



## Revisión

# Papel de las subunidades alfa de proteínas G en los procesos morfogénicos de hongos filamentosos de la división Ascomycota



Ramón O. García-Rico<sup>a,\*</sup> y Francisco Fierro<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Pamplona, Pamplona, Norte de Santander, Colombia

<sup>b</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, Distrito Federal, México

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

### Historia del artículo:

Recibido el 10 de septiembre de 2015

Aceptado el 21 de junio de 2016

On-line el 4 de febrero de 2017

### Palabras clave:

Ascomycota filamentosos  
Proteínas G heterotriméricas  
Desarrollo morfológico  
Germinación  
Conidiación

### Keywords:

Filamentous Ascomycota  
Heterotrimeric G proteins  
Morphological development  
Germination  
Conidiation

## R E S U M E N

La división Ascomycota comprende alrededor del 75% de las especies fúngicas descritas e incluye especies de enorme importancia médica, fitosanitaria, agrícola y biotecnológica. La capacidad para propagarse, explorar y colonizar nuevos sustratos es una característica de vital importancia para este grupo de organismos. En ese sentido, procesos como la germinación conidial, la extensión de las hifas y la esporulación constituyen el eje central del desarrollo en la mayoría de los hongos filamentosos. Estos procesos requieren de una maquinaria morfogénica especializada, coordinada y regulada por mecanismos que aún están siendo dilucidados. En los últimos años se ha avanzado sustancialmente en la comprensión del papel que desempeña la ruta de señalización mediada por proteínas G heterotriméricas en los procesos biológicos básicos de diversos hongos filamentosos. Por lo anterior, esta revisión se enfoca en el papel que desempeñan las subunidades alfa de dichas proteínas en los procesos morfogénicos de los hongos filamentosos de la división Ascomycota.

© 2016 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Role of G-protein alpha sub-units in the morphogenic processes of filamentous Ascomycota fungi

### A B S T R A C T

The phylum Ascomycota comprises about 75% of all the fungal species described, and includes species of medical, phytosanitary, agricultural, and biotechnological importance. The ability to spread, explore, and colonise new substrates is a feature of critical importance for this group of organisms. In this regard, basic processes such as conidial germination, the extension of hyphae and sporulation, make up the backbone of development in most filamentous fungi. These processes require specialised morphogenic machinery, coordinated and regulated by mechanisms that are still being elucidated. In recent years, substantial progress has been made in understanding the role of the signalling pathway mediated by heterotrimeric G proteins in basic biological processes of many filamentous fungi. This review focuses on the role of the alpha subunits of heterotrimeric G proteins in the morphogenic processes of filamentous Ascomycota.

© 2016 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Los hongos filamentosos conforman uno de los grupos biológicos de mayor abundancia en la biosfera y tienen un importante impacto para el hombre, ya sea como patógenos de plantas y/o

animales, o en aplicaciones en diferentes ámbitos: farmacéutico, industrial, alimentario, agrícola, entre otros. En los hongos filamentosos de la división Ascomycota la unidad central de crecimiento es la hifa<sup>68</sup>. A pesar de su aparente simplicidad, las hifas son estructuras extraordinarias que permiten que estos organismos colonicen una gran variedad de hábitats. Cada hifa consiste en una serie lineal de células haploides vegetativas,

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [rovigar@hotmail.com](mailto:rovigar@hotmail.com) (R.O. García-Rico).

mono o multinucleadas, separadas por septos que permiten la migración de orgánulos y nutrientes entre células, y propician la compartimentalización de funciones, procesos ambos en los que resulta crucial la participación de las proteínas septinas<sup>4,70</sup>. Por una parte, el extremo apical es el que direcciona el crecimiento y, en condiciones nutricionales adecuadas, se elonga constantemente; por otra parte, las células subapicales pueden generar nuevas hifas mediante ramificaciones laterales que incrementan la superficie del entorno a ser explorada<sup>34</sup>. Esta dinámica de crecimiento en la superficie de medios de cultivo sólidos genera una colonia simétricamente radial que se expande a una velocidad constante<sup>66</sup>.

Con el fin de afianzar su supervivencia, los hongos filamentosos necesitan asegurar la dispersión de sus propágulos, razón por la cual desarrollan hifas aéreas que les permiten iniciar la elaboración de estructuras multicelulares de reproducción asexual que son conocidas como «conidióforos». La estructura del conidióforo es diversa; pueden ser simples o ramificados, y en ocasiones pueden estar agrupados en una estructura denominada conidioma. Estos conidióforos producen esporas asexuales, mono y/o multinucleadas, denominadas conidias. La regulación molecular de la conidiación es compleja y está sujeta a diversos factores del entorno circundante<sup>28,64</sup>. Una vez liberada, y después de un periodo de dormancia en el que alcanza su madurez fisiológica, la conidia germina. Para que este proceso ocurra es necesaria una señal medioambiental que indique la existencia de un ambiente favorable en el entorno y modifique la tasa metabólica de la conidia<sup>35,79</sup>. Esta señal externa desencadena un crecimiento isotrópico que rehidrata e incrementa el volumen de la conidia, al tiempo que ocurren cambios metabólicos característicos tales como la disminución intraconidial de manitol y/o trehalosa<sup>16,94</sup>. En un momento dado, el crecimiento deja de ser isotrópico para convertirse en polarizado, lo que conlleva finalmente la aparición del tubo germinal. En este proceso es fundamental la coordinación entre la actina y los microtúbulos para el establecimiento del citoesqueleto y el redireccionamiento de la maquinaria morfogénica al sitio de polarización<sup>3,84</sup>. Una vez la conidia ha germinado da comienzo el crecimiento vegetativo, con el mantenimiento permanente del crecimiento polarizado de la nueva hifa, hecho que los diferencia de las levaduras<sup>68</sup>. Posteriormente la organización funcional alcanzará su madurez cuando el sistema de vesículas secretoras direccionadas al extremo de la hifa se acumule temporalmente de manera estratificada en una estructura apical denominada Spitzenkörper, que organiza el crecimiento hifal<sup>69</sup>.

Como podemos ver, la conidiación, la germinación conidial y el crecimiento apical de las hifas son eventos que conforman el eje central del desarrollo en los hongos filamentosos. Se trata de procesos que requieren de coordinados y complejos sistemas de regulación en los que están implicadas algunas rutas de transducción de señales que son reguladas por mecanismos que aún no se conocen o que están siendo dilucidados. Una comprensión profunda de las bases moleculares de estos mecanismos es de gran importancia y tiene implicaciones prácticas. Por un lado, en el caso de los hongos patógenos, bloquear cualquier estadio de su desarrollo sería una forma efectiva de combatirlos, y conocer las vías de transducción de señal y los efectores que controlan el desarrollo permite buscar dianas terapéuticas sobre las que actuar. Por otro lado, en el caso de hongos de uso industrial, el conocimiento de estos mecanismos regulatorios puede permitir mejoras en aspectos como la eficiencia en la germinación y la tasa de crecimiento. En los últimos años, se ha avanzado en la comprensión de la importancia y del rol de la ruta de señalización mediada por proteínas G heterotriméricas en los procesos biológicos básicos de hongos filamentosos. Tomando en consideración lo anterior, el presente trabajo presenta de manera sucinta las características generales de las proteínas G heterotriméricas y profundiza en el papel que desempeñan las subunidades alfa de dichas proteínas en los procesos morfogénicos de los hongos filamentosos de la división Ascomycota.

## Proteínas G heterotriméricas

Este grupo de proteínas conforman una subfamilia denominada GTPasas heterotriméricas, incluida en la clase *translation factor-related* (TRAFAC) de GTPasas que contienen el motivo P-loop<sup>47</sup>. Esencialmente, estas proteínas G acoplan los receptores integrados en la membrana citoplasmática con una amplia variedad de efectores intracelulares, como canales iónicos o enzimas, lo cual hace fluctuar la concentración de segundos mensajeros en el citosol (por ejemplo, AMP cíclico) y desencadena una respuesta celular al estímulo proveniente del entorno<sup>55</sup>.

