



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DEL GEN *dmapA*
(AN4445) EN EL HONGO *Aspergillus nidulans*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

JOSÉ ANTONIO CONTRERAS CHIJATE

TUTOR: DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
P r e s e n t e

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Análisis de la función del gen *dmapA* (AN4445) en el hongo *Aspergillus nidulans*

realizado por **Contreras Chijate José Antonio** con número de cuenta **3-0404461-6** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Propietario Dr. Luis Servín González

Propietario Tutor Dr. Jesús Aguirre Linares

Suplente Dr. Sigfrido Sierra Galván

Suplente Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”
Ciudad Universitaria, D. F., a 24 de marzo de 2014
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/mdm

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Contreras
Chijate
José Antonio
56 07 70 55
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304044616

2. Datos del tutor

Dr.
Jesús
Aguirre
Linares

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Joaquín
Cifuentes
Blanco

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Luis
Servín
González

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Sigfrido
Sierra
Galván

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe

7. Datos del trabajo escrito.

Análisis de la función del gen *dmapA*
(AN4445) en el hongo *Aspergillus nidulans*
82 pp.
2014

Este trabajo se realizó en el laboratorio 107 oriente bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Agradezco el apoyo técnico de la Biol. Alma Olivia Sánchez González durante la realización de este trabajo. Agradezco el apoyo técnico del Dr. Fernando Lara Rojas durante la realización de este trabajo. Agradezco el apoyo técnico del Biol. Rafael Jaimes Arroyo durante la realización de este trabajo. Agradezco al Biol. Tadeo de Jesús Perez Covarrubias por el apoyo en los análisis bioinformáticos y en la edición de algunas figuras. Agradezco a Fabián Márquez González por su asistencia en el laboratorio.

Agradezco a mis sinodales, el Dr. Joaquín Cifuentes Blanco, el Dr. Luis Servín González, la Dra. Laura Kawasaki Watanabe y el Dr. Sigfrido Sierra Galván por sus observaciones que permitieron mejorar este trabajo.

Este trabajo fue posible gracias a los recursos proporcionados por los donativos 153256 de CONACYT, IN209211e IN207913 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (PAPIIT-UNAM) y el donativo en colaboración DFG-CONACYT Alemania-México 75306.

Se agradece a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por los servicios prestados que permitieron la realización de este trabajo.

Agradecimientos

A mis padres, José Luis Regino Contreras Jiménez y Patricia Catalina Chijate Nez por su amor, constante apoyo y darme la oportunidad de estudiar. A mi querida hermana Cecilia Herandi Contreras Chijate por siempre darme mucha lata.

A mi esposa Brenda Alicia Zamora Ávalos por su paciencia, infinito amor y apoyo incondicional tanto en buenos, como en malos momentos, te amo.

Al mi tío, Gustavo Tavizón Alvarado por su consejo y ayuda en todo momento, además de proveerme de recursos académicos.

Al Dr. Jesús Aguirre Linares por todas sus enseñanzas y darme la oportunidad de entrar a su laboratorio desde cero y poder conocer el interesante mundo de la biología molecular, la transducción de señales, las “ROS” y el desarrollo en los hongos.

A mis amigos: Sebastián Ugalde, César, Espinoza, Elizabeth Sánchez, Loray Rosales, Christian Damián, Leopoldo Vázquez, Josué Martínez, Elizabeth González, Eréndira González, Tania Salazar, Abraham Ortíz, Antonio Miranda, Antonio Vergara, Víctor Del Castillo, Verónica Díaz, Hannali Castañeda, Ana Mora, Daniela Candia y a aquellos que me faltó nombrar, gracias por su compañía y amistad a lo largo de estos años.

A la Biol. Olivia Sánchez por mantener el balance entre la luz y la oscuridad en el laboratorio. Gracias también por tus enseñanzas desde que me inicié en el taller, y por brindarnos bolsitas de té y bocadillos en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 107 Oriente y del Instituto de Fisiología Celular: Fernando Lara, Jenny Arratia, Nallely Cano, Rafael Jaimes, César Ortiz, Tadeo Pérez, Sol Hernández, Ariel Madrigal, Ignacio Velázquez, Fabián Márquez, Minerva Igrein, Ariann Mendoza, Ana Karen, Dora Alicia, Genaro Vázquez, Alan González y Miguel Sarabia. Gracias por su enseñanzas, consejos y hacer más amena la estancia en el Instituto de Fisiología Celular.

A los miembros del laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias, en especial a la Dra. Josefina Herrera y la Dra. Patricia Guevara por su guía y consejos.

Al pueblo de México que permite la existencia de la UNAM y nos da una oportunidad de estudiar y continuar nuestra formación.

Índice

Resumen	8
Introducción	9
<i>Aspergillus nidulans</i> como organismo modelo y su relación con otros hongos	9
Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i>	12
El Metabolismo Secundario y La Diferenciación Celular en Hongos Filamentosos	15
La proteína CpsA como un posible blanco de CfwA	16
Las proteínas de la familia Cps1/DIP2 se encuentran conservadas en los animales y los hongos	16
Las 5-metilcitosina DNA metil-transferasas	19
La proteína asociada a la DNA-metiltransferasa 1 (DMAP1)	21
DMAP1 en los hongos	21
Justificación	22
Objetivos	23
Objetivo General	23
Objetivos Particulares	23
Hipótesis	23
Materiales y Métodos	24
Análisis In silico	24
Cepas empleadas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento de <i>Aspergillus nidulans</i>	24
Eliminación del gen AN4445	25
Transformación por electroporación de <i>Aspergillus nidulans</i>	27

<i>Extracción del DNA</i>	28
Resultados	30
<i>El gen AN4445 codifica para un ortólogo de la proteína DMAP1</i>	30
<i>Comparación de los dominios SANT de DmapA y DMAP1</i>	34
<i>Confirmación de la existencia del gen dmapA en Aspergillus nidulans</i>	37
<i>Eliminación del gen dmapA</i>	38
<i>Las cepas ΔdmapA se encuentran en estado heterocariótico</i>	42
<i>Las cepas transformadas con la construcción para eliminar el gen dmapA presentan fenotipos variables e inestables genéticamente</i>	44
Discusión	47
Conclusiones	51
Perspectivas	52
Referencias	53
Anexos y Material Suplementario	62

Análisis de la función del gen *dmapA* (AN4445) en el hongo *Aspergillus nidulans*

Resumen

-

En el hongo *Aspergillus nidulans*, la eliminación del gen *cpsA* (AN0842) reduce drásticamente la esporulación asexual o conidiación. Este gen codifica para una proteína conservada en los hongos y en los animales y la cual posee dos dominios de adenilación y un posible dominio de unión a DMAP1. En animales DMAP1 es una proteína asociada a la DNA-metiltransferasa 1, la cual participa en la regulación de la cromatina y la expresión genética. Para evaluar la posible funcionalidad del dominio de unión a DMAP1 presente en CpsA, se llevó a cabo la eliminación del único gen presente en el genoma de *A. nidulans* que codifica para una proteína ortóloga de DMAP1, al cual hemos denominado *dmapA*. Los resultados muestran que *dmapA* es un gen esencial, cuya eliminación sólo fue posible en un estado heterocariótico. Los defectos en la conidiación y la producción de pigmentos observados en los heterocariones con la mutación $\Delta dmapA$ sugieren que la remodelación de la cromatina juega un papel central en la regulación de genes relacionados con la diferenciación celular y el metabolismo secundario en *A. nidulans*.

Introducción

***Aspergillus nidulans* como organismo modelo y su relación con otros hongos**

El hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter, es un hongo homotático de la familia Aspergillaceae (orden Eurotiales, clase Eurotiomycetes) del phylum Ascomycota (Houbraken & Samson, 2011). *A. nidulans* ha sido un importante organismo modelo por más de 50 años, entre sus ventajas encontramos que su ciclo de vida presenta tanto una fase sexual como una asexual, lo cual permite propagar el hongo fácilmente y analizar la progenie de cruces de diferentes cepas (Pontecorvo *et al.*, 1953). Su genoma tiene un tamaño aproximado de 30 MB (mega bases), y se encuentra secuenciado, ensamblado y mapeado en ocho cromosomas (Galagan *et al.*, 2005).

Los hongos miembros de la familia Aspergillaceae, a la cual pertenece *A. nidulans* son principalmente saprobios y habitan en los suelos. Algunas especies tienen un impacto positivo en actividades humanas, al utilizarse durante los diferentes procesos de fermentación para la producción de alimentos, antibióticos, ácidos orgánicos y enzimas. Entre las especies de importancia industrial podemos encontrar a *A. niger*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *Penicillium chrysogenum*, *P. roqueforti* y *P. camberti* (Houbraken *et al.*, 2014). Por otra parte especies como *A. fumigatus*, *A. parasiticus* y *A. flavus*, son patógenos oportunistas en personas inmunosuprimidas (Haas, 2011) y a su vez contaminan reservas de semillas y alimentos ya que producen toxinas; entre ellas las aflatoxinas que son potentes agentes carcinógenos (Moretti *et al.*, 2013).

Tradicionalmente la taxonomía de los aspergilli y en general de los hongos se ha realizado con base en caracteres morfológicos tales como, el aspecto de las colonias, conidióforos, conidiosporas, ascomas y ascosporas, así como algunos caracteres fisiológicos (Taylor *et al.*, 2000). Actualmente este enfoque se ha combinado junto con el análisis del espectro de metabolitos secundarios que

producen los hongos y el uso de secuencias de DNA, lo cual promete ser una herramienta útil para resolver la compleja taxonomía en este género (Samson & Varga, 2009).

