencia a la 2-tiourea, análogo tóxico de la urea, la cual sería transportada por la misma proteína.

El gen *ureA* fue clonado en nuestro laboratorio por complementación de función en un mutante *ureA1* con una biblioteca genómica de *A. nidulans* y posteriormente secuenciado. El análisis de la secuencia de *ureA* reveló que este gen tendría un marco abierto de lectura de 2176 pb interrumpido por dos intrones, codificando una proteína de 693 aminoácidos. Para esta proteína deducida se predicen 14 dominios transmembrana y dominios conservados con la familia SSF (Sodium:solute Symporter Family) de “simporters” de sodio (Abreu, 2010). Se encontraron ortólogos en todos los miembros de la familia *Aspergillus*, y también es posible encontrar homólogos tanto en plantas, como en hongos y levaduras. Tal es el caso del transportador de urea y poliaminas de *Saccharomyces cerevisiae* (ScDur3) (ElBerry *et al.*, 1993), donde se encontró que la secuencia de *ureA* presenta una identidad del 43% con la secuencia genómica de ScDur3. Se han caracterizado homólogos con alta homología de secuencia en las plantas *Arabidopsis thaliana* (AtDur3) (Liu *et al.*, 2003) y *Oryza sativa* (OsDUR3) (Wang *et al.* 2011) y los hongos *Paxillus involutus* (PiDur3) (Morel *et al.*, 2008) y *Candida albicans* Dur3 (Navarathna *et al.*, 2011). Éstos transportadores de urea de hongos y plantas, presentan la particularidad de utilizar un mecanismo de intercambio de protones en lugar de sodio. Así fue que se propuso que este grupo de proteínas de hongos y plantas constituye una subfamilia de simportadores urea:H⁺ incluida dentro de los transportadores SSS (Abreu, 2010).

La secuencia de *ureA* esta anotada con el numero de acceso ANID_0418.1 en el genoma completo de *A. nidulans*. Además, se identificaron en el genoma otras tres proteínas que presentan una homología de secuencia significativa con *ureA*. Éstos son ANID_07373.1 (63 % de homología), ANID_02598.1 (57 % de homología) y ANID_07557.1 (52 % de homología). Estos tres parálogos son centrales en este trabajo, creyéndose que puedan estar involucrados en el transporte de otros compuestos nitrogenados o en el transporte secundario de urea. En este sentido, el crecimiento residual sobre urea de los mutantes " $\Delta ureA$ " podría deberse al transporte a través de alguno de estos parálogos. Esto ha sido descrito con anterioridad para ScDur3 (ElBerry *et al.*, 1993), donde se encontró un sistema de transporte secundario, independiente de energía, operante gracias a difusión facilitada cuando las concentraciones de urea son elevadas (mayores a 3 mM).

1.5 Regulación de la expresión de transportadores de sustancias nitrogenadas.

El hecho de que *A. nidulans* sea capaz de utilizar un amplio rango de compuestos como fuente de nitrógeno, implica que una gran variedad de genes participen en la importación de estos compuestos a la célula. Esto ha llevado a la existencia de un sistema de regulación que permite la expresión de estos genes sólo cuando el sustrato adecuado se encuentra presente, lo cual implica la presencia de un sistema de control específico para cada vía de utilización de las distintas fuentes de nitrógeno, que detecte la presencia de cada compuesto en el medio extracelular. En general, los genes que codifican para las enzimas involucradas en la utilización de un metabolito específico solo son transcriptas en presencia de un inductor específico. Los inductores actúan activando factores de transcripción específicos, los cuales provocan la transcripción de genes catabólicos específicos.

Por otro lado, el amonio es la fuente preferencial de nitrógeno y en su presencia (o de su metabolito L-glutamina), los genes involucrados en la utilización de otras fuentes se encuentran reprimidos. Este fenómeno se conoce como represión metabólica por nitrógeno. Si el amonio es reemplazado por otra

fuente de nitrógeno no preferencial, las permeasas y enzimas catabólicas apropiadas son desreprimidas.

Este tipo de “doble control” parece ser una característica común del modo de vida microbiano libre y ha sido descrito para la regulación de genes implicados en la utilización de fuentes de nitrógeno, de carbono y otros compuestos (Felenbok, 2001; Marzluf, 1993; Peñalva y Arst, 2002). Como consecuencia el organismo puede utilizar un determinado compuesto como nutriente siempre que éste se encuentre presente en el medio de cultivo y que además no disponga de ninguna otra sustancia que sea más eficazmente asimilable.

Si bien la regulación ocurre principalmente a nivel transcripcional, también existen otros niveles de regulación de las permeasas que consisten en modular su estabilidad en la membrana plasmática (Valdez, 1999).

1.5.1 Regulación a nivel de la transcripción en relación a la fuente de nitrógeno disponible

Como ya se mencionó anteriormente, en presencia de las fuentes preferenciales de nitrógeno, ocurre un fenómeno conocido como represión catabólica por nitrógeno, donde se reprime la transcripción de genes involucrados en la utilización de fuentes de nitrógeno alternativas (Caddick, M.X, 1994). Esto ocurre mediante la inactivación del factor de transcripción del tipo GATA, AreA. AreA es un activador de la transcripción, codificado por el gen *areA* y es necesario para la transcripción eficiente de genes que codifican enzimas y permeasas involucradas en la utilización de todas las fuentes de nitrógeno (a excepción de amonio y L-glutamina) (Arst y Cove, 1973). El inhibidor fisiológico de la activación transcripcional mediada por AreA es en realidad la L-glutamina. Mutaciones de pérdida de función de la glutamina sintetasa (que cataliza la conversión de amonio en L-glutamina) no presentan represión de los genes bajo el control de AreA en presencia de amonio (Wiame y Arst, 1985).

El gen *areA* codifica una proteína de 876 aminoácidos que contiene un motivo de unión al ADN del tipo dedo de Zinc Cys-2-Cys-17-Cys-2Cys característico que lo ubica dentro de la clase de factores transcripcionales GATA (Caddick *et al.*, 1986; Kudkla *et al.*, 1990).

Los mecanismos mediante los cuales AreA es inhibido incluyen la represión de la transcripción del propio gen *areA*, la inhibición de AreA mediada por la proteína NmrA, la degradación del ARN mensajero de *areA* y la exclusión de AreA del núcleo (Morozov *et al.*, 2001; Morozov *et al.*, 2000; Todd y Andrianopoulos, 1997). AreA actúa sobre promotores regulados por nitrógeno, usualmente en sinergia con factores de transcripción específicos para cada vía y que responden a la inducción por un sustrato nitrogenado específico (Scazzocchio, 2007).

Ahora bien, en lo que respecta a la inducción, en general la inducción por sustrato de un transportador específico es un requisito previo para la expresión de los genes que codifican todas las enzimas participantes en la vía de utilización de ese sustrato. Una vez inducido el transportador y por lo tanto expresado en la membrana, el sustrato es capaz de ingresar a la célula y dentro de ella inducir los genes que codifican para todas las enzimas vinculadas a la utilización del sustrato. A modo de ejemplo se puede citar el caso del nitrato que, activando el regulador específico NirA, induce la transcripción de genes que codifican las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa, así como los transportadores de nitrato (Scazzocchio, 2007). Por el contrario, la represión del transportador, implica que el inductor se encuentra excluido de la célula, ya que no encuentra un medio para el ingreso a la misma, y por lo tanto los genes que codifican para las enzimas involucradas en la utilización del sustrato no son expresados.

1.5.2 Regulación a nivel de la transcripción durante la germinación

Durante la fase isotrópica de crecimiento, o germinación, se da un alto grado de expresión, no solo de los genes “house-keeping”, sino también de los genes que codifican para transportadores. Dos estudios fisiológicos han mostrado que las actividades de transporte de nitrato y amonio en *A. nidulans* son muy bajas en las conidias sin germinar, aumentan dramáticamente durante la germinación para alcanzar un máximo asociado a la emergencia del tubo germinativo y caen luego a niveles basales en el micelio (Cook y Anthony, 1978; Brownlee y Arst, 1983). Tiempo después, se describió el mismo tipo de regulación para el gen que codifica para el transportador de prolina, *prnB*. El transcripto de *prnB* es indetectable en las conidias de *A. nidulans*, pero con el curso de la germinación

su expresión aumenta de manera independiente de la inducción por prolina o del factor de transcripción que media esta inducción PrnA, (Tazebay *et al.*, 1995; Tazebay *et al.*, 1997). Al cabo de dos horas se detecta el pico máximo de expresión, y es totalmente independiente de la presencia del inductor o de PrnA. Fenómenos muy similares se describieron luego para los genes *uapA*, *uapC*, *azgA* y *agtA* (Amillis *et al.*, 2004; Cecchetto *et al.*, 2004, Harispe, 2008). En todos los casos esta se da de manera independiente de la presencia del inductor específico, del factor de transcripción específico de la vía y de las fuentes de carbono y nitrógeno presentes en el medio. Lo que es más, en presencia de amonio o de L-glutamina no se observa el fenómeno de represión catabólica por nitrógeno, indicando entonces que este nuevo mecanismo de activación transcripcional es independiente de AreA. Al momento no se han podido establecer los factores participantes de éste mecanismo. Estos operarían específicamente para los transportadores, no así para las enzimas metabólicas, durante las etapas tempranas de la germinación sugiriendo esto que *A. nidulans* podría utilizar sus transportadores *per se* ya sea para identificar el ambiente en el que crecen, como para el transporte de solutos (Diallinas, 2007).

1.5.3 Regulación a nivel del tráfico y endocitosis

Además de los mecanismos de control a nivel de la transcripción planteados en los apartados anteriores, se ha descubierto que la expresión de los transportadores también está sujeta a un control rápido y estricto a nivel del tráfico de las proteínas y su endocitosis, en relación a condiciones ambientales (Dupre *et al.*, 2004). Los estudios iniciales que llevaron a la formulación de dicho mecanismo de control fueron realizados en la levadura *S. cerevisiae* sobre su permeasa de aminoácidos Gap1p, y sobre su permeasa de uracilo Fur4p.

Los transportadores son producidos en los ribosomas y son dirigidos al retículo endoplasmático (RE). Si estos fueron correctamente plegados y en presencia de factores proteicos que actúan en *trans* (Fromme y Schekman, 2005), se almacenan en vesículas que son direccionadas al aparato de Golgi, y de ahí a vacuolas, peroxisomas o a la membrana plasmática.

Por otra parte, la inactivación de las permeasas de aminoácidos y otros

transportadores de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, implica la remoción de estos de la membrana plasmática mediante endocitosis y su degradación en la vacuola (Dupre *et al.*, 2004). Esto puede ser desencadenado por distintos estímulos que incluyen el cambio de un medio de cultivo conteniendo una fuente no preferencial de nitrógeno o de carbono, a una fuente preferencial (fenómeno conocida como inactivación catabólica) o el sometimiento de células a distintos factores de estrés (Harispe, 2008).

Evidencia de lo anterior fue demostrada para *A. nidulans*. Las permeasas de purinas UapA y UapC, la permeasa de prolina PrnB, la permeasa de aspartato y glutamato AgtA y la permeasa de urea UreA exhiben cambios muy importantes a nivel de su distribución subcelular en presencia de amonio. Son removidas de la membrana plasmática y concentradas en vacuolas citoplasmáticas donde son degradadas (Valdez-Taubas *et al.*, 2004; Pantazopoulou *et al.*, 2007; Harispe, 2008; Abreu *et al.*, 2010).

1.5.4 Regulación del gen *ureA*

En cuanto a la regulación del gen *ureA*, que codifica para la permeasa de urea de alta especificidad de *A. nidulans* estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Abreu *et al.*, 2010) indican que el gen es susceptible a la represión catabólica mediada por nitrógeno, y ésta está mediada por la proteína AreA. Sin embargo, la expresión de *ureA* no parece responder a una fuente de nitrógeno inductora específica ya que para distintos compuestos nitrogenados (urea, arginina, hipoxantina, acetamida, prolina) el nivel de transcrito fue similar. Por último, cuando se realiza el cultivo bajo una fuente no represora de nitrógeno, el nivel de transcripción de *ureA* aumenta notablemente durante las dos primeras horas de la germinación de esporas, para luego decaer. UreA se encuentra regulada también a nivel post-traducciona. Cuando una cepa que porta el gen *ureA* fusionado a la proteína verde fluorescente (*gfp*) *ureA-gfp*, es crecida en presencia de una fuente de nitrógeno no represora (ej. Prolina), la fusión se encuentra localizada en la membrana plasmática. A los 60 minutos del agregado de amonio, se observa que UreA-GFP desaparece de la membrana, y se internaliza en vacuolas citoplasmáticas. Esto sugiere que la represión por amonio conlleva a una endocitosis del transportador y posterior transporte

vesicular hacia el interior de la célula (Abreu *et al.*, 2010) .

2 - OBJETIVOS DEL TRABAJO

El primer objetivo del presente trabajo consistió en el análisis de expresión de los genes parálogos de *ureA*: ANID_02598.1, ANID_07373.1 y ANID_07557.1. Luego, se planteó realizar la eliminación de ANID_02598.1, para observar la presencia de cambios a nivel fenotípico, y así inferir las posibles funciones de éste.

3 - ESTRATEGIAS UTILIZADAS

3.1 Análisis de expresión

Con el objetivo de analizar la expresión de los genes ANID_02598.1, ANID_07373.1 y ANID_07557.1, se realizaron ensayos de RT-PCR (transcripción reversa - PCR), para los cuales se cultivó una cepa de tipo salvaje (*wt pabaA1*) bajo distintas condiciones: no represión por nitrógeno (utilizando prolina como fuente de nitrógeno), ausencia completa de nitrógeno y fase isotrópica de crecimiento (o germinación). En base a lo observado para *ureA* y otras permeasas de *A. nidulans*, estas condiciones serían las más favorables para detectar la expresión de genes vinculados al transporte de urea y/o de otros sustratos nitrogenados. Asimismo, se evaluó la expresión génica en condiciones de represión catabólica por nitrógeno (presencia de NH_4^+).

Mediante la técnica de RT-PCR es posible identificar los transcritos que están siendo expresados en cada condición y así comprobar o no la expresión de los genes parálogos. En ésta técnica, se parte de ARN, y mediante una enzima viral conocida como transcriptasa inversa se realiza la síntesis de la molécula de ADN complementaria, conocida como ADN copia (ADNc). Esto se realiza en dos etapas. Inicialmente, la retrotranscriptasa reconoce los extremos 3' poli-T del cebador (oligo dT), los cuales complementan con la cola poli-A del ARNm. A partir de estos la enzima sintetiza la hebra de ADN complementaria al ARNm. Luego, la hebra de ARNm es remplazada por otra hebra de ADN, generándose así el ADNc.

Finalmente, el ADNc es amplificado mediante una clásica reacción de PCR (Clark *et al.*, 2008). Otra de las grandes ventajas de ésta técnica se hace evidente cuando el objetivo es amplificar la secuencia codificante de un gen a partir de un genoma eucariota. Bien es sabido que en el genoma eucariota la secuencia codificante de cualquier gen se ve en general interrumpida por la presencia de intrones. Luego de la transcripción, éstos son escindidos del transcrito primario a través del “splicing”. Si partimos de ARNm, los intrones no estarán presentes en la molécula, y por lo tanto tampoco estarán presentes en el ADN obtenido luego de la RT-PCR.

3.2 Eliminación de ANID_02598.1

El segundo objetivo planteado consistió en la delección del gen ANID_02598.1. Para ello se realizó una construcción de un “cassette” génico utilizando la técnica de “Fusion-PCR” (Szewczyk *et al.*, 2007), que comprende las regiones 5’ y 3’ del gen ANID_02598.1 y entre éstas, el gen marcador *pabaA*. Una vez obtenido, se transformó sobre una cepa wt *pabaA1 Δnku::argB*. Este “cassette” permite dirigir la integración homóloga del mismo al locus ANID_02598.1. *A. nidulans* tiene una tasa de recombinación homóloga de aproximadamente 20%, y en muchos casos al transformar, se dan varias integraciones, en distintos lugares del genoma. De manera de aumentar la tasa de recombinación homóloga y evitar varias integraciones, se pueden generar cepas con el gen *nku* deletado (Δnku) (Nayak *et al.*, 2006). El gen *nku* es esencial para la recombinación no homóloga del ADN en el proceso de reparación de lesiones, y por lo tanto la delección de este gen incrementa la frecuencia de integración homóloga de fragmentos de ADN transformantes, llevando por tanto a un gran incremento de la integración dirigida a un locus en particular.

La presencia de cepas transformantes es evaluada de manera simple por su crecimiento en medio no suplementado con ácido p-aminobenzóico (*paba*) y posterior confirmación por PCR.

3.2.1 Fusion PCR (Szewczyk *et al.*, 2007)

Ésta técnica generada por Szewczyk *et al.* (2007) se empleó para obtener la construcción 5'UTR 2598.1::*pabaA*::3'UTR 2598.1 (“ Δ 2598”). Ésta técnica es sumamente valiosa ya que la misma puede ser utilizada para generar construcciones génicas para reemplazar genes, fusionar genes a epítopes fluorescentes, reemplazar promotores endógenos por promotores regulables, a través de la introducción de un marcador de selección. En suma, esta técnica puede utilizarse para construir moléculas de ADN recombinante combinando dos o tres fragmentos de ADN.

La misma se desarrolla en dos etapas (ver Figura 3). En el caso de este trabajo, en una primer ronda de PCR se amplifican por separado los extremos 5' y 3' UTR del gen 2598.1, y por otro lado el gen *pabaA* a partir del ADN de una cepa wt. En una segunda ronda de PCR empleando cebadores anidados se obtiene la construcción. El punto clave de la técnica está en los cebadores que se utilizan en la primer ronda de PCR para amplificar los extremos 5' y 3' UTR del gen ANID_02598.1: además de la secuencia específica para amplificar las regiones de interés, uno de los dos cebadores utilizados en cada reacción fue diseñado de manera que contenga una secuencia extra de aproximadamente 20 nucleótidos que complementa, en un caso con el extremo 5' del gen *pabaA* y en el otro caso con el extremo 3' del gen *pabaA*. De esta manera, estas secuencias adicionales actúan como cebadores durante la segunda ronda de PCR, permitiendo que los tres fragmentos se fusionen y que la construcción se amplifique.

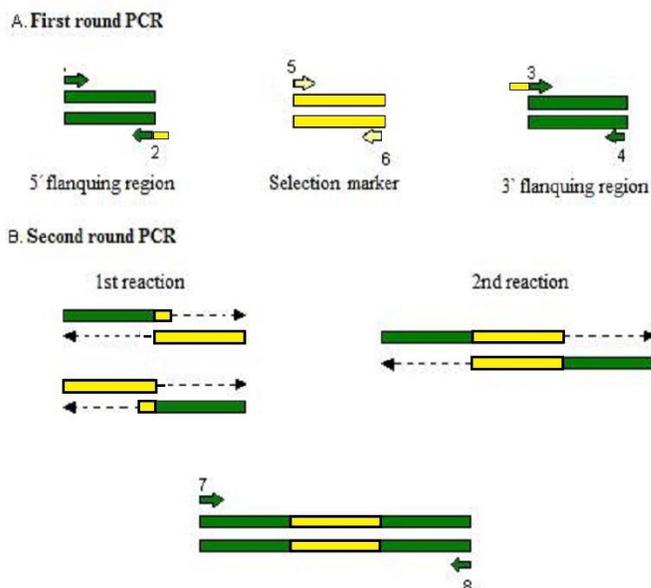


Figura 3 – Diagrama explicativo de la técnica “Fusion-PCR” (tomado de: Sanguinetti, 2008)

4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de expresión de los genes parálogos de *ureA*

Se realizó extracción de ARN total de una cepa *wt pabaA1* crecida bajo distintas condiciones en relación al metabolismo y la fuente de nitrógeno: fuente no represora del metabolismo de nitrógeno (con prolina como fuente de nitrógeno), fase isotrópica de crecimiento (con prolina como fuente de nitrógeno), ausencia total de nitrógeno y por último, condiciones de represión catabólica por presencia de amonio. En todos los casos, para verificar el estado de los ARN se realizó una corrida electroforética de 2 μ l de una alícuota diluída de ARN en gel de agarosa 1% (Figura 4), verificándose la integridad de los ARN. Además, para cuantificarlos se realizaron diluciones de ARN y se tomaron medidas de absorbancia a 260 nm (ver Tabla 1).

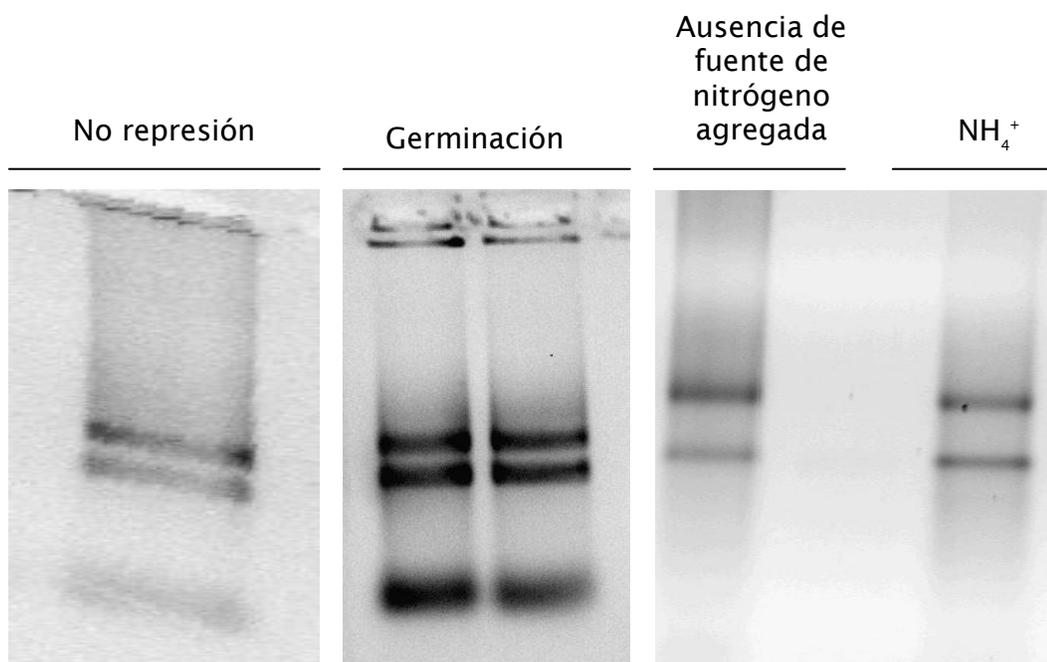


Figura 4 - Evaluación del estado de los ARN obtenidos. Los ARN extraídos de la cepa *wt pabaA1* bajo distintas condiciones de crecimiento se corrieron en gel de agarosa al 1% con BrEt. Se cargaron 2 μ l en cada caso.