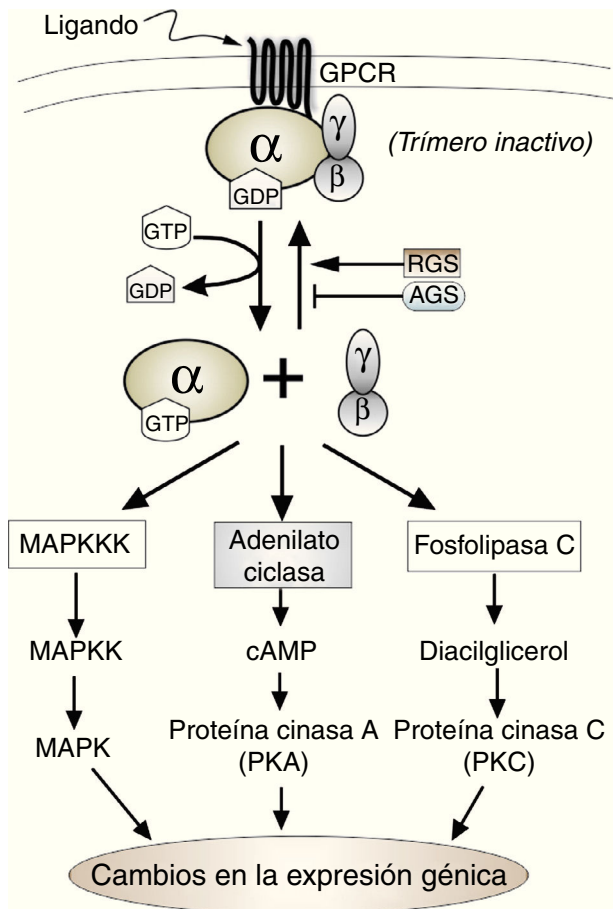
### Componentes funcionales y ciclo de activación e inactivación

Las proteínas G heterotriméricas están compuestas por tres subunidades: alfa ( $G\alpha$ ), beta ( $G\beta$ ) y gamma ( $G\gamma$ ), que en su estado inactivo se hallan asociadas formando un trímero en el lado interno de la membrana celular. Este trímero ( $\alpha\text{-}\beta\text{-}\gamma$ ) se encuentra además asociado a una proteína receptora ubicada en la membrana celular, que pertenece a la familia *G protein-coupled receptor* (GPCR), que responde a una amplia variedad de ligandos<sup>90</sup>. La subunidad alfa es una GTPasa que se encuentra anclada a la membrana mediante un grupo miristoilo o palmitoilo<sup>93</sup>, y tiene una molécula de guanosina-difosfato (GDP) unida a ella. La estimulación de la proteína G por un receptor activado conlleva el intercambio de GDP por GTP en la subunidad alfa, proceso que ocasiona la separación del complejo heterotrimérico en dos componentes: la subunidad alfa unida a una molécula de GTP y, por otra parte, las subunidades beta y gamma, que debido a su estructura permanecen fuertemente asociadas en forma de dímero y ancladas a la membrana a través de la prenilación de la subunidad  $G\gamma$ <sup>17,61,93</sup>. Ambas subunidades, el monómero alfa y el dímero  $G\beta\text{-}\gamma$ , son entonces capaces de interactuar con moléculas efectoras (fig. 1). Todas las subunidades alfa son GTPasas, y cuando el GTP es hidrolizado a GDP, la subunidad alfa se reagrupa con el dímero  $G\beta\text{-}\gamma$ , retornando así la proteína G a su estado inactivo inicial ( $\alpha\text{-}\beta\text{-}\gamma$ ) asociado al receptor de membrana<sup>17,61</sup>.

Debido a que la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad alfa determina el tiempo que la señal permanece activa, su modificación regulará el ciclo de activación de la señal. En este sentido, se ha caracterizado un grupo de proteínas que cumple una función aceleradora de la actividad GTPasa de tal subunidad, al actuar como *GTPase activating protein* (GAP) y disminuir drásticamente el tiempo de activación de la señal, por lo que su efecto es inhibitorio. Esta familia de proteínas ha sido denominada *regulator of G-protein signaling* (RGS)<sup>92</sup>. Por otra parte, se ha descrito la existencia de un grupo de proteínas que pueden regular positivamente la señal mediada por proteínas G de una manera totalmente independiente de los receptores GPCR, grupo que ha sido denominado *activators of G-protein signaling* (AGS) (fig. 1)<sup>72</sup>. De este grupo de proteínas hay un subgrupo de particular interés, ya que tales proteínas presentan uno o varios motivos reguladores, también conocidos como motivos GoLoco, con los que interactúan con la subunidad  $G\alpha$  unida a GDP para formar en algunas ocasiones complejos proteicos y evitando la reagrupación del heterotr trímero<sup>62</sup>.

### Proteínas G heterotriméricas en Ascomycetes filamentosos

Las GTPasas triméricas en hongos, al igual que en animales, se clasifican dependiendo de la similitud estructural y funcional de su respectiva subunidad alfa<sup>6</sup>. Al analizar varios genomas fúngicos depositados en las bases de datos se encontró que, a diferencia de las levaduras que poseen dos subunidades  $G\alpha$ , la gran mayoría de los Ascomycetes filamentosos poseen tres subunidades  $G\alpha$ , junto con una única subunidad  $G\beta$  y otra  $G\gamma$ , lo que les permite formar tres diferentes proteínas G heterotriméricas<sup>50,82,95</sup>. Actualmente, siguiendo el criterio definido por Bötker<sup>6</sup>, se consideran tres



**Figura 1.** Esquema del ciclo de activación/inactivación de las proteínas G heterotriméricas. Se muestran las tres principales rutas de señalización que pueden acoplar la señal transmitida por estas proteínas G. También se indica el papel de las proteínas RGS y AGS en el ciclo.

grupos de proteínas G heterotriméricas fúngicas (grupos I, II y III). El grupo I ( $G\alpha_I$ ) contiene las subunidades  $G\alpha$  con el mayor grado de conservación filogenética, y parece ser el grupo con mayores efectos pleiotrópicos en los hongos, y el único grupo que afecta significativamente el metabolismo secundario<sup>50</sup>. Estas subunidades, debido a la presencia de los motivos de miristoilación en el extremo N-terminal y de ADP ribosilación por la toxina pertussis en el extremo C-terminal, se encuentran relacionadas con el grupo  $G\alpha_i$  de mamíferos. Esto hizo pensar que este subgrupo provocaría una disminución del AMP cíclico intracelular tal como ocurre en eucariotas superiores, pero en muchos hongos filamentosos el efecto parece ser el opuesto<sup>22,31,82,85</sup>. Por su parte, el grupo II ( $G\alpha_{II}$ ) incluye las subunidades con mayor heterogeneidad filogenética y sin un equivalente claro en mamíferos. Finalmente, el grupo III ( $G\alpha_{III}$ ) abarca las subunidades que se consideran análogas al grupo  $G\alpha_s$  de mamíferos debido al efecto positivo sobre los niveles de AMP cíclico intracelular en levaduras<sup>6</sup>; sin embargo, esta relación parece ser más funcional que estructural, puesto que en casos como el de *Neurospora crassa*, la subunidad GNA3 tiene mayor similitud con el subgrupo  $G\alpha_{12}$  del ser humano que con el grupo  $G\alpha_s$ <sup>50</sup>. Con la secuenciación de genomas completos se ha reportado de manera reciente en algunos hongos filamentosos la presencia de una cuarta subunidad  $G\alpha$ , que no tiene una identidad filogenética propia como los tres grupos ya mencionados, y cuya función es aún desconocida. Este es el caso de *Metarhizium anisopliae*, *Stagonospora nodorum*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus oryzae* y *Thielavia terrestris*<sup>5,19,32,105</sup>.

Debido al hecho de que la activación o inactivación de la señal de transducción depende de la actividad GTPasa de las subunidades  $G\alpha$ , para el estudio funcional de las mismas ha sido de gran ayuda el desarrollo de alelos modificados, que se comportan de manera dominante y que provocan una activación constitutiva de la señal puesto que producen una subunidad  $G\alpha$  cuya actividad GTPasa está disminuida o afectada completamente. Tal es el caso de las modificaciones G42R, R178L, G183S, R205H y Q204L para las  $G\alpha_I$ , o G45L, R182L, G187S y Q208L para las pertenecientes al grupo III<sup>51,54,95,101,106</sup>. De manera similar también se han generado alelos que afectan la unión de la subunidad  $G\alpha$  con el dímero  $G\beta$ - $\gamma$  y evitan la separación del trímero, lo que inactiva la señal. La modificación más ampliamente usada es la G203R para el grupo I y su análoga la G207R para las  $G\alpha_{III}$ <sup>23,101,107</sup>. La incorporación de estos alelos conlleva, en la mayoría de los casos, alteraciones fenotípicas importantes, además de afectar a aspectos como la patogenicidad o la producción de metabolitos secundarios<sup>8,23,50,51</sup>. Por ejemplo, en *Aspergillus nidulans* la incorporación del alelo con la modificación G42R ( $G\alpha_I$ ) generó un fenotipo en el que prolifera el micelio aéreo sin la producción de conidióforos, al que se denominó «fluffy» y que perdió su capacidad productora de esterigmatocistina<sup>8,36,103</sup>. En casos como el de *Magnaporthe grisea*, los alelos G187 y Q208L ( $G\alpha_{III}$ ) inducen un incremento del cAMP intracelular y la generación de apresorios en condiciones no inductoras, lo que promueve su fitopatogenicidad<sup>51</sup>. Estos efectos fenotípicos suceden como consecuencia de la afectación de algunos procesos morfológicos en los que se profundizará a continuación.