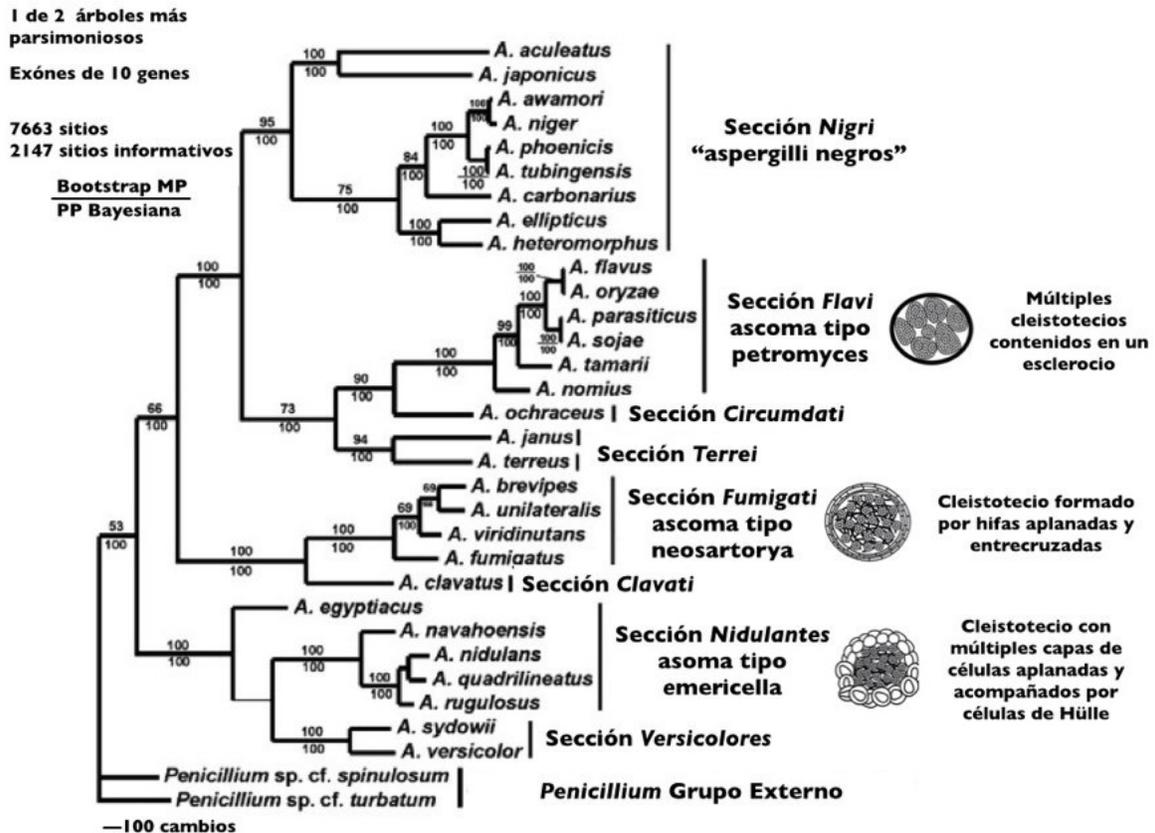


Figura 1. Relación filogenética entre algunas secciones de los aspergilli. Árbol construido con base en la secuencia de 10 genes, ver trabajo de Geiser *et al.* (2008). En la parte superior de las ramas se muestran valores de bootstrap obtenidos por el método de máxima parsimonia y debajo de las ramas la probabilidad posterior bayesiana. A la derecha se muestra el tipo de ascoma que producen durante la fase sexual cada una de las secciones de aspergilli aquí mostradas, las secciones sin ilustración no se les ha encontrado una fase sexual (figura modificada de Geiser *et al.* (2008). Las ilustraciones y descripciones de los ascomas fueron tomadas de Dyer & O'Gorman (2011).

Recientemente se resolvió que el hongo *P. chrysogenum* de la familia Aspergillaceae esta conformado por un complejo de varias especies, todas muy similares morfológicamente las cuales, fueron identificadas mediante un análisis filogenético multigénico, demostrando la existencia cuatro especies: *P.*

chrysogenum, *P. rubens* (especie a la que pertenece cepa original de Alexander Flemming), *P. chainii* y *P. floyeri*, estas dos últimas descritas como nuevas (Browne *et al.*, 2013).

Se encontraron 30 registros, entre sinónimos y subespecies para *A. nidulans* (ver material suplementario), una parte de esta sinonimia se debe al uso de un sistema de nomenclatura dual, en el cual se describían por separado tanto la fase asexual (*A. nidulans*), como la sexual (*Emericella nidulans*) de los hongos. Este sistema fue abolido debido a su complejidad y se acordó dar prioridad al primer nombre válido dado a una especie o nombrarlo conforme al género más reconocido, sin embargo se permite hacer referencia al antiguo nombre en minúscula, para resaltar el tipo de ascoma (ver tipos de ascoma en la figura 1) que produce el hongo (Hawksworth *et al.*, 2011).

Mediante análisis filogenéticos para uno o varios genes, análisis de metabolitos secundarios y evaluación del crecimiento a diferentes temperaturas, se han encontrado diferencias entre las variedades descritas de *A. nidulans* (Matsuzawa *et al.*, 2012), con base en estos criterios estos hongos podrían ser separados en un complejo de especies con una cercana relación filogenética dentro de la sección Nidulantes de los aspergilli (Peterson, 2008).

La taxonomía y correcta identificación de algunas cepas de importancia industrial se ha realizado por este método, pero siguen existiendo complicaciones, por ejemplo, la cepa *A. nidulans* var. *roseus* utilizada para la producción del antifúngico equinocandina B, mostró mas cercanía con *A. rugulosus*, aunque también se piensa que esta cepa puede ser un híbrido entre este hongo y *A. nidulans*, debido a que *A. nidulans* var. *roseus* es capaz de formar heterocariones estables con ambas especies (Toth *et al.*, 2011). Por otra parte, las cepas utilizadas para la investigación en laboratorios, así como la cepa silvestre FGSC A4 que han sido secuenciadas y analizadas filogenéticamente, continúan agrupadas como *A. nidulans* (Matsuzawa *et al.*, 2012; Toth *et al.*, 2011).

Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*

Durante la fase asexual o conidiación se forman los conidióforos, estructuras especializadas generadas a partir del micelio, que es una red de hifas o células fúngicas multinucleadas con forma de filamentos interconectados y que en ascomicetos están delimitadas por septos con cuerpos de Woronin.

Cuando el micelio es expuesto al aire (Adams *et al.*, 1998; Clutterbuck, 1969; Timberlake & Clutterbuck, 1994) se induce la conidiación, la cual inicia a partir de una hifa delimitada por dos septos denominada célula pie o basal. De este compartimento se genera una hifa aérea denominada pedicelo, la cual al terminar su crecimiento apical se hincha, formando la vesícula (Adams & Yu, 1998). En la vesícula ocurren múltiples divisiones nucleares y posteriormente se forman las mótulas a partir de gemaciones uninucleadas (Adams *et al.*, 1998; Clutterbuck, 1969; Etxebeste *et al.*, 2010). En la parte terminal de las mótulas ocurren otras dos gemaciones que originan a las fiálides, también uninucleadas (Fischer & Timberlake, 1995). A partir de las fiálides se producen, por mitosis sucesivas, las esporas asexuales, o conidiosporas, o conidios de modo que los más jóvenes se encuentran cercanos a las fiálides (Clutterbuck, 1969; Timberlake & Clutterbuck, 1994).

La fase sexual ocurre generalmente después de la conidiación, en condiciones de hipoxia y en ausencia de luz (Axelrod *et al.*, 1973). Durante esta fase se desarrollan los ascomas esféricos, también denominados cleistotecios. La formación de las células de Hülle (Elliott, 1960) indica el inicio del ciclo sexual. Estas crecen agrupadas en forma de nido, en donde se forma el primordio (Hermann *et al.*, 1983) generado a partir del tejido ascógeno o himenio, del cual se formarán hifas ascógenas con forma de gancho conocidas como uncínulos. En la penúltima célula del uncínulo se forma la célula madre del asca que es dicariótica y posteriormente ocurren la cariogamia y la meiosis (Elliott, 1960). El asca contiene cuatro núcleos después de la meiosis, los cuales se dividen mitóticamente generando ocho núcleos, que posteriormente dan lugar a ocho ascosporas. Cada

núcleo de las ascosporas pasa por otra división mitótica para producir ascosporas maduras binucleadas. La ascogénesis se repite al fusionarse la célula apical y basal del primer uncínulo, generando un segundo uncínulo, repitiendo el proceso de formación de las ascosporas (Casselton & Zolan, 2002; Martinelli, 1994).

Durante la maduración del primordio cleistotecial se forma una red de hifas estériles las cuales rodean al tejido ascógeno y forman el peridio o pared del cleistotecio, el cual al culminar su maduración se melaniza, adquiriendo una coloración oscura y tornándose rígido (Yoon, 2002). Los cleistotecios pueden contener de mil a diez mil ascosporas aproximadamente, dependiendo si son producto de una autocruza o híbridos generados a partir de la cruce de dos cepas distintas (Pöggelker, 2006).

A. nidulans también presenta un ciclo parasexual, el cual en la naturaleza ofrece a los hongos la posibilidad de generar variación genética a partir de una ruta mitótica (Pontecorvo & Kafer, 1958). El ciclo parasexual se inicia cuando los núcleos haploides de una hifa en estado heterocariótico se fusionan formando un diploide, genéticamente estable, el cual puede continuar con el desarrollo sexual y asexual (Pontecorvo *et al.*, 1953; Roper, 1952).

En ciertas condiciones al dividirse, algunos núcleos diploides pueden perder cromosomas generando núcleos aneuploides inestables, los cuales durante mitosis sucesivas pueden llegar a haploidizarse (Kafer, 1961) restaurando el número cromosómico normal ($n=8$) del hongo, pero con cromosomas heredados al azar de las 2 cepas parentales (Todd *et al.*, 2007).

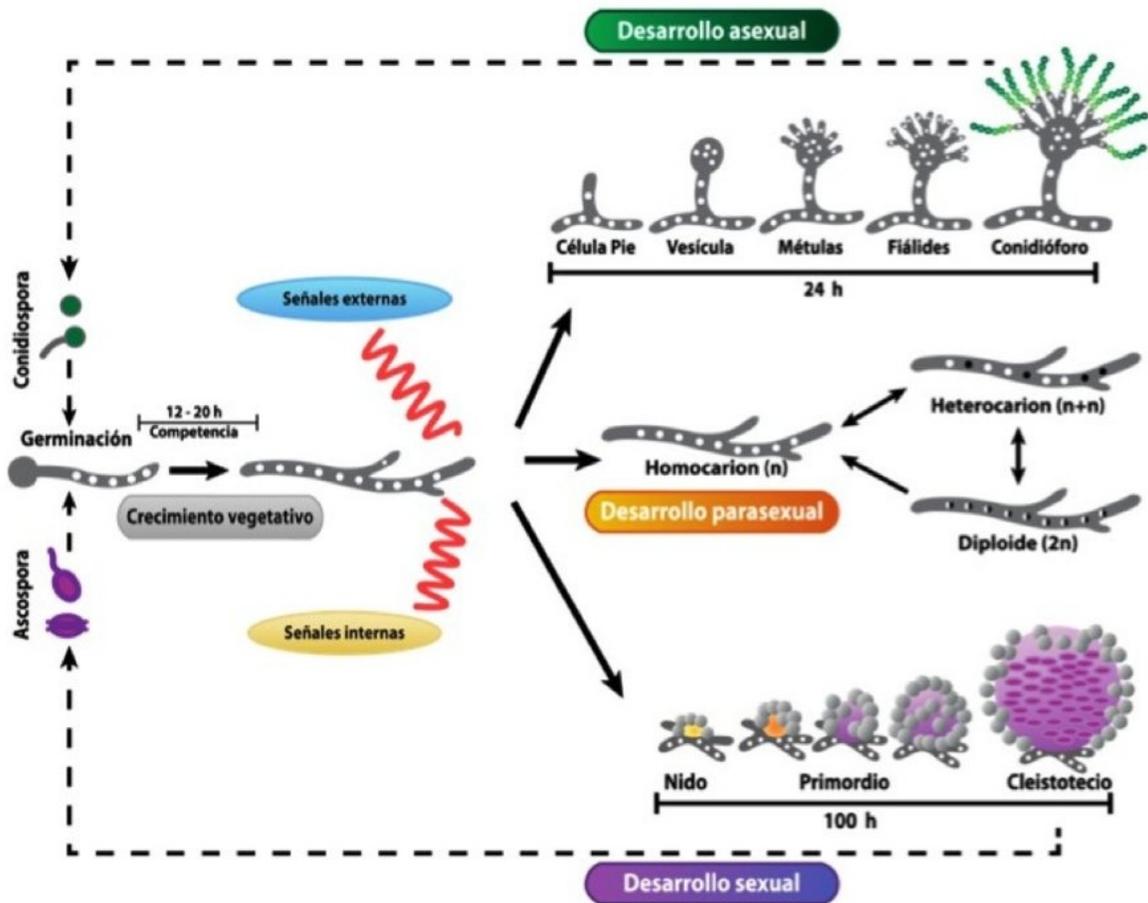


Figura 2. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. A partir de la germinación de esporas (asexuales o sexuales) puede iniciar el crecimiento vegetativo del micelio. Dependiendo de las condiciones ambientales el micelio puede diferenciarse hacia el desarrollo asexual, sexual o parasexual. Si hay nutrientes en el medio las esporas sexuales (en morado) o asexuales (verde) germinan a través un tubo germinal que crece apicalmente y forma un conjunto de células tubulares multinucleadas (círculos blancos) o micelio. Cuando el micelio se expone al aire, ocurre la diferenciación celular que culmina con la formación de los conidióforos que originan conidios uninucleados. Después del ciclo asexual suele ocurrir el ciclo sexual, el cual se caracteriza por la aparición de células Hülle y la formación de los cleistotecios que contienen las ascosporas. El ciclo parasexual es una fase donde se fusionan dos micelios diferentes, formando un micelio heterocariótico, el cual contiene dos tipos de núcleos diferentes (círculos blancos y negros). Los núcleos de un heterocarión se pueden fusionar y formar un diploide estable. Tanto el micelio heterocariótico como el micelio diploide pueden continuar con el desarrollo asexual y sexual (Figura modificada de Bayram y Braus, 2011).