Tabla 1 - Diluciones y concentración de ARN obtenido en distintas condiciones.

	No represión	Germinación	Ausencia de nitrógeno	NH ₄ ⁺
Dilución	1/500	1/250	1/250	1/250
[ng/μl]	624	704 - 632	1627	1342

Luego, para cada condición se realizó la RT-PCR (ver Materiales y Métodos para cada caso), utilizando pares de cebadores específicamente diseñados para amplificar cada gen en base a la secuencia de cada uno de éstos. Además se tomó en cuenta al momento de diseñarlos que la región amplificada contuviera por lo menos un intrón, de manera que se estableciera una diferencia (en pares de bases) entre el ADN amplificado a partir del ADNc y el ADNg. Los tamaños de los productos de PCR esperados se encuentran en la Tabla 2. Como control, se realizó la misma reacción sobre ADN genómico, extraído de la cepa wt *pabaA1*, lo cual además permitió verificar la funcionalidad de los cebadores. Los productos de RT-PCR y de PCR (controles) se corrieron en geles de agarosa al 2% (Figuras 5, 6 y 7).

Tabla 2 - Tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR esperados de la reacción de RT-PCR.

	Codificante	Genómico
<i>ureA</i>	432 pb	526 pb
ANID_02598.1	682 pb	1132 pb
ANID_07373.1	527 pb	625 pb
ANID_07557.1	501 pb	551 pb

Condiciones de no represión

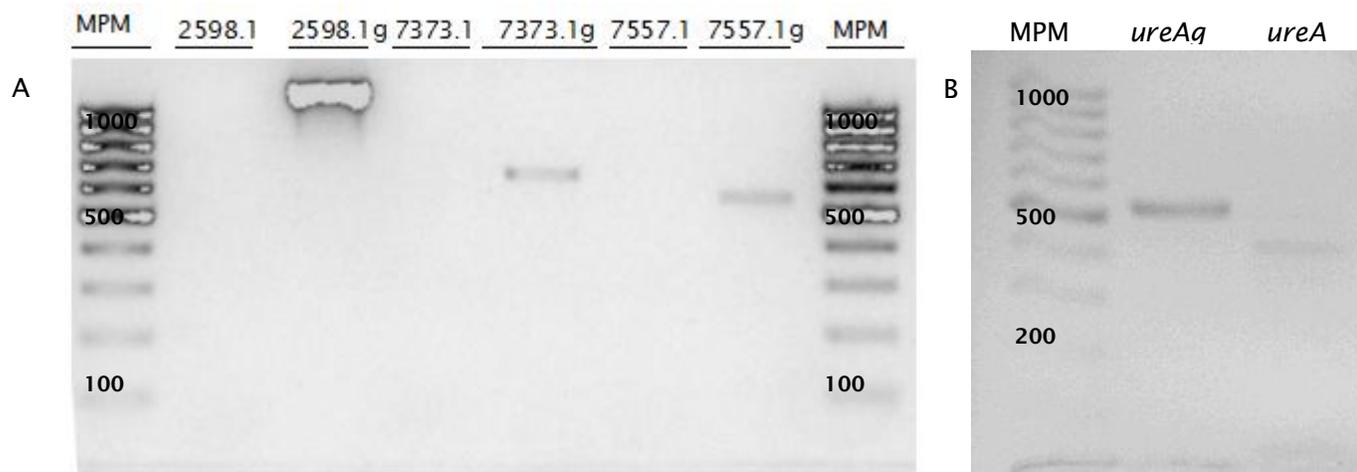


Figura 5 - Productos de RT-PCR a partir de condiciones de no represión y de PCR sobre ADN genómico. Gel de agarosa al 2% con BrEt. Se cargaron 30 μ l de los productos de RT-PCR y 5 μ l de los productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico. A) MPM- marcador de peso molecular de 100 bp. 2598.1- RT-PCR correspondiente a ANID_02598.1. 2598.1g - PCR correspondiente a ANID_02598.1 obtenido a partir de ADN genómico. 7373.1 - RT-PCR correspondiente a ANID_07373.1. 7373.1g - PCR correspondiente a ANID_07373.1 obtenido a partir de ADN genómico. 7557.1 - RT-PCR correspondiente a ANID_07557.1. 7557.1g - PCR correspondiente a ANID_07557.1 obtenido a partir de ADN genómico. MPM - marcador de peso molecular de 100 bp. B) MPM - marcador de peso molecular de 100 bp. *ureAg* - PCR correspondiente a *ureA* obtenida a partir de ADN genómico. *ureA* - RT-PCR correspondiente a *ureA*.

Condiciones de germinación

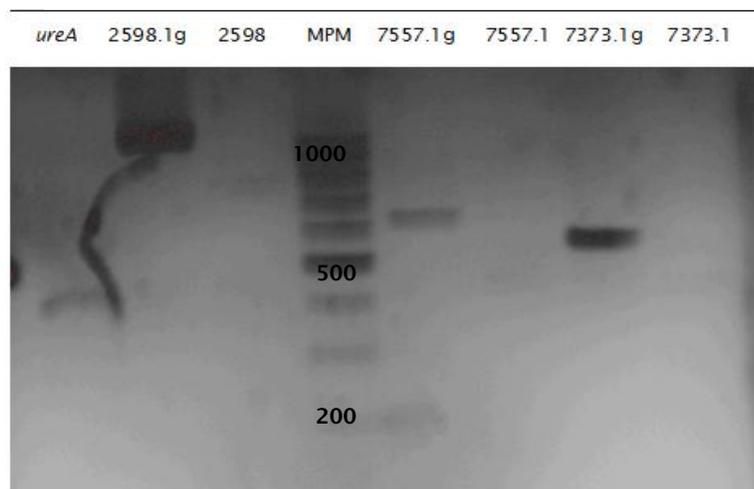


Figura 6 - Productos de RT-PCR a partir de condiciones de germinación y de PCR sobre ADN genómico. Gel de agarosa al 2% con BrEt. Se cargaron 15 μ l de los productos de RT-PCR y 5 μ l de los productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico. *ureA* - RT-PCR correspondiente a *ureA*. 2598.1g - PCR correspondiente a ANID_02598.1 obtenido a partir de ADN genómico. 2598 - RT-PCR correspondiente a ANID_02598.1. MPM - marcador de peso molecular

de 100 bp. 7557.1g - PCR correspondiente a ANID_07557.1 obtenido a partir de ADN genómico. 7557.1 - RT-PCR correspondiente a ANID_07557.1. 7373.1g - PCR correspondiente a ANID_07373.1 obtenido a partir de ADN genómico. 7373.1 - RT-PCR correspondiente a ANID_07373.1.

Condiciones de ausencia de nitrógeno y represión catabólica por nitrógeno

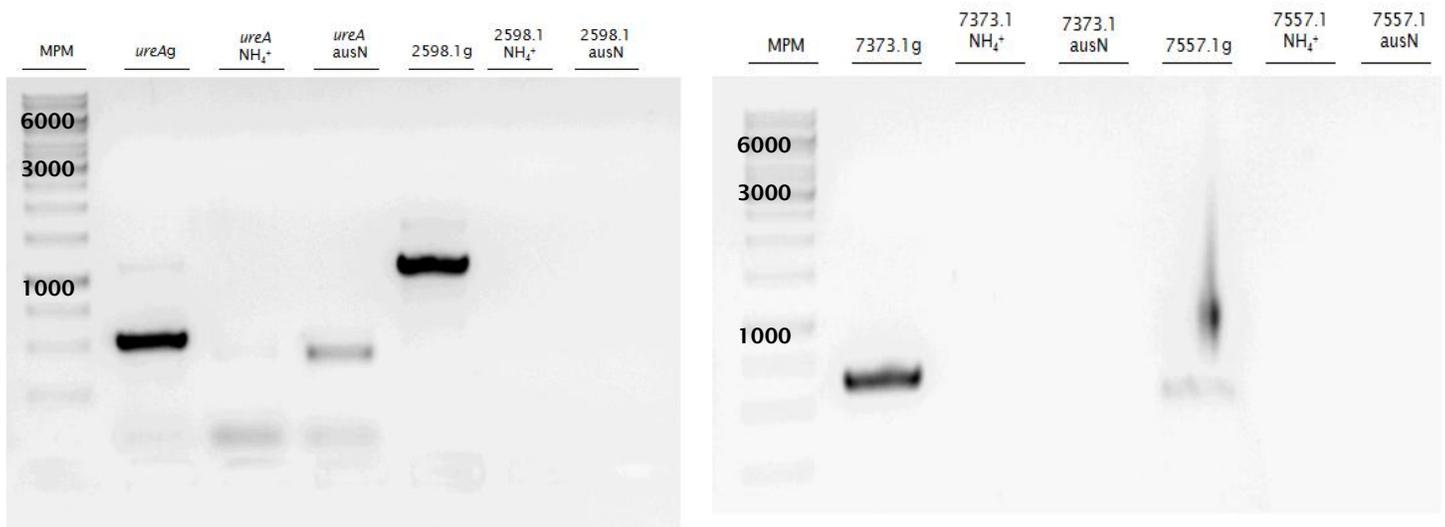


Figura 7 - Productos de RT-PCR a partir de condiciones de ausencia de nitrógeno y de represión catabólica por nitrógeno y productos de PCR sobre ADN genómico. Gel de agarosa al 2% con BrEt. Se cargaron 5 μ l de producto en todos los casos. MPM - marcador de peso molecular de 100 bp. *ureA*g - PCR correspondiente a *ureA* obtenido a partir de ADN genómico. *ureA* NH₄⁺ - RT-PCR correspondiente a *ureA* obtenido en condiciones de crecimiento en NH₄⁺. *ureA* ausN - RT-PCR correspondiente a *ureA* obtenido en condiciones de ausencia de nitrógeno. 2598.1g - PCR correspondiente a ANID_02598.1 obtenido a partir de ADN genómico. 2598.1 NH₄⁺ - RT-PCR correspondiente a ANID_02598.1 obtenido en condiciones de crecimiento en NH₄⁺. 2598.1 ausN - RT-PCR correspondiente a ANID_02598.1 obtenido en condiciones de ausencia de nitrógeno. MPM - marcador de peso molecular de 100 bp. 7373.1g - PCR correspondiente a ANID_07373.1 obtenido a partir de ADN genómico. 7373.1 NH₄⁺ - RT-PCR correspondiente a ANID_07373.1 obtenido en condiciones de crecimiento en NH₄⁺. 7373.1 ausN - RT-PCR correspondiente a ANID_07373.1 obtenido en condiciones de ausencia de nitrógeno. 7557.1g - PCR correspondiente a ANID_07557.1 obtenido a partir de ADN genómico. 7557.1 NH₄⁺ - RT-PCR correspondiente a ANID_07557.1 en condiciones de crecimiento en NH₄⁺. 7557.1 ausN - RT-PCR correspondiente a ANID_07557.1 obtenido en condiciones de ausencia de nitrógeno.

Como puede observarse en las figuras anteriores, no se obtuvieron productos de RT-PCR para ninguno de los tres parálogos (ANID_02598.1, ANID_07373.1 y ANID_07557.1) en ninguna de las condiciones estudiadas. Se modificaron distintas variables (cantidad de cDNA molde, temperatura de "annealing", tiempo de extensión, enzima utilizada) buscando la obtención de productos, pero los resultados no fueron exitosos. Aunque si se obtuvieron en todos los casos productos de PCR utilizando ADN genómico como molde lo cual indica que los cebadores funcionan en forma correcta. Además, en todos los casos se observa

que los productos de RT-PCR de *ureA* si presentan banda en el gel de agarosa (ver Figuras 5, 6 y 7). Esto indica claramente que la reacción de RT-PCR también se desarrollo de manera correcta.

Como última alternativa se propuso realizar una PCR anidada sobre los productos de RT-PCR. Se seleccionaron dos de las cuatro condiciones iniciales del estudio para continuar este trabajo: ausencia de nitrógeno y crecimiento en presencia de amonio (represión catabólica por nitrógeno). Se diseñaron cebadores específicos para amplificar regiones contenidas dentro de los productos iniciales de PCR y con éstos se realizó la PCR anidada. Los productos de “nested-PCR” se muestran en la Figura 8. Los tamaños de los productos de nested-PCR predichos por la base de datos se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3 - Tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR esperados de la reacción de RT-PCR.

	Codificante	Genómico
ANID_02598.1	381 pb	676 pb
ANID_07373.1	355 pb	355 pb
ANID_07557.1	348 pb	399 pb

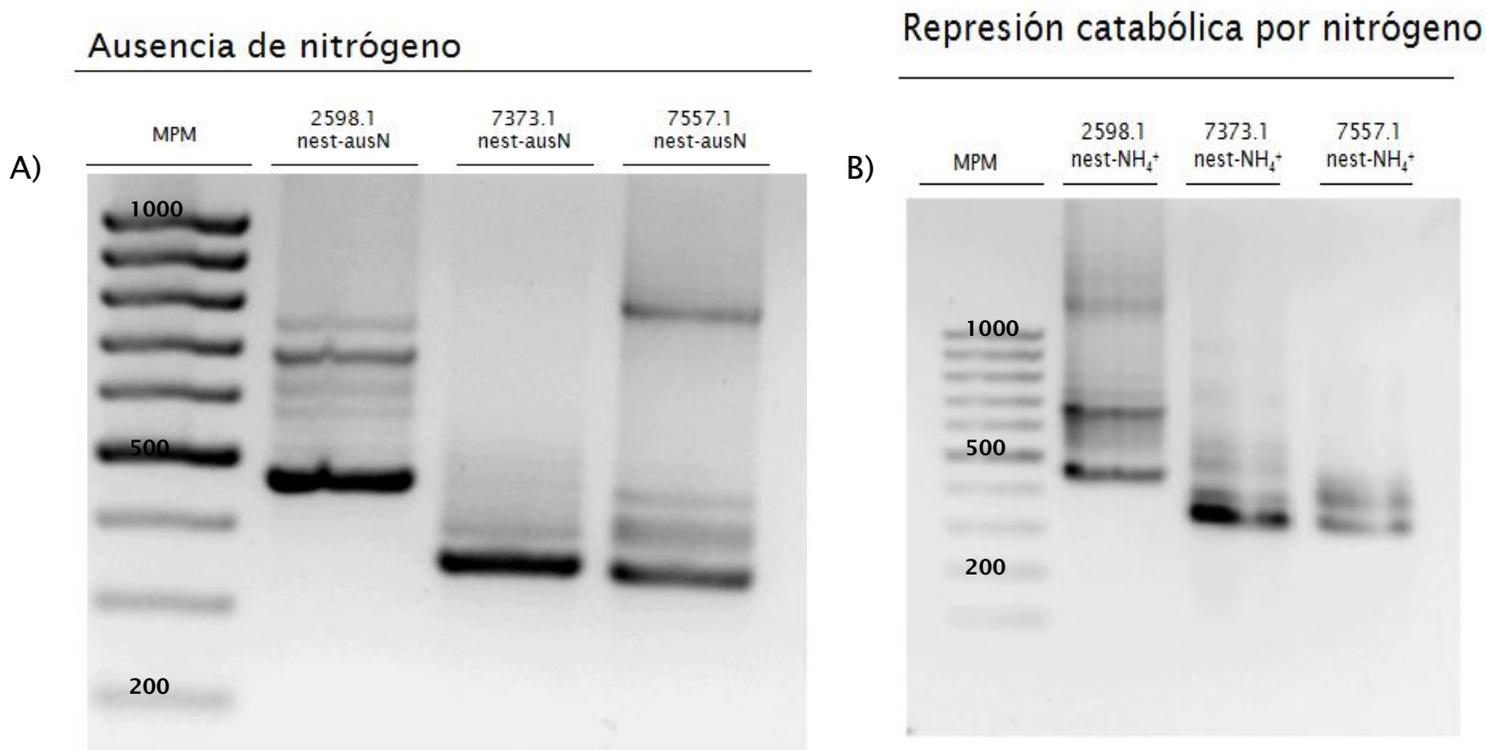


Figura 8 - Productos de “nested-PCR” para las condiciones de ausencia de fuente de nitrógeno y condiciones de represión catabólica por nitrógeno (presencia de NH₄⁺). Gel de agarosa 2% con BrEt. Se cargaron 5 µl. A) Condiciones de ausencia de nitrógeno: MPM - marcador de peso molecular de 100 bp. 2598.1 nest-ausN - “nested-PCR” correspondiente a ANID_02598.1. 7373.1 nest-ausN - “nested-PCR” correspondiente a ANID_07373.1. 7557.1 nest-ausN - “nested-PCR” correspondiente a ANID_07557.1. B) Condiciones de represión catabólica por nitrógeno: MPM - marcador de peso molecular de 100 bp. 2598.1 nest-NH₄⁺ - “nested-PCR” correspondiente a ANID_02598.1. 7373.1 nest-NH₄⁺ - “nested-PCR” correspondiente a ANID_07373.1. 7557.1 nest-NH₄⁺ - “nested-PCR” correspondiente a ANID_07557.1.

En el caso de los 3 genes parálogos se obtuvieron productos de PCR tanto para las condiciones de ausencia de fuente de nitrógeno, como para la condición de represión catabólica por nitrógeno, como puede observarse en la Figura 8. Si bien se observan bandas de diversos tamaños, en todos los casos es claro que los productos mayoritarios se corresponden aproximadamente con los tamaños esperados para cada uno de los tres parálogos. Los productos obtenidos de la “nested-PCR” en condiciones de ausencia de nitrógeno fueron purificados (Figura 9), y su identidad se comprobó por secuenciación (Figura 10).

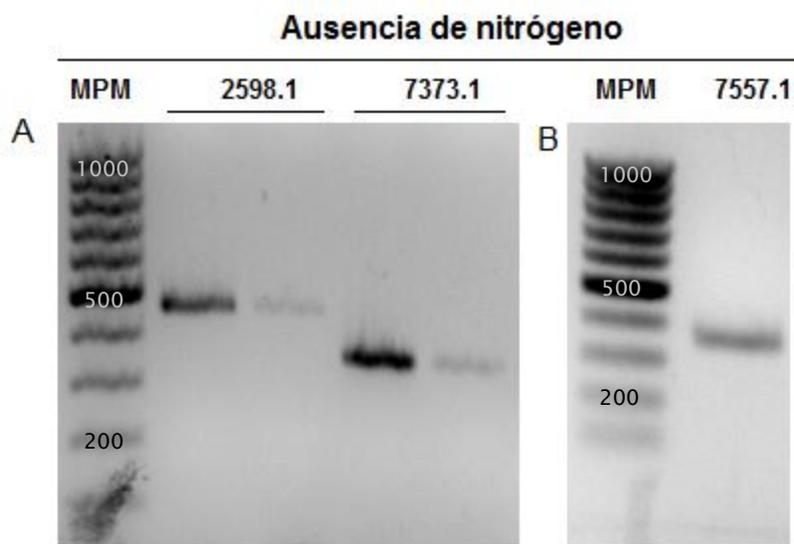


Figura 9. Productos purificados de “nested-PCR” de los tres genes parálogos en condiciones de ausencia de fuente de nitrógeno. Gel de agarosa 2% con BrEt. Se cargaron 3 μ l. A) MPM - marcador de peso molecular de 100 bp. 2598.1 - “nested-PCR” correspondientes a ANID_02598.1. 7373.1 - “nested-PCR” correspondientes a ANID_07373.1. B) MPM - marcador de peso molecular de 100 bp. 7557.1 - “nested-PCR” correspondiente a ANID_07557.1.

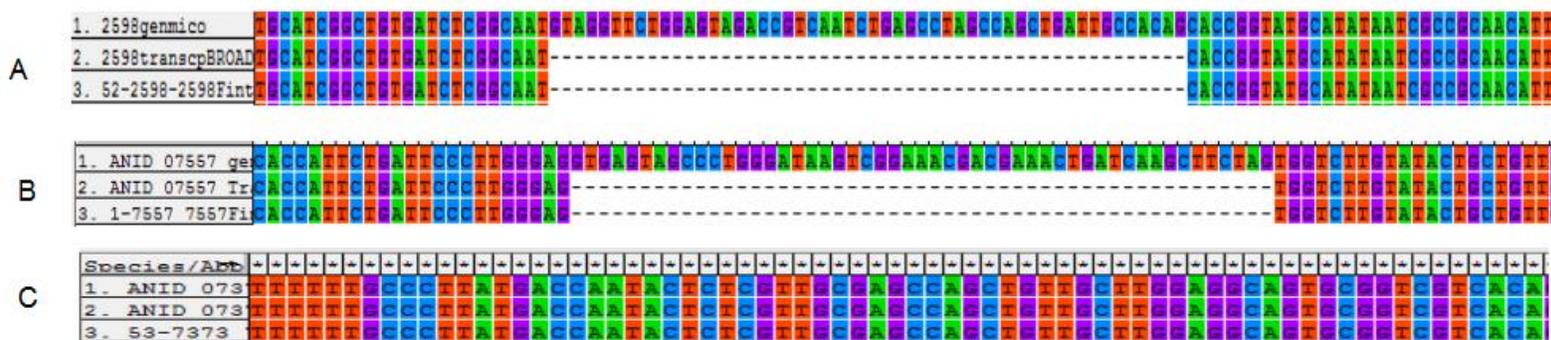


Figura 10. Alineamientos. Alineamiento de ANID_02598.1 (A), ANID_07557.1 (B) y ANID_07373.1 (C) con las secuencia genómica y codificante predichas para estos genes (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html). Se utilizó el programa MEGA 5.0.