Finalmente cabe señalar que hasta el momento, en los hongos, se ha demostrado que la señalización mediada por proteínas G heterotriméricas es transmitida a través de una de las siguientes rutas: a) vía adenilato ciclasa con modificación de la concentración de AMP cíclico intracelular<sup>14,44,82,85</sup> y, en consecuencia con la regulación de la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA)<sup>8,44</sup>; b) a través de la ruta de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)<sup>13,73</sup>, y c) por afectación de la fosfolipasa C<sup>74</sup> (fig. 1).

## Participación de las subunidades $G\alpha$ en los procesos morfológicos

### Germinación conidial

El estudio de las señales de transducción que afectan la germinación conidial es un tema relativamente poco abordado; a pesar de ello, algunas rutas de señalización han sido vinculadas a la germinación conidial. Es el caso de la señalización mediada por proteínas G monoméricas tipo Ras, que se han asociado principalmente al crecimiento isotrópico y su transición al crecimiento polarizado<sup>18,33,97</sup>. Sin embargo, la evidencia experimental indica que otros aspectos del proceso son regulados en los hongos filamentosos por proteínas G heterotriméricas<sup>13,14,107</sup>. En este sentido, la cascada mediada por AMP cíclico/PKA es el mecanismo más ampliamente estudiado, y se ha comprobado que tanto en *A. nidulans* como en *N. crassa* ejerce un control primordial en pasos críticos que suceden en etapas tempranas del proceso germinativo, tales como la hidrólisis de la trehalosa y la acumulación de glicerol<sup>10,11,16,88</sup>. Respaldado lo anterior el hallazgo de que en *A. nidulans* la GTPasa trimérica conformada por la subunidad  $G\alpha_{III}$  y el dímero  $\beta$ - $\gamma$  ( $G\alpha_{III}$ - $\beta$ - $\gamma$ ) juega un papel estimulador del proceso, ya que participa en la detección de la fuente de carbono (glucosa), y en respuesta a ello se incrementan los niveles de AMP cíclico dentro de la conidia, lo cual desencadena la germinación<sup>9,45</sup>. Trabajos posteriores realizados en la búsqueda de la participación de esta subunidad ( $G\alpha_{III}$ ) en *Talaromyces marneffeii*, *Trichoderma atroviride* y *Botrytis cinerea* han corroborado lo hallado en *A. nidulans*, ya que en todos los casos

**Tabla 1**  
Efectos descritos de las subunidades Gα de los grupos I, II y III sobre los procesos de germinación, crecimiento y conidiación en especies de hongos ascomicetos filamentosos

Especie	Tipo de subunidad Gα: gen	Efecto sobre			Referencia
		Germinación conidial	Crecimiento vegetativo	Conidiación	
<i>Alternaria alternata</i>	GαI: <i>aga1</i>	?	+	+	91,98
<i>Aspergillus flavus</i>	GαI: <i>fadA</i> <sup>a</sup>	nd	+	-	8
<i>Aspergillus fumigatus</i>	GαI: <i>gpaA</i>	nd	+	-	46,53,102
<i>Aspergillus nidulans</i>	GαI: <i>fadA</i>	nd	+	-	36,56,103
	GαIII: <i>ganB</i>	+	-	-	9,45,102
<i>Aspergillus oryzae</i>	GαI: <i>aorfadA</i>	nd	-	-	60
<i>Botrytis cinerea</i> ( <i>Botryotinia fuckeliana</i> )	GαI: <i>bcg1</i>	ns	+	+	29
	GαII: <i>bcg2</i>	ns	ns	ns	29
	GαIII: <i>bcg3</i>	+	nd	+	13
<i>Cochliobolus heterostrophus</i>	GαI: <i>cga1</i>	+	+	nd	12,37
<i>Colletotrichum graminicola</i>	GαI: <i>cgg1</i>	+	nd	+	89
<i>Colletotrichum trifolii</i>	GαI: <i>ctg-1</i>	+	nd	nd	86
<i>Cryphonectria parasitica</i>	GαI: <i>cpg-1</i>	nd	?	-	20,76
	GαII: <i>cpg-2</i>	nd	ns	ns	20
	GαIII: <i>cpg-3</i>	nd	nd	nd	77
<i>Fusarium fujikuroi</i>	GαI: <i>ffg1</i>	nd	ns	nd	82
	GαII: <i>ffg2</i>	nd	ns	nd	82
	GαIII: <i>ffg3</i>	nd	+	nd	82
<i>Fusarium graminearum</i> ( <i>Giberella zeae</i> )	GαI: <i>Gzgp1</i>	nd	ns	nd	100
<i>Fusarium oxysporum</i>	GαI: <i>fga1</i>	ns	+	+	39
	GαIII: <i>fga2</i>	nd	ns	ns	40
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	GαI: <i>fadA</i> <sup>a</sup>	nd	-	-	8,83
<i>Magnaporthe grisea</i>	GαI: <i>magB</i>	nd	+	+	51,52
	GαIII: <i>magA</i>	nd	ns	ns	51,52
<i>Monascus ruber</i>	GαI: <i>mga1</i>	nd	+	+	49
<i>Neurospora crassa</i>	GαI: <i>gna1</i>	+	+	-	14,41,95
	GαII: <i>gna2</i>	ns	ns	ns	28,96
	GαIII: <i>gna3</i>	+	+	-	14,41,95
<i>Penicillium chrysogenum</i>	GαI: <i>pga1</i>	+	+	-	22,24,25
<i>Penicillium roqueforti</i>	GαI: <i>pga1</i> <sup>a</sup>	+	+	-	21,24,25
<i>Stagonospora nodorum</i> ( <i>Phaeosphaeria nodorum</i> )	GαI: <i>gna1</i>	nd	+	+	31,32,81
<i>Talaromyces marneffeii</i>	GαI: <i>gasA</i>	nd	ns	-	7,106
	GαIII: <i>gasC</i>	+	ns	-	7,107
<i>Trichoderma atroviride</i> ( <i>Hypocrea atroviridis</i> )	GαI: <i>tga1</i>	nd	+	-	67,71
	GαIII: <i>tga3</i>	+	+	-	30,104
<i>Trichoderma reesei</i> ( <i>Hypocrea jecorina</i> )	GαI: <i>gna1</i>	nd	?	-	78,85
	GαIII: <i>gna3</i>	nd	-	-	74,85
<i>Trichoderma virens</i> ( <i>Hypocrea virens</i> )	GαI: <i>tgaA</i>	ns	ns	ns	57,58
	GαII: <i>tgaB</i>	ns	ns	ns	58

nd: el efecto no fue determinado; ns: Gα no produce un efecto significativo en la característica analizada; +: el efecto es positivo; -: el efecto es negativo; ?: los resultados son contradictorios o poco claros.

<sup>a</sup> Se usó un gen heterólogo de una especie relacionada. El gen homólogo no ha sido descrito.

la ausencia de la subunidad GαIII afectó negativamente la cinética de germinación conidial<sup>13,104,107</sup>. Por lo tanto, el papel positivo de GαIII en la germinación parece ser algo generalizado en los hongos filamentosos (tabla 1).

Por otra parte, los resultados sobre la participación de la subunidad GαI en la germinación no son tan consistentes. En primer lugar se debe considerar que en algunos Ascomycota filamentosos se ha abordado el efecto morfogénico de la ruta mediada por proteínas G heterotriméricas pero sin ningún experimento orientado específicamente a establecer la relación de GαI con la germinación conidial. Por ejemplo, en *A. nidulans*, *Cryphonectria parasitica*, *Fusarium fujikuroi*, *Gibberella zeae* y *T. marneffeii* no se ha abordado este aspecto<sup>77,80,82,100,106</sup>. El uso en ensayos de germinación conidial de una cepa de *M. grisea* con la delección del gen codificante de GαI no fue posible al no haber producción de conidias<sup>51</sup>. Por su parte, en los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *B. cinerea* la eliminación de GαI no generó ningún efecto observable en la cinética germinativa<sup>29,39</sup>; de hecho, en *B. cinerea* la responsabilidad en la activación de la germinación parece recaer únicamente en GαIII<sup>13</sup>.