El Metabolismo Secundario y La Diferenciación Celular en Hongos Filamentosos

Un aspecto importante sobre de la biología de los hongos es el metabolismo secundario, cuyos productos generalmente no se requieren para el crecimiento primario de los organismos. Los metabolitos secundarios generalmente se producen durante la fase estacionaria (Calvo *et al.*, 2002) del crecimiento de los microorganismos, o en condiciones de estrés. Estas condiciones también son favorables para los procesos de diferenciación celular, tales como la esporulación asexual y la generación de cuerpos fructíferos (Brakhage, 2013).

La mayor parte de los compuestos derivados del metabolismo secundario son producidos por dos tipos de enzimas: las sintetasas peptídicas no ribosomales (NRPS) (Finking & Marahiel, 2004) y las policétido sintetasas (PKS) (Keating & Walsh, 1999). Estos dos tipos de enzimas muestran similitud en la arquitectura modular de sus dominios catalíticos, pero además tienen en común la regulación a través de la unión covalente del cofactor 4-fosfopanteteína a una serina de un dominio denominado de tiolación o de proteína acarreadora de acilos (ACP) (Walsh *et al.*, 1997). Dicha reacción regulatoria es catalizada por enzimas de la familia de las 4-fosfopanteteinil transferasas (PPT) (Lambalot *et al.*, 1996).

La eliminación de la PPT CfwA/NpgA en *A. nidulans* elimina la producción de pigmentos de las conidiosporas y de compuestos producidos por las PKS, tales como la esterigmatocistina (Guzmán-de-Peña *et al.*, 1998), así como compuestos derivados de las NRPS, tales como la penicilina (Keszenman-Pereyra *et al.*, 2003) y los sideróforos. CfwA/NpgA también se requiere para la síntesis de lisina, función conservada en todos los hongos. Se ha propuesto que la PPT CfwA/NpgA y sus ortólogos participan en la activación de todas las PKS y NRPS. Esta enzima es esencial para la patogenicidad en ciertos hongos (Horbach *et al.*, 2009) y también es necesaria para la producción de señales para la diferenciación celular en *A. nidulans* y posiblemente otros hongos. Por lo anterior se ha propuesto que las PPT

de la familia CfwA/NpgA constituyen un blanco apropiado para el desarrollo de fármacos antifúngicos (Horbach *et al.*, 2009; Márquez-Fernández *et al.*, 2007).

La proteína CpsA como un posible blanco de CfwA

En *A. nidulans* encontramos que el gen AN0842 codifica para un ortólogo de la proteína CPS1 del hongo fitopatógeno *Cochliobolus heterostrophus*, cuya eliminación atenúa la virulencia en los ascomicetos fitopatógenos *C. heterostrophus*, *C. victoriae* y *Gibberella zeae*, por lo que se ha propuesto que CPS1 funciona como un factor de la virulencia general en los hongos fitopatógenos. El análisis de la secuencia de aminoácidos de CPS1 indica dos dominios de adenilación y un posible dominio de tiolación (Lu *et al.*, 2003), que podría ser sustrato de las PPT de la familia CfwA.

Un análisis *in silico* del ortólogo AN0842/*cpsA* en *A. nidulans* mostró que esta proteína además de conservar ambos dominios de adenilación, también posee un dominio de unión a DMAP1. Las mutantes carentes del gen *cpsA* crecen de manera similar a una cepa silvestre en medio mínimo y no se encuentran afectadas en el ciclo sexual. Sin embargo, muestran graves defectos en la esporulación asexual además de acumular un pigmento café-rojizo, lo que indica una desregulación en su metabolismo secundario (Ramos-Balderas *et al.*, en preparación).

Las proteínas de la familia Cps1/DIP2 se encuentran conservadas en los animales y los hongos

La proteína CPS1 de *C. heterostrophus* se encuentra conservada (ver figura 3) en los hongos (excepto basidiomicetos) y en los metazoarios (Lu *et al.*, 2003), teniendo como ortóloga en este último taxón a la proteína que interactúa con Disco 2 (DIP2 con las isoformas A, B y C). DIP2 se expresa en bajos niveles durante el desarrollo embrionario en los organismos modelo *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus*, y muestra patrones de expresión específicos durante el desarrollo del sistema nervioso (Mukhopadhyay *et al.*, 2002). También se ha detectado su expresión en tejidos reproductivos (endometrio) donde se le asocia con

oscilaciones hormonales del ciclo menstrual, así como en tejidos no reproductivos y en el torrente sanguíneo (Khorram *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que DIP2A interactúa en la membrana celular con la proteína similar a la folistanina 1 (FSTL1/FRP) (Ouchi *et al.*, 2010), y poco después se demostró que funciona como un receptor de tipo I para FSTL1. DIP2A también participa en la comunicación en tejidos del sistema cardiovascular (Tanaka *et al.*, 2010). DIP2A posee tres dominios: un dominio de unión a DMAP1 y dos dominios de adenilación del tipo crotonobetaneína-CoA ligasa/carnitina-Coenzima-A ligasa (CaiC) y acetil-Coenzima-A ligasa. Estos dominios se encuentran en varias proteínas que unen AMP (adenosín monofosfato) a ácidos grasos y otros sustratos.

La isoforma DIP2B se ha asociado con algunos tipos de retraso mental en humanos. En 41 personas con este padecimiento se encontró una inserción de varias copias de la secuencia CGG (denominada región frágil sensible a folato (FRA12A) en el promotor de DIP2B, lo cual reduce los niveles de expresión de DIP2B cuando este sitio se encuentra metilado, y la elevan cuando el sitio no está metilado, esto sugiere que deficiencias en la expresión de DIP2B en el cerebro, son una posible causa de los problemas neurocognitivos asociados con la mutación FRA12A (Winnepenninckx *et al.*, 2007).

Aunque las proteínas de la familia Cps1/DIP2 parecen haber adquirido funciones distintas según el Phylum y la distancia evolutiva de los organismos, se desconocen las funciones específicas que llevan a cabo, mientras que los análisis bioinformáticos a nivel de secuencia de aminoácidos de la proteína y la evidencia experimental sobre sus funciones como un receptor no concuerdan del todo (Tanaka *et al.*, 2010). Tampoco se sabe si el dominio de unión a la proteína asociada a la DNA-metiltransferasa 1 (DMAP1) presente en CpsA y otras proteínas ortólogas es funcional y tenga relación con cambios en el estado de la cromatina y la regulación genética.

Las 5-metilcitosina DNA metil-transferasas

El estado transcripcional de la cromatina depende del estado de metilación del DNA, el cual es modificado mediante las enzimas DNA metil-transferasas (Dnmt). Las Dnmt agregan un grupo metilo ($-CH_3$) a las citosinas en la posición cinco, transformándolas en 5-metilcitosina (m5C), en regiones del DNA ricas en citosina y guanina. Este mecanismo se encuentra conservado en los metazoarios y las angiospermas, así como algunos hongos y protistas. La metilación del DNA tiene una función en el silenciamiento de genes (Goll & Bestor, 2005).

Existen dos clases de Dnmt divididas en 5 familias. Las Dnmt, como Dnmt3, establecen patrones de metilación *de novo* durante el desarrollo de los organismos (Okano *et al.*, 1998). Otras como Dnmt1 (Bestor *et al.*, 1988; Gruenbaum *et al.*, 1983) y las Dnmt2 (Yoder & Bestor, 1998) mantienen los patrones de metilación durante la división celular. La cuarta familia, se encuentra únicamente en angiospermas y agrupa a las Cromometilasas (CMT) (Henikoff & Comai, 1998), las cuales metilan el DNA bajo el contexto CpNpG (Jackson *et al.*, 2002) y su función no se ha esclarecido del todo. Sin embargo, se sabe que contribuyen a la inactivación de transposones y a silenciarlos por metilación. (Goll & Bestor, 2005).

Algunas Dnmt de hongos como RID, pertenecen a una quinta familia exclusiva de hongos que participa en un mecanismo de silenciamiento de genes conocido como repetición de mutaciones puntuales inducidas (RIP) Freitag *et al.* (2002) el cual inactiva genes duplicados al insertar mutaciones de transición en el contexto C:G a A:T en ambas copias del gen (Cambareri *et al.*, 1989). Se piensa que este mecanismo funciona como defensa contra elementos móviles del DNA o transposones.

En general los hongos son organismos hipometilados; en levaduras no se ha detectado metilación del DNA (Lee *et al.*, 2010) y en hongos filamentosos se ha podido detectar solamente en ciertas fases de la meiosis durante el desarrollo sexual en los hongos *A. immersus* (Kouzminova & Selker, 2001) y en *N. crassa* (Malagnac *et al.*, 1997).

El ortólogo de Dnmt1 (DmtA) en *A. nidulans* es esencial para la formación de las ascosporas o esporas sexuales y la eliminación de *dmtA* no produce ningún otro cambio en el fenotipo del hongo (Lee *et al.*, 2008).