Utilizando el programa MEGA 5 se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas con las secuencias genómicas y codificantes predichas en la base de datos. Como bien nos informa este alineamiento, la identidad de los productos de

“nested-PCR” corresponde efectivamente a cada uno de los parálogos. Nótese la ausencia de intrones en las secuencias de los productos de RT-PCR tanto para el caso de ANID_02598.1 y ANID_07557.1, confirmándose así que los mismos fueron amplificados a partir de ADNc y por tanto que ambos genes se expresan en las condiciones ensayadas. Para el caso particular de ANID_07373.1 no es posible verificar ausencia de intrones, ya que los mismos no están incluidos en la región secuenciada. Aún así podemos suponer que la secuencia obtenida de ANID_07373.1 corresponde a la secuencia codificante, ya que ésta se obtuvo en las mismas condiciones que las otras dos, utilizando como molde el mismo ADNc que se usó para los otros dos genes.

Con respecto a los productos obtenidos para las condiciones de represión catabólica por nitrógeno, estos aún deben ser purificados y secuenciados para comprobar sus identidades. De cualquier manera, en base a sus tamaños podemos estimar que provienen también de los transcritos de los tres genes parálogos.

4.2 Delección del gen ANID_02598.1

4.2.1 Construcción del “cassette” 5’ANID_02598.1::pabaA::3’ANID_02598.1

Para la realización de la construcción se empleó la técnica “Fusion-PCR” (Szewczyk *et al.*, 2007), generando así un “cassette” génico comprendido de tres fragmentos: la región 5’ UTR del gen ANID_02598.1, el gen *pabaA* que actuará como marcador de selección y la región 3’UTR del gen ANID_02598.1 (de aquí en más denominado “ Δ 2598”), como se explica en la sección Materiales y Métodos. Los fragmentos amplificados fueron purificados y cuantificados. El resultado se muestra en la Figura 11.

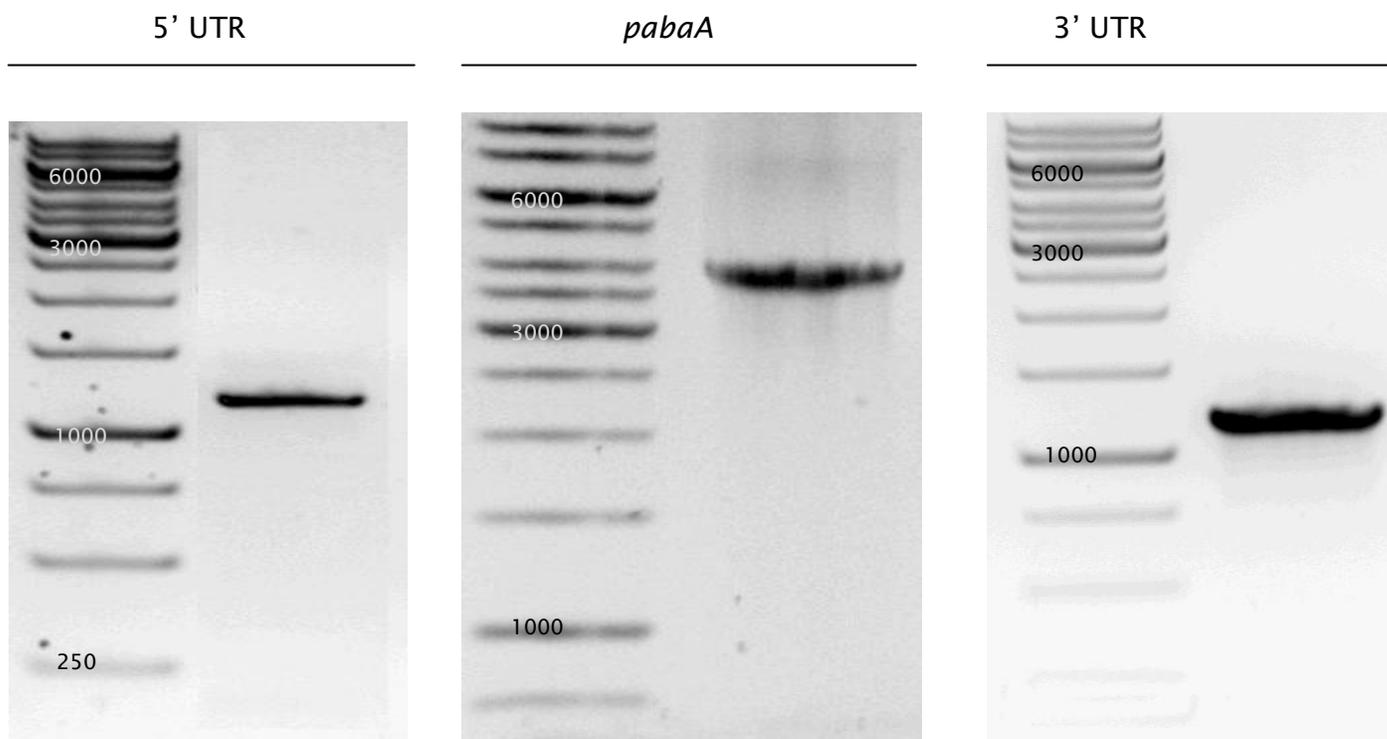


Figura 11 - Purificación y cuantificación de los fragmentos de PCR correspondientes a 5'UTR ANID_02598.1, el gen *pabaA* y 3'UTR ANID_02598.1 respectivamente. Gel de agarosa 1%. A) 1 - marcador de peso molecular de 1 kb. 2 - PCR correspondiente a 5'UTR ANID_02598.1 (2 μ L). B) 1 - marcador de peso molecular de 1 kb. 2 - PCR correspondiente a *pabaA* (3 μ L) C). 1- marcador de peso molecular de 1 kb. 2- PCR correspondiente a 3'UTR ANID_02598.1 (3 μ L).

En la Tabla 4 se presentan los tamaños esperados para cada fragmento, los tamaños de los productos purificados y la concentración de ADN expresada en ng/ μ l.

Tabla 4 - Tamaños esperados y obtenidos de cada uno de los fragmentos y cuantificación de los mismos.

	5'UTR ANID_02598.1	<i>pabaA</i>	3'UTR ANID_02598.1
Tamaño esperado (pb)	1193	4009	1191
Tamaño estimado del producto (pb)	1200	3800	1200
Concentración (ng/ μ l)	25	40	100

Como se observa en la Tabla 4, los tamaños de los fragmentos coinciden aproximadamente con los tamaños esperados. Una vez purificados y cuantificados, se procedió a realizar la segunda ronda de PCR y se realizó una corrida electroforética de una alícuota de la reacción en una gel de agarosa 1% (Figura 12). El tamaño esperado de la construcción es de 6200 pb (en base a la suma de los tamaños obtenidos para cada fragmento), que coincide con la banda que se observa en el gel como producto mayoritario, inmediatamente por encima de 6000 pb. Los productos de la fusión fueron purificados directamente, sin previa separación por electroforesis en gel de agarosa, ya que luego de repetidos intentos, la cantidad de ADN que se perdía en la purificación separando previamente la banda del gel era excesiva, obteniendo finalmente cantidades insuficientes de ADN con respecto a las necesarias para la transformación (mínimo de 300 ng en 15 μ l de volumen). De cualquier manera, a efectos de la transformación, ésta no se vería afectada, ya que al menos algunos de los transformantes integrarán la fusión completa en forma correcta, y no serán auxótrofos para paba. Por otra parte, la integración al locus puede ser fácilmente detectada por PCR.

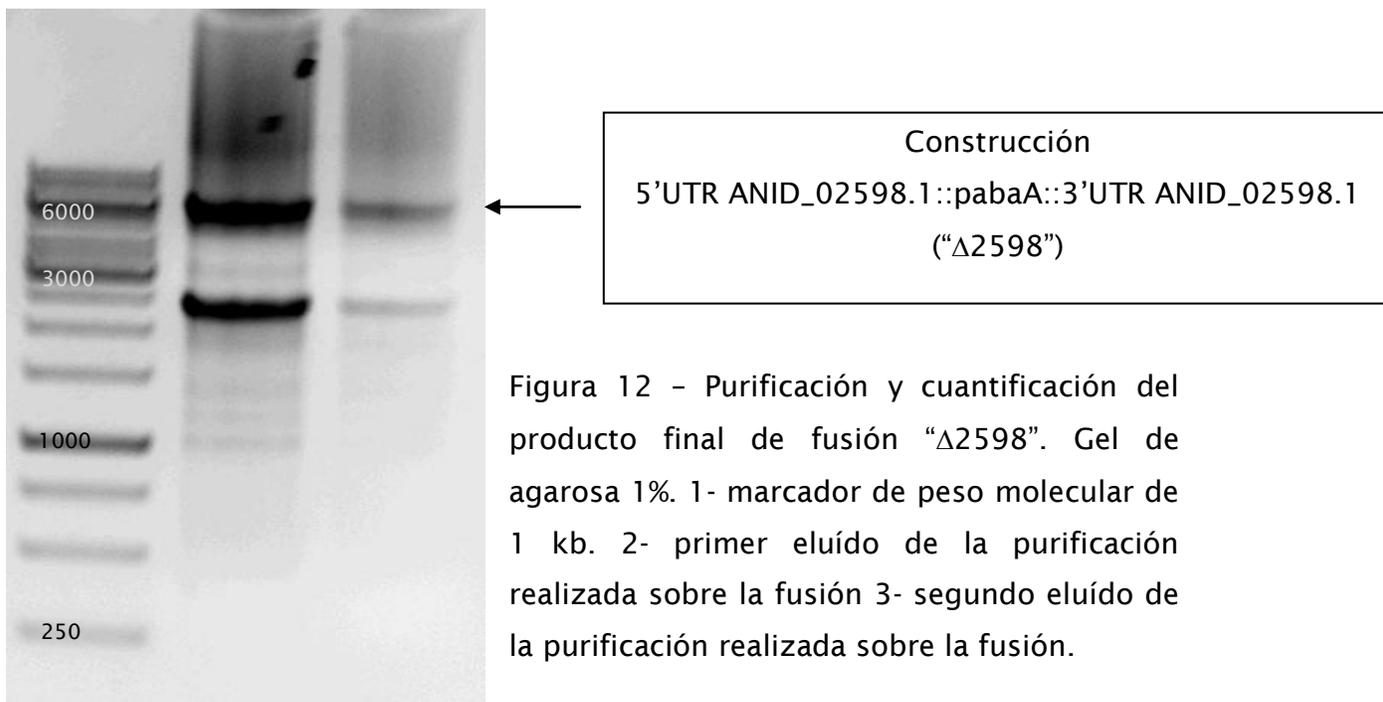


Figura 12 - Purificación y cuantificación del producto final de fusión " Δ 2598". Gel de agarosa 1%. 1- marcador de peso molecular de 1 kb. 2- primer eluido de la purificación realizada sobre la fusión 3- segundo eluido de la purificación realizada sobre la fusión.

4.2.2 Transformación de la construcción “ $\Delta 2598$ ” en la cepa MVD26

Una vez obtenida la construcción “ $\Delta 2598$ ”, se procedió a transformar con ésta la cepa MVD 26 (*yA2 riboB2 pyroA4 pabaA1 $\Delta nku::argB$*) para generar una cepa transformante con este gen deletado ($\Delta ANID_02598.1::pabaA$). La cepa MVD 26 fue obtenida en el curso de este trabajo mediante cruzamiento de las cepas MVD 13A y P002 (ver Materiales y Métodos). El criterio de selección para detectar las cepas MVD 26 que incorporaron la construcción “ $\Delta 2598$ ”, fue el crecimiento en medio carente de paba. Siendo la cepa receptora *pabaA1*, auxótrofa para este suplemento, solo aquellas cepas que hayan integrado la construcción “ $\Delta 2598$ ” en su genoma se recuperarán en ausencia de paba (Figura 13).

Una vez seleccionados los transformantes, éstos se purificaron, y se corroboró su fenotipo mediante la realización de una “placa madre” (ésta contiene la cepa receptora MVD 26, la cepa MVD 14A como control, que contiene el gen *ureA* deletado como control y distintos transformantes elegidos al azar luego de que estos fueron purificados) y réplicas sobre medio mínimo sólido suplementado para chequear las distintas auxotrofías (ácido p-aminobenzóico, riboflavina, piridoxina) de los transformantes (Figura 13).

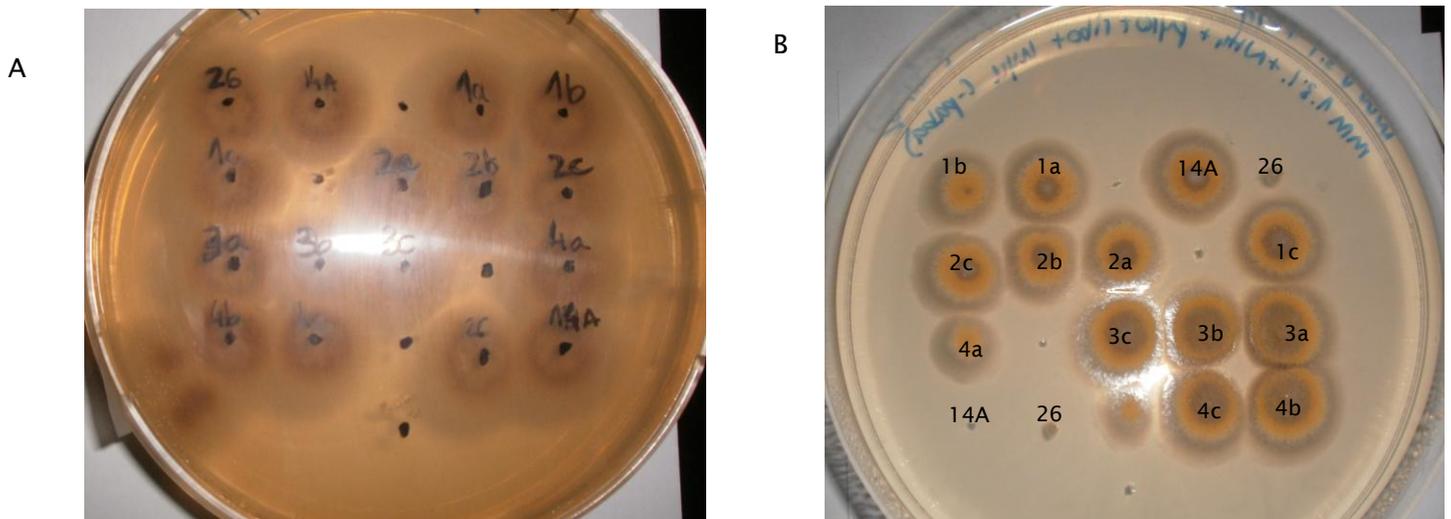


Figura 13 - Placa madre (A) y placa de selección (réplica) de transformantes que incorporaron la construcción “ $\Delta 2598$ ” (B). A) Crecimiento en medio mínimo sólido suplementado con NH_4^+ como fuente de nitrógeno y todos los suplementos necesarios (piridoxina, riboflavina, paba y uridina y uracilo B) Crecimiento en medio sólido con NH_4^+ como fuente de nitrógeno y todos los suplementos necesarios (piridoxina, riboflavina y uridina y uracilo), pero en ausencia de paba, como medio de selección para aquellos transformantes que hayan incorporado la construcción “ $\Delta 2598$ ” en su genoma.

Finalmente, si bien se espera que al portar la cepa MVD 26 la delección del gen *nku*, la inserción de la construcción “ Δ 2598” se de mayoritariamente en el locus del gen ANID_02598.1, esto debe ser corroborado por PCR, ya que podría ocurrir el caso de que la construcción se insertara en otro lugar del genoma. Para ello se realizó extracción de ADN de dos de los transformantes y posterior PCR, utilizando los mismos cebadores empleados en la segunda ronda de PCR de la técnica “Fusion-PCR”. Dado que los productos de PCR a partir de una cepa salvaje y de una cepa deletada tendrán tamaños diferentes (4,7 Kb vs 6,2 Kb respectivamente), es posible así discriminar entre éstas.

Luego de repetidos intentos, no se obtuvo el producto de PCR del tamaño esperado. Por el contrario, se obtuvo un producto de aproximadamente 2000 pb menos que el control wt. Por tal motivo se realizó una segunda PCR utilizando otro juego de cebadores: como cebador “sense”, se utilizó el “2598 5N”, y para el “antisense” se utilizó el “pabaRv”. Esta PCR nos permite determinar si efectivamente el gen *pabaA* se integró al locus de ANID_02598.1, ya que la reacción solo debería amplificar si el fragmento 5'UTR ANID_02598.1 estuviera fusionado a *pabaA*. Nuevamente el producto obtenido fue de menor tamaño que el esperado. Si consideramos que los transformantes son capaces de crecer en medio carente de paba, podemos suponer que una de las posibilidades es que en realidad el marcador *pabaA* se haya integrado completamente en otra parte del genoma (por ejemplo en locus *pabaA*), y en el locus de ANID_02598.1 se haya integrado parcialmente algún fragmento de la construcción “ Δ 2598”.

4.2.3 Rol de ANID_02598.1 en el transporte de urea

Por último, se ensayó el crecimiento de los transformantes en medio mínimo sólido sobre distintas concentraciones de urea como fuente de nitrógeno (5 mM, 2.5 mM, 1.25 mM y 0.625 mM) y en presencia de distintas concentraciones de su análogo tóxico 2-tiourea (5 mM, 2.5 mM, 1.25 mM y 0.625 mM), con nitrato como fuente de nitrógeno. Antes de continuar, vale aclarar que este ensayo se realizó en paralelo a la PCR para verificar que la construcción “ Δ 2598” se haya integrado en el locus del gen ANID_02598.1 por razones de tiempo, y por lo tanto los resultados aquí obtenidos, son de carácter especulativo, ya que una vez realizada

la PCR de verificación, se hizo claro que en realidad la construcción “ $\Delta 2598$ ” no se insertó, al menos completamente, en el locus del gen ANID_02598.1. De cualquier manera se procederá al análisis de los resultados obtenidos de los ensayos de crecimiento en placa.

Dado que ANID_02598.1 se encuentra anotado en la base de datos como un simportador Na^+ /prolina también se ensayó el crecimiento sobre prolina 5mM como fuente de nitrógeno. Era de esperarse que si el gen ANID_02598.1 estuviera vinculado de alguna forma al transporte de urea, se observarían diferencias a nivel fenotípico en aquellas cepas que posean el gen deletado. Lo mismo puede aplicarse al transporte de prolina, en el caso de que el gen estuviera vinculado al transporte de ésta. En la figura 14 se encuentran los resultados de los ensayos de crecimiento en placa.

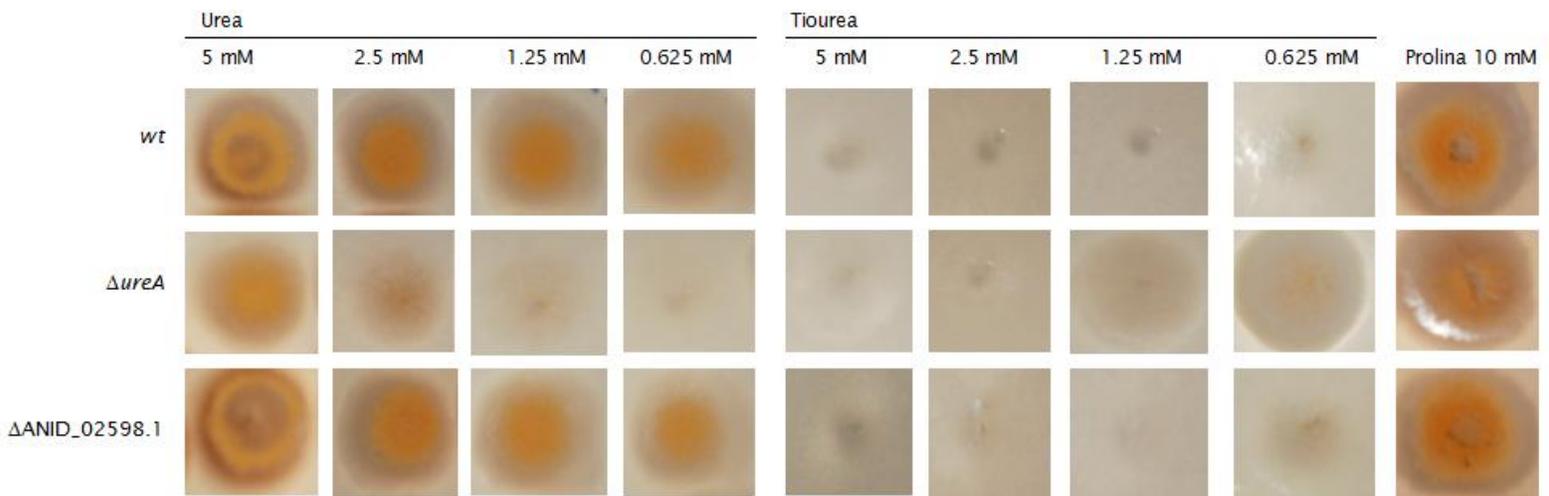


Figura 14 – Ensayo de crecimiento en placa de los transformantes obtenidos sobre urea, tiourea y prolina. Las cepas fueron crecidas por 48 hrs a 37°C en medio mínimo con distintas concentraciones de urea y tiourea (con nitrato como fuente de nitrógeno) y en prolina. La cepa $\Delta ureA$ muestra una menor sensibilidad a la tiourea, la misma es transportada a través de UreA.

Como se puede apreciar en la Figura 14, a nivel fenotípico no es posible observar diferencias evidentes entre las cepas de tipo salvaje, y las cepas que portan la delección del gen, en lo que respecta al crecimiento sobre las concentraciones de

urea y prolina utilizadas en el ensayo. Asimismo, no se observan diferencias respecto al tipo salvaje en lo que respecta a la susceptibilidad a la tiourea en las concentraciones ensayadas. Se incluye como control de estos ensayos una cepa $\Delta ureA$. Estas observaciones implicarían que el gen ANID_02598.1 no estaría implicado en el sistema primario de transporte de urea, ni de prolina.