En segundo lugar, tenemos un grupo de hongos filamentosos en el que la subunidad GαI es, de alguna manera, necesaria para la germinación. Los primeros reportes proceden de dos hongos fitopatógenos, *Cochliobolus heterostrophus* y *Colletotrichum trifolii*,

en los que la eliminación o la disrupción del gen que codifica esta subunidad afectó notoriamente la tasa de germinación conidial<sup>12,37,86</sup>. En particular, en *C. trifolii* la germinación estuvo acompañada de un incremento del ARN mensajero del gen *ctg-1* (GαI) en las conidias germinantes<sup>86</sup>. En estas dos especies, los resultados indican que GαI desempeña un papel relevante en las etapas tempranas de la germinación. Posteriormente, nuestro grupo de trabajo describió que la activación constitutiva de la señal mediada por la subunidad GαI de *P. roqueforti* desencadena la germinación aun en un entorno sin fuentes de carbono, lo que sugiere además que dicho efecto está relacionado con el incremento en los niveles de AMP cíclico intracelular<sup>21</sup>. Al examinar con mayor profundidad el proceso en *Penicillium chrysogenum* se observó que la delección de esta subunidad ralentizó la cinética de germinación y disminuyó la tasa de conidias germinadas, un efecto no tan drástico como el documentado en *C. trifolii*, mientras que la activación constitutiva de la señal produjo resultados similares a los observados en *P. roqueforti*<sup>21,24</sup>. Los resultados también sugieren la participación del AMP cíclico en la inducción de la germinación en *P. chrysogenum*<sup>24</sup>. En cepas de *Alternaria alternata* defectivas en GαI se produjo una ralentización en la cinética de germinación similar a la observada en *P. chrysogenum*<sup>98</sup>. Recientemente se ha observado que en *P. roqueforti* GαI promueve la germinación

conidial reprimiendo la expresión de un factor transcripcional del tipo Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> que además regula de manera negativa los genes *brlA*, *abaA* y *wetA* de la ruta central reguladora de la conidiación<sup>27</sup>. Se han publicado también evidencias indirectas que respaldarían la participación de las subunidades G $\alpha$  en la germinación conidial en *G. zeae* y *Trichoderma virens*<sup>57,63</sup>.

En un reciente estudio transcriptómico de la germinación conidial en *Aspergillus niger* se encontró que el gen que codifica la subunidad G $\alpha$ III se expresa a niveles muy bajos, al menos durante las 8 h posteriores al inicio del proceso germinativo, por lo que no se considera que posea un rol importante en el proceso. Por el contrario, los datos sugieren una temprana y fuerte participación de G $\alpha$ I aun desde la fase de dormancia de la conidia, por lo que puede observarse un pico de expresión 2 h después de iniciado el proceso<sup>87</sup>. Al realizar un estudio similar en *Aspergillus fumigatus* se encontró que *gpaA* (que codifica la subunidad G $\alpha$ I) es uno de los genes que se transcriben casi de manera constitutiva en la fase de dormancia de la conidia, y su expresión se incrementa alrededor de 7 veces después de 30 min de inducida la germinación<sup>46</sup>. Estos resultados demuestran la participación de G $\alpha$ I en las fases tempranas de la germinación en *A. niger* y *A. fumigatus*, y son consistentes con lo observado en *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *C. heterostrophus* y *C. trifolii*<sup>21,24,37,86</sup>. Esta participación preponderante de G $\alpha$ I en la germinación conidial en *A. niger* y *A. fumigatus* contradice lo observado en *A. nidulans*, donde el rol central es desempeñado por la subunidad G $\alpha$ III<sup>45</sup>. Resulta llamativo, por tanto, que entre especies del mismo género se observen diferencias en cuanto a la participación de las subunidades G $\alpha$  en la germinación.

Con esta diversidad de resultados en diferentes Ascomycota filamentosos en lo referente a la participación de G $\alpha$ I en la germinación, merece la pena destacar el caso del hongo modelo *N. crassa*. Teniendo en cuenta que algunos trabajos previos habían abordado el análisis de las subunidades G $\alpha$  de manera separada, se generó un triple mutante (se delecionaron los genes de los tres tipos de G $\alpha$ ), pero no se realizó ningún análisis experimental para evaluar la incidencia en la germinación conidial<sup>41</sup>. Sin embargo, al estudiar recientemente una proteína no-GPCR que induce el intercambio de GDP por GTP, que activa la señal, se dilucidó el papel de las G $\alpha$  en la germinación<sup>14</sup>. Los resultados indican que tanto G $\alpha$ I como G $\alpha$ III son necesarias en la regulación del proceso germinativo en *N. crassa*, con una diferencia en la magnitud de su participación, con G $\alpha$ III con un papel más importante ya que su función resultaría fundamental en los eventos tempranos de la germinación (activación y crecimiento isotrópico), mientras que G $\alpha$ I tiene un rol secundario ya que actuaría en las etapas posteriores (crecimiento polarizado), en la emisión y crecimiento del tubo germinal<sup>14</sup>. Este rol secundario de G $\alpha$ I también se observa en el micoparásito *T. virens*, en el que los mutantes defectivos en G $\alpha$ I mostraron un proceso germinativo con tubos germinales anormales, por lo que su papel no parece muy relevante en etapas tempranas sino más bien en el establecimiento del crecimiento polarizado<sup>58</sup>. En *N. crassa* queda por dilucidar la implicación de GPR-4, un receptor GPCR que responde a fuentes de carbono y que se demostró se acopla a G $\alpha$ I en una ruta de señalización mediada por AMP cíclico<sup>48</sup>. Como en muchos otros casos, la subunidad G $\alpha$ II mostró no estar implicada en la germinación<sup>51,52,58</sup>. De esta manera, *N. crassa* se constituye en un ejemplo que nos invita a considerar hasta qué punto en otros hongos filamentosos se habrá pasado por alto el evaluar con cierta profundidad el rol y la cooperación de las subunidades G $\alpha$  en la germinación conidial.

#### Crecimiento vegetativo

La elongación de las hifas en los hongos filamentosos es un proceso coordinado en el que la participación de la señalización mediada por las proteínas G heterotriméricas resulta importante,

en la mayoría de los casos, para un normal crecimiento y desarrollo de la colonia en medio de un cultivo sólido, y en el caso de los fitopatógenos para un adecuado funcionamiento de los mecanismos de patogenicidad. Sin embargo, la señalización mediada por proteínas G no es indispensable para el desarrollo micelial, por lo que puede inferirse la participación de otras rutas<sup>50,82</sup>. Por ejemplo, en *T. virens* y *T. marneffeii* la señalización mediada por las subunidades G $\alpha$  no participa en la regulación del crecimiento vegetativo<sup>7,58</sup>, mientras que en el resto de Ascomycota filamentosos en los que se ha estudiado este proceso la participación recae en las subunidades G $\alpha$ I y G $\alpha$ III, especialmente cuando dichas subunidades afectan la actividad de la adenilato ciclasa. No obstante, la magnitud de su función y el tipo de regulación (positiva o negativa) depende del organismo en estudio (tabla 1).

En el hongo modelo *A. nidulans* la activación de la señal mediada por la subunidad G $\alpha$ I generó, como ya se ha comentado, un fenotipo *fluffy* en el que se observó un proceso acelerado de autólisis<sup>8</sup>. La participación de G $\alpha$ I en el crecimiento se postuló al demostrar que la inactivación constitutiva de la señal (alelo G203R) disminuyó considerablemente la tasa de extensión apical en medio sólido<sup>101,103</sup>. Por ello se asume que la actividad de G $\alpha$ I es necesaria para mantener y promover una tasa de crecimiento normal<sup>102</sup>. Esta función es llevada a cabo mediante la regulación de los niveles de AMP cíclico intracelular, que al estimular la acción de una proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PkaA) promueve el crecimiento vegetativo en medio sólido<sup>80</sup>. Por su parte, la subunidad G $\alpha$ III tiene una función complementaria y diferente a G $\alpha$ I, ya que su activación constitutiva tuvo un efecto negativo sobre la extensión radial de la colonia del hongo, mientras que ni su inactivación ni su delección tuvieron consecuencias en el crecimiento apical<sup>9</sup>. Lo anterior sugiere que el balance en la expresión de las subunidades G $\alpha$ I y G $\alpha$ III regula la extensión de las hifas en medio sólido. En *A. fumigatus* el mecanismo de acción de la subunidad G $\alpha$ I es similar al descrito en *A. nidulans*<sup>102</sup>. Por su parte, un estudio reciente demostró que, a diferencia de lo que sucede en *A. nidulans*, la activación constitutiva de la subunidad G $\alpha$ I reprime el crecimiento vegetativo en *A. oryzae*<sup>60</sup>.

En *Monascus ruber*, *M. grisea*, *B. cinerea*, *C. heterostrophus* y *Colletotrichum graminicola* G $\alpha$ I desempeña un papel promotor del crecimiento vegetativo<sup>29,37,49,51,52,89</sup>. En el caso de *N. crassa* la inactivación de la subunidad G $\alpha$ I redujo en un 50% la tasa de extensión apical, en tanto que al deleccionar G $\alpha$ III la extensión apical se redujo en un 20%. Lo anterior sugiere que ambas subunidades participan de manera cooperativa en la regulación del crecimiento, resultado que se confirmó al observar que el crecimiento vegetativo se afectó drásticamente en la cepa en la que se suprimieron ambas subunidades<sup>41</sup>. En *N. crassa* la subunidad G $\alpha$ II no desempeña una función evidente en el crecimiento<sup>96</sup>.