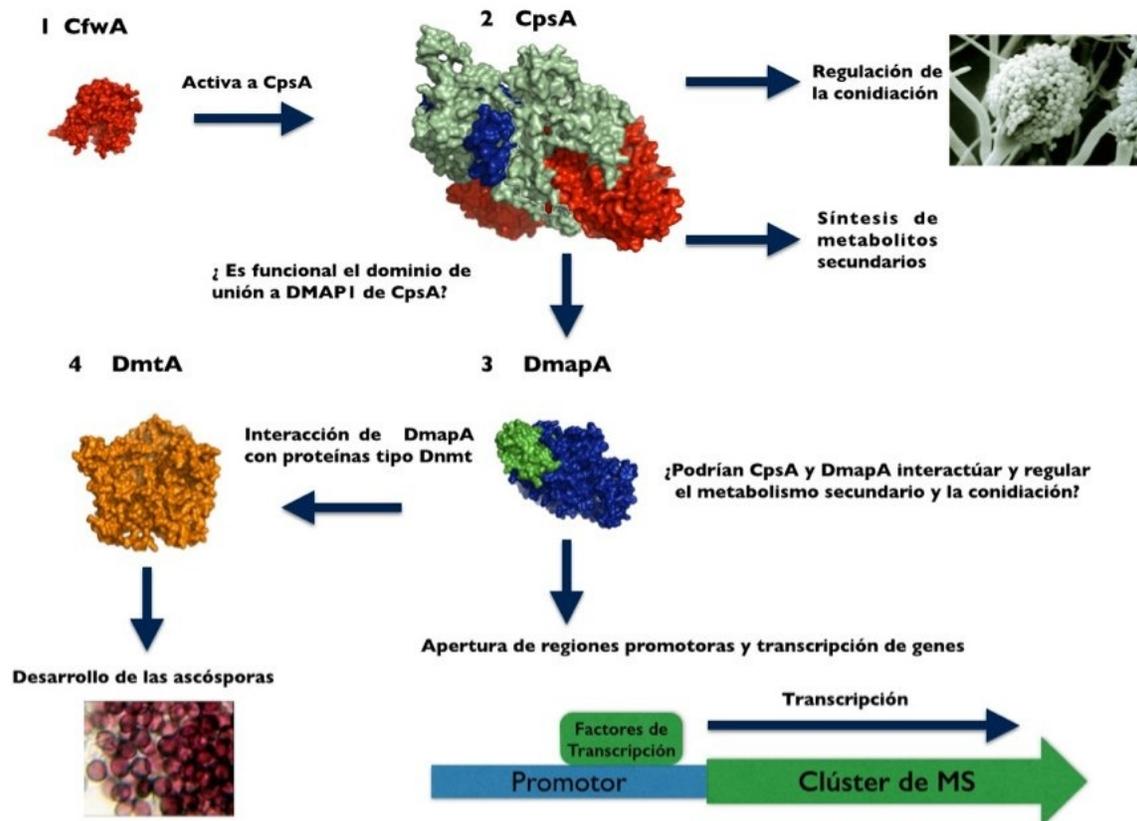


Figura 4. Esquema de las posibles interacciones entre las proteínas DmapA, CpsA y DmtA. A) La fosfopanteteneil transferasa CfwA y la acetil-CoenzimaA ligasa CpsA juegan un papel central en la regulación de la esporulación asexual y la eliminación de estas proteínas genera mutantes que comparten defectos en la conidiación. B) CpsA posee un posible dominio de unión a la proteína DmapA, objeto de este trabajo, la cual esta conservada en los eucariontes. C) DmapA podría formar parte de complejos remodeladores de la cromatina e interactuar con la DNA metiltransferasa DmtA, la cual participa en el proceso de maduración de las ascosporas. E) La apertura de la cromatina vía complejos remodeladores esta relacionada con la transcripción de algunos grupos de genes (clústeres de genes) del metabolismo secundario y la diferenciación celular en *A. nidulans*.

La proteína asociada a la DNA-metiltransferasa 1 (DMAP1)

Las Dnmt interaccionan con otras proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina, tales como la desacetilasa de histonas 2 (HDAC2) y la proteína asociada a la DNA-metiltransferasa 1 (DMAP1) (Rountree *et al.*, 2000).

DMAP1 es una proteína de aproximadamente 467 aminoácidos que interactúa con la DNMT1 (DNA metiltransferasa 1), a través de los primeros 121 aminoácidos de esta última. DMAP1 también posee un dominio SANT (Boyer *et al.*, 2004) que es un módulo de unión a la región N-terminal de las histonas. DMAP1 es por si misma un represor de la transcripción, aunque también puede interactuar con otras proteínas como, TSG101 (Gen de susceptibilidad a tumores 101) que es otro potente correpresor de la transcripción (Rountree *et al.*, 2000). DMAP1 también conocida como el represor transcripcional mediado por “menage a trois 1” MAT1 (MMTR) y es capaz de interactuar con el complejo cdk7, ciclina H y MAT1 (CAK), el cual es a su vez es un subcomplejo de la maquinaria general de transcripción (TFIIH). De manera independiente, DMAP1/MMTR también regula negativamente el ciclo celular al evitar que la cinasa CAK fosforile a la ciclina dependiente de cinasas 1 (CDK1), una proteína importante para mediar la transición normal en las fases G2/M del ciclo celular (Shin *et al.*, 2010).

DMAP1 en los hongos

Los ortólogos de DMAP1 en los hongos *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* (Eaf2 y Swc4) pertenecen a la subfamilia “Sick with Rats8” SWR1 del complejo remodelador de histonas dependiente de ATP INO80 (Bao & Shen, 2011).

El complejo SWR1 regula diversos procesos, entre ellos la transcripción de genes (Bittner *et al.*, 2004), el reclutamiento de la variante de histona H2AZ, la estabilidad cromosómica (Krogan *et al.*, 2004) y la adaptación durante el punto de control del ciclo celular inducido por daño al DNA. Eaf2/Swc4 también forma parte del subcomplejo NuA4 descrito en levaduras, el cual acetila la región N-terminal de

las histonas H4 regulando la transcripción (Auger *et al.*, 2008), la progresión del ciclo celular y la reparación del DNA (Negishi *et al.*, 2009).

Justificación

Algunas proteínas de la familia DMAP1 se han estudiado en levaduras (Micialkiewicz & Chelstowska, 2008) y otros eucariontes. Sin embargo, su papel no ha sido evaluado en los hongos filamentosos, los cuales presentan diferencias en la función de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP y en las modificaciones postraduccionales de histonas, con respecto a la levadura y otros organismos eucariontes (Brosch *et al.*, 2008).

En nuestro laboratorio se encontró que la proteína CpsA (AN0842) posee un posible dominio de unión a Dmap1 y dos dominios de adenilación. CpsA se requiere para la esporulación asexual (conidiación) y nos interesa conocer su mecanismo de acción (Ramos-Balderas *et al.*, en preparación).

En este trabajo nos planteamos eliminar el gen AN4445 de *A. nidulans*, que codifica para un posible ortólogo de DMAP1, como un primer paso para determinar su función en la diferenciación celular de este organismo.

Objetivos

Objetivo General

Eliminar el gen AN4445 que codifica para un posible ortólogo de la proteína asociada a la metiltransferasa de DNA 1 (DMAP1) y caracterizar las mutantes.

Objetivos Particulares

- Realizar un análisis *in silico* de la proteína AN4445, como posible ortólogo de DMAP1 en *Aspergillus nidulans*
- Obtener cepas mutantes nulas para el gen AN4445 (*dmapA*).
- Analizar el fenotipo de las mutantes $\Delta dmapA$.

Hipótesis

En *A. nidulans* la carencia de la proteína CpsA (AN0842) disminuye la conidiación y altera la producción de pigmentos. Si la proteína AN4445 (DMAP1) participa en la misma vía misma de CpsA, entonces la carencia de AN4445 tendrá efectos negativos en la conidiación y alterará la producción de pigmentos.

Materiales y Métodos

Análisis *In silico*

Se buscaron los ortólogos a la proteína DMAP1 de *Homo sapiens* en las bases de datos genómicos de los aspergilli presente en el Broad Institute, por medio de un BLAST de proteínas (BLASTP) (Altschul *et al.*, 1997) usando los parámetros estándar. También se realizaron búsquedas en el Gen Bank del NCBI usando el mismo algoritmo con los parámetros estándar utilizando los genomas de *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *H. sapiens*, *Caenorhabditis elegans* y *Arabidopsis thaliana*.

Posteriormente las secuencias primarias de las proteínas hipotéticas obtenidas de las bases de datos se alinearon con el algoritmo T-Coffee (Magis *et al.*, 2014; Notredame *et al.*, 2000) y se refinó el alineamiento resultante con el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), usando la suite bioinformática UGENE con los parámetros estándar (Okonechnikov *et al.*, 2012). Para otros análisis de los alineamientos se utilizó el programa Seaview (Gouy *et al.*, 2010). La generación del modelo *ab initio* de la proteína DmapA se realizó con el servidor Phyre 2 (Kelley & Sternberg, 2009) en modo intensivo. El modelo resultante de DmapA se alineó y comparó con la estructura homóloga de mayor similitud, utilizando programa MacPyMOL en su versión educativa (Schrödinger, 2010).

Cepas empleadas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento de *Aspergillus nidulans*

Las cepas de *A. nidulans* se cultivaron en medio mínimo de Käfer (Kafer, 1977), con 1% de glucosa más los suplementos necesarios para el crecimiento de cada cepa. Para preparar medios de cultivo sólidos se adicionó 1.25 g de agar por cada 100ml de medio de cultivo. Una vez sembradas las cepas se incubaron a 37 °C. El material utilizado y los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Cuadro 1. Cepas Utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Origen
CLK43	<i>pabaA1, yA2; veA1</i>	(Kawasaki <i>et al.</i> , 2002)
11035	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
TJAC1	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; ΔnkuA::argB; veA1; ΔdmapA::AfpyrG</i>	Este trabajo, cepa 11035 transformada con el producto de PCR <i>ΔdmapA</i> .
TJAC2	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; ΔnkuA::argB; veA1; ΔdmapA::AfpyrG</i>	Este trabajo, cepa 11035 transformada con el producto de PCR <i>ΔdmapA</i> .
TJAC3	<i>pyrG89; pyroA4; riboB2; ΔnkuA::argB; veA1; ΔdmapA::AfpyrG</i>	Este trabajo, cepa 11035 transformada con el producto de PCR <i>ΔdmapA</i> .

Eliminación del gen AN4445

La eliminación del gen AN4445 se hizo con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de doble unión (Yu *et al.*, 2004) para generar un amplicón lineal con el cual se transformó a *A. nidulans* por la técnica de electroporación de conidiosporas (Sánchez, 1996; Sánchez *et al.*, 1998). Se diseñaron oligonucleótidos (ver cuadro 2) para amplificar 3 kb río arriba del ORF *dmapA* usando los oligonucleótidos *dmapA* 5' For y *dmapA* 5' Rev. Posteriormente con los oligonucleótidos *dmapA* 3' For y *dmapA* 3' Rev se amplificó la región río abajo del ORF *dmapA*. En la tercera reacción de PCR se amplificó el marcador selectivo *AfpyrG* de *A. fumigatus* con los oligonucleótidos *PyrGforward* y *PyrGreverse*. El amplicón final se generó con una reacción de PCR de doble unión, donde se usaron como molde los tres productos amplificados en las rondas de PCR antes descritas, para lo cual se usaron los oligonucleótidos anidados *Nested For* y *Nested Rev*. Los parámetros usados para las PCR de doble unión, PCR diagnósticas y las PCR de secuenciación se muestran a continuación (ver cuadros 3 y 4). Todos los productos de PCR usados para reacciones de secuenciación, PCR subsecuentes y digestiones se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y se extrajeron del gel de agarosa con el Kit de QIAGEN QIAQUICK® GEL EXTRACTION KIT (50), de acuerdo con las instrucciones del

fabricante, excepto que en el paso final se utilizó agua destilada estéril, previamente calentada a 55 °C, para eluir el DNA purificado.

Cuadro 2. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'————— 3'
Diag For Diag Rev	GATCCTTCACCCGCTGTACC CAAACCAAGCAACCGAAAATC
dmapA 3' For dmapA 3' Rev	CAGTGCCTCCTCTCAGACTTCAGACTTTGTACCTTA GTCCCCTTGGGAGCCTCA
dmapA 5' For dmapA 5' Rev	TGCAGACAAGTGGAAAGGA AAGAGCATTGTTTGAGGCGGTCGTCAAGCGGACCCT
Nested For Nested Rev	GAACAGCTTTGGGCAAAA CCCACCAATGCCCCAAT
PyrGforward PyrGreverse	GCCTCAAACAATGCTCTTCACC GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC
Sec dmapA For Sec dmapA Rev	CGTCTCGATTAACAACCACTCC GACTGAATTGATCCTCAGACC

Cuadro 3. Condiciones de las PCR para los productos parciales del amplicón $\Delta dmapA$.