5 - CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con respecto al análisis de expresión, se pudo comprobar que los tres genes estudiados, ANID_02598.1, ANID_07373.1 y ANID_07557.1 se expresan, al menos en condiciones de ausencia de fuente de nitrógeno así como en presencia de amonio.

De cualquier forma, es de presumir que el nivel de expresión de estos genes sea bajo, ya que la PCR anidada se realizó como una segunda ronda de PCR, sobre el amplicón de la RT-PCR. Es interesante lo que ocurre con la expresión en condiciones de represión catabólica por nitrógeno, ya que en general bajo estas condiciones opera la represión catabólica por nitrógeno sobre los genes que codifican enzimas y transportadores vinculados al metabolismo de sustancias nitrogenadas. Las posibles hipótesis que se plantean para fundamentar dicha expresión pueden ser varias. Entre ellas, se plantea que en realidad estos genes puedan ser por ejemplo, canales, transportadores secundarios o de baja afinidad que mantengan niveles de expresión constantes o que estén sujetos a regulación post-traducciona. Este tipo de regulación se ha descrito previamente para algunos transportadores secundarios o de baja afinidad (ElBerry *et al.*, 1993). Otra posibilidad sería que los parálogos en estudio no estuviesen involucrados en el transporte de fuentes de nitrógeno, sino de sustratos no identificados aún.

Restan realizarse las PCRs anidadas para las condiciones de germinación y de no represión, para así completar el análisis de la expresión en éstas condiciones, y determinar si se observan diferencias en cuanto a la expresión de los parálogos para las distintas condiciones. Asimismo, se podrían realizar ensayos de “Real Time-PCR”, que permite la cuantificación del nivel de expresión de cada gen.

En lo que respecta al objetivo de realizar la delección del gen ANID_02598.1, para lograr identificar posibles roles del gen, los resultados no son concluyentes. Si bien se logró obtener la construcción “ Δ 2598”, utilizada luego para deletar el gen en la técnica de transformación, no se pudo afirmar que se haya tenido éxito en la obtención de cepas portadoras de la delección. Como se mencionó en los resultados los transformantes seleccionados lograron crecer en medio carente de paba, lo cual indica que integraron el gen *pabaA* en alguna región de su genoma. Pero, la PCR para verificar que la construcción se haya insertado en el locus del

gen ANID_02598.1, no es concluyente. Como ya se mencionó antes, el producto obtenido tiene un tamaño inferior al esperado (incluso menor que el del control). Esto podría indicar que en realidad el gen *pabaA* sí se insertó en el genoma, pero no en el locus ANID_02598.1. La delección de *nku* no impediría la doble recombinación de la construcción a nivel del locus *pabaA* endógeno. De cualquier manera, la conclusión anterior es meramente especulativa. Para comprobar qué fue lo que realmente se insertó, se podría realizar un ensayo de Southern Blot, empleando dos sondas: una que hibride con el gen *pabaA* y otra que hibride con la región 5' o 3' no codificante de ANID_02598.1. De esta forma podríamos comprobar qué fue lo que realmente se integró. También se podría tomar otro transformante y realizar nuevamente las PCRs para verificar la integración en el locus ANID_02598.1, y así ver si se obtienen nuevos resultados. Por todo lo antes mencionado no es posible atribuir un rol al gen ANID_0298.1 en el transporte de urea ni de prolina.

Una vez obtenido el mutante Δ ANID_02598.1, se podrá realizar la construcción de un doble mutante Δ ANID_02598.1 Δ ureA que permitirá corroborar un posible rol de ANID_02598.1 en el transporte secundario de urea, ya que de ser así, el crecimiento residual que se observa cuando los mutantes Δ ureA son crecidos en urea, debería ser eliminado, o al menos disminuido, si ANID_02598.1 está involucrado en el transporte de urea.

Por otro lado, con el propósito de determinar el posible sustrato de ANID_02598.1, se podrían realizar ensayos de crecimiento en placa sobre otras fuentes de nitrógeno, como por ejemplo poliaminas. Cabe destacar que éstas son sustrato del transportador de urea de *S. cerevisiae*, ScDur3, (Uemura *et al.*, 2007), para las cuales el mismo incluso posee mayor afinidad que por la urea. Por ello se especula con la posibilidad que los parálogos en cuestión puedan ser en realidad, transportadores de poliaminas.

Asimismo, la delección de los genes ANID_07373.1 y ANID_07557.1 y los posteriores ensayos de crecimiento en placa con distintos compuestos nitrogenados como fuente de nitrógeno permitirán conocer más sobre las posibles funciones de estos parálogos de UreA. Continuando con la línea anterior, si generamos dobles mutantes Δ ureA Δ ANID_07373.1 y Δ ureA Δ ANID_07557.1,

también podremos determinar si éstos están vinculados a sistemas de transporte secundarios de urea.

6- MATERIALES Y METODOS

6.1 - Cepas empleadas

6.1.1 Genotipos de las cepas empleadas

- MVD 001 wt *pabaA1*
- MVD 10A *ureA::gfp::pyrGAf riboB2 pyrG89 pyroA4 $\Delta nku::argB$*
- MVD 26 *$\gamma A2$ riboB2 pyroA4 pabaA1 $\Delta nku::argB$*
- MVD 13A *riboB2 pyrG89 pyroA4 $\Delta ureA::riboB$ $\Delta nku::argB$*
- MVD 14A *$\gamma A2$ $\Delta ureA::riboB$ riboB2 pyroA4 pyrG89 $\Delta nku::argB$*
- MVD P002 *$\gamma A2$ pabaA1*

6.1.2 Descripción de los genotipos y fenotipos

- *pabaA1* es un alelo que provoca la auxotrofia para el ácido p-aminobenzóico.
- *$\gamma A2$* es una mutación de pérdida de función del gen que codifica la lacasa conidial que ocasiona la producción de conidias verdes.
- *riboB2* es un alelo del gen *riboB* que provoca la auxotrofia para la riboflavina (vitamina B2).
- *pyroA4* es el alelo responsable de la auxotrofia para la piridoxina.
- *$\Delta nku::argB$* es el gen *nku* interrumpido por el alelo *argB* (alelo que codifica la ornitina carbamil transferasa la cual cataliza la conversión de ornitina en citrulina, un precursor de arginina). *nku* es esencial para la recombinación no homóloga del ADN en la reparación de roturas de doble cadena. Por lo tanto la delección de este gen reduce considerablemente la frecuencia de integración no homóloga de fragmentos de ADN transformantes llevando a un significativo mejoramiento de la integración dirigida a un locus particular.
- *pyrG89* es un alelo que provoca la auxotrofia para la uridina y el uracilo.
- *$\Delta ureA::riboB$* es el gen *ureA* interrumpido por el alelo *riboB* (alelo que codifica para una enzima implicada en la síntesis de riboflavina).

6.2 - Medios de cultivo

Los medios se preparan y se utilizan según lo recomendado por Pontecorvo y col. (1953). Pueden ser utilizados para cultivos líquidos o sólidos agregando 1.3% o 3% de agar cuando las placas sean utilizadas para coleccionar esporas.

Medio mínimo (MM): 20 ml de solución de sales
 10 g de glucosa (dextrosa)

- Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza mediante calor húmedo (15-20 minutos a 105 °C).
- Observación: Este medio debe complementarse con una fuente de nitrógeno y con los suplementos nutricionales requeridos según las auxotrofías de las cepas cultivadas.

Medio Completo (MC): 20 ml de solución de sales
 10 ml de solución de vitaminas
 10 ml de solución de casaminoácidos
 10 g de glucosa (dextrosa)
 2 g peptona
 1 g de extracto de levadura

- Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza mediante calor húmedo (15-20 minutos a 105 °C).
- Observación: cuando este medio es empleado para cultivar cepas auxótrofas para la arginina, la riboflavina, la adenina o el uracilo y la uridina, es necesario agregar estos suplementos al medio completo.

Medio para la regeneración

de protoplastos (isosmótico): 20 ml solución de sales
 10 g de glucosa (dextrosa)
 342.3 g de sacarosa

- Se lleva a un litro con agua destilada, se ajusta el pH a 6.8 con NaOH y se esteriliza mediante calor húmedo (15-20 minutos a 105 °C).
- Observación: se toman las mismas consideraciones en cuanto a las fuentes de nitrógeno y suplementos nutricionales que el MM.

Solución de Sales: 26 g de cloruro de potasio
 26 g de sulfato de magnesio heptahidratado
 76 g fosfato de potasio monobásico
 50 ml de solución de elementos traza

- Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (20 minutos a 121 °C) y luego se le agrega 2 ml de cloroformo como conservante. Se almacena a 4 °C.

Solución de Vitaminas: 50 mg de tiamina-HCl (o aneurina)
 10 mg de biotina
 100 mg ácido nicotínico
 200 mg pantotenato de calcio
 50 mg piridoxina-HCl
 100 mg riboflavina
 500 mg ácido p-aminobenzóico.

- Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza por filtración y se conserva a 4 °C.

Solución de Elementos Traza: 40 mg borato de sodio decahidratado
 400 mg sulfato de cobre pentahidratado
 800 mg fosfato férrico dihidratado
 800 mg sulfato de magnesio dihidratado
 800 mg molibdato de sodio dihidratado
 8 g sulfato de zinc heptahidratado

- Se lleva a un litro con agua destilada

Solución de Casaminoácidos: 150 g caseína hidrolizada

- Se lleva a un litro con agua destilada. Se esteriliza mediante calor húmedo (20 minutos a 121 °C) y se conserva a 4 °C.

Suplementos nutricionales

Suplementos Nutricionales de *A.nidulans*: las soluciones, salvo que se especifiquen otras condiciones, se preparan 100 veces concentradas en agua destilada con respecto a la concentración final de trabajo (100x). Se esterilizan mediante calor húmedo (20 minutos a 121 °C) y se conservan a 4 °C.

Suplemento	Concentración de la solución stock (100x)
Amonio (tartrato de)	9.5 g/100 ml
Ac. P-aminobenzoico (paba)	20 mg/100 ml
Nitrato de sodio	0.85 g/100 ml
2-Tiourea (*)	3.81 g/100 ml
Uracilo	61 mg/ml
Piridoxina HCL (vit. B6)	500 mg/100ml
Urea (*)	3.03 g/100 ml
Uridina	56 mg/ml
Riboflavina	25 mg/100 ml
Prolina	2.5 g/100 ml

(*) soluciones que se esterilizan por filtración

6.3 - Técnicas empleadas

6.3.1 Condiciones de cultivo

A partir de una inoculación puntual de conidias sobre medio sólido, luego de 48 horas a 37 °C, se desarrolla una colonia de forma compacta que permite la visualización de caracteres fenotípicos con extrema facilidad. La sensibilidad de los ensayos de crecimiento en medio sólido tiene un valor experimental incalculable, y es otra de las ventajas que presenta este organismo como modelo experimental. Mediante sencillos experimentos en placas de Petri es posible detectar la expresión de genes estructurales y reguladores, sin necesidad de técnicas más laboriosas como la medida de la actividad enzimática.

Los estudios de crecimiento en medio sólido se llevan a cabo en placas de Petri con medio mínimo sólido (1.3 % agar) suplementado. Con una pequeña cantidad de esporas de la colonia a testar, recogidas con un palillo estéril, se inocula por duplicado la placa que luego es incubada a 37°C por 48 hs. En cada placa se incluyen uno o más controles positivos, cepas que se sabe que crecen en esas condiciones y controles negativos, que no son capaces de crecer.

Además del crecimiento normal que presenta la cepa de tipo silvestre en condiciones de cultivo estándar, en los ensayos de crecimiento se puede observar:

- crecimiento intermedio, inferior al del tipo silvestre pero donde aún se produce esporulación. Este tipo de crecimiento es característico de mutantes en permeasas que son capaces de incorporar el metabolito utilizando otro sistema de transporte o de mutaciones rezumantes.
- crecimiento residual, donde se puede visualizar la formación del micelio incoloro pero no la producción de esporas. Este crecimiento es típico de una cepa que no puede utilizar una determinada fuente de nitrógeno o está en presencia de una sustancia tóxica.
- crecimiento nulo, donde las esporas inoculadas no alcanzan a germinar. Este crecimiento es característico de mutantes que no pueden utilizar una fuente de nitrógeno y/o acumulan un producto tóxico.

Por último, los cultivos en medio líquido se realizan inoculando 400 ml de medio con una suspensión de esporas, las cuales son recolectadas a partir de dos placas

confluentes y resuspendidas en 20 ml de 0.1 % Tween 80. La incubación se realiza a 25 °C con una agitación de 120 r.p.m. durante 11 o 12 horas para la preparación de protoplastos, hasta 16 horas para la extracción de ARN y hasta por 20 horas para la extracción de ADN.

6.4 Análisis de expresión génica

Condiciones de cultivo

Las condiciones de crecimiento varían según la condición del ensayo:

- Para la condición de no represión por nitrógeno, una cepa wt *pabaA1* se crece durante 16 horas a 25°C y 140 r.p.m., en prolina como fuente de nitrógeno y suplementada con ácido p-aminobenzóico (paba).
- Para la condición de fase isotrópica de crecimiento, las esporas de una cepa wt *pabaA1* (obtenidas por previo filtrado) se crecen durante 2 horas a 37°C y 200 r.p.m. (condiciones de expresión máxima en la germinación), en prolina como fuente de nitrógeno y suplementadas con paba.
- Para las condiciones de ausencia de fuente de nitrógeno y de represión catabólica por nitrógeno, una cepa wt *pabaA1* se crece durante 16 horas a 25°C y 140 r.p.m., en prolina como fuente de nitrógeno y suplementada con paba. Luego, se incubó por dos horas más a 25°C en ausencia de nitrógeno por un lado y en presencia de NH_4^+ por otro lado.

Extracción de ARN

- Se filtra el cultivo de *A. nidulans* crecido en las condiciones adecuadas para cada ensayo
- El micelio obtenido se congela con nitrógeno líquido y se muele con mortero. Se resuspenden 100 mg en 750 μl de una solución de extracción de ARN.
- Se centrifuga 5 minutos a 15800g y se transfiere el sobrenadante a un tubo eppendorf estéril; se agrega 70 μl de acetato de sodio 2M pH 4 y luego 700 μl de fenol y 140 μl de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Se homogeniza con vórtex.

- Se separa la fase acuosa por centrifugación y el ARN se precipita agregando dos volúmenes de etanol 95%. Se agita lentamente y se mantiene por 30 minutos a -20°C . Luego se centrifuga 10 minutos a 15800g.
- El ARN precipitado se lava con etanol 70% y se resuspende en 30 μl de agua estéril. La concentración se determina por medida de absorbancia a 260 nm y se realiza un minigel de agarosa al 1% para comprobar que los ARN no se hayan degradado.

SOLUCIONES:

Solución de extracción de ARN: 4M tiocianato de guanidinio, 25 mM citrato de sodio pH7, 0.5% sarcosyl, 0.72% β -mercapto etanol (se incorpora en el momento).

Tratamiento de ARN con DNase RQ1

Se utilizan hasta 5 μg de ARN de la cepa MVD 001 resuspendidos en buffer TE (Tris-EDTA) o en agua, y se agrega:

1 x RQ1 RNase-free DNase Reaction Buffer [400 mM Tris-HCl (pH 8),
100 mM MgSO_4 , 10 mM CaCl_2]
1 u/ μg ARN RQ1 RNase-free DNase
Agua mQ c.s.p. 100 μl

Se incuba 60 minutos a 37°C . Se inactiva la reacción al añadir 10 μl de RQ1 Dnase STOP solution y se coloca a 65°C por 10 minutos. Se extrae con 1 volumen de cloroformo y se centrifuga 20 minutos a 10000 g. Se precipita la fase orgánica con 1/10 volumen de LiCl 4 M y 2.5 volúmenes de EtOH 100%. Se centrifuga 20 minutos a 10000 g. Se lava con EtOH 70% y se resuspende en agua estéril.

Transcripción reversa – RT con enzima Superscript III

Se utilizan de 10 pg a 5 µg de RNA total de la cepa MVD 001, previamente tratado con Dnase RQ1. Se agrega:

1 µl oligo (dT)₂₀ (50 µM)
1 µl dNTP mix (10 mM)
agua c.s.p 13 µl

Se calienta a 65°C durante 5 minutos y se incuba en hielo durante 1 minuto. Luego, se agrega:

1x First Strand Buffer
1 µl DTT 0.1M
40 U Rnase OUT (Ribolock)
200 U SuperScript III enzyme

Se incuba a 50°C durante 60 minutos. Se inactiva la enzima por calor, calentando a 70°C por 15 minutos.

PCR con enzima Pfu DNA Polymerase de Promega

5 µg de ADNc obtenido en los pasos previos se utilizan como molde en reacciones de 50 µl de volumen final, conteniendo:

- 1 x Reaction Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.8 a 25°C), 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 mg/ml nuclease-free BSA, 1% Triton X-100)
- 0.2 mM dNTPs
- 0.4 µM cebadores FureA2 y Sp2ureA (para amplificar *ureA*)
F2598ureA y R2598ureA (para amplificar ANID_02598.1)
F7373ureA y R7373ureA (para amplificar ANID_07373.1)

F7557ureA y R7557ureA (para amplificar ANID_07557.1)

- 1.25 UE Pfu DNA Polymerase

PCR anidada con enzima U-Taq

Se utilizan 2 µl de los productos de PCR obtenidos en la ronda anterior como molde en reacciones de 50 µl de volumen final conteniendo:

- 1 x Reaction Buffer
- 0.2 mM dNTPs
- 0.4 µM cebadores 2598 Fint y 2598 Rint (para amplificar ANID_02598.1)
- 7373 Fint y 7373 Rint (para amplificar ANID_07373.1)
- 7557 Fint y 7557 Rint (para amplificar ANID_07557.1)
- 3 UE enzima U-Taq Dna Polymerase

Los cebadores fueron diseñados empleando las herramientas informáticas que se encuentran disponibles en línea:

http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi y
<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>.

Tabla - Nombres y secuencias de todos los cebadores (sentido 5' - 3') empleados en las reacciones de RT-PCR y de PCR anidada

CEBADOR	SECUENCIA
FureA2	GTTCTTCGGTTATCCAAAATGG
Sp2ureA	GATGGCTTCCAGGAATGTGT
F2598ureA	CATTGTCGTCGTCCTCATCG
R2598ureA	ACCAAAGTTGGAGCAGGTGT
F7373ureA	GCACAGTTGCTTATGAGTATGG
R7373ureA	TTGGATTTGAGCGTGACGTA

F7557ureA	CAAGATTCGAGTGCCG
R7557ureA	TTTGCCAGAAGGCAGTATCC
2598 Fint	AGTGGGAATTTTCATGCAAGC
2598 Rint	TGCAGAATCCCGAAGAGAAT
7373 Fint	CCCGTACTGCCATACATTCC
7373 Rint	GGCTGTCTTGAGGAGATCGT
7557 Fint	ACGTCTTTGGCTGTGCTTCT
7557 Rint	GAACCAACCCCCAGATGATT

6.5 PCR de fusión

Se empleó la técnica “Fusion-PCR” (Szewczyk, 2007) para obtener la construcción 5’UTR 2598.1::pabaA::3’UTR 2598.1 (“ Δ 2598”). Ésta técnica se desarrolla en dos etapas. En una primera ronda de PCR se amplifican por separado los extremos 5’ y 3’ UTR del gen 2598.1, y por otro lado el gen *pabaA* de una cepa wt. En una segunda ronda de PCR empleando cebadores anidados, se ensamblan estos tres fragmentos, obteniéndose la construcción, lo cual es posible gracias a las características de los cebadores. En este caso, uno de los dos cebadores utilizados para amplificar las regiones 5’ y 3’ UTR del gen ANID_02598.1 contienen, además de secuencias complementarias a éste gen, una secuencia extra de aproximadamente 20 nucleótidos que complementa, en un caso con el extremo 5’ UTR del gen *pabaA* y en el otro caso con el extremo 3’ UTR del gen *pabaA*. De esta manera, estas secuencias adicionales actúan como cebadores durante la segunda ronda de PCR, permitiendo que los tres fragmentos se fusionen y que la construcción se amplifique.

Primera ronda de PCR

Para la **amplificación de *pabaA* y de 3’UTR2598.1** se utiliza la enzima Pfu DNA Polymerase. Se utilizan 50 ng de ADNg de la cepa MVD 10A como molde en reacciones 50 μ l de volumen final conteniendo:

- 1 x Reaction Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.8 a 25°C), 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 mg/ml nuclease-free BSA, 1% Triton X-100)
- 0.2 mM dNTPs
- 0.4 μM cebadores: paba2598Fw y 25983UTRRv (para amplificar 3'UTR2598.1)
pabaFw y pabaRv (para amplificar *pabaA*)
- 1.25 UE Pfu DNA Polymerase

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

- 3'UTR2598.1: una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 53°C, 2:20 minutos a 75°C, y una etapa final de extensión de 10 minutos a 72°C.
- *pabaA*: una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 6 minutos a 72 °C, y una etapa final de extensión de 10 minutos a 72°C.

Para la **amplificación de 5'UTR2598.1** se utilizan 50 ng de gDNA de la cepa MVD10 A como molde de reacciones de 25 μl de volumen final conteniendo:

- 1x KAPA HiFi Reaction Buffer
- 0.3 mM dNTPs
- 0.3 μM cebadores: 25985'UTRFw y 2598pabaRv
- 0.5 UE KAPA HiFi DNA Polymerase

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

- Una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 20 segundos a 98°C, 15 segundos a 60°C, 90 segundos a 72°C, y una etapa final de extensión de 5 minutos a 72°C.

Segunda ronda de PCR

Se utiliza una relación molar de 1:2:1 (60:120:60 ng) para los fragmentos amplificados 5'UTR2598.1, pabaA y 3'UTR2598.1 respectivamente en reacción de 50 µl de volumen final conteniendo:

- 1 x Reaction Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.8 a 25°C), 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1 mg/ml nuclease-free BSA, 1% Triton X-100)
- 0.2 mM dNTPs
- 0.4 µM cebadores: 25985N y 25983N
- 1.25 UE Pfu DNA Polymerase

Las condiciones de amplificación son:

- Una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, seguida de 10 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 8 minutos a 72°C, seguida de 15 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 8 minutos + 20 segundos por ciclo a 72°C y una etapa final a 72°C por 10 minutos.