En algunos casos, los resultados ponen en evidencia la diferencia de funciones y de subunidades participantes en el crecimiento, incluso en organismos filogenéticamente muy próximos, tal como se presenta en el género *Trichoderma*. En *T. atroviride* la señalización mediada por proteínas G tiene un efecto positivo sobre el crecimiento. En este organismo participan tanto G $\alpha$ I como G $\alpha$ III pero, a diferencia de *N. crassa*, es la subunidad G $\alpha$ III la que posee un papel preponderante sobre la extensión apical<sup>30,71,104</sup>. En *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) también participan ambas subunidades, pero la regulación tiene un sentido negativo y es dependiente de la luz<sup>78</sup>. En condiciones de cultivo sumergido el mecanismo opera de manera diferente, siendo G $\alpha$ I la subunidad protagonista con un efecto positivo sobre el crecimiento en condiciones de oscuridad<sup>78</sup>. Por su parte, en *T. virens*, ni G $\alpha$ I ni G $\alpha$ II parecen afectar el crecimiento vegetativo<sup>58</sup>. Esta diversidad de efectos también se observa en el género *Fusarium*. Mientras que en *Fusarium sporotrichoides* la subunidad G $\alpha$ I afectó negativamente la tasa de crecimiento apical<sup>8,83</sup>, en *F. oxysporum* G $\alpha$ I es requerida para una adecuada

morfología de la colonia en medio sólido, fenómeno en el que no interviene la subunidad G $\alpha$ III<sup>39</sup>, en tanto que en *Fusarium graminearum* (*G. zeae*) no son las subunidades alfa sino la subunidad beta la que asume la regulación del proceso, y lo hace estimulando el crecimiento vegetativo<sup>100</sup>. Además, en *F. fujikuroi* la señal mediada por proteínas G tiene un efecto positivo sobre el crecimiento, pero tal efecto solo es llevado a cabo por la subunidad G $\alpha$ III; ni G $\alpha$ I ni G $\alpha$ II parecen participar en dicha regulación<sup>82</sup>.

En el género *Penicillium* no se ha observado, hasta el momento, esa disparidad de resultados descrita en otros géneros. Nuestro grupo de trabajo encontró que en *P. chrysogenum* y *P. roqueforti* la activación de G $\alpha$ I genera una reducción en la tasa de extensión apical en medio sólido, lo que sugiere una regulación negativa de este proceso<sup>25</sup>. La participación prioritaria de esta subunidad con un efecto represor del crecimiento también fue descrita en *M. anisopliae*, *T. reesei* y *F. sporotrichoides*<sup>8,15,83,85</sup>. Por su parte, *C. parasitica* podría considerarse un caso particular, puesto que la activación de la subunidad G $\alpha$ I ocasionó, al igual que su eliminación, una considerable reducción de la tasa de crecimiento y una completa ausencia de micelio aéreo<sup>20,76</sup>.

#### Reproducción asexual: conidiogénesis

La conidiogénesis necesita de una compleja regulación génica, una especialización celular y una coordinada comunicación intracelular<sup>2,64</sup>. En *A. nidulans* se ha propuesto una ruta reguladora central esencial donde confluyen todas las rutas reguladoras, que está conformada por el producto de los genes *brlA*, *abaA* y *wetA*<sup>1</sup>. Esta ruta actúa en conjunto con otros genes para controlar la expresión de los genes específicos de la conidiación y determinar el orden de la activación génica durante el desarrollo del conidióforo y la maduración de los conidios<sup>2,64</sup>. La señalización mediada por las proteínas G heterotriméricas desempeña un papel muy importante en la regulación de este proceso. En muchos hongos filamentosos la señalización por proteínas G heterotriméricas parece actuar analizando el entorno para controlar la germinación y posteriormente el crecimiento vegetativo, mientras que se mantiene reprimida la conidiación<sup>9,22,24,45,63,82,96,102</sup>. Lo anterior permitiría inferir que cuando las condiciones nutricionales del medio cambian, el mecanismo permite la conidiación al tiempo que se controla el crecimiento vegetativo<sup>2,22,28,42,53,106</sup>.

Tal como sucede en la germinación conidial, son las subunidades G $\alpha$ I y G $\alpha$ III las que participan en este proceso (tabla 1), siendo la subunidad G $\alpha$ I la que posee mayor relevancia en buena parte de las especies fúngicas estudiadas. En este sentido se observa que al sobreexpresar o activar constitutivamente G $\alpha$ I se produce un efecto represor de la conidiación, generando en algunas ocasiones un fenotipo aconidial<sup>8</sup>. En el caso de *A. nidulans*, *Aspergillus flavus*, *Cryphonectria parasitica* y *T. marneffeii*, el efecto es tan drástico que la activación de esta subunidad suprime la formación de conidióforos<sup>56,76,77,103,106</sup>, y en *C. parasitica* se demostró además que reprime la expresión de proteínas hidrofobinas<sup>76</sup>. Por su parte, en organismos como *N. crassa*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *A. fumigatus*, *F. sporotrichoides* y *T. atroviride* se observa una reducción sustancial en la producción conidial<sup>22,28,41,53,67,83</sup>. Esta función represora de G $\alpha$ I se ve ratificada en especies como *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *P. chrysogenum*, *N. crassa*, *T. atroviride* y *T. marneffeii*, en las que al usar alelos de inactivación constitutiva de la subunidad G $\alpha$ I, o bien mediante atenuación de la expresión o la delección del gen, se observa un inusual incremento en la expresión de los genes de la ruta reguladora central de la conidiogénesis, especialmente *brlA*. Esta desregulación altera de tal manera el mecanismo conidiogénico que se forman conidióforos y cadenas de conidios en cultivos sumergidos, condiciones en las cuales la conidiación normalmente está reprimida en estas especies<sup>22,41,53,56,71,103,106</sup>.

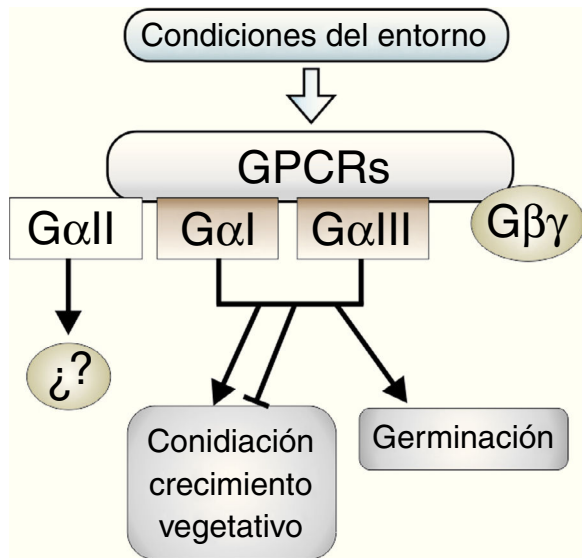
La contraparte a este patrón de regulación negativa por parte de G $\alpha$ I la constituyen *M. ruber* y los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *M. grisea*, *C. graminicola* y *S. nodorum*, en los cuales la ausencia de esta subunidad genera un efecto negativo en la conidiogénesis<sup>29,39,49,51,75,81,89</sup>. Particularmente, en *B. cinerea* el efecto positivo se ejerce a través de ambas subunidades, G $\alpha$ I y G $\alpha$ III, siendo al parecer la subunidad G $\alpha$ III la que posee una función reguladora más fuerte a través de la ruta dependiente de AMP cíclico<sup>13,29,75</sup>. En los hongos filamentosos recientemente mencionados no se han descrito los efectos de la sobreexpresión o de la activación constitutiva de estas subunidades alfa, salvo en *M. grisea*. En este patógeno del arroz, el papel de la subunidad alfa es opuesto al descrito en *A. nidulans*, ya que la delección de G $\alpha$ I suprime totalmente la conidiación, mientras que la activación constitutiva de la misma genera un fenotipo hiperconidante. Al parecer, la participación de G $\alpha$ III en el proceso es secundaria<sup>51</sup>.

En *A. nidulans*, *T. atroviride*, *T. reesei* y *T. marneffeii* la subunidad G $\alpha$ III también participa en la regulación de la reproducción asexual, con una función represora que genera efectos similares a los reportados para la activación constitutiva de G $\alpha$ I<sup>7,9,78,85,104,107</sup>. El grado de participación de cada subunidad, o la manera coordinada en que tiene lugar esta regulación, es aún tema de investigación; hasta el momento se ha demostrado que el mecanismo se produce mediante la interacción de estas subunidades con al menos dos proteínas cinasas dependientes de AMP cíclico, las cuales a su vez reprimen la expresión de *brlA*, el primer gen de la ruta reguladora central de la conidiación<sup>59,64</sup>. Se ha descrito recientemente en *N. crassa* que la ausencia de G $\alpha$ III y la subunidad  $\beta$  generan, cada una, fenotipos con un mayor grado de hiperconidiación que los observados al suprimir G $\alpha$ I, tanto en medios de cultivo aéreos como sumergidos; por tanto en *N. crassa* se ha propuesto que G $\alpha$ III, junto con la subunidad  $\beta$ , ejercen una regulación negativa preponderante en el control de la conidiación<sup>95</sup>.