PCR	Región Río Arriba		Región Río Abajo		Marcador <i>AfpYrG</i>	
	Temperatura °C	Tiempo	Temperatura °C	Tiempo	Temperatura °C	Tiempo
	94	3'	94	3'	94	3'
35 Ciclos	94	30''	94	30''	94	30''
	50	40''	55	40''	55	50''
	68	3'	68	3'	68	3'
	68	7'	68	7'	72	7'

Cuadro 4. Condiciones de las PCR para generar el amplicón $\Delta dmapA$, para la secuenciación del ORF silvestre *dmapA* y las reacciones de PCR diagnósticas de las cepas $\Delta dmapA$.

PCR	Amplicón $\Delta dmapA$		Secuenciación del ORF <i>dmapA</i>		PCR Diagnóstica $\Delta dmapA$	
	Temperatura °C	Tiempo	Temperatura °C	Tiempo	Temperatura °C	Tiempo
	94	3'	94	3'	94	3'
35 Ciclos	94	45''	94	30''	94	30''
	60	30''	57	50''	57	50''
	68	7'	68	3'	68	3'
	68	7'	72	7'	72	7'

Transformación por electroporación de *Aspergillus nidulans*

Se sembraron cinco placas con medio mínimo más suplementos (piridoxina, riboflavina, uridina y uracilo) de la cepa 11035 (ver cuadro 1) y se incubaron a 37 °C durante 7 días. Una vez maduras las esporas, se rasparon de las cajas con una solución estéril de Tween 80 al 0.1 % con ayuda una asa triangular. En condiciones estériles, después de raspar la primera caja la suspensión se pasó a la segunda caja y así sucesivamente hasta coleccionar las esporas de todas las cajas. La suspensión final de esporas de las cajas se coleccionó en 1 tubo Falcon estéril de 12 ml.

Las esporas se concentraron centrifugando los tubos durante 5 minutos a 6000 rpm en una centrífuga clínica. El sobrenadante se desechó y se agregaron 12 ml de agua estéril. Las esporas se resuspendieron con un vortex. Se volvió a centrifugar durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante y se resuspendieron nuevamente las esporas en 12 ml de agua estéril. Este paso se repitió 5 veces. Finalmente las esporas limpias se resuspendieron en 2 ml de agua y se cuantificaron usando una cámara de Neubauer.

Se inoculó una concentración de 1×10^7 esporas en medio mínimo líquido más los suplementos (piridoxina, riboflavina, uridina y uracilo) y se incubaron en agitación (100 rpm) a 37 °C por dos horas. Las esporas se concentraron en dos botellas de propileno de 250 ml y se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos a 4° C utilizando el rotor Beckman JA-14 y la centrífuga Beckman Avanti J-23. Se decantó el sobrenadante dejando aproximadamente 50 ml de medio para evitar la pérdida de esporas. Para lavar las esporas se agregaron 200 ml de agua estéril fría a cada frasco resuspendiendo las esporas y centrifugando nuevamente a 6000 rpm. Este último paso se realizó dos veces. Después se decantó lo más posible de agua y se agregaron 12.5 ml de buffer de pretratamiento frío (100 ml de extracto de levadura y glucosa al 1%, HEPES 20 mM, ajustando a un pH de 8 con Tris 100 mM) a cada tubo (total 25 ml). Se resuspendieron las esporas y se incubaron con agitación a 100 rpm y una temperatura de 30 °C durante una hora.

Posteriormente se centrifugaron los frascos y se retiró el sobrenadante cuidadosamente con ayuda de una pipeta Pasteur. Finalmente se agregó 1 ml de buffer de electroporación frío (4 °C) (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 270 mM sacarosa, 1 mM de acetato de litio, esterilizar por autoclave) a cada botella (2.5 ml si son dos botellas). Las esporas se resuspendieron con una pipeta Pasteur y se distribuyeron en microtubos de 1.5 ml incubados en hielo, en alícuotas de 200 μ l, y se guardaron a una temperatura de -20 °C.

Para hacer la electroporación se descongelaron dos microtubos con conidios electrocompetentes y se hicieron alícuotas de un volumen de 50 μ l más 10 μ l del producto de PCR con el que se va a transformar. Para el control negativo se usaron 50 μ l de conidios electrocompetentes más 10 μ l de agua estéril. Ambos tubos se mezclaron con una micropipeta evitando hacer burbujas y se incubaron en hielo durante 15 minutos. La solución se pasó a una celda de electroporación (Cuvette Bio-Rad®) estéril de 0.2 cm. Los parámetros usados para electroporación fueron los siguientes: 1.0 kV, 400 W, 400 Ω y 2.5 μ F. Se usó un Gene Pulser II y el Controlador Pulser II (Bio-Rad®, Hercules, CA).

Después de la electroporación, se agregó 1 ml de medio YEG (Extracto de levadura y glucosa al 1 %, agregar 100 μ l de elementos traza, ajustar el pH a 6.5 y esterilizar en autoclave) frío a cada celda, se resuspendió con ayuda de la micropipeta y se pasó a tubos estériles de 10 ml. Para favorecer la obtención de transformantes heterocariones, a un tubo se le agregaron 30 μ l de esporas sin electroporar. Los tubos se incubaron a 30 °C por hora y media a 100 rpm. Al final del periodo de incubación, cada tubo se plaqueó con ayuda de un asa de vidrio en tres placas con medio mínimo con piridoxina y riboflavina, pero sin uridina y uracilo, para seleccionar cepas protótrofas para uracilo y uridina (*pyrG*⁺) Se dejó secar el exceso de agua de las cajas y se incubaron a 37 °C durante 5 días.

Extracción del DNA

Para extraer el DNA, se sembraron en medio mínimo de cultivo sólido pequeños cuadros de micelio cortado a partir de colonias en medio sólido y micelio, se

incubaron por cuarenta y ocho horas a 37 °C. Para colectar el micelio, se cortaron tiras delgadas de agar de las regiones periféricas de las colonias y posteriormente se cortó el micelio sobre un portaobjetos limpio y se colocó en microtubos de 1.5 μ l previamente enfriados a 4 °C. Inmediatamente se congeló el micelio en nitrógeno líquido y se liofilizó al vacío durante tres horas y media usando una “Speed Vac SAVANT®. El micelio se pulverizó usando una espátula pequeña.

El micelio en polvo se resuspendió en 600 μ l del buffer de extracción (EDTA 50 mM SDS 0.2% y 1 μ l/ml de DEPC) y se calentó a 68 °C durante 30 minutos. Después se le agregaron 400 μ l extra del buffer de extracción, ya que el agar absorbe el agua de la solución. Posteriormente se congelaron las muestras durante tres minutos en nitrógeno líquido y se centrifugaron a 12 000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregaron 200 μ l de fenol-cloroformo (1:1) a 4 °C, se mezcló con vortex y se centrifugó durante 10 minutos a 12 000 rpm. Posteriormente se recuperó la fase acuosa y esta se precipitó con un volumen de isopropanol, mezclando cuidadosamente por inversión y se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con etanol al 70 % centrifugando por 5 minutos a 12 000 rpm. Finalmente se secó el pellet durante 5 minutos a 68 °C y se resuspendió el DNA en 100 μ l de agua destilada estéril.

Resultados

El gen AN4445 codifica para un ortólogo de la proteína DMAP1

La búsqueda bioinformática de una proteína ortóloga de DMAP1 en el genoma de *A. nidulans* se realizó por medio de un BLAST de proteínas (BLASTP) con los parámetros estándar (Altschul *et al.*, 1997), en la base de datos del Broad Institute (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/GenomesIndex.html). Como molde se utilizó la secuencia de la proteína DMAP1 de *H. sapiens*, con el número de acceso en el NCBI (NP_001029196.1). El resultado de este análisis indicó la existencia de proteínas ortólogas para todos los aspergilli presentes en esta base de datos, con la excepción de *A. nidulans* (ver figura 5 A), por lo que se procedió a buscar en otras bases de datos.