Tabla - Nombres y secuencias de todos los cebadores (sentido 5' - 3') empleados en las reacciones de RT-PCR y de PCR anidada.

CEBADOR	SECUENCIA
paba2598Fw	<u>TGTCCAGATGATGGGCGGATACCTCGTCTCGCTTTGCAAGCAGTC</u>
25983UTRRv	CTGTGCGGTTCTTCATCATC
PabaFw	TTGCCAGATCTGTAGAAAGG
PabaRv	GAGGTATCCGCCCATCATCT
25985'UTRFw	AAAAGGCAGTCCAGCTCTCT
2598pabaRv	<u>GCAGACCTTTCTACAGATCTGGCAATCTGTGATGCTAGCGTAGC</u>
25985N	TCAAGGCTAAGCTGGATGCT
25983N	CATCCTTTGGGCCTCTGATA

6.6 - Generación de la cepa MVD 26 *yA2 riboB2 pyroA4 pabaA1 Δnku::argB* por cruzamiento de la cepa MVD 13A x P002 (Todd *et al.*, 2007)

- Se inoculan las cepas parentales a una distancia de 5 mm en una placa de MC 1.3%. Es importante que las cepas estén lo suficientemente cerca de manera que lograr hifas anastomosadas. También se recomienda el uso de cepas parentales de distinto color para distinguir claramente el cleistotecio híbrido.
- Se incuba por 48 horas a 37°C.
- Se corta con navaja o bisturí estéril la región donde se juntan los parentales y se transfiere a placa pequeña de MM con fuente de nitrógeno y las auxotrofías compartidas por ambas cepas parentales.
- Se incuba por 48 horas a 37°C.
- Se sella la placa con cinta adhesiva para excluir el oxígeno. La exclusión de oxígeno promueve la formación de cleistotecios.
- Se incuba durante dos semanas aproximadamente hasta observar cleistotecios.
- Se selecciona 1 cleistotecio maduro y se transfiere a una placa de agar 2% utilizando un anza estéril. Se observa el cleistotecio bajo lupa y se limpia. Para esto se debe rodar el cleistotecio por la placa hasta que se encuentre libre de hifas, células de Hülle y conidióforos. Se esteriliza el anza periódicamente durante la limpieza. Se recomienda repetir este paso con 4 cleistotecios en total, ya que algunos pueden no ser híbridos.
- Se transfiere cada cleistotecio con anza estéril a un eppendorf conteniendo de 100 a 500 µl de 0.1% Tween 80. Se rompe el cleistotecio apretándolo contra las paredes del tubo. Cuando se rompe se liberan ascosporas rojas fácilmente visibles. Se homogeniza con Vórtex la suspensión.
- Se toman 5-10 ul de la suspensión y se estrían en MM amonio suplementado con las auxotrofías compartidas por ambos parentales si corresponde.
- Se incuba durante 48 horas a 37°C.

- Se elige como candidato uno de los cleistotecios crecidos. Se toma la suspensión de ascosporas correspondiente a éste cleistotecio, se homogeniza por vórtex y se diluyen 2-3 μ l en 100 μ l de agua estéril. Se plaquea esta dilución en en MC 1.3%. Es importante aclarar que la concentración de la dilución puede variar y puede ser necesario realizar nuevas diluciones y volver a plaquear de manera de obtener no más de 50 colonias por placa.
- Se incuba durante 48-72 horas a 37°C.
- Se transfiere la progenie aislada a una placa madre (MC 1.3%), que contenga a modo de control ambas cepas parentales.
- Se incuba por 48 horas a 37°C.
- Se realizan réplicas en MM 1.3% con amonio y los marcadores necesarios o seleccionados para análisis fenotípico. En estas replicas se realiza una placa que contiene los suplementos para todas las auxotrofías involucradas en el cruce y otras en las que se excluye un suplemento a la vez, de modo que las cepas auxótrofas para éste no serán capaces de crecer.
- Se selecciona la cepa de interés.
- La delección del gen *nku* fue corroborada por PCR. Previo a ello se realizó una extracción de ADN de la cepa MVD 26, y se realizó la amplificación utilizando cebadores específicos, que solamente permiten amplificar un producto si *nku* está deletado, estando la región codificante sustituida por el marcador *argB*. El cebador “directo” utilizado hibrida sobre *argB*, mientras que el reverso lo hace sobre la región 5’UTR de *nku*, que se mantiene en la cepa deletada.

Extracción de ADN

- Se filtran 500 ml de un cultivo de *A. nidulans* crecido hasta 20 horas a 25-30 °C.
- El micelio obtenido se congela con nitrógeno líquido y se muele con mortero hasta obtener un polvo blanco.

- Se agrega 800 μ l de solución de extracción por cada 200 mg de micelio, se homogeniza bien y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente.
- El ADN se extrae primero con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y luego con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se centrifuga a 2.500g por 10 minutos a temperatura ambiente.
- El sobrenadante final se precipita con dos volúmenes de etanol 95% en presencia de 0.3 M de AcNa y centrifugando 10 minutos a 11.600 g.
- El precipitado se lava con EtOH 70%, se seca y se resuspende en 50 μ l de buffer Tris-EDTA 10-1.
- Se incuba 30 minutos a 37 °C con RNAsa 10 μ g/ml final.
- El ADN se cuantifica por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1 %, utilizando un marcador de peso molecular de 1 Kb (ver 4.4).

Soluciones:

Solución de extracción: 0.2 M Tris-HCl (ph 7.5), 1 % SDS, 1 mM EDTA.

Buffer Tris-EDTA (TE) 10-1: 10 mM tris.HCl, 1 mM EDTA(pH 8).

PCR para verificar la delección del gen *nku* con enzima Taq Long

Se utilizan 10 ng de la cepa candidata MVD 26 como molde en reacciones de 50 μ l de volumen final conteniendo:

1 x Reaction Buffer

0.3 μ M cebadores ArgB-Fw y *nku* Δ -Rv

0.2 mM dNTPs

0.50 UE Taq polimerasa (Expand Long Template PCR System)

Las condiciones de amplificación son:

- Una etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 4:30 minutos a 68°C, y una etapa final a 68°C por 10 minutos.

6.7 - Transformación de *A. nidulans* (Szewczyk *et al.*, 2007)

Producción de protoplastos

- El día previo a la transformación se inoculan 400 ml de MM (con los suplementos correspondientes) con una suspensión de 3 placas de conidias en 30 ml Tween 80-4 (0.1%).
- Se incuba de 11 a 12 horas a 25 °C con agitación fuerte. Se observa el cultivo al microscopio, y se detiene la incubación cuando las esporas hayan comenzado a germinar. Para obtener una buena cantidad de protoplastos es muy importante que el cultivo sea joven.
- El cultivo se filtra sobre blutex, se lava el micelio con agua estéril y se seca entre hojas de papel estériles.
- El micelio seco se pesa por diferencia en un falcon estéril y se resuspende en solución B, a razón de 10 ml/g de micelio. Se mezcla bien con vórtex para favorecer la actividad de las enzimas.
- Se transfiere a un matraz estéril y se agrega la enzima comercial Glucanex a razón de 300-400 mg/g de micelio (también puede utilizarse Novozima a razón de 20 mg/g de micelio).
- Se añaden 3 a 7 mg de albúmina de suero bovino (BSA) por gramo de micelio y se incuba con agitación suave (100 rpm) a 30 °C durante 120 minutos. La formación de protoplastos se sigue al microscopio.
- La suspensión de protoplastos se transfiere a tubos Corex estériles y se agrega lentamente por las paredes del tubo un volumen igual de solución D. Se forman dos capas. Los tubos deben mantenerse en hielo.
- Se centrifuga 10 minutos a 6000 rpm (en rotor vacilante de 142 mm de radio) a 14 °C. Los protoplastos formarán una capa blanca en la interfase que se transfiere con pipeta Pasteur a otro tubo Corex estéril.
- Los protoplastos recuperados son lavados agregando 5 ml de solución E y se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm.

- Los protoplastos se resuspenden en 5 ml de solución G, se realiza un recuento de los mismos en célula de Thoma y se centrifuga 10 minutos a 4000 rpm.
- Una vez finalizada la centrifugación, los protoplastos se resuspenden en un volumen de solución G tal que se obtenga una concentración de $2-5 \times 10^7$ protoplastos/ 100 μ L. Se transfieren 100 μ L de la suspensión de protoplastos a 2 tubos eppendorf.

Transformación

- A 100 μ L de suspensión de protoplastos se agrega no menos de 250 ng de ADN en un volumen menor a 15 μ L de Buffer TE y preferiblemente en menos de 10 μ L. En paralelo se realiza un control negativo, al que se le agrega agua en lugar de ADN.
- Se homogeniza con vórtex de 6 a 8 veces por un segundo a máxima velocidad.
- Se agregan 50 μ L de solución PEG recién filtrada.
- Se homogeniza por vórtex 3-4 veces por un segundo a máxima velocidad.
- Se pone en baño de agua fría por 25 minutos.
- Se agrega 1 ml de solución PEG recién filtrada. Se mezcla la solución PEG con la suspensión de protoplastos mediante el uso de una micropipeta (tomando cierto volumen para luego tirarlo nuevamente en la solución, hacerlo por lo menos 10 veces). Se deja a temperatura ambiente por 25 minutos. Si la transformación es exitosa, protoplastos fusionados pueden ser observados en la mezcla de transformación.
- Se plaquea la mezcla de transformación en placas de selección. Las placas deben tener 1.0 M de sacarosa mas los suplementos correspondientes para la selección. Deben estar bien secas. Para las placas de Petri de 100 mm de diámetro, se utilizan 115 μ l de mezcla de transformación para que pueda ser plaqueada por toda la superficie de la placa. Si se quiere plaquear un volumen menor, se puede poner un cierto volumen de solución PEG arriba de la placa y a ese volumen agregarle el volumen de mezcla de

transformación deseado de tal forma que, volumen de mezcla de transformación + solución PEG = 100 μ l.

- Se incuban parcialmente las placas overnight boca arriba a 30°C o 37°C. Al otro día las placas deben ser invertidas.

Soluciones

B: 1.2 M $MgSO_4$, 10 mM ortofosfato (pH 5.8)

Pesar el $MgSO_4$, agregar H_3PO_4 y agua (no completar a volumen), agitando con agitador magnético, agregar NaOH; cuando se disuelve el precipitado medir pH, no pasar de pH 6 porque se forma un precipitado insoluble. Se filtra, no se esteriliza por calor húmedo.

D: 0.6 M sorbitol, 100 mM trisCl (pH 7.5)

E: 1 M sorbitol, 10 mM trisCl (pH 7.5)

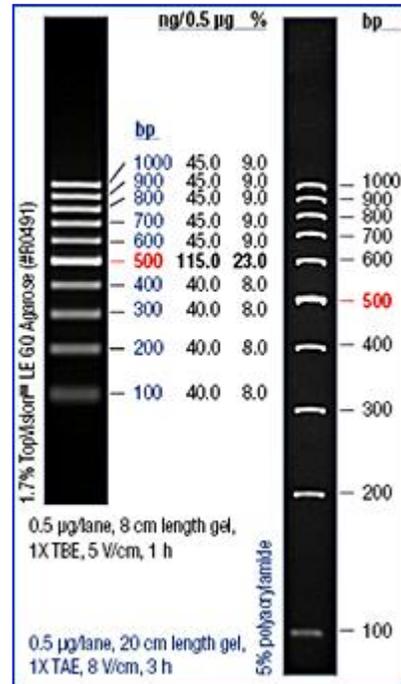
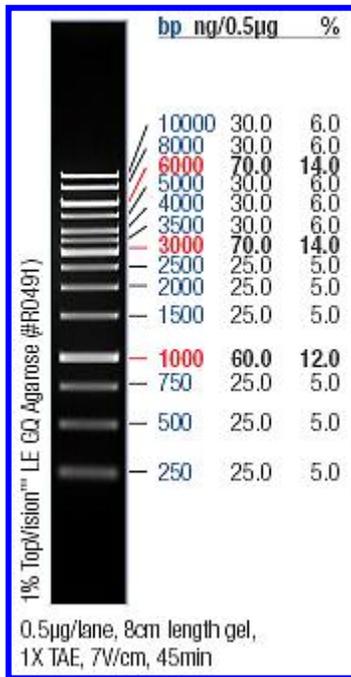
G: 0.6 M KCl, 50 mM $CaCl_2$

PEG: 0.6 M KCl, 50 mM $CaCl_2$, 75 mM PEG (= 25% w/v). Filtrar antes de usar.

Las soluciones D, E, G y PEG se esterilizan por calor húmedo (105°C por 20 minutos).

6.8 - Análisis electroforético de ADN

Los ADNs se analizan por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8)) con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio. Las muestras de ADN se cargan en el gel con ayuda de un buffer de carga 6X (50 % glicerol, 0.02 % azul de bromofenol, 0.002 % xylencianol). Como referencia de peso molecular se empleó el marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) y el marcador GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas), según corresponda. Las corridas se realizan aplicando un voltaje de 9 V/cm y el ADN se visualiza por exposición a luz UV de 302 nm.



6.9 - Purificación de bandas de ADN

Para la extracción y purificación de las bandas de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el kit de purificación “GeneJET™ Gel Extraction Kit” de la empresa Fermentas. Una vez purificadas, las muestras de ADN fueron cuantificadas comparando la intensidad de la banda obtenida con la del marcador de peso molecular.

7 – BIBLIOGRAFÍA

Abreu, C; Sanguinetti, M; Amillis, S; Ramon, A. **2010**. UreA, the major urea/H⁺ symporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* Doi:10.1016/j.fgb.2010.07.004

Amillis, S; Cecchetto, G; Sophianopoulou, V; Koukaki, M; Scazzocchio, C. y Diallinas, G. **2004**. Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. *Mol. Microbiol.* **52**: 205-216.

Arst, H.N y Cove, D.J. **1973**. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molec. Gen. Genet.***126**: 111-141.

Ballance, D; Buxton, F.P., Turner, G. **1983**. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem, Biophys. Res.* **112**: 284-289.

Bodie, E.A; Bower, B; Berka, R.M. y Dunn-Coleman, N.S. **1994**. Economical important organic acid and enzyme products. En; "*Aspergillus: 50 years on*" Elsevier Science B.V. Amsterdam, Holanda, 561-602.

Bold, H.C; Alexopoulos, C.J. y Delevoryas, T. **1987**. Morfología de las plantas y los hongos. *Ediciones Omega, S.A., España, 733-734*.

Braaksma, M. y Punt, P.J. **2007**. *Aspergillus* as a Cell Factory for Protein Production: Controlling Protease Activity in Fungal Production. En; "*The Aspergilli, Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*" (G.H. Goldman y S.A. Osimani, Eds). CRC Press, pp. 441-455.

Brownlee, A.G. y Arst, H.N. Jr. **1983**. Nitrate uptake in *Aspergillus nidulans* and involvement of the third gene of the nitrate assimilation gene cluster. *J. Bacteriol.* **182 (1)**: 1138-1146.

Caddick, M.X; Arst, H. N. Jr.; Taylor, L. H, Johnson, R. I, Brownlee, A. G. **1986**. Cloning of the regulatory gene *areA* mediating regulate nitrogen metabolism repression in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **5**: 1087 - 1090.

Caddick, M.X. **1994**. Nitrogen Metabolite Repression. In *Aspergillus: 50 years on*, Martinelli, S.D. y Kinghorn, J.R., eds. (London: ELSEVIER), pp. 323-354.

Castellani C, Cuppens H, Macek M, Jr., Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A *et al.* **2008**. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*, **7(3)**:179-196.

Cecchetto, G.; Amillis, S; Diallinas, G; Scazzocchio, C; Drevet, C. **2004**. The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*: characterisation of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *Journal of Biological Chemistry.* **279**: 3132-3141.

- Clark, D. P., Pazdernik, N, J. **2008**. BIOTECHNOLOGY. Applying the genetic revolution. Elsevier Academic Press.
- Clutterbuck, A.J. **1974**. *Aspergillus nidulans*. En; "Handbook of Genetics". Vol 1 (R.C. King) Plenum, New York. 1: 447-510.
- Cook, R. y Anthony, C. **1978**. Regulation by glutamine of ammonia transport in *Aspergillus nidulans*. *Bioch. Biophys Acta*. **113**: 51-56.
- Diallinas, G. **2007**. *Aspergillus* Transporters. En; "The *Aspergilli*, Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods" (G.H. Goldman y S.A. Osimani, Eds). CRC Press, pp.301-320.
- Dupre, S; Urban-Grimal, D. y Haguenaer-Tsapis, R. **2004**. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim. Biophys. Acta*. **1695**: 89-111.
- ElBerry, H.M; Majumdar, M.L; Cunningham, T.S; Sumrada, R.A. y Cooper, T.G. **1993**. Regulation of the Urea Active Transporter Gene (DUR3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **175**: 4688-4698.
- Felenbock, B; Flipphi, M; Nikolaev, I. **2001**. Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **69**: 149 - 204.
- Fincham, J.R.S. **1989**. Transformation in Fungi. *Microbiol. Rev.* **53**: 148-170.
- Fromme, , J.C. y Schekman, R. **2005**. COPII-coated vesicles: Flexible enough for large cargo? *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**: 345-352.
- Gorfinkel, L; Diallinas, G. y Scazzocchio, C. **1994**. Sequence and regulation of the *uapA* gene encoding a uric acid-xanthine permease in the fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **268**: 23376-23381.
- Harispe, L. **2008**. Estudios sobre la topogénesis de los transportadores de purinas y de aminoácidos en *Aspergillus nidulans*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de la República; Université Paris-Sud, U.F.R. Scientifique D´Orsay.
- Käfer, E. **1958**. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics.* **9**: 105-145.
- Koukaki, M; Giannoutsou, E; Karagouni, A; Diallinas, G. **2003**. A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *Journal of Microbiological Methods.* **55**: 687 - 695.
- Kudkla, B; Caddick, M. X; Langdon, T, Martínez-Rossi, N. M, Bennet, C.F, Sibley, S, Davies, R. W; Arst, H. N. **1990**. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative Zinc finger. *EMBO J.* **9**: 1355 - 1364.

- Liu, J., Rost, B., **2001**. Comparing function and structure between entire proteomes. *Protein Sci.* **10**: 1970 – 1979.
- Liu, J, Ludewig, U, Frommer, W.B., von Wirén, N. **2003**. AtDUR3 Encodes a New Type of High-Affinity Urea/H Symporter in Arabidopsis. *The Plant Cell.* **15**: 790 – 800.
- Marzluf, G. **1993**. Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 31 – 55.
- McCully, K.S. y Forbes, E. **1965**. The use of master strains of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genetical Research.* **6**: 352-359.
- Morel, M, Jacob, C, Fitz, M, Wipf, D, Chalot, M, Brun, A. **2008**. Characterization and regulation of PiDur3, a permease involved in the acquisition of urea by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Fungal Genetics and Biology.* **45**: 912 – 921.
- Morozov, I.Y; Martinez, M.G; Jones, M.G. y Caddick, M.X. **2000**. A defined sequence within the 3´UTR of the *areA* transcript is sufficient to mediate nitrogen metabolite signalling via accelerated deadenylation. *Mol. Microbiol.* **37**: 1248-1257.
- Morozov, I.Y; Galbis-Martinez, M; Jones, M.G. y Caddick, M.X. **2001**. Characterization of nitrogen metabolite signalling in *Aspergillus* via the regulated degradation of *areA* mRNA. *Mol. Microbiol.* **42**: 269-277.
- Navarathna, D.H.M.L.P; Das, A; Morschhäuser, J; Nickerson, K.W; Roberts, D.D. **2011**. Dur3 is the major urea transporter in *Candida albicans* and is co-regulated with the urea amidolyase Dur1,2. *Microbiology.* **157**: 270-279.
- Nayak, T; Szewczyk, E; Oakley, E; Osmani, A; Ukil, L; Murray, S; Hynes, M; Osmani, S; Oakley, B. **2006**. A Versatile and Efficient Gene-Targeting System for *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* **172**: 1557 – 1566.
- Pantazopoulou, A; Lemuh, N.D, Hatzinikalaou, D.G, *et al.* **2007**. Differential Psychological and developmental expression of the UapA and Azga purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **44**: 627-640.
- Pateman, J.A. y Kinghorn, J.R. **1977**. Nitrogen metabolism. En; “*Genetics and Physiology of Aspergillus*” (J.E. Smith y J.A. Pateman, Eds.). Academic Press, New York, pp. 147-202.
- Pateman, J.A; Dunn, E. y Mackay, E. **1982**. Urea and Thiourea Transport in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Genetics.* **20**: 777-790.
- Peñalva, M.A; Arst, H.N. **2002**. Regulation of gene expresión by ambient pH in filamentous fungi and yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 426 – 446.

Pontecorvo, G; Roper, J.A; Hemmons, L.M; McDonald, K.D. y Buffon, A.W.J. **1953**. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advanc. Genet.* **5**: 141-238.

Roper, J.A. **1952**. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia.* **8**: 14-15.

Sanguinetti, M. **2008**. Gen *ureA*: Delección y seguimiento subcelular de su producto, el transportador de urea de *Aspergillus nidulans*. Tesina de grado. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Scazzocchio, C. y Darlington, A.J. **1968**. The induction and repression of the enzymes of purine breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Biophys. Act.* **166**: 557-558.

Scazzocchio, C. **2006**. *Aspergillus* genomes: secret sex and the secrets of sex. *TRENDS in genetics.* **22**: 521 – 525.

Scazzocchio, C. **2007**. *Aspergillus*: a multifaceted genus. En; “*Encyclopedia of Microbiology*” (Moselio Schaechter, ed). Elsevier.

Sophianopoulou, V. y Dhalluin, G. **1994**. Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 53-57.