#### Conclusiones y perspectivas

De las tres subunidades alfa que poseen la mayoría de los hongos filamentosos, son las subunidades del tipo G $\alpha$ I y G $\alpha$ III las que participan en la regulación de la germinación conidial, el crecimiento vegetativo y la reproducción asexual (fig. 2). La ausencia de reportes que involucren las subunidades G $\alpha$ II en alguno de los procesos mencionados y el hecho de que en hongos como *B. cinerea*, *C. parasitica*, *F. fujikuroi*, *N. crassa* y *T. virens* la subunidad G $\alpha$ II no tenga efecto fenotípico alguno, indica que este tipo de subunidad no juega un papel relevante en los procesos morfogénicos de los hongos filamentosos.

De los estudios llevados a cabo hasta el momento se puede concluir que no existe un patrón único de acción de las subunidades G $\alpha$ I y G $\alpha$ III sobre los procesos morfogénicos. Se aprecian diferencias no solo en el grado de implicación de una determinada subunidad en un proceso, sino incluso en el sentido de su regulación sobre el mismo, siendo positivo en algunos casos y negativo en otros, y estos contrastes no se dan necesariamente entre taxones alejados filogenéticamente sino que en algunos casos ocurren también entre especies de un mismo género (tabla 1). Es decir, a lo largo de la evolución se ha conservado la función básica de señalización de la vía de las proteínas G heterotriméricas en los hongos, y en el caso particular de la subunidad G $\alpha$ I el muy elevado grado de conservación de la misma sugiere además un papel básico e insustituible en el control del programa de desarrollo de los hongos. Pero esta función básica de señalización se ha adaptado en cada especie a una función particular de regulación, positiva o negativa, y con distintos grados de control sobre cada uno de los procesos que conforman el programa general de desarrollo de los hongos. Esta particularidad puede enmarcarse dentro de un rasgo general que



**Figura 2.** Participación de las subunidades alfa de proteínas G heterotriméricas en los procesos morfogénicos de hongos filamentosos de la división Ascomycota. Las subunidades G $\alpha$ I y G $\alpha$ III están implicadas en los tres procesos. Su efecto en la germinación es siempre positivo, ya sea si actúan en conjunto o por separado, mientras que en la conidiación y el crecimiento su rol es variable y su efecto resulta de un balance entre ambas subunidades. No se ha demostrado la participación de G $\alpha$ II en estos procesos, por lo que no se sabe con precisión cuál pueda ser su función. Las líneas terminadas en flechas representan un efecto positivo y las terminadas en barra indican un efecto represor.

conciene a la evolución de los sistemas regulatorios de los organismos al que se ha dado el nombre de «*weak linkage*»<sup>26,43</sup>, y que básicamente consiste en la capacidad de las moléculas o complejos proteicos de cambiar a lo largo de la evolución aquellas moléculas con las que interactúan, a la vez que conservan sus funciones básicas. Así, las proteínas G heterotriméricas conservan en todos los hongos su función general al ejercer un papel central en la regulación del programa de desarrollo morfológico, pero mediante cambios en la interacción con otros efectores, o en la función de estos, se han producido modificaciones adaptativas de su función específica en cada especie, lo que hace que frecuentemente el tipo de regulación que se ejerce sobre un determinado proceso sea diferente, y hasta de sentido opuesto, entre especies. Este fenómeno llega a darse incluso entre especies de un mismo género, como es el caso de *Aspergillus*, *Fusarium* o *Trichoderma*. Las diferencias son probablemente una respuesta adaptativa a los diferentes hábitats naturales de cada especie. Por tanto, es de esperar que especies con hábitats diferentes presenten patrones de regulación diferentes por parte de la vía de las proteínas G heterotriméricas, y esto puede ser especialmente evidente en géneros que comprenden especies fitopatógenas.

Otro rasgo destacable en el control del desarrollo morfológico de los hongos filamentosos es la redundancia de funciones entre varias vías regulatorias, que se infiere de muchos de los resultados obtenidos en diferentes estudios, donde la inactivación de la función de una determinada subunidad G $\alpha$ , o incluso de las tres, no tiene como consecuencia un fenotipo letal, ni tampoco la completa supresión de un determinado proceso. Por ejemplo, la eliminación de las subunidades G $\alpha$ III o sus mutaciones no ocasionaron, en ningún caso, la pérdida total de la capacidad germinativa de los conidios, aunque sí afectó la cinética del proceso<sup>9,12-14,21,24,86,98,104,107</sup>. Esto mismo sucede al estudiar las proteínas G monoméricas tipo Ras (Ras1 y Ras2), que también regulan la germinación<sup>16,18,33,97</sup>. En cuanto al crecimiento vegetativo se observan situaciones similares, de las que podemos resaltar que el fenotipo resultante nunca es tan extremo como el generado por las mutaciones en efectores corriente abajo; tal es el caso de las proteínas cinasas dependientes

de AMP cíclico en *F. graminearum* y *F. fujikuroi*<sup>38,82</sup>. Lo anterior sugiere que varias rutas de transducción pueden llegar a confluir en los mismos efectores<sup>18,73,85</sup>. Recientemente se ha reportado la participación de la vía de transducción de señales *target of rapamycin* (TOR) en la regulación del crecimiento vegetativo en hongos filamentosos, sin descifrar aún los mecanismos moleculares por los cuales esto sucede<sup>99</sup>; sin embargo, es evidente la interacción entre los componentes de esta vía con la ruta mediada por las proteínas G heterotriméricas<sup>54,99</sup>. Por otra parte, es en la conidiación donde se observan los fenotipos más drásticos, lo que apunta a que la vía de las proteínas G heterotriméricas tiene un papel especialmente relevante en este proceso. Cabe recordar que la activación de la señal mediada por G $\alpha$ I llega a suprimir por completo la conidiación en especies de *Aspergillus*, *Cryphonectria* y *Talaromyces*, y que su inactivación genera fenotipos hiperconidiantes.

La importancia de la vía de las proteínas G heterotriméricas en el proceso de desarrollo morfológico de los hongos filamentosos hace que sea necesario profundizar en el estudio de la misma, para lo cual pueden utilizarse diferentes abordajes que permitirán una caracterización más exhaustiva del funcionamiento de dicha vía. Es importante, por ejemplo, estudiar el tipo de participación y el grado de cooperación entre diferentes subunidades G $\alpha$  en la regulación de los diferentes procesos, ya que estudios recientes apuntan en esta dirección. Por otro lado, es de gran importancia identificar y caracterizar los efectores que participan en la regulación de los procesos controlados por la vía de las proteínas G. Algunos de ellos han sido ya claramente establecidos, como la adenilil ciclasa o la proteína cinasa A<sup>50,65,80,82</sup>, y recientemente se ha identificado un posible efector final, un hipotético factor de transcripción codificado por el gen *pcz1*, implicado en la regulación de la germinación, crecimiento y conidiación en *P. roqueforti*<sup>27</sup>. Entre las metodologías aplicables a la identificación de efectores que medien la regulación ejercida por las subunidades G $\alpha$  están los estudios de proteómica y fosfoproteómica comparativa en los que se utilizan cepas con subunidades G $\alpha$  constitutivamente activas o inactivas, y los estudios de interactoma.

## Financiación

Este artículo contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) a través de los Proyectos CB-2008-01-105527 y CB-2013-01-222207.

## Agradecimientos

A la Universidad de Pamplona y al grupo GIMBIO por el apoyo financiero y de recursos físicos.

## Bibliografía

- Adams TH, Wieser JK, Yu J-H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:35-54.
- Alkhayyat F, Chang Kim S, Yu J-H. Genetic control of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. En: Gadd GM, Sariaslani S, editores. *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press; 2015. p. 93-107.
- Berepiki A, Lichius A, Read ND. Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9:876-87.
- Berepiki A, Read ND. Septins are important for cell polarity, septation and asexual spore formation in *Neurospora crassa* and show different patterns of localisation at germ tube tips. *PLoS ONE.* 2013;8:e63843.
- Berka RM, Grigoriev IV, Otilar R, Salamov A, Grimwood J, Reid I, et al. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat Biotechnol.* 2011;29:922-7.
- Bölker M. Sex and crime: Heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genet Biol.* 1998;25:143-56.
- Boyce KJ, Andrianopoulos A. Morphogenetic circuitry regulating growth and development in the dimorphic pathogen *Penicillium marneffei*. *Eukaryot Cell.* 2013;12:154-60.

8. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66:447–59.
9. Chang M-H, Chae K-S, Han D-M, Jahng K-Y. The GanB G $\alpha$ -protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 2004;167:1305–15.
10. D'Enfert C, Bonini BM, Zapella PD, Fontaine T, da Silva AM, Terenzi HF. Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol.* 1999;32:471–83.
11. De Pinho CA, de Lourdes M, Polizeli TM, Jorge JA, Terenzi HF. Mobilisation of trehalose in mutants of the cyclic AMP signalling pathway, cr-1 (CRISP-1) and mcb (microcycle conidiation), of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;199:85–9.
12. Degani O, Maor R, Hadar R, Sharon A, Horwitz BA. Host physiology and pathogenic variation of *Cochliobolus heterostrophus* strains with mutations in the G protein alpha subunit, CGA1. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:5005–9.
13. Doehlemann G, Berndt P, Hahn M. Different signalling pathways involving a G $\alpha$  protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol Microbiol.* 2006;59:821–35.
14. Eaton CJ, Cabrera IE, Servin JA, Wright SJ, Cox MP, Borkovich KA. The guanine nucleotide exchange factor RIC8 regulates conidial germination through G $\alpha$  proteins in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE.* 2012;7:e48026.
15. Fang W, Pei Y, Bidochka MJ. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, cag8, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology.* 2007;153:1017–25.
16. Fillinger S, Chaverche MK, Shimizu K, Keller N, d'Enfert C. cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 2002;44:1001–16.
17. Flock T, Ravarani CN, Sun D, Venkatakrishnan AJ, Kayikci M, Tate CG, et al. Universal allosteric mechanism for G $\alpha$  activation by GPCRs. *Nature.* 2015;524:173–9.
18. Fortwendel JR. Orchestration of morphogenesis in filamentous fungi: Conserved roles for ras signalling networks. *Fungal Biol Rev.* 2015;29:54–62.
19. Gao Q, Jin K, Ying SH, Zhang Y, Xiao G, Shang Y, et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet.* 2011;7:e1001264.
20. Gao S, Nuss DL. Distinct roles for two G protein  $\alpha$  subunits in fungal virulence, morphology, and reproduction revealed by targeted gene disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14122–7.
21. García-Rico RO, Chávez R, Fierro F, Martín JF. Effect of a heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunit on conidia germination, stress response, and roquefortine C production in *Penicillium roqueforti*. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol.* 2009;12:123–9.
22. García-Rico RO, Fierro F, Martín JF. Heterotrimeric G $\alpha$  protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum* controls conidiation mainly by a cAMP-independent mechanism. *Biochem Cell Biol.* 2008;86:57–69.
23. García-Rico RO, Fierro F, Mauriz E, Gómez A, Fernández-Bodega MÁ, Martín JF. The heterotrimeric G $\alpha$  protein Pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysofenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology.* 2008;154:3567–78.
24. García-Rico RO, Martín JF, Fierro F. Heterotrimeric G $\alpha$  protein Pga1 from *Penicillium chrysogenum* triggers germination in response to carbon sources and affects negatively resistance to different stress conditions. *Fungal Genet Biol FG B.* 2011;48:641–9.
25. García-Rico RO, Martín JF, Fierro F. The *pga1* gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. *Res Microbiol.* 2007;158:437–46.
26. Gerhart J, Kirschner M. The theory of facilitated variation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104 Suppl 1:8582–9.
27. Gil-Durán C, Rojas-Aedo JF, Medina E, Vaca I, García-Rico RO, Villagrán S, et al. The *pcz1* gene, which encodes a Zn(II)2Cys6 protein, is involved in the control of growth, conidiation, and conidial germination in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS ONE.* 2015;10:e0120740.
28. Greenwald CJ, Kasuga T, Glass NL, Shaw BD, Ebbole DJ, Wilkinson HH. Temporal and spatial regulation of gene expression during asexual development of *Neurospora crassa*. *Genetics.* 2010;186:1217–30.
29. Gronover CS, Kasulke D, Tudzynski P, Tudzynski B. The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI.* 2001;14:1293–302.
30. Gruber S, Omann M, Rodríguez CE, Radebner T, Zeilinger S. Generation of *Trichoderma atroviride* mutants with constitutively activated G protein signaling by using geneticin resistance as selection marker. *BMC Res Notes.* 2012;5:641.
31. Gummer JPA, Trengove RD, Oliver RP, Solomon PS. A comparative analysis of the heterotrimeric G-protein G $\alpha$ , G $\beta$  and G $\gamma$  subunits in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *BMC Microbiol.* 2012;12:131.
32. Gummer JPA, Trengove RD, Oliver RP, Solomon PS. Dissecting the role of G-protein signalling in primary metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *Microbiology.* 2013;159:1972–85.
33. Harispe L, Portela C, Scazzocchio C, Peñalva MA, Gorfinkiel L. Ras GTPase-activating protein regulation of actin cytoskeleton and hyphal polarity in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 2008;7:141–53.
34. Harris SD. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia.* 2008;100:823–32.
35. Hayer K, Stratford M, Archer DB. Germination of *Aspergillus niger* conidia is triggered by nitrogen compounds related to L-amino acids. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80:6046–53.
36. Hicks JK, Yu JH, Keller NP, Adams TH. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G $\alpha$  protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.* 1997;16:4916–23.
37. Horwitz BA, Sharon A, Lu SW, Ritter V, Sandrock TM, Yoder OC, et al. A G protein alpha subunit from *Cochliobolus heterostrophus* involved in mating and appressorium formation. *Fungal Genet Biol.* 1999;26:19–32.
38. Hu S, Zhou X, Gu X, Cao S, Wang C, Xu J-R. The cAMP-PKA pathway regulates growth, sexual and asexual differentiation, and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2014;27:557–66.
39. Jain S, Akiyama K, Mae K, Ohguchi T, Takata R. Targeted disruption of a G protein  $\alpha$  subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Curr Genet.* 2002;41:407–13.
40. Jain S, Akiyama K, Takata R, Ohguchi T. Signaling via the G protein  $\alpha$  subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;243:165–72.
41. Kays AM, Borkovich KA. Severe impairment of growth and differentiation in a *Neurospora crassa* mutant lacking all heterotrimeric G $\alpha$  proteins. *Genetics.* 2004;166:1229–40.
42. Kim JD, Kaiser K, Larive CK, Borkovich KA. Use of 1H nuclear magnetic resonance to measure intracellular metabolite levels during growth and asexual sporulation in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2011;10:820–31.
43. Kirschner M, Gerhart J. Evolvability. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:8420–7.
44. Kwon N-J, Park H-S, Jung S, Kim SC, Yu J-H. The putative guanine nucleotide exchange factor RicA mediates upstream signaling for growth and development in *Aspergillus*. *Eukaryot Cell.* 2012;11:1399–412.
45. Lafon A, Seo J-A, Han K-H, Yu J-H, d'Enfert C. The heterotrimeric G-protein GanB( $\alpha$ )-SfaD( $\beta$ )-GpgA( $\gamma$ ) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 2005;171:71–80.
46. Lamarre C, Sokol S, Debeaupuis JP, Henry C, Lacroix C, Glaser P, et al. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genomics.* 2008;9:417.
47. Leippe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol.* 2002;317:41–72.
48. Li L, Borkovich KA. GPR-4 is a predicted G-protein-coupled receptor required for carbon source-dependent asexual growth and development in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2006;5:1287–300.
49. Li L, Shao Y, Li Q, Yang S, Chen F. Identification of Mga1, a G-protein  $\alpha$ -subunit gene involved in regulating citrinin and pigment production in *Monascus ruber* M7. *FEMS Microbiol Lett.* 2010;308:108–14.
50. Li L, Wright SJ, Krystofova S, Park G, Borkovich KA. Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:423–52.
51. Liu H, Suresh A, Willard FS, Siderovski DP, Lu S, Naqvi NI. Rgs1 regulates multiple G $\alpha$  subunits in *Magnaporthe pathogenesis*, asexual growth and thigmotropism. *EMBO J.* 2007;26:690–700.
52. Liu S, Dean RA. G Protein  $\alpha$  subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 1997;10:1075–86.
53. Mah J-H, Yu J-H. Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 2006;5:1585–95.
54. Marroquin-Guzman M, Wilson RA. GATA-dependent glutaminolysis drives appressorium formation in *Magnaporthe oryzae* by suppressing TOR inhibition of cAMP/PKA signaling. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1004851.
55. Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: A short history. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S46–55.
56. Molnár Z, Mészáros E, Szilágyi Z, Rosén S, Emri T, Pócsi I. Influence of fadAG203R and delta*flbA* mutations on morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Appl Biochem Biotechnol.* 2004;118:349–60.
57. Mukherjee M, Mukherjee PK, Kale SP. cAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*. *Microbiol Read Engl.* 2007;153:1734–42.
58. Mukherjee PK, Latha J, Hadar R, Horwitz BA. Role of two G-protein alpha subunits, TgaA and TgaB, in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:542–9.
59. Ni M, Riererson S, Seo J-A, Yu J-H. The *pkdB* gene encoding the secondary protein kinase A catalytic subunit has a synthetic lethal interaction with *pkcA* and plays overlapping and opposite roles in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 2005;4:1465–76.
60. Ogawa M, Tokuoaka M, Jin FJ, Takahashi T, Koyama Y. Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in koji-mold *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol FG B.* 2010;47:10–8.
61. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:60–71.
62. Oner SS, Maher EM, Gabay M, Tall GG, Blumer JB, Lanier SM. Regulation of the G-protein regulatory-G $\alpha$ i signaling complex by nonreceptor guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem.* 2013;288:3003–15.
63. Park AR, Cho AR, Seo JA, Min K, Son H, Lee J, et al. Functional analyses of regulators of G protein signaling in *Gibberella zeae*. *Fungal Genet Biol FG B.* 2012;49:511–20.
64. Park H-S, Yu J-H. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2012;15:669–77.
65. Peeters T, Versele M, Thevelein JM. Directly from Galpha to protein kinase A: the kelch repeat protein bypass of adenylate cyclase. *Trends Biochem Sci.* 2007;32:547–54.
66. Prosser JI. Kinetics of filamentous growth and branching. En: Gow NAR, Gadd GM, editores. *The Growing Fungus*. Springer Netherlands; 1995. p. 301–18.