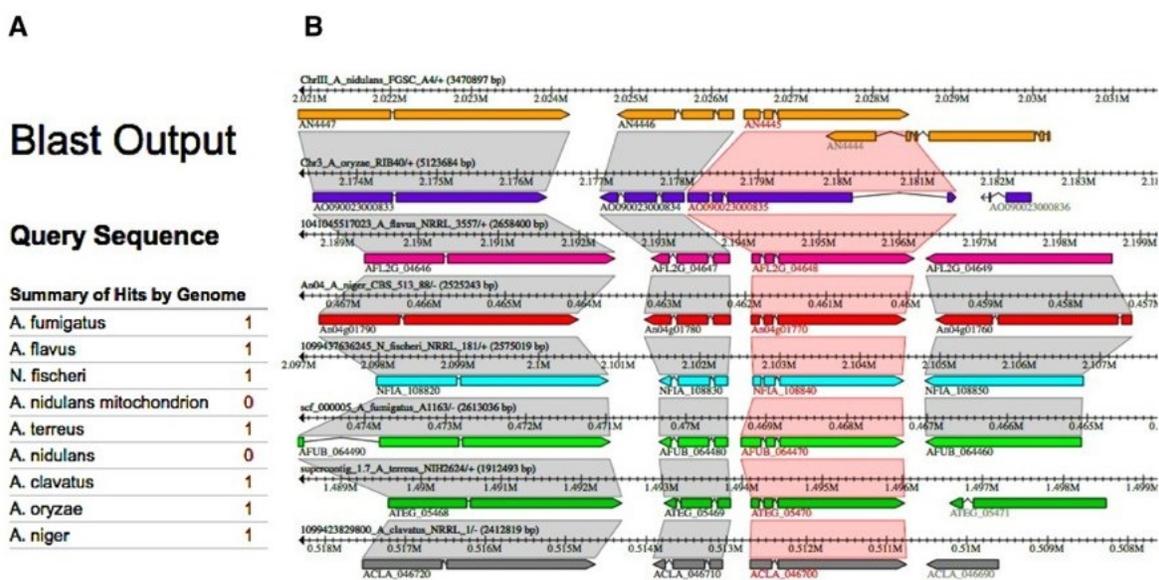
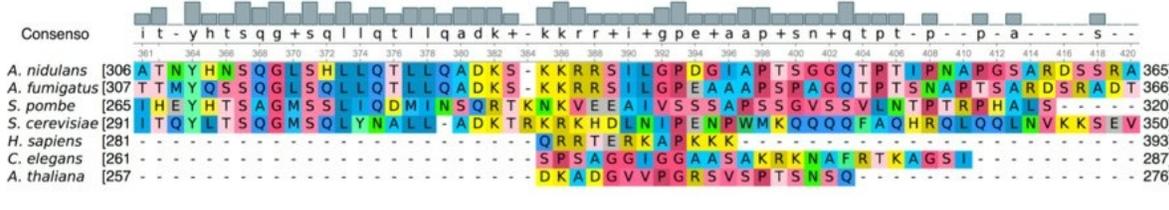
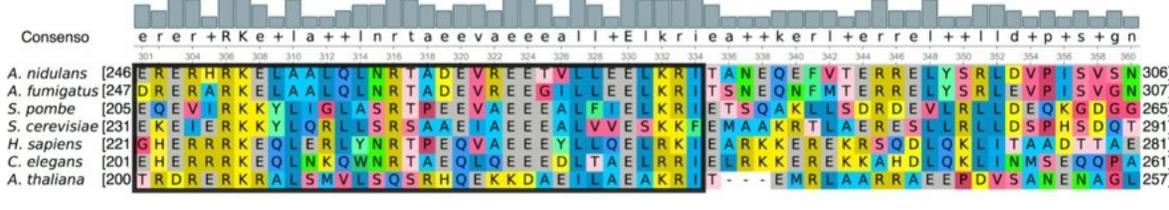
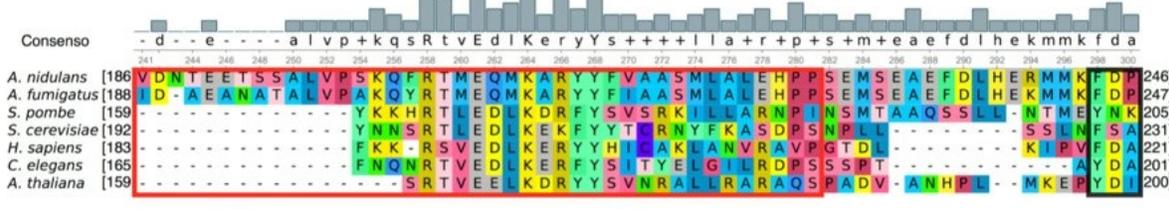
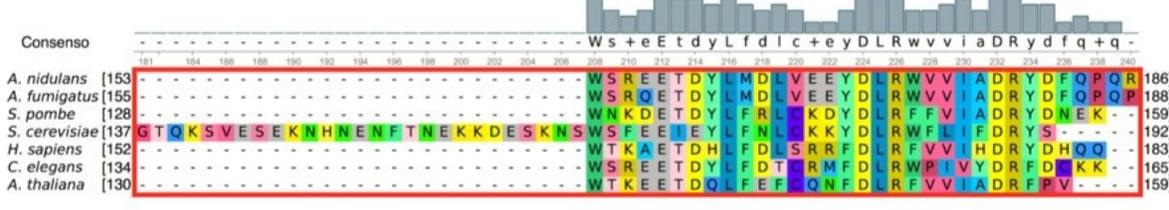
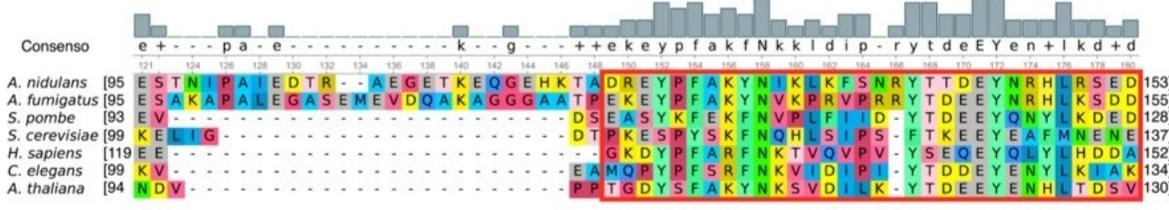
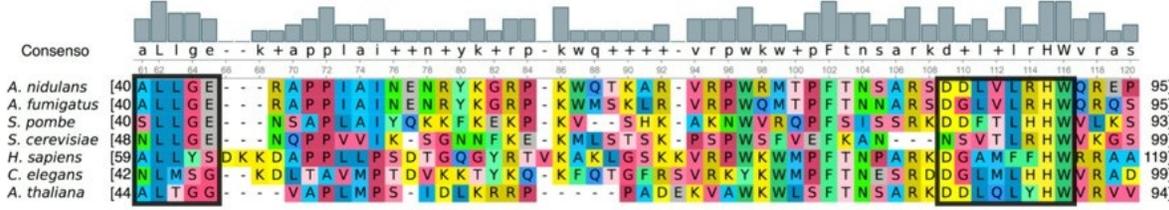


Figura 5. Resultados de la búsqueda por pBLAST de los ortólogos de DMAP1 en los aspergilli. A) Se muestran el número de secuencias ortólogas a DMAP1 en la base de datos del Broad Institute en diferentes aspergilli. **B)** Se resaltan en rojo los genes ortólogos a *dmap1*, encontrados en la base AspGD para los aspergilli. Las flechas denotan la posición del gen, la dirección en la que se transcriben y su sintenia con respecto a otros genes aledaños.



Por medio de un BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) en la base de datos del NCBI de proteínas no redundantes (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se encontró la anotación de una secuencia de *A. nidulans* con una identidad de 32% y un “e-value” de 1×10^{-25} con respecto al alineamiento local con DMAP1 de *Homo sapiens*. El gen AN4445 pertenece a una anotación de la base de datos “Aspergillus Genome Database” (AspGD; <http://www.aspergillusgenome.org>), y tiene un tamaño de 1884 nucleótidos, el cual codifica para una proteína hipotética de 594 aminoácidos. La base AspGD también indica la existencia de genes ortólogos en diferentes especies de *Aspergillus* en la base (ver figura 5, panel B), por lo que seguramente existe un error en la anotación de este gen en la base de datos del Broad Institute.

Cuadro 5. Matriz de identidad simple (excluyendo gaps) del alineamiento de la figura 6. Secuencias usadas *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schyzosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens* y *Arabidopsis thaliana*. La matriz se construyó en el programa UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012).

	A. nidulans	A. fumigatus	S. pombe	S. cerevisiae	H. sapiens	C. elegans	A. thaliana
A. nidulans	100%	72%	33%	26%	32%	24%	27%
A. fumigatus	72%	100%	33%	26%	32%	23%	28%
S. pombe	33%	33%	100%	31%	30%	25%	26%
S. cerevisiae	26%	26%	31%	100%	21%	20%	20%
H. sapiens	32%	32%	30%	21%	100%	36%	29%
C. elegans	24%	23%	25%	20%	36%	100%	25%
A. thaliana	27%	28%	26%	20%	29%	25%	100%

Porcentaje de Identidad 10% 25% 50% 70% 90%

Se realizó un alineamiento a nivel de secuencia primaria entre ortólogos de DmapA de diferentes organismos modelo y se encontró que las proteínas de hongos filamentosos poseen una mayor longitud (aproximadamente 100 aminoácidos) con respecto a la secuencias de levaduras, plantas y metazoarios (ver figura 6). Todas las secuencias de proteínas ortólogas a DMAP1 muestran entre sí una identidad global con una media no mayor al 31 %; mientras que entre *A. nidulans* y *A. flavus* se observa una identidad del 72 %.

Las proteínas de *H. sapiens* y *C. elegans* muestran una identidad del 36%. La proteína de la levadura *S. pombe* es 33 % idéntica con las de *A. flavus*, y 31 % con *S. cerevisiae*. La proteína de la angiosperma *A. thaliana* guarda una mayor identidad con la de *H. sapiens* (29 %) y *A. fumigatus* (28 %) (ver cuadro 5). Las proteínas de la familia dmap1 cd11658 (Marchler-Bauer *et al.*, 2013) comparten un dominio SANT (SWI3, ADA2, N-CoR y TFIIB), el cual se piensa que funciona como un módulo de unión a las histonas y como un andamio para interacciones proteína-proteína (Aasland *et al.*, 1996; Boyer *et al.*, 2004). Este dominio se encuentra conservado en las proteínas mostradas en el alineamiento de la figura 6.

Comparación de los dominios SANT de DmapA y DMAP1

El alineamiento apareado del dominio SANT (98 aminoácidos) de las proteínas DMAP1 y DmapA, indicó que poseen un 36 % de identidad y una similitud de un 55 %. El dominio SANT de *dmapA*, presenta una inserción de 18 aminoácidos con respecto a DMAP1 (ver figura 7 A). Utilizando el programa Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) se generó un modelo de la proteína DmapA con la secuencia de aminoácidos anteriormente deducida. 517 de 594 aminoácidos de la cadena polipeptídica fueron modelados *ab initio* y el resto de la cadena polipeptídica (77 aminoácidos) se modeló con base en un molde con el programa Phyre 2 (Kelley & Sternberg, 2009) con un nivel de confianza del 90 %.

La secuencia molde que mostró el mayor nivel de homología (100 %) con respecto a DmapA fue el cristal del dominio SANT de la proteína DMAP1 de *H. sapiens* (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=3HM5>), la región alineada entre ambas secuencias arroja un valor de identidad del 41 %. Otras secuencias que también tuvieron valores altos de homología con DmapA con valores de entre 95.5 % y 97.9 % (no se muestra) fueron proteínas que pertenecen a la superfamilia Myb-SANT y las del tipo Homeodominio. Ambas familias tienen

La región de la inserción en DmapA denotada en color amarillo en la representación del modelo en listones, no adopta una conformación ordenada en este modelo. Sin embargo el resto del dominio adopta prácticamente la misma disposición estructural que el molde DMAP1 (ver figura 8).

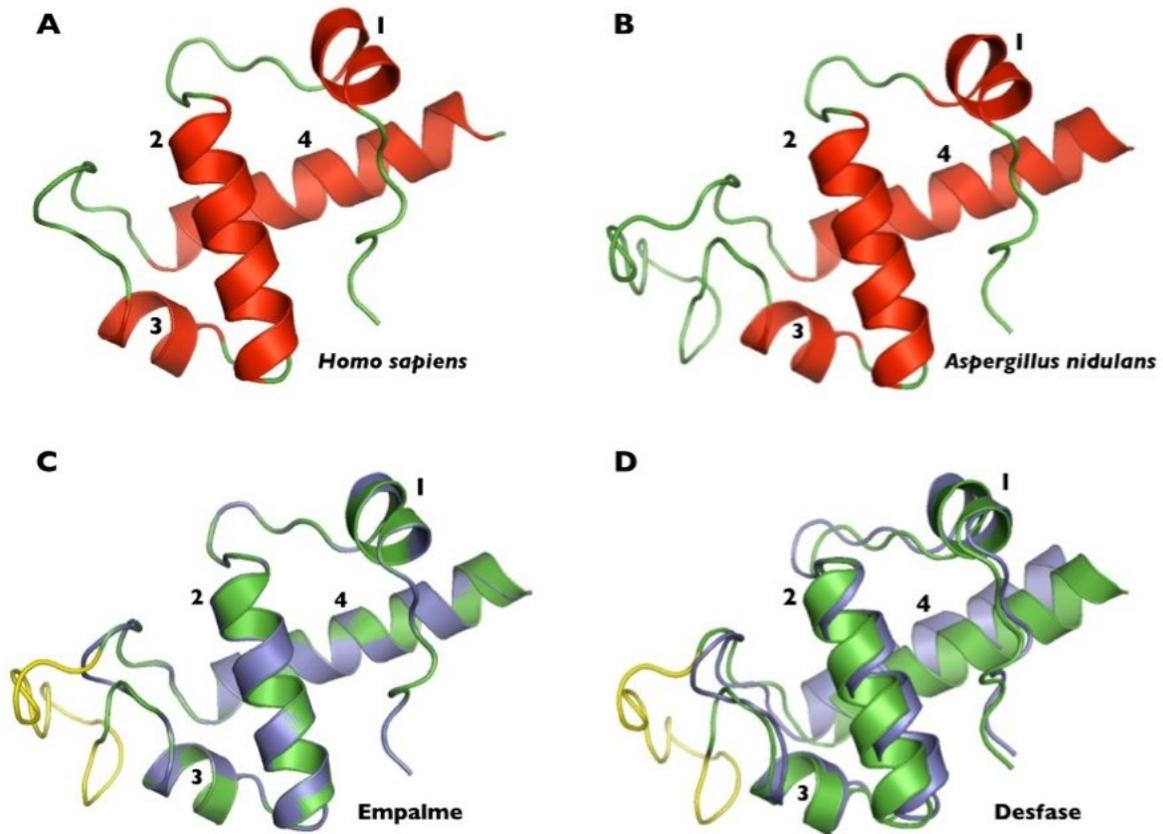


Figura 8. Dominio SANT de la proteína DMAP1 y un modelo de la región correspondiente de DmapA. A) Representación de listones del dominio SANT de DMAP1. **B)** Modelo del dominio SANT de la proteína DmapA. En rojo se colorean las cuatro alfa hélices que caracterizan al dominio SANT. **C)** Empalme entre ambos modelos. En azul se muestra a DMAP1 y a DmapA en verde; la región amarilla corresponde a la inserción que presenta DmapA con respecto a DMAP1. **D)** Ligero desfase del empalme de ambos modelos, los números indican el orden de cada hélice de amino (N-terminal) al carboxilo (C-terminal). Las proteínas se modelaron con el programa PyMOL.