Szewczyk, E; Nayak, T; Oakley, E; Edgerton, H; Xiong, Y; Taheri-Talesh, N. **2007**. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature Protocols.* **6**: 3111 – 3120.

Tazebay, U.H; Sophianopoulou, V; Cubero, B; Scazzocchio, C. y Dhalluin, G. **1995**. Post-transcriptional control and kinetic characterization of proline transport in germinating conidiospores of *Aspergillus nidulans*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **132**: 27-37.

Tazebay, U.H; Sophianopoulou, V; Scazzocchio, C. y Dhalluin, G. **1997**. The gene encoding the major proline transporter of *Aspergillus nidulans* is upregulated during conidiospore germination in response to proline induction and amino acid starvation. *Mol. Microbiol.* **24**: 105-117.

Tilburn, J; Scazzocchio, C; Taylor, J.H; Zabicky-Zissman, J.H; Lockington, R.A. y Davies, R.W. **1983**. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* **26**: 205-221.

Todd, R.B. y Andrianopoulos, A. **1997**. Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal. Genet. Biol.* **21**: 388-405.

Todd, R; Davis, M; Hynes, M. **2007**. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nature Protocols.* **4**: 811 – 821.

Uemura, T., Kashiwagi, K., Igarashi, K., **2007**. Polyamine uptake by DUR3 and SAM3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **282**: 7733-7741

Valdez, J.E. **1999**. Biología molecular de los transportadores de purinas en el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Tesis doctoral. Centro de Investigaciones en Química Biológica (CIQUIBIC-CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Valdez-Taubas, J; Harispe, L; Scazzocchio, C; Gorfinkiel, L y Rosa, A.L. **2004**. Ammonium-induced internalisation of UapC, the general purine permease from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **33**: 115-125.

Wang, W; Kölher, B; Cao, F; Liu, G; Gong, Y; Sheng, S; Song, Q; Cheng, X; Garnett, T; Okamoto, M; Qin, R; Mueller-Roeber, B; Tester, M; Liu, L. **2011**. Rice DUR3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization when expressed in Arabidopsis. *New Phytologist*. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03929.x.

Wiame, J.M; Grenson, M. y Arst, H.N. **1985**. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* **26**: 1-88.

Yelton, M.M; Hamer, J.E. y Timberlake, W.E. **1984**. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **81**: 1470-1474.

8 - ANEXO

Secuencia genómica del gen *ureA*

AGTAGTCTCGCCAATCTTGTCTCAGTGTGCTTTGCCCGCAAATCTCGTTCTAGACTGGTATCTTGCCTCGCTA
CCGGCGGGAATACGAAGTATAGGTAAGGGTCTGCATGGTTCACCTCAACAGCCGCTATCGACTTAATCCCGT
CATGGATGTCAAGGAAACGCTTGGATTGGGGCTGGATTGTAATTAGAAATATATGCCTTGAATCTCATTTCGAC
ACTAGTTAACTCACGAAACCTGGAGCAGTCGAAGATAGTATCACACCCACGCTCCAAGCCTCTGGGGTCAGC
TTGTCTCGGGTCCATGTGGTTCGATGCAC
CGATGACAAGGGAGATCAGATAAGGAATCCAGATCTCGAAGCCACGGGCAAACGCGGTATTTCGCTACCCGGGT
CCTGGTTTTGTGGGAATGTTAACGATCTGTAGCCTCTAGTAATCATTCAAGTAACCTGTGGGCTCTTCGCGTAT
GGCATATTCGGCGTATTCTATGGGCTCTTGAGTCCTGGGCCTTTGAGGTATATCCTCTCTAACTGCCCGCAGA
ACTGGCGAAAACCTCATTGCAAGAACTTTTTGTACCATTGTATGCTTACCTGGGCACTGTGGGCAGGCCTTCT
TGGGAGTCCAACCCTCCTACGGTCTACTTGGGATTAGGACGATATTCCTCCCTACTTCGTAGACTAACTCCCA
GTGGAAGCATTTGGGGGAGAGGTTTCGATGTGTGGATTATAATACTCTTGGGCGAAGAGACTGTTGCTATTGG
TCTAGCAGAAAGACAGGACGAGTTCCAAAACGGCTTGAGGTTGATAAGTGTGAATATATTCCTGTGCCAGA
GGAGCCGTAGTAACCTGATAGGCATTTCCAGGGAGACAGCTGCACGTAGTCGGACAGTTCGGAGCTCTGGAC
ATGTGGGGGAGCACAGAATCGAAAAGATTAGTGGGAGTATCGAGTAAAACGTTATCTGCAGTCAAGTTATCAG
TTCTCGAGAATGACCATGGCCCTTCTCTTCAATGCGTGCTTCGGCCATGGCCGGCCCGTCCCCAGTTCAACTG
TCGGGCCCGCTTATCAGCTGGCTTTCCCGTCCAATGGGATCACGTCAAGCTTTTCTGATAAGCCTACAATTTT
CCAATGGGATGATTTGCTTCTTCATCCACCACGATAACGAAACATCCTGCCAGTAAGGTTAACTCGCTGCTC
CAGGCCATTCTTTTCAGAGACCCTGAGTACGAAGTGAAGGAATGATGGAGAAACCAAGAGCTATGCCAAGCTC
AATCCTTTATT
ACGAAACATGGTCGTCCTTATCATGCCTTCCACGAGCTGGGACAGCTCTCCTTGTATCAGCCTCGTTCTTATT
TATCATTGCATCGCCAATAATTACTTGTCTATCGCGAGCTTCATCGATACTGCTTGAAGGTTGACGCAGCGGG
ATCGGAGATTTAAGTCCTTATATCAGCCCGTCAGTCCCTGCTCTGAGTTGTGCGCCATCACAACTTAAAGATC
TGAAACTGCAGACACCAGACTGCCTGAAATTGTACTACGAAGTAGAGCAGTTGTTTTCTGTTGAGGTTGCTA
GTTCTCCACTG**GTTCTTCGGTTATCCAAAATGGTTGCGGTTATAGCTGCCCCGATGAAGCCGGGGTAGAGAC**
CGTTACGTTCACTGCTCCCTCACCAAGGGTTTTGGGTACGGGATCATCATCGGGCTCGGGTTCGCCTTTGCC
CTGGTCATGATCTTCATCACCTGGTCCCTAAAGAGCTTAAGTTTTGTTCAGACATTTGGTTTCGAGCAGGACTAAC
GGTCTAGCTATCAACATGAGATTATCACGTCTGAGATGTTCTCCACAGCTGGACGGAGTGTCAAGTCTGGCCT
GGTGGCCTCTGCTGTCTGTAGCAGTTGGACCTGGGACGTACTCTGCTGCAATCTTCGGCCGTGGCCTACCCAG
TACGGCACCTCGGGCCGTTCTTCTATGCATCGGCTTGGTCTTCACCCCGGTATGACACGAAGGATATACTGA
CAGTTTTGCAGCGCCACCCTTCAGATCATCTTGTGTTGCAACGCTCGCCATTGAACTCAAGAGACCGCGCCTA
ACGCACACACATTTCCTGGAAGCCATCCGTGCCCGTTACGGTACCGTCTGATCATCTCGTCTTCATCGTTTTCTG
CCTGATGACCAACATCCTCGTTACGGCCATGCTGCTCACTGGCGGCGCAGCGGTGCTCAACTCTATGACTGGC
GTCCAGTTGTTGCAGCCTGCTTCCCTCCCAATCGGTGTGGTTCTGTACACCCTTTTCGGAGGCATTAAG
CAACATTCATCACCGACTATATGCACACTGTTGTCAATTGTGCTGATCATCTTCATCTTCGCTTTCTCTGCCTA
CGCCAGCAACGACCGTCTTGGCTCCCCGGCAAAGTCTATGACCTCCTCGTCCAAGCTGCTCTGCGCAATCCG
GTTTTAGGGAACGCTGAAGGTAGCTACCTCACCATGCGCTCCAAAGATGGCGGTATCTTCTGGGTTCATCAACC
TCGTCGGTAACTTCGGCACTGTCTTCTGGACAACGGCTACTACAACAAGCCATCGCCGCGCACCCAGTCCA
CGCTTTCCCTGGATATGTCATCGGCGGTCTCTGCTGGTTGCTATTCCCTGGCTCTGCGCGACAACGATGGGT
CTCTCTGCACTTGCCTAGAGGGAACGCGCCGATTGCCTCCGTTGACGTAACAGCCGGCCTCGTCCTTCCCT
TTGCATCTGTGAACTCCTCGGATATAGTGGCGCAGTATGCACAACCTTATGATCTTTATGGCCGTGACCTC
TGCCTTCTCGGCCAGCTCATCGCCGTGCTCTGATCCTCACCTACGATATCTACCAAGCCTACATCAACCT
GCCGCAAAGGGCAAACGCCTCGTCTGGGTCTCGCACCTCTCCTGCGTAGTCTTCGCAATCGCGATGGCTGCCT
TTGCGACAGGTCTTCACTACGCTGGTATCGGTATGGGCTATCTTACCTTCTCATGGGCGTCATCATCTCCTC
AGCCGTGTTCCCGGGCGCCATGACCTCGTCTGGAAGGGGCGAAGTGGATCGCGGCAGCCGCTCTCCAGTT
TTGGCCTCGCAATGTCCCTGGTTGCGTGGCTTGTACAACAAGACAGAGTATGGCGTCTTACCCGTGAAA
CCACAGAGCAAACCTACCCCATGCTAGCGGGCAACGTCGCCGCCCTTCTCAGCCCTGTGCTTCTCGCCAGT
CTTGACATCCTCTTCGCGCCTCAGAATTACGATACGAATCCATGCGCGCCATCCGCAAAGTTCGATGACTCG
GATGTGCGCCGCGGCGCAGCTCGACCTCGAGCTCATTTCCCGCGCTTCCAATACAACACTCGTCCCTTCCAC
AGCAACAGCAAGAGGAAGAGGAAATAAGAAAACCTCAACAAAGCCGATTTATTTCCCGCTGTCTCACAGTTGG
CATGGTAATTTGTTTTGATCCTCTGGCCTATACCCATGTATGGCAGCGGGTACGTTTCAGCAAGAAGTTC

TTCACAGGCTGGGTTGTTGTGGGCATCATCTGGCTCTTTGGGACTGCGTTTCGGGGTGATTCTATTCCCGCTCT
GGGAGGGTAGGAGCAGTATCAAAGGGTTGGTAAGCTTATGCTGCTCGATGCGATGGGAAGGCAGTGGAAAAG
CAGTGCTCTGGTAGGCCAGGGAGACGAAGAGAGTGAAGAGTCTGGGTCTGGTGTGTTACACCGAGCGAGAAG
ATTGTTGCAAAATGAGTGTGTTCATATATCTTGCCTTGTGTGTGTTTCAGCTAGCTAGATTTCATTTATGTTTT
GCGTTTTGATTCAATTATACCCCACTCGTTACACATGTACCAAGTTTTTATAACCAGGGTGGCGACCAGCGTTCA
TGATAAGATAGCTTATATAGAATATGGCTATTTTCATTAAGCATTATAAATTCATTCTTACGGACCCTAGCTGAA
GCAGTTATGTCGTCCAAGCCGTCATTAACCTTATAGAGCGAAATATAGAATTACAACTGGAAAGACAAGAGC
AATGTTCCCTCCAGAGATCAACCCCAACAGACCATAGAACAGTAACTTAGGTATCGTCATCAATCTGAGAGTA
AACTCCAGTCTTTTCGAGGACCTGACGAACACTGCCTCAGAGGCATTTGCCATGAGCGCATCACTTATACGCAT
ACGGCTGTGGTGGCGGTGATGTAGCCCCGACGCTACGGGAGGATACTGCATTTGCTGCTGCGGGGTTTGCTG
CTGCTGATACCCCCAAAGTATGCCTGCGGGCGAGGTTGTGGTCCGTAGCCTGCATTTGGGGGCGGCCGAGTG
TCTGGGTTAATATCGGGGCGATCACTATTCTTGTAGTTTATGAACAATATAAGCATGTACTGAGAAGCAGTG
GATCAGATGAAAAAAGGAGAGCATAAGGCAAGGGAAGGATATACCGCAAGTCCCTGGGTAAATCGGCATGTGTA
GCATGTAACCTTCCCTTGTACTTGTGCATTGCTAATGGGATCACGGGCTGTATGGGATATGTCAGTTCCTTTTCT
TCGGTACAATACTGCCTTTAGCAAAGGCAGGATAGTGCCATAACAATGAAGCAGATCGTGAAGAATGGCCTGTA
TACATGCGTTAGCCCCAGGCGTAGTTAGTTAACTCAGGACAACATAACCATCGTGTACACACCCGTCATTCCA
ATGGTTGCCTGTACGGAGTTTAGTGCCAGATCCATTGGTAACTGTTGAACAGCAGCCACGCCGTGTCCTTGTC
TCAGAAATCGGGACTA

Referencias:

Verde: intrones

Amarillo: cebadores RT-PCR

Letras en negro: Regiones no codificantes

Letras en rojo: secuencia codificante

Secuencia genómica ANID_07373.1

ATGAGCTCTACTGTTCACCTGTCTACCTCAAGGCGCCGGGTACGGCGTTGTGCTTGGCATTGGCCTCTTCT
TCGCACTGCTTATGGCATGTGTGTCATACCTACAAGATGCTATAACAAAAACACAAGTAAGGGCGTTTCTGAC
ATGACCAGAACCGATACACGCAGTATTCAACGAAAACCTAGCGAGGAGTTCAATACGGCCAGCCGAGCGTCAA
GCCTGGCCTAATCGCTAATGGAGTGGTGTCCGCATGGACATGGGCAGCGACTCTGTTGCAAAGTAGCACAGTT
GCTTATGAGTATGGAATCTCTGGTCCGTTCTGGGTAGGTGATCGCTTTTCTGATGATAAATGTCATATACTG
ACTTGTAGCAGTGTGAGTGCATACTGCTCCAGACTACTGATAAATTTATACTGAGGATGTCCAGACGCCGCCGG
TTCAACTGTACAGATCTTCATGTTCTCCGCTTTAGCTTGAAGGTCAAGCAAAAACGCCTCCGTAAGTCCATACA
TTCCCTTGAGATTGTTTATCATCGCTACGGGCAAGCGACGCATCTTGTGTTTCGATTTTTTGGCCCTTATGACCA
ATACTCTCGTTGCGAGCCAGCTGTTGCTTGGAGGCAGTGGGTCGTACAGCCCTGACCGGCATGAACGTCTA
CGCGGCTGTCTTTTTGATCCCCCTCGGCGTCTGTATCTATGTCGTTCTCGGTGGCCTGCGGGCGACGTTTCTA
TGTGATTACACTCACACAGTCATTGTGTCATGGTCATCCTCTACTTTCATGTTTCGACGTCTATACGAGAAACG
AGCTGATCGGTTCCGCTCTCAGATGTACGATCTCTCAAGACAGCCGCAGTTGAACGTCTGTAGAAAGGGAA
CATAGAGGGGTCGTACGTCACGCTCAAATCCAACTCTGGTCTTGTATTTGGTGTATCGAGCTATGCACCGGC
CTAAGCACGGTATTTCTTGATCAGGGCTACTGGCAGCGAGCCATCGCCAGTCGGCCACCACCGCTGTCCGGG
CCTATATCATGGGCGGCTTGTCTGGTTTTGCAATCCCCCTTTGGATTTCGCAACCACCCTGGGTCTTGGCCGTGT
AGCGTTAACGAACAACCCCGGTTCCCGACTTACCCGAACAATATGACAAGCAGTCAGATCTCAGCAGGTCTC
GCGGCTCCATTTGGCGCCACAGCCCTTGCCGGGAAGGGCGGTGCGACTGCCTTGCTTTTGACACTGTTTCATGG
CCGTCACCTCCTCCGCCTCGTCTCAACTCATCGCCGATCGTTCGATCCTGACATTCGACATTTACAAAACCTA
CCTCAAGCCCAAGGCCACTCCTCAACAGTCATCTTCGTTCCCATATAATGATCTGCATCTTCGGCGTGGTT
ATGGCGTGCCTTGCCTCTGGAACGGCATTCCGGATCGACCTGGGCTGGCTGTTCTGGTAATGGGTCCTT
TGATTTGGCGGTGCGGTCTTCCCGGCTGCATTACCATCCTCTGGAAAGGACAGACGCGCCTAGGTGCTGTCTG
CGGTGCAATTGGTGGCCTGGCAGCTGGGCTGATTGCCTGGCTGGTTGAAGCCAAAGTATACTATGGCAACTCA
CCGTAGCTACAACAGGTGCCAACTACCCACATTGGCCGGGAACATGGCGAGCGTCTTGACTGGTCTCATTCT
CACTGTTGGAATCTCTCTTCTCAAACCGGATGACTTCAACTGGGAAAAGACCCGAGCTATTAACGCGCCAGCT
ACATATAACCCGGAACCCGTCATCGAATCTAAACCTCCCATGGCGATCAAGACGACGCGGTTGACCAAAGTG
AGAAAACAGCAGACTCTGCGGTCATCGAGGATCCAAAAGCTCTACAGAAAACATTTCGTCATGGCCGTGCTTGT
ATCTGCCGTTCTGTGCTGATCATGGACATCATTATCCCAATTCCTATGTTTCTTAGCCATTATATCTTCTCC
AAGGGCTTCTTTACGGCGTGGGTAGTAATATCGTTTCTCTGGGTATTTGCCGCTTTTTCTCTGTGGGATTT

TGCCAGTCGTTGAGACGAGGCGATTCTGGGGGATGCTGTTTAAAGAGGATGTTTGGAAAGAAAGTGGTCTTGGATGCCAAGTGCAGCAGGGACAGAGTTCTGAAGACGACGCGCAACGCGGAGCAAGGACTCAATAGCC TAG

Referencias

Verde: intrones

Amarillo: cebadores RT-PCR para amplificar ANID_07373.1

Rojo: cebadores "nested-PCR" para amplificar ANID_07373.1

Secuencia genómica ANID_02598.1

ATG GCAGAGACAGCGGTTCAACCGCCGCTGTCGCAGGCGGTTGGGTA CATTGTCGTCGTCCTCATCG GAGCCA
TCATCGCTCTGG GTATGCAACCGCCGCAATAAAAAGCTAGCCGCTGAAGCTGACTTGGAGTAG TGATGATGTTG
GTTACCAAGGTGCTCAAAAAGACAACCTGGGGAAGACAACAAAAAGACCGAGAT STATGCATTACCCCTCGTGG
GGGCGTCTATACTTGGCTGATACTGATATATTGCAG GTTTATGACTGCCAATCGAACCGTCCGGACTGGTCTC
ACTGCCTCAGCTGTTATCTCG GTTCGCCTCTCCCTCGTCCAGTCTGTTCTCAATTCGTCTAACAAAAGCCCC
TAG TCCTGGTTATGGTCAACTCAGCTGCTCGGCTCTTCTTTCACCGGTACGACTATGGCGTTTCTGGCCCT
TCTGGTTTCGCTGCCGTTGCAGTCCCATGATCGTCTTCTTCGCCCT AGTGGGAATTCATGCAAGC GCAAGAT
CCCAGAGGCCACACCTCGCTCGAGGTGGTTTCGCATTTCGATACG STATATTCGAGCCCTTATCGCTGTGGCTG
CCACAGGCTAAACGCTCTCCAG GCCACATTGCCACGCTGTCTTCATGGTTCTCTGTCTTGTGAACAATATC
TTCGCCAGCGCAACATGCTTCTCGGTGCATCGGCTGTGATCTCGGCAAT GTAGGTTCTGGAGTAGACCGTCA
ATCTGAGCCTAGCCAGCTGATTGCCACAGCACCGGTATGCATATAATCGCCGCAACATTCTCTGCTGCCCGTGG
CTGTGACTGTTTATACATTGTTGGAGGCATAAAAAGCAACGCAAGTCTTTTCTCGCAATCTCTTGGCAGATC
AAGGCTAACGCTCTAGCAG TTTCTTACCAGTACTTCCACACAACCATCATTCTCATCATTGCCTGTATTT
CTCAGTCAAGGCATTCCAGTCTGACCAAAATCGGCTCGGTTGGCAACTGTACGAGCTTCTCAAATCGGCTGGC
CAGCGGCACCCTGTCTCTGGGAACCAGGATGGAACGTATTTAACCATGACCTCCAAAGAT GTGAGCTTATCTG
TTTCGGCGCAAGATCGCGAAGGCAAACCTAACCTATCTTAG GGAATTCTCTTCGGGATTCTGCAACACTGCT
CCAACTTTGGT CTTGTGATT GTATGACAAACCCGTTTCATGTCCGGATTGAGTGCTAACTTATGCAG ATGGACA
CGAGCTATTTTCATCAAGGCGTTCTCAGCCTCGCCCAAGGCAGTTGTCCCAGGATACGCGATTGGAGGCGCCAT
GTACTTCTCTATTCCATGGGCTCTCGGGACGGTGATGAGCTCTGTTGCCCTGGGGTTGGAGAACCAGCCCAAT
TTCCAACCTACCCTCGA GTCAGTGTGCTTGGACCATTATAGCTATATCGTCTTCTTACTGACATGTGCTA
TAG AGAATGACTTCTCTGAGGTCAGTGGTGGTCTTGTCTCCCGTACGCCCATGACCATTGCAGGCAAAG
GAGGAGCTGCAGCGGTCCTTCTCATGATCTTCATGGCTGTGACATCGACCCTATCTGCCAGGTGATTGCCGT
AAGCTCCATCCTGAGTTTTGACGTATATCGCGAGTACTTTAAGCGATCTGCGACGGACCGAGATGTAATCCGT
GCCAGCCACCTTGGCGTCATCTTTTTTCGCGCCCTTCTGCGCTGGATTGAGTACGATGCTACACTACGTGGGCG
TCGATCTCGGCTGGACACTGTACATGCTTG STATAGGGCATTCAAATCCCAAAGCTAGACCTCACTGACTGACGA
TGACTGCTACTATTACAG GCGTGGTTACCTGCCAGGAATCTTCCCTATGGTCTTTCACCGTGTCTGGCGCCG
ACAGAGCAAAGCTGCTGCCATTTTGTGCGCTATCCTGGGATTAGCAACTGGTCTAGCCGTCTGGCTTACCACT
GCCGGTCATTTCCGAGGCGAGGTGACCGTGCCTACCACTGGCCAAGTGCTACCGTGCCTATGGCACCGTGG
CCTCGGCCTTCTCGCCATCCTCTACTCCGTCTGATCACGCTTATTGCCCCACAGGATTATGATTGGAGTGA
TTTCAAGAAGGAGAAGCTGTGCTGGAAAACTCGAGAGCGATTTGACCACAGTGCACCATGAAACACGCGAC
TCCACAGCAGGAGCATTGAGGACGGAGGCGTGAACAGCGCTGTGTGAAAGCACAGGAGCTGAAGCGATGGG
GTCCGATTGCAGCCTTCTGGGCGGTCGCGACATTCTTGGGCCACTGGGTGCTGTGGCCACTTCCCATGTATGG
CTCGCACTATGTGTTTGGCAAGGGTTCTATATTGCTTGGGTAGTGGTTGCCATTATCTGGCTTTGGGCAACA
ATGTTTCGTTGAGACGCTCTACCCCATTTGTCGACGGGGTTACCAGCAGATTTTGCAGGTCTACCGAGGCCTTC
GTGGACGACAGCCATTGCCCGCCGTTGCAAAACCTGGAGGAGAGTCTGCGGATGGTTCAATAAGTGATGGCGC
GCAGGGCGAGCAAGTTAAGGCT TAA