67. Reithner B, Brunner K, Schuhmacher R, Peissl I, Seidl V, Krška R, et al. The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genet Biol*. 2005;42:749–60.
68. Riquelme M. Tip growth in filamentous fungi: A road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:587–609.
69. Riquelme M, Sánchez-León E. The Spitzenkörper: a choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2014;20:27–33.
70. Rittenour WR, Si H, Harris SD. Hyphal morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol Rev*. 2009;23:20–9.
71. Rocha-Ramírez V, Omero C, Chet I, Horwitz BA, Herrera-Estrella A. *Trichoderma atroviride* G-protein alpha-subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryot Cell*. 2002;1:594–605.
72. Sato M, Blumer JB, Simon V, Lanier SM. Accessory proteins for G proteins: Partners in signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:151–87.
73. Schmidt MC. Signaling crosstalk: Integrating nutrient availability and sex. *Sci Signal*. 2013;6:pe28.
74. Schmol M. The information highways of a biotechnological workhorse—signal transduction in *Hypocrea jecorina*. *BMC Genomics*. 2008;9:430.
75. Schumacher J, Kokkelink L, Huesmann C, Jimenez-Teja D, Collado IG, Barakat R, et al. The cAMP-dependent signaling pathway and its role in conidial germination, growth, and virulence of the gray mold *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2008;21:1443–59.
76. Segers GC, Nuss DL. Constitutively activated Gα negatively regulates virulence, reproduction and hydrophobin gene expression in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet Biol*. 2003;38:198–208.
77. Segers GC, Regier JC, Nuss DL. Evidence for a role of the regulator of G-protein signaling protein CPRGS-1 in Gα subunit CPG-1-mediated regulation of fungal virulence, conidiation, and hydrophobin synthesis in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Eukaryot Cell*. 2004;3:1454–63.
78. Seibel C, Gremel G, do Nascimento Silva R, Schuster A, Kubicek CP, Schmol M. Light-dependent roles of the G-protein alpha subunit GNA1 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*). *BMC Biol*. 2009;7:58.
79. Seong K-Y, Zhao X, Xu J-R, Güldener U, Kistler HC. Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol*. 2008;45:389–99.
80. Shimizu K, Keller NP. Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 2001;157:591–600.
81. Solomon PS, Tan K-C, Sanchez P, Cooper RM, Oliver RP. The disruption of a Gα subunit sheds new light on the pathogenicity of *Stagonospora nodorum* on wheat. *Mol Plant Microbe Interact*. 2004;17:456–66.
82. Studt L, Humpf H-U, Tudzynski B. Signaling governed by G proteins and cAMP is crucial for growth, secondary metabolism and sexual development in *Fusarium fujikuroi*. *PLoS ONE*. 2013;8:e58185.
83. Tag A, Hicks J, Garifullina G, Ake C Jr, Phillips TD, Beremand M, et al. G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Mol Microbiol*. 2000;38:658–65.
84. Takeshita N, Manck R, Grün N, de Vega SH, Fischer R. Interdependence of the actin and the microtubule cytoskeleton during fungal growth. *Curr Opin Microbiol*. 2014;20:34–41.
85. Tisch D, Kubicek CP, Schmol M. New insights into the mechanism of light modulated signaling by heterotrimeric G-proteins: ENVOY acts on *gna1* and *gna3* and adjusts cAMP levels in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Fungal Genet Biol*. 2011;48:631–40.
86. Truesdell GM, Yang Z, Dickman MB. A Gα subunit gene from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum trifolii* is required for conidial germination. *Physiol Mol Plant Pathol*. 2000;56:131–40.
87. Van Leeuwen MR, Krijgsheld P, Bleichrodt R, Menke H, Stam H, Stark J, et al. Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Stud Mycol*. 2013;74:59–70.
88. Van Schaftingen E, van Laere AJ. Glycerol formation after the breaking of dormancy of *Phycomyces blakesleeanus* spores. *Eur J Biochem*. 1985;148:399–404.
89. Venard C, Kulshrestha S, Sweigard J, Nuckles E, Vaillancourt L. The role of a *fada* ortholog in the growth and development of *Colletotrichum graminicola* in vitro and in planta. *Fungal Genet Biol*. 2008;45:973–83.
90. Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2013;494:185–94.
91. Wang NY, Lin CH, Chung KR. A Gα subunit gene is essential for conidiation and potassium efflux but dispensable for pathogenicity of *Alternaria alternata* on citrus. *Curr Genet*. 2010;56:43–51.
92. Wang Y, Geng Z, Jiang D, Long F, Zhao Y, Su H, et al. Characterizations and functions of regulator of G protein signaling (RGS) in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:7977–87.
93. Wedegaertner PB, Wilson PT, Bourne HR. Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem*. 1995;270:503–6.
94. Witteveen CF, Visser J. Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett*. 1995;134:57–62.
95. Won S, Michkov AV, Krystofova S, Garud AV, Borkovich KA. Genetic and physical interactions between Gα subunits and components of the Gβγ dimer of heterotrimeric G proteins in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell*. 2012;11:1239–48.
96. Wright SJ, Inchausti R, Eaton CJ, Krystofova S, Borkovich KA. RIC8 Is a guanine-nucleotide exchange factor for Gα subunits that regulates growth and development in *Neurospora crassa*. *Genetics*. 2011;189:165–76.
97. Xie X-Q, Guan Y, Ying S-H, Feng M-G. Differentiated functions of Ras1 and Ras2 proteins in regulating the germination, growth, conidiation, multi-stress tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. *Environ Microbiol*. 2013;15:447–62.
98. Yamagishi D, Otani H, Kodama M. G protein signaling mediates developmental processes and pathogenesis of *Alternaria alternata*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2006;19:1280–8.
99. Yu F, Gu Q, Yun Y, Yin Y, Xu JR, Shim WB, et al. The TOR signaling pathway regulates vegetative development and virulence in *Fusarium graminearum*. *New Phytol*. 2014;203:219–32.
100. Yu HY, Seo JA, Kim JE, Han KH, Shim WB, Yun SH, et al. Functional analyses of heterotrimeric G protein Gα and Gβ subunits in *Gibberella zeae*. *Microbiology*. 2008;154:392–401.
101. Yu J-H. Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol Seoul Korea*. 2006;44:145–54.
102. Yu J-H. Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*. 2010;38:229–37.
103. Yu J-H, Wieser J, Adams TH. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J*. 1996;15:5184–90.
104. Zeilinger S, Reithner B, Scala V, Peissl I, Lorito M, Mach RL. Signal transduction by Tga3, a novel G protein α subunit of *Trichoderma atroviride*. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:1591–7.
105. Zhao G, Yao Y, Qi W, Wang C, Hou L, Zeng B, et al. Draft genome sequence of *Aspergillus oryzae* strain 3.042. *Eukaryot Cell*. 2012;11:1178.
106. Zuber S, Hynes MJ, Andrianopoulos A. G-protein signaling mediates asexual development at 25 °C but has no effect on yeast-like growth at 37 °C in the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*. *Eukaryot Cell*. 2002;1:440–7.
107. Zuber S, Hynes MJ, Andrianopoulos A. The G-protein α-subunit GasC plays a major role in germination in the dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*. *Genetics*. 2003;164:487–99.