Confirmación de la existencia del gen *dmapA* en *Aspergillus nidulans*

Tomando como referencia la base AspGD, se obtuvo la secuencia de nucleótidos del gen AN4445 0.8 kb río arriba y 0.7 kb río abajo del ORF. Se diseñaron oligonucleótidos (ver cuadro 2) para amplificar por PCR (ver cuadro 4) este fragmento, utilizando como molde DNA genómico de la cepa silvestre CLK43 (ver cuadro 1).

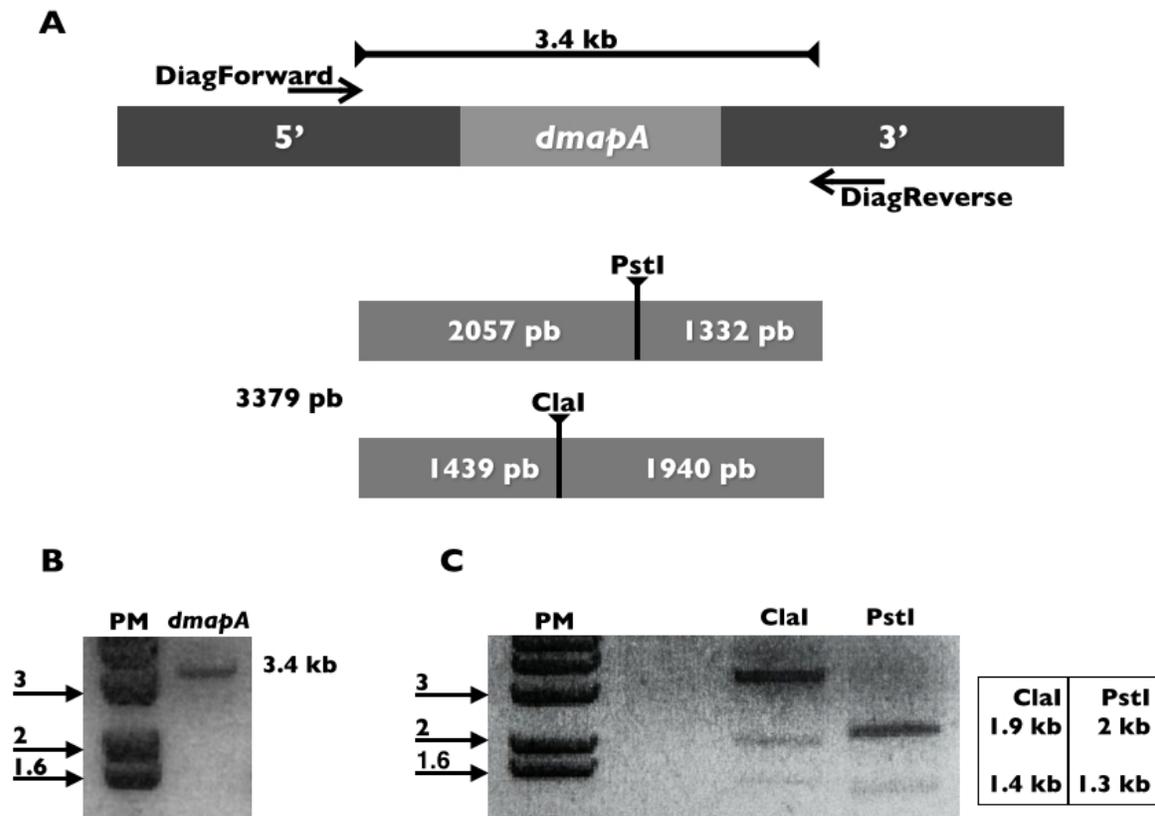


Figura 9. Amplificación del gen AN445 (*dmapA*). **A)** Estrategia de amplificación del gen *dmapA* con los oligonucleótidos indicados, denotando el tamaño del amplicón teórico esperado, así como los patrones de restricción esperado. **B)** Producto de PCR purificado de 3.4 kb. **C)** Restricción del producto de PCR con las enzimas ClaI y PstI. El patrón de restricción de ClaI corresponde a dos bandas de 1.9 kb y 1.4 kb; PstI muestra un patrón con dos bandas de 2 kb y 1.3 kb. La primer banda de la parte superior del carril de ClaI es el amplicón sin digerir.

Se obtuvo un producto de PCR con el tamaño teórico esperado, el cuál se purificó y se hicieron dos reacciones de restricción por separado usando las enzimas ClaI y PstI durante 3 horas a 37 °C. Una vez finalizadas las reacciones, estas se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se obtuvo el patrón de restricción teórico esperado para ambas enzimas (ver figura 9C), posteriormente con los oligonucleótidos “Sec” (ver cuadro 2) se realizó una secuenciación parcial de la región 5’ y 3’ del gen (no se muestra), lo que confirmó la existencia de este gen en el genoma de *A. nidulans* y al cual se decidió nombrar *dmapA*.

Eliminación del gen *dmapA*

Utilizando la técnica de PCR de doble fusión (Yu *et al.*, 2004) se generó un amplicón lineal para eliminar por recombinación homóloga al gen silvestre *dmapA*. Se diseñaron oligonucleótidos (ver cuadro 2) y por reacciones de PCR (ver cuadro 3) independientes se amplificaron fragmentos de DNA con una longitud aproximada de 2 kb de las regiones río arriba (5’) y río abajo (3’) de la secuencia codificante del gen *dmapA*. En otra PCR (ver cuadro 3) se amplificó el marcador selectivo *AfpYrG* del hongo *A. fumigatus* a partir del plásmido pFN03 (ver figura 10). Mediante una PCR final se obtuvo el amplicón 5’*dmapA*-*AfpYrG*-3’*dmapA* (ver figura 11).

La construcción anterior se usó para transformar *A. nidulans* por el método de electroporación de conidiosporas (Sánchez, 1996; Sánchez *et al.*, 1998). Se utilizó a la cepa 11035 (ver cuadro 1), en la que el gen *nkuA*, que codifica para una proteína con actividad de recombinasa, ha sido reemplazado por el marcador selectivo *argB*. Al eliminar el gen *nkuA* se elimina la recombinación no homóloga, con lo cual se aumenta la frecuencia de eventos de integración de DNA deseados (Nayak *et al.*, 2006). Las conidiosporas electroporadas se sembraron en medio carente de uridina y uracilo, seleccionando únicamente transformantes protótrofos (PyrG⁺), capaces de crecer en medio sin estos suplementos. Se obtuvieron 12 colonias transformantes PyrG⁺ (protótrofas para uridina y uracilo), las cuales

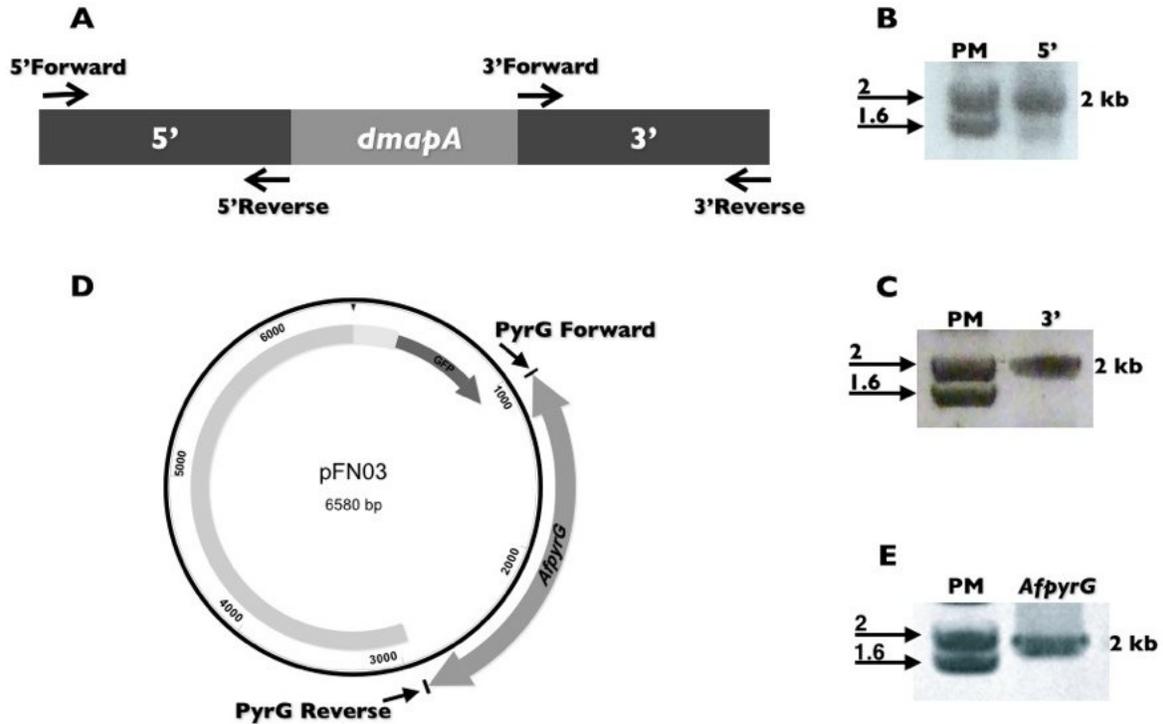


Figura 10. Generación de los productos parciales de PCR para la construcción del amplicón $\Delta dmapA$. **A)** Usando los pares de oligos representados por las flechas se amplificaron las regiones 5' y 3' que flanquean al ORF silvestre *dmapA*. Los productos esperados corresponden a una longitud de 2 kb. **B y C)** Productos de PCR purificados de las regiones 5' y 3' que flanquean al ORF *dmapA* de 2 kb longitud. **D)** Mapa de restricción del plásmido pFN03 que contiene a el gen *AfpyrG* de *A. fumigatus* de una longitud de 2 kb. **E)** Producto de PCR purificado de 2 kb correspondiente al marcador *AfpyrG*.

después de 5 días de crecimiento mostraron fenotipos heterogéneos, con patrones irregulares de conidiación y crecimiento. Cuando se sembraron conidios de estas transformantes en medio nuevo para obtener colonias aisladas crecidas a partir de una spora (uninucleada), únicamente se obtuvieron colonias en zonas de las cajas Petri donde se sembró una alta densidad de conidios, sugiriendo que el gen *dmapA* es esencial.