Referencias

Verde: intrones

Amarillo: cebadores RT-PCR para amplificar ANID_02598.1

Rojo: cebadores “nested_PCR” para amplificar ANID_02598.1

Secuencia genómica ANID_07557.1

```
ATGTCCTCAGTCGGAACCTGACCTAATCCCTCAGGGAACGGCGTATGGCCTGCTTATTGGCCTCGGGCGTCTCT
TCTGCGGGGTGATTCTTATTGCCATCAAAGTGCAGAAGGCCTATCTATCCGAGGATTCAGCAACTTCGGAGAT
GTTTATGGTCGCGAACAGATCTGTTGGAACAGGACTGACAGCCTCAGCGGTATTTTCGTCGTGGATGTGGATC
AATGAGACAGTTTTATGCGCCGCCATGTGCTATAGAGATGGATTGGCTGTGCCTTTGCTACGTCTCTTGCTTA
TACATGTAGTCGAGCAGGCTGACAAAAACAGTGGTGGGGATCAGGTCTCTGCTTCCAGATTGCGCTCATGGCT
GCTCTCGGAGTCATGGC CAAGATTTCGAGTGCCG TATGCTCATACTTCATTGGAGATCATAAAAAATGAGATATG
GCACAATTGGACATTTGGTCTTCATCTTCTTGAACCTGGTCAACA ACGTCTTTGGCTGTGCTTCT ATGATTTT
AACAGGATCTCAACTGGTATCTGGAGTTTCTGGCATGCACTTTGTTGCAGCCACCATTCTGATTCCCTTGGGA
GCTGAGTAGCCCTGGGATAAGTCGGAAACGACGAAACTGATCAAGCTTCTAGTGGTCTTGTATACTGCTGTTG
GAGGTCTCAAAGCCACCTTTCTGACAGACTTCCTGCACACGGCTGTGCGCCTTATTCTCATTATATATTTCTAC
CTTGTCTGTTTTGACGAATGAACATATTGGCGGACTGGCGGTCTCTATGATAAGGTGATGGCCACAGCAAGC
GAAAACCTATATCCCGACAACACTACGAGGGGTACTACTCACCATGAAGTCAAAGGGAGC AATCATCTGGGGT
TGGTTC TGAAATTTGGGAACCTGGCCCTGGTTCATCAT GGATACTGCCTTCTGGCAAA AGTCCTTTGCCAGCGA
GGTCAACTCAACTGTACCAGCATATAACCTCGCCGCGATCGCCGTCTTTGGTATCCCATGGGGTCTAGGGACA
GTTCTTGGACTATCCGCCAGAGCACTTCATCTCACACCCATATTTCCCGACATATCCCGCCGACATCACTGAGA
CAGAGGTCTCAACAGGTCTGGTGTATGCCATTTCTTGTAAAGCTCTCATCGGTGACTCTGGCATTGTGCGGTT
TTTTCGTCTTCTTTTCATGGCTTTGACTAGCACTGTATCGTCTTCCATGATTGCGGTGACTGAGTATCCTCTCG
TTCGACATCTACAAGACATATTTCAATCCCAAAGCAACAGACAGGAAGCTGCTCAGAGCAAGCCACGTACCG
TGGTCATTCATGCAGTCTTCATTACCGGCATCTCAATTGCACTGAATTATGGCGGCACCAACATGACCTGGCT
TGGTTACTTCAGACCCGCTCTTTTCTGCTCTGGAATCATTCTCTCGGCCTGACTCTTTTCTGGAGCGGCCAG
ACAAAACCTGGCCGCAATTCCTCGCGCCTGTCTTGGGGTTTTTTCACAGGACTCGCAATCTGGCTGGGTACCGCGC
ATGCTCTGTACGGCGAAGTGAACATGATAACAACAGGGAACCCCTACCTGCACTCTACGGAGCTATTGGGTC
TTTTTTCTCCCCTGCTATCTACTCAGTTGTGATTTCTCTCTACAAACCCTACAAATTCGACTGGCGGATCTTC
CTCCGCATCGAACTCGCTGCGGAAGCCCAACTCCACAGCGCCGACAAATCAAAAAGCCACAGTCATTGAGTCAG
AAGTGAAAGAAAAATCCGGTACCAATACCCCAAGCGCGACACCTCGGACGCAGCCGACGCCACAACCGCAAC
TGCGGATCCCGAACACGCAGCCGCCCTTGAGAAGCCCAATCCCGCATCAAGAGCAAATCAACTCCCGTCTCC
GAATCAAGCCTAGACGACATTCGCCACCCCTTCGATGAAAAGACATTAAGAGAAGTGTACCGCTGGATGAAGA
TAGCCTGGGTCATCTTTGTAGTCATCGTCTGGAACCTTCATCCTCTGGCCGATGCCGCTGTACCGGAATTA
CATCTTCAGCAAGTCGTTCTTCTCAGGTTGGGTATCCGTGGCTATTGTCTGGCAATTTTTTGCCTTCTCTGCT
GTTGTATCTATCCGCTATACGATGGACGGTATGAGATCGACAAGGGCGCTCGAGG
```

Referencias

Verde: intrones

Amarillo: cebadores RT-PCR para amplificar ANID_07557.1

Rojo: cebadores “nested-PCR” para amplificar ANID_07557.1

Construcción “Δ2598”

Secuencia ANID_02598.1

```
TTCCCTGAGGAAAGTTGTGCGGTGCGGGATAGGTATGTCTGCTGTGTTTACTGCCCACTACACAAGCTACCATA
GTGCAAGAGCAACTCAATGTGCATAAGTCAGGTGGCAGATCGTCTCACAAGCATCACAGGATGGCCCAACGAG
AAACTTTCATGCCAATGCAGGAAATAGGCTGACCATGTCTGACCCTCGTGCCGAAGAGAATCGTCGGAATAAC
TGGGTCCATTCGCGCACGAGCG AAAAGGCAGTCCAGCTCTCT TACTGGAGAAGAGCATATTTTTGGATATTACC
```

GGTGCCCTCGTTCCGGGTGGCCAAGTCCAGATTGGAAAAGCCGTTAATCGCTCCGATTTGGGATCCAGCCCA
ACCGCTGATTGCATTTCGATCACAATGGCTGCTGGGCAGCTAAGTCAGACCACACCATTTCTCAGCTTCAAGGC
TAAGCTGGATGCTAGTCATATATTTCTTGAAACGCACAGTTACGCGCTTAATGTCTCAAATCGTAGAATTGC
TCTGCTTCAACCCATCAGTGGTGGCGATAAAAATCGCCGACGGGAGACCTCCACCTAGAACGCTGAGGAGGTGA
TCGATGATGAAAAGTGCCAGCAGTAAGGCCCGGATTGCCGCTCGTAGCTCGTTTTCGACACCAACTTACAAGGC
CTCTGTCCAGGTCTAACCTCCATGAGGGTGGTGGATTGTATGATCGACGAGCACACCATCGATGTATATA
ACATCAATGTGGGCCCCGATCGCGCAATGCCCGAGATCCAACTAGCAGACCCGGCCAAATTATTGGACCATTC
CTGGTTAGACTTCTTGACTTTTTTCTAGCATCTTGCTTCTCGGGCGAGAGTCTATATCTGGACGGCTTTTTCT
GGGTTCCCTGGTCCGGGCCCTTTCGCCCCGGGAAAGATTAGCACTCAATCATCGCTAAACCAACTGATCATG
GAGCACCAAGTGGTGGGAGCCCTCATGTCTCTTCTGCTTAGTCCAGTGAATTTCTGGTGTCTCCAAAAGT
GCCCCGGTTTCGACTCTACTATGATCAAGGGCCGAAAACACGAGAGAAAAGCCCGTAGCTCACCAAAGGCTT
TAGTAGGGCTGATTCTAGAGATCAATGAACCCCTGGGGTCGGAACCCTGGATTATCATGCAGGCTGCTCGTGA
AATGACTAGCAAAGCACCTCATCTCCTGCATTGATCAAGTCATTGTGGATCATATCTTGCTCATGAGCTCTGA
TCCTGTACCCCTCACCCCGAAGGCCATGATCAGTCTCATTTAAGCATACATTAGTCCGTCTGTTCCACGAGC
TTAGTAGCTGAGTTTGAAGTCAATTATTGGTGTGTCAACCTCCCATCCTTGCATAACAGTACTGATTGACC
GATGGTTGGCCGTGCTCTTCTGTGCTGCTACGCTAGCATCACAGATGCGAGACAGCGGTTCAACCGCCG
CTGTGCGAGGCGGTTGGGTACATTGTGCTGCTCCTCATCGGAGCCATCATCGCTCTGGGTATGCAACCGCCG
AATAAAAGCTAGCCGCTGAAGCTGACTTGGAGTAGTGATGATGTTGGTTACCAAGGTGCTCAAAAAGACA
GGGAAGACAACAAAAGACCGAGATGTATGCATTCACCCTCGTCGGGGCGTCTATACTTGCTGATACTGAT
ATATTGCAGGTTTATGACTGCCAATCGAACCGTCCGGACTGGTCTCACTGCCTCAGCTGTTATCTCGGTTCCG
CTCTCCCTCGTCCAGTCTGTTCTCAATTTTCGTCTAACAAAAGCCCTAGTCTGGTTATGGTCAACTCAGCTG
CTCGGCTCTTCTTCCACCGGCTACGACTATGGCGTTTCTGGCCCCCTTCTGGTTTCGCTGCCGGTTGCAGTCCCA
TGATCGTCTTCTTCGCCCTAGTGGGAATTTTCATGCAAGCGCAAGATCCCAGAGGCCACACCTCGCTCGAGGT
GGTTCGCATTCGATACGGTATATTCGAGCCCTTATCGCTGTGGCTGCCACAGGCTAAACGCTCTCCAGGCCA
CATTGCCCACGCTGTCTTCATGGTTCTCTGTCTTGTGAACAATATCTTCGCCAGCGCCAACATGCTTCTCGGT
GCATCGGCTGTGATCTCGGCAATGTAGGTTCTGGAGTAGACCGTCAATCTGAGCCTAGCCAGCTGATTGCCAC
AGCACCCGATGCATATAATCGCCGCAACATCTCTGCTGCCGTCGGTGTGACTGTTTATACATTGTTGGAG
GCATAAAAAGCAACGCAAGTCTTTTCTCCTCGCAATCTTGGCAGATCAAGGCTAACGCTTAGCAGTTTCTT
CCGACTACTTCCACACAACCATCATTCTCATCTTGCCTGCTATTTCTCAGTCAAGGCATTCCAGTCTGACCA
AATCGGCTCGGTTGGCAACTTGTACGAGCTTCTCAAATCGGCTGGCCAGCGGCACCCTGTCTCTGGGAACCAG
GATGGAACGTATTTAACCATGACCTCCAAAGATGTGAGCTTATCTGTTTCGGCGCCAAGATCGCGAAGGCAAA
CTAACCTATCTTAGGGAATTTCTTTCGGGATTCTGCACACCTGCTCCAACTTTGGTCTTGTGATTGTATGAC
AAACCCGTTTCATGTGCGGATTGAGTGCTAACTTATGCAGATGGACACGAGCTATTTTCATCAAGGCGTTCTCAG
CCTCGCCCAAGGCAGTTGTCCCAGGATACGCGATTGGAGGCGCCATGTAATCTCTATTCCATGGGCTCTCGG
GACGGTGTGAGCTCTGTTGCCCTGGGGTTGGAGAACCAGCCAAATTTCCAACTACCCTCGAGTCAGTGTG
GCTTGGACCATTATAGCTATATCGTCTTCTTACTGACATGTGCTATAGAGAATGACTTCTCTGAGGTCAGT
GGTGGTCTTGTCTCCCGTACGCCCCATGACCATTGCAGGCAAAGGAGGAGCTGCAGCGGTCTTCTCATGA
TCTTCATGGCTGTGACATCGACCCTATCTGCCAGGTGATTGCCGTAAGCTCCATCCTGAGTTTTGACGTATA
TCGCGAGTACTTTAAGCGATCTGCGACGGACCGAGATGTAATCCGTGCCAGCCACCTTGGCGTCATCTTTTT
GCGGCCTTCTGCGCTGGATTGAGTACGATGCTACACTACGTGGGCGTGCATCTCGGCTGGACACTGTACATGC
TTGGTAGGGCATTCAAATCCAAAGCTAGACCTCACTGACTGACGATGACTGCTACTATTACAGGCGTGGTTA
CCTGCCAGGAATCTTCCCTATGGTCTTACCCTGCTCTGGCGCCGACAGAGCAAAGCTGCTGCCATTTTGTG
GCCTATCCTGGGATTAGCAACTGGTCTAGCCGTCTGGCTTACCACTGCCGGTCATTTCCGAGGCGAGGTGACC
GTCGCTACCACTGGCCAAGTGTACCGTGCCTATGGCACCGTGGCCTCGGCCTTCTCGCCATCCTCTACT
CCGTCTGATCACGCTTATTCGCCCACAGGATTATGATTGGAGTGATTTCAAGAAGGAGAAGCTGTGCTGGA
AAAACCTCGAGAGCGATTTGACCACAGTGCACCATGAAACACGCGACTCCACAGCAGGGAGCATTGAGGACGGA
GGCGTGAACAGCGCTGCTGTGAAAGCACAGGAGCTGAAGCGATGGGGTTCGGATTGCAGCCTTCTGGGCGGTG
CGACATTCTTGGGCCACTGGGTGCTGTGGCCACTTCCCATGTATGGCTCGCACTATGTGTTTGGCAAGGGGTT
CTATATTGCTTGGGTAGTGGTTGCCATTATCTGGCTTTGGGCAACAATGTTTCGTTGAGACGCTCTACCCCAT
GTCGACGGGGTTACCAGCAGATTTTGCAGGCTACCGAGGCTTTCGTGGACGACAGCCATTGCCCGCGGTTG
CAAAACCTGGAGGAGAGTCTGCGGATGGTTCAATAAGTGTGCGCGCAGGGCGAGCAAGTTAAGGCTTAAAT
GTCTCGCTTTGCAAGCAGTCTGAGTGCAAAATAGTCACATAGATATAATAGATGTACCTCGATTGGACAAGAT
TCGCTCTTCTATTTCCGACGACTCTTCATTAACCTTCGAGTAATACTATAGTCTCAACACAGCACCTTCTGA
TGATGAACCCATAATGGAAGACCAGTGTAGTCTTGAACCAGCATCCCTGCTCCAACGCACCCGCGGAACCCGAC
AGCATTCTTCATTGCGAGCGCAGCCATAAATGACTTTTTCGAATACTCGCACTGACCCCTGAAAACATAGGCC
AGCATCACTCTGAACAACCTTGTCTGCTCTTCCCATGTGCGGAGGTTTTGATATGGGCAGAAAACGGGGACGAA
GATCCTCAGGGCTCGGTCAATGCAGATCAGTGGGGATTAGTTTTGCGTGGTATTGCATCATTTTTCCGCTAGTAC

```
GCTGGCTGACACGGAATGCATTTCTCCTATTAATCACCTTGATTGTTTTGGAGTATCAATTACGAATTTCTAT
GGCAAGCGACTACGACATCAGTACCTATATCCTTTAACGGCTGCCAGTGCGCCAACACCCGCACACTATCTGT
AAAAAAACCACGGTGGTCCCGGATTTGTTGAAGTTCTGCGCATGAAATGCTTGAAGCTGATATAGAAGTTGCT
CTAAAATACTGACACCCAACGACCACCAGAGCGTATATTGGAGAGTCAAGCACACTCCCCCTAACAATGATAT
FGGTAGGCCAAAGTCTCCTGCGGTAACAAACTGATAGCTGGGGGTTGCGAGTACTGTGCATCACACGACATAG
TCCAGACTTCGTATCATTCTTTTATAGGTACATCAAGTACAATATCCTCGTTCATGGCCCCGTAACGGGGTTC
CAGAAGGGGCATACTGAACAGTTATTACGCAGCAGACGCTAATAATACAGCCCTGAAAAATGATGAAAAATGTA
TTCAATTCCATTTATACGAGATGCAGAGCCTGTCTGTTACCTCGGAGGATTCTAGTCTGACCAGAATCGGTC
AATCGACTGTAGGTATCTAGTCTATCATGTTTGAATTTCCACAATATCAGAGGCCCAAAGGATGGAGCCCAAC
CGTTCCGGGGCCCCAGGAGCTGCGAAATCTCCTTGACCAGGCGGCATCCCCAGTCGCCCATCCACCATCGATCAC
GGAGATGATGAAGAACCGCACAGTAATGTGCGAAGATGGTAAGGGCCAGCGGTTGCTGCTCACGGACTAGGTC
GAGGTATCGAGATGGGAGGCGGAACAGCCACCAGAGCAATCATGGTCGGTTCGCCCCCTTTACTGAGCATT
TCTAGTGATCGGTCAAGTTTTGAAATCGCGTCTCATAGATGCTGGTTTCGTGAGACGGGTCTTTCTTTGCGC
TGGCGTTATTGAGATTTTCGCATGGCAAGTATAGTCAGGGTATAAGTGTGGAAGCTGGTGGTAGGGGTCAGT
TTGGGTGAAGAGGGCCTTCAGTTCGCCCTTTTCGACCTTATCGATCACCTCTGAACTGGACGATAACCCTCGC
ACAGTGTGAAACATGTCGAGTAGTTTATGCAGTGATGGTGACGACGTTCTTTGTTTCATCATCCTTTTCGCGGAC
TCGATTTATCCCCGCTTCGGCCAGCGAAGCGGACGCCAGTTCATACATCAGCAGAATACTGGCGGTAGAAAA
GGCCCGGTTGCACCCGAGACCCAGAGGGCTTTTCGGCAACCGGGGTGACCCGAGCCACAGCTTGACTGTAGTGC
GCATCAGCCTCCTGCAAGTAAGCCTTCCGCTTGTCCGAGCCAGCTTCGCTGGTATATGCAAGCTGGATAGCGG
ACAGAGCCAGCGTGTGTGGCGCAGCGCTGGGTATCGGTCCGACTCGCGCCGGATGAGCACCTGCCATGACTG
GTCTTTGCTCTTATTGTGTATTAGCGATCGCTCGGTTGAGGAGCGCCAATTATCCCACAGCCGTACATCGCCC
AGACCCGAGCCTTGCACGTGGCAGGAC
```

Referencias:

Gris: 5' UTR ANID_02598.1

Blanco: ANID_02598.1

Azul: 3' UTR ANID_02598.1

Verde: cebadores para amplificar la región 5' UTR ANID_02598.1 (las "colas híbridas" no están representadas)

Amarillo: cebadores para amplificar la región 3' UTR ANID_02598.1 (las "colas híbridas no están representadas)

Secuencia del gen *pabaA*

```
TTGCCAGATCTGTAGAAAAGGTTCTGCGTTTTCTACCAAGAACAGTGTTGGTCTGAATTTGTTTTGGGTCTATATT
GCTTGATTGTGCCGATGTTTTTGTCTACGGCCTGACACCGTGAGCATATTCTATGACCCCGGCTCAAAAAGCC
ATCGGGTTCAACCGGTCTGGCAGTATATTCTGCAATTACCACTATTTCCAGCAACTACATGAGAAGGCATTGC
TCCAGAAACCGACTCCAGACCGGGCTGAAGCTATGGTCTATTGGTGGGTACGCTTTTACACGAGCTTGCTCA
TAACCTCGTTGCGGACCATAGTTCTGCACATAGCTATTACACGTATGTTTGAGACCCTTGACGCCTTTAGAA
CGACTGTGATTGCCAGACGCTAACATTTCCGCTGCAGAGAGAGCTTTGTGAGTCAATACTTCACTAGAATTGC
AGCCAAGATCGCCCATGCTGCTACCAAGAGGCCTAATCCTGAGCAATGACAGCGTTGTAGTTAGAAGACCATG
TTTTGTCTGTCAAATTTGCCAGATAGGGTAGACTATAGACTTTTCTGCGACTTTGCAAATATTGTTTTATGAG
AATTAACAAATTGAGGTAGTCGAACCGTGGATCACCCGACGGTGACAATCCTGGTAGTAGATTGAAGGCTCCA
CTACGTTTCGTCTTTTCCCCCGGAAATCTGGAAATCTTCGATTTCGCCGATTGCCACCTTCAAACATCAATTC
TCTGTACGCTCTGAGAGTTTTTCGAAAACATATTTATTTCAAGACTAGTCTTTATCATGCCCATCTCACATCA
GATATAAGGATGGTGGTGCCACCTGCCAGTCATCTTTTAGTGTTGTCGATCCGCTGTTTTCTGATATAGAAGA
GCCTGATCCTCTTCGTGATCATCATTATATACGCTATCCTCGTTTTAACTCCTAACTTGTTTAAACATCTTCT
CGGTCTGATTAACCTCAGCATACTCTTCAGGGCGATATCCGTGATGGCACCGCTCCTTGGTGATTGGGCAGCAT
CGAAAGCTCGCCGGGACAAGGAAGCGGGCCAAGGTGTTTCGTCAGAAAAGTATACTGTATGTGGATGCTTATGA
TTCTTTCTCTTACAATGTGGCGGCTATGATTGAAGAGATTCTTTGGGGCTCGAGTCACGGTGATGATGATTGAT
GCGGAATGGCCCGATGGCAACATGCTGGAATGTCTTCAACACTACGATGCAGTCGTTCTTGGACCAGGACCAG
GAGATCCCAATGTCCCCGAAGATGTCGGTATTATGGCAGATATCTGGAACATTGACAGCTCGCATATGCTGCC
TGTTTTGGGTATTTGCCTTGGTTTTCCAGAGTTTATGTCTTCATTACGGCACCCCTATTGGGCGATTACCGGAA
```

CCTCTGCATGGGCAGGTTACACGAATTACAACAGCTGAGAGGGATATCTTTGAGAATCTACAGAATCTCGAAG
TCACTCTGTATCACTCGCTATATGCAATGTTGGATGGTCAAGCAGAGTCGGGTTTCATGCGACGGGGCTGCCTC
ACCAACTCCGGCCCTTGACGTACTTGCTGGCTCTCTATCCAAGCAGACGATCTTTGTTCTTCTGTACGCAG
ATCCCGATGGCTGTTTCGACACACTGAGAAGCCTTTCTGGGGTGTGCAGTTTCATCCTGAGTCCTGCAAGTCTG
ACCGAGAAGCATGCAGTCAACTGCTCCGCAAGTGGTGGGACATGGCCATCAAATACAACAAAAGCCGTCATCG
TGATGGCTGTGGGAGTCTATCTATAGATATGATTTCGATCTTCATGTGAAGACACTCGCTTGCCAAATGTTGCT
TTCACAATGGTGAATTGGAGTGTGTCTCTTCCGCTAATTGCGCCTCGAGATTGTTTGATACATGTCAGCTGG
ATGCTGAAGGGCTATGCGAATTATTCAACGATCCGGGCGTTCCGACAGTTTTGTTTCAGTCGAATGGCAGATA
CAGCATTATTTCTGTGCCAAGTCCGGGAAGCTGGAGGCTTGAGTACTACTCACAGCGGCACTCTCTATCAATG
CAACGCCAATCCGCTCCTCCAGTGGGTGCAACGCCTGAAAGATTTCGGACATGAGACTTGAGGCTACCATGT
CTGTTTCTCAGTTTTTGGGACGTCTTAAGGTATTTGATGGATATGAAAAGGTCGAATCGGGGAACATGAGCT
TCCCTTCTGGGGAGGTTCTAGGCTATTTTTCTACGAACCTGGACTGGCTTGCTTGTCTACCCCAAACAC
GAAAGTGAAGCATCGCAGATGACCATTGCTCTCAGGAGAGCGCCAGTGTGATGATCCACCAGATGTTAGCC
TTCTGTGGACTGACAGGAGCGTTGTTGTTGACAATGAGACTGGTCGAGTAATTCTACAATCGACTAGAGAAGC
AGACAATCTACCAGCTGGCTGGTTAGACCAGGCTCAAAAACACTGGAACGTTTTCTGTTGATGGACATTCTG
CCAAAACCAAAGAATTCTGCCTCCGACGACGAGTTTTCTTGATTTCAGTTTTTGGGCCGGGAGTCATCCAGTTTT
CCAGCGAGAATGCCTACCGAAATCAGGTTGAGGCTTGCAAGGACGAACTGAGGGCCGGTGAGTCGTACGAGCT
GTGCCTTACCTGCGAGACATCCATCACTTTACCATCGCCCCGATGTTCCCATCGGCCGCATTGAGTTCCTTGG
AAATTATACAAACGACTGCGCATGTACAATCCTGCTGCGTTCAGTGCCTTTGCGAGACTTGGAATAGCAAGA
TTGTGAGTAGTAGCCCTGAGTGTCTTCTCAACTGGGACCGACACTCGACATTGGAGATGAAGCCAATGAAAGG
AACTGTTGAAAGTCCGACAGCATGACAATGGAAGGGCACGGGAGATTCTTGGATCAACCAAAGAAATGGCT
GAGAATCTCATGATTGCGGATCTCGTACGGCACGATCTCTATGGCATCTGCGGTGCTGGCAACGTTTCATGTTG
AGAACTTCTCAAAGTGGAGGATCACGGTCGAGTATATCAAATGATAACCCATGTCAAAGGTCATGTTGACCC
ACATCGACCGGGATATGCTGCAAAGAGCCTTCCACGACTGCAGTCGTGCAATATGTCAGGATATGGACTCACG
GCATTGCAGCGATGTCTACCACCAGGGTCCATGACTGGAGCTCCAAAGGAACGATCCTGTATGCACCTTCTCT
CAATTGAGGGCCGGAAGCGCGGGATTTACTCTGGCGTTATGGGATTTCTCGACCTTGGAGGAGGAGGAAGCTT
TTCTGTCTCAATACGCACGGCATTACATCATCTAACGACAATGACGACGTTCAAAGTGGCGAATTGGTGTCT
GGAGGCGCGGTAACCATGCTGAGCAGCGCCGACGGTGAATGGGCCGAGATGCTCACCAAGCTACAGACTGTCT
GCGGCATATTTATGCCTTCGCACGCGAAATGATGCTGCGTACGGGCAAACAGCGCTGGTATTACTATTAACA
TGAATATTTTCTGGGATTTGGCGGATATAATGCATGGCAACGATCTTCAACAGTTGTCTAGGAACGATTAGTT
GTGAACTGGATATATTTAGACGCGATAGATGGGTGCGATTCAACATTTCAGCGTGGGAATTGGCGTTTGTTCG
ATTATTATGATAACCTTGAATCAGTACCCAAGGCTTTATGAAGCTCGCAGAATAAGAATCGCGCGATGCCTGA
ACCTTTACCTAACCTATTTTCTTTGATTGATTATACTTATTTGCGTCAGACTGGAGATGCAAATGTGCAAA
CAGGGCCTCATAGTCGCGGAGAGCAAGGTATCGAACCGAGCTTCTCTTCTGCAGAACTACGTCTTCCATTAGA
GATTGTATTATTTTACTCCTCATTTCGAGCATAGAAGACTGAAACCGCAACTTCGATGGCAGGCACTCAGGA
CCCATCCTCGCTGGAGGAAATCTTATGGCGATCTCCGTCGCATGTCCAGATGATGGGCGGATACCTTCATTCA
ACAATAGTAGGGATCTCCCTCACTCCAACATCATTTTTCAATAAATGCAATTAATTGTCTTCCGTGATAGTC
CTCTTTTACTTTCGCGAGTCTCCCTTTTTTCGACGCAACCTCGAACAATGCCTCGTTAGCCATTCAAGCAAAT
ACAATGAAGCCTTTTCGTCATTTTGTGAAACAAGGGAAGCCTTCGAGGCCGACTGAAGACTATGCAGGGTCT
GGAGTTCATGGTTGCTTATGACCCATTGCAGGCTGCTGCAGGCGCAACGCCAATTTGTGCACGAACCGTCC
AACGTGTGGGTAATTCGGAACAGACAAGGCGGAAGAGGTCCGGGTTTGGAGACGAGGTGCTGGTTCTGGCTA
CGTTCTTTGTGGTGGGGACTGCATTTACATGGCCCTTCAGCTGCGAGCGTGATAGGGAACAGAATAGTATG
CCTTGTGGCC

Referencias

Amarillo: cebadores para amplificar el gen *pabaA*

Construcción “Δ2598”

AAAAGGCAGTCCAGCTCTCTTACTGGAGAAGAGCATATTTTTGGATATTACCGGTGCCCTCGTTCCGGGTGG
CCAAGTCCAGATTGGAAAAGCCGTTAATCGCTCCGATTTGGGATCCAGCCCAACCGCTGATTGCATTTCGATCA
CAATGGCTGCTGGGCAGCTAAGTCAGACCACACCATTTCTCAGCTTCAAGGCTAAGCTGGATGCTAGTCATAT
ATTTCTTGAACGCACAGTTACGCGCTTAATGTCTCAAATCGTAGAATTGCTCTGCTTCAACCCATCAGTGG
TGGCGATAAAAATCGCCGACGGGAGACCTCCACCTAGAACGCTGAGGAGGTGATCGATGATGAAAAGTGCACG

AGTAAGGCCCGGATTGCCGCTCGTAGCTCGTTTCGACACCAACTTACAAGGCCTCTGTCCAGGTCTAACCTCC
ATGAGGGTTCGGTTGGATTTGTATGATCGACGAGCACACCATCGATGTATATAACATCAATGTGGGCCCGGATC
GCGCAATGCCCGAGATCCAAACTAGCAGACCGGCCAAATTATTGGACCATTCTGGTTAGACTTCTTGACTTT
TTTCTAGCATCTTGCTTCTCGGGCGAGAGTCTATATCTGGACGGCTTTTCTGGGGTTCCTGGTCCGGGGCC
TTTCGCCCCGGGAAAGATTAGCACTCAATCATCGCTAAACCAACTGATCATGGAGCACCAAGTGGTGGGAGCC
CTCATGTATCTTCTGCTCTAGTCCAGTGAATTCTTGGTGTCTCCAAAAGTGCCCGGGTTCGACTCTACTAT
GATCAAGGGCCGGAAAACACGAGAGAAAAGCCCGCTAGCTCACCAAAGGCTTTAGTAGGGCTGATTCTAGAGA
TCAATGAACCCCTGGGGTCCGAACCCCTGGATTATCATGCAGGCTGCTCGTGAAATGACTAGCAAAGCACCTCA
TCTCCTGCATTGATCAAGTCATTGTGGATCATATCTTGTCTCATGAGCTCTGATCCTGTACCCCTCACCCGAA
GGCCATGATCAGTCTCATTAAAGCATAACATTAGTCCGTCTGTTCACGAGCTTAGTAGCTGAGTTTGAAGT
CAATTATTGGTGTCTGTCAACCTCCCATCCTTGATAACAGTACTGATTGACCGATGGTTGGCCGTGCTCTTCT
CTGTGCGCTACGCTAGCATCACAGATTGCCAGATCTGTAGAAAGGTCTGCGTTTCTCACCAAGAACAGTGTTC
GTCTGAATTTGTTTGGGTCTATATTGCTTGATTGTGCCGATGTTTTTGTCTACGGCCTGACACCGTGAGCAT
ATTCTATGACCCCGGCTCAAAAGCCATCGGGTTCAACCGGTCTGGCAGTATATTCTGCAATTACCACTATTTT
CAGCAACTACATGAGAAGGCATTGCTCCAGAAACCGACTCCAGACCGGGCTGAAGCTATGGTCTATTGGTGGG
TCACGCTTTCACACGAGCTTGTCTATAACCTCGTTGCGGACCATAGTTCTGCACATAGCTATTACACGTATGT
TTGAGACCCCTTGACGCTTTCAGAACGACTGTGATTGCCAGACGCTAACATTCCGCTGCAGAGAGAGCTTTG
TGAGTCAATACTTCACTAGAATTGCAGCCAAGATCGCCCATGCTGCTACCAAGAGGCCTAATCCTGAGCAATG
ACAGCGTTGTAGTTAGAAGACCATGTTTTGTCTGTCAAATTGGCAGATAGGGTAGACTATAGACTTTTCTGC
GACTTTGCAAATATTGTTTTATGAGAATTAACAAATTGAGGTAGTCGAACCGTGGATCACCCGACGGTGACAA
TCCTGGTAGTAGATTGAAGGCTCCACTACGTTCTGTCTTTTCCCCCGGAAATCTGGAAATCTTCGATTCCGCC
CATTGCCACCTTCAAACATCAATTCTCTGTGACGCTCTGAGAGTTTTTCGAAAACATATTTATTTCAAGACTAG
TCTTTATCATGCCCATCTCACATCAGATATAAGGATGGTGGTGCCACCTGCCAGTCATCTTTTAGTGTGTGCG
ATCCGCTGTTTTCTGATATAGAAGAGCCTGATCCTCTTCGTGATCATCATTATATACGCTATCCTCGTTTTA
ACTCCTAACTTGTTAAACATCTTCTCGGTCTGATTAACCTCAGCATACTCTCAGGGCGATATCCGTGATGCA
CCGCTCCTTGGTGATTGGGCAGCATCGAAAGCTCGCCGGGCAAGGAAGCGGGCCAAGGTGTTTCGTGAGAAA
GTATACTGATGTGGATGCTTATGATTCTTTCTTACAATGTGGCGGCTATGATTGAAGAGACTTCTGGGGC
TCGAGTCAAGTGTGATGATTGATGCGGAATGGCCCATGGCAACATGCTGGAATGTCTTCAACACTCAGGAT
GCAGTCGTTCTTGGACCAGGACCAGGAGATCCCAATGTCCCCGAAGATGTCGGTATTATGGCAGATATCTGGA
ACATTGACAGCTCGCATATGCTGCCTGTTTTGGGTATTTGCCTTGGTTTCCAGAGTTTATGTCTTCATTACGG
CACCCCTATTGGGCGATTACCGGAACCTCTGCATGGGCAGGTTTACCAGAAATACAACAGCTGAGAGGGATATC
TTTGAGAATCTACAGAATCTCGAAGTCACTCTGTATCACTCGCTATATGCAATGTTGGATGGTCAAGCAGAGT
CGGGTTCATGCGACGGGGCTGCCTACCAACTCCGGCCCTTGACGTAATGCTTGCCTGGCTCTCTATCCAAGCAGA
CGATCTTTGTTCTTCTGTACGCAGATCCCGATGGCTGTTTCGACACACTGAGAAGCCTTTCTGGGGTGTGCAG
TTTCATCCTGAGTCTGCAAGTCTGACCGAGAAGCATGCAGTCAACTGCTCCGCAAGTGGTGGGACATGGCCA
TCAAATACAACAAAAGCCGTCATCGTGATGGCTGTGGGAGTCTATCTATAGATATGATTGATCTTTCATGTGA
AGACTCGCTTGCCAAATGTTGCTTTCACAATGGTGAATTGGAGTGTGTCCTCTTCCGCTAATTGCGCCTCG
AGATTGTTTGATACATGTGAGTGGATGCTGAAGGGCTATGCGAATTATTCAACGATCCGGGCGTTCCGACAG
TTTTGTTTCAGTCGAATGGCAGATACAGCATTATTTCTGTGCCAAGTCCGGGAAGCTGGAGGCTTGAGTACTA
CTCACAGCGGCACTCTCTATCAATGCAACGCCAATCCGTCTCCTCCAGTGGGTGCAACGCACTGAAAGATTTCG
GACATGAGACTTGAGGCTACCATGTCTGTTTCTCAGTTTTTGGGACGTCCTAAGGTATTTGATGGATATGAAAA
AGGTCGAATCGGGGAACATGAGCTTCCCTTCTGGGGAGGGTTTCTAGGCTATTTTTTCTACGAACTTGGACT
GGCTTGCTTGTACCCCCAAACACGAAAGTGGAAAGCATCGCAGATGACCATTGCTCTCAGGAGAGCGCCAGT
GCTGATGATCCACCAGATGTTAGCCTTCTGTGGACTGACAGGAGCGTGTGTTGTTGACAATGAGACTGGTTCGAG
TAATTCTACAATCGACTAGAGAAGCAGACAATCTACCAGCTGGCTGGTTAGACCAGGCCTCAAAAACACTGGA
ACGTTTTCTGTTGATGGACATTCTGCCAAAACCAAGAATTCTGCCTCCGACGACGAGTTTCTTGATTGAGTT
TTGGGCCGGGGAGTCAATCCAGTTTCCAGCGAGAATGCCTACCGAAATCAGGTTGAGGCTTGCAAGGACGAAC
TGAGGGCCGGTGTGATCGTACGAGCTGTGCCTTACCTGCGAGACATCCATCACTTTACCATCGCCCGATGTTCC
CATCGGCCGATTGAGTTCCCTTGGAAATATACAACGACTGCGCATGTACAATCCTGCTGCGTTTCAGTGCC
TTTTCGAGACTTGAAATAGCAAGATTGTGAGTAGTAGCCCTGAGTGTCTTCTCAACTGGGACCGACACTCGA
CATTGGAGATGAAGCCAATGAAAGGAACTGTTTCGAAAGTCCGACAGCATGACAATGGAAAGGGCACGGGAGAT
TCTTGGATCAACCAAGAAATGGCTGAGAATCTCATGATTGCGGATCTCGTACGGCACGATCTCTATGGCATC
TGCGGTGCTGGCAACGTTTCATGTTGAGAACTTCTCAAAGTGGAGGATCACGGTCGAGTATATCAAATGATAA
CCCATGTCAAAGGTCATGTTGACCCACATCGACCGGGATATGCTGCAAAGAGCCTTCCACGACTGCAGTCTGTC
GAATATGTGAGGATATGGACTCACGGCATTGCAGCGATGTCTACCACCAGGGTCCATGACTGGAGCTCCAAAG
GAACGATCCTGTATGCACCTTCTCTCAATTGAGGGCCGGAAGCGCGGGATTTACTCTGGCGTTATGGGATTTT
TCGACCTTGGAGGAGGAGGAAGCTTTTCTGTCTTAATACGCACGGCATTACATCATCTAACGACAATGACGA

CGTTCAAAGTGGCGAATTGGTGCTGGAGGCGCGGTAACCATGCTGAGCAGCGCCGACGGTGAATGGGCCGAG
ATGCTCACCAAGCTACAGACTGTCTGCGGCATATTTATGCCTTCGCACGCGAAA**TGATGCTGCGTACGGGCAA**
AACAGCGCTGGTATTACTATTAACATGAATATTTCTGGGATTTGGCGGATATAATGCATGGCAACGATCTTC
AACAGTTGTCTAGGAACGATTAGTTGTGAACTGGATATATTTAGACGCGATAGATGGGTCCGATTCAACATTC
AGCGTGGGAATTGGCGTTTGTTCATTATTATGATAACCTTGAATCAGTACCCAAGGCTTTATGAAGCTCGC
AGAATAAGAATCGCGCGATGCCTGAACCTTTACCTAACCTATTTCTTTTCGATTGATTATACTTATTTGCGTC
AGACTGGAGATGCAAACGTGCAAAACAGGGCCTCATAGTCGCGGAGAGCAAGGTATCGAACCGAGCTTCTCTT
CTGCAGAACTACGTCTTCCATTAGAGATTGTATTATTTGACTCCTCATTTCGCAGCATAGAAGACTGAAACCG
CAACTTCGATGGCAGGCACTCAGGACCCATCCTCGTGGAGGAAATCTTATGGCGATCTCCGTCGCATGTCCA****
GATGATGGGCGGATACCTCGTCTCGCTTTGCAAGCAGTCGAGTGCGAAAATAGTCACATAGATATAATAGATG
TACCTCGATTGGACAAGATTTCGCTCTTCTATTTCCGCAGCACTCTTCATTAACCTTCGAGTAATACTATAGTC
TCAACACAGCACCTTCTGATGATGAACCCTAATGGAAGACCAGTGTAGTCTTGAACCAGCATCCCTGCTCCAA
CGCACCCGCGGAACCGCACAGCATTCTTCATTGCGAGCGCAGCCATAAATGACTTTTTTCGAATACTCGCACTG
ACCCCTGAAAACATAGGCCAGCATCACTCTGAACAACCTTGCTCGTCCTTTCCCATGTCGCGAGGTTTTGATAT
GGGCAGAAACGGGGACGAAGATCCTCAGGGCTCGGTCAATGCAGATCAGTGGGGATTAGTTTTGCGTGGTATTG
CATCATTTTTCCGCTAGTACGCTGGCTGACACGGAATGCATTTCTCCTATTAATCACCTTGATTGTTTTGGAGT
ATCAATTACGAATTTCTATGGCAAGCGACTACGACATCAGTACCTATATCCTTTAACGGCTGCCAGTGCGCC
AACACCGCACACTATCTGTAAAAAAACCACGGTGGTCCCGGATTTGTTGAAGTTCTGCGCATGAAATGCTTGA
AGCTGATATAGAACTTGCTCTAAAATACTGACACCCAACGACCACCAGAGCGTATATTGGAGAGTCAAGCACA
CTCCCCCTAACAAATGATATTGGTAGGCCAAAGTCTCCTGCGGTAACAAACTGATAGCTGGGGGTTGCGAGTAC
TGTGCATCACACGACATAGTCCAGACTTCGTATCATTTCTTTTATAGGTACATCAAGTACAATATCCTCGTTCA
TGGCCCCTAACTGGGGTTCCAGAAGGGGCATACTGAACAGTTATTACGCAGCAGACGCTAATAATACAGCCCT
GAAAAATGATGAAAATGTATTCAATTCCATTTATACGAGATGCAGAGCCTGTCTGTTTACCTCGGAGGATTCT
AGTCTGACCAGAATCGGTCAATCGACTGTAGGTATCTAGTCTATCATGTTTGAATTTCCACAA**TATCAGAGGC**
CCAAAGGATGGAGCCCAACCGTTCCGGCCCCAGGAGCTGCGAAAATCTCCTTGACCAGGCGGCATCCCCAGTGC
CCCATCCACCATCGATACCGA**GATGATGAAGAACCGCACAG**

Referencias:

Fondo verde: Región que comprende a 5'UTR ANID_02598.1

Fondo blanco: Región que comprende a *pabaA*

Fondo rosado: Región que comprende a 3' UTR ANID_02598.1

Fondo amarillo: cebadores utilizados para amplificar los tres fragmentos por separado.

Doble subrayado con fondo amarillo: “colas híbridas” de los cebadores

Fondo azul: cebadores para la “nested_PCR”