Para lograr conservar estas transformantes y tener micelio en constante crecimiento, se cortó micelio joven (de la periferia de la colonia) con un bisturí y se transfirió a un medio nuevo con los suplementos necesarios, pero sin uridina y uracilo (ver cuadro 2).

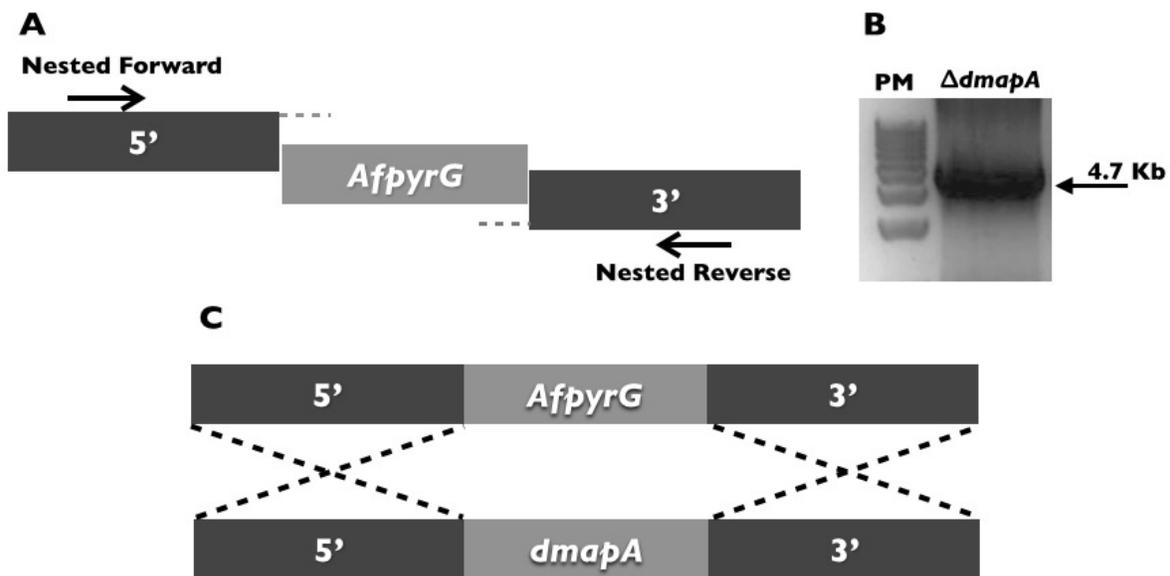


Figura 11. Generación del producto final de PCR y estrategia de eliminación del gen *dmapA*. **A)** Reacción de PCR de doble unión para obtener el amplicón $\Delta dmapA$. **B)** Producto de PCR final purificado con un tamaño de 4.7 kb. **C)** Esquema del evento de integración esperado en el cual se reemplaza el gen silvestre *dmapA* por el marcador *AfpyrG*, mediante la doble recombinación en las regiones homólogas que flanquean al ORF silvestre.

Después de una incubación de 3 días a 37 °C, se realizaron observaciones de las colonias. Estas mostraron nuevamente una esporulación irregular, por sectores. Algunas colonias resembradas presentaron una pigmentación roja y dificultad para crecer, otras colonias tuvieron un aspecto irregular (ver figura 12).

No fue posible seguir el protocolo normal para la extracción de DNA genómico, debido a que al inocular medio líquido con las esporas de las transformantes se obtuvo un crecimiento mínimo. Por lo tanto, se optó por extraer DNA genómico a partir de micelio crecido en medio sólido. Se seleccionaron las transformantes resaltadas con un asterisco rojo en la figura 12 (TJAC1-3) con base en los patrones de esporulación y crecimiento que mostraron. Se cortó el micelio de la zona de crecimiento en la periferia de las colonias seleccionadas y este se sembró en medio sólido nuevo.

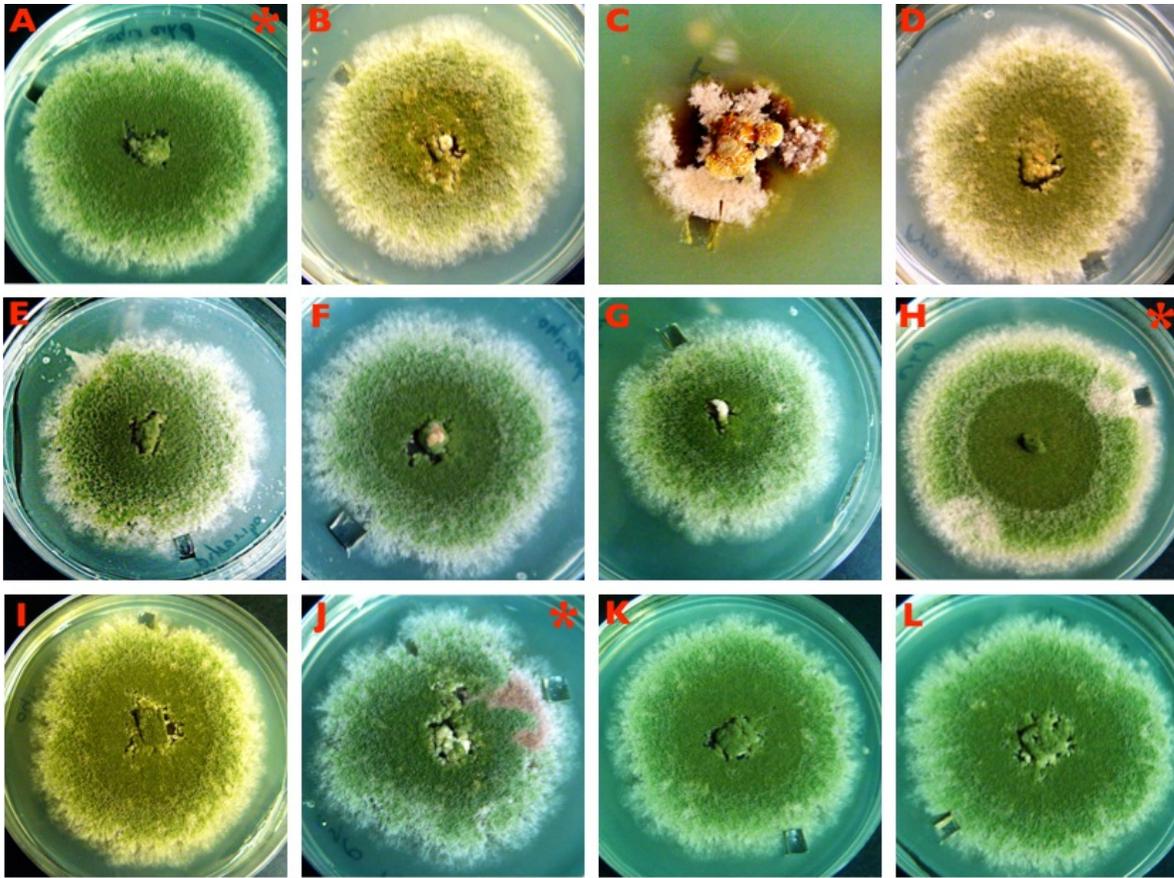


Figura 12. Transformantes obtenidas con la construcción para eliminar el gen *dmapA*. Se sembraron trozos de micelio de las transformantes originales en medio mínimo con los suplementos necesarios y se incubaron a 37 °C durante 3 días. La zona periférica de la colonia denota un crecimiento irregular y algunas colonias esporularon por sectores y generaron micelio de tipo algodonoso.

Después de incubar 48 horas a temperatura ambiente el micelio se colectó, liofilizó y se le extrajo el DNA genómico (ver protocolo en materiales y métodos). Este DNA se utilizó para llevar a cabo reacciones de PCR diagnósticas (ver cuadro 4), con el fin de comprobar la eliminación del gen *dmapA* en las transformantes obtenidas. El análisis por electroforesis de los amplicones de las 3 cepas demostró la integración del gen *AfpyrG* y la consecuente eliminación del ORF *dmapA* (ver figura 13) .

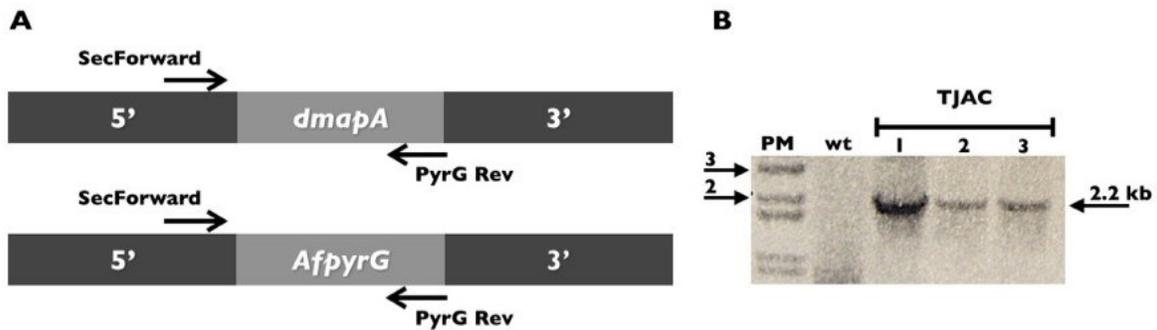


Figura 13. Comprobación de la eliminación del gen *dmapA*. A) Reacción de PCR para amplificar el marcador *AfpyrG* integrado. B) La amplificación del marcador *AfpyrG* en aquellas cepas que tengan reemplazado el gen silvestre *dmapA* por dicho marcador con un tamaño de 2.2 kb. Como control negativo se utilizó DNA de la cepa silvestre (wt) CLK43.

Las cepas $\Delta dmapA$ se encuentran en estado heterocariótico

El hecho de que no fue posible obtener colonias aisladas a partir de 12 transformantes independientes y que estas solo pudieron propagarse mediante la resiembra de fragmentos de micelio, sugiere que las transformantes contienen núcleos silvestres (*dmapA*⁺) y mutantes (*dmapA*⁻) y que el crecimiento solo puede producirse en estado heterocariótico. Para comprobar este hecho, se utilizaron los oligonucleótidos Sec For y Sec Rev para amplificar por PCR el gen *dmapA* cien pares de bases (pb) antes del codón ATG de inicio de la traducción del gen y cien pares de bases después del codón de paro de la traducción.

Se usó como molde DNA genómico de las cepa silvestre (CLK43) (ver cuadro 1) como control, y de las transformantes $\Delta dmapA$ TJAC1-3. Se obtuvieron amplicones de DNA con un tamaño aproximado de dos mil doscientas pares de bases (2.2 kb) para cada cepa, los cuales se purificaron con el Kit Qiagen y se les realizó una restricción con la enzima XhoI, y los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa como puede verse en la figura 14.

La digestión con XhoI del producto de PCR obtenido de una cepa silvestre (wt) generó bandas 1.5 y otra de 0.6 kb visiblemente tenue. Por el contrario, la

digestión del producto de PCR obtenido a partir de las 3 transformantes analizadas generó 4 bandas de aproximadamente 1.5, 1.3, 0.8, y 0.6 kb, las cuales corresponden tanto con el patrón silvestre como con el patrón esperado para la eliminación del gen *dmapA*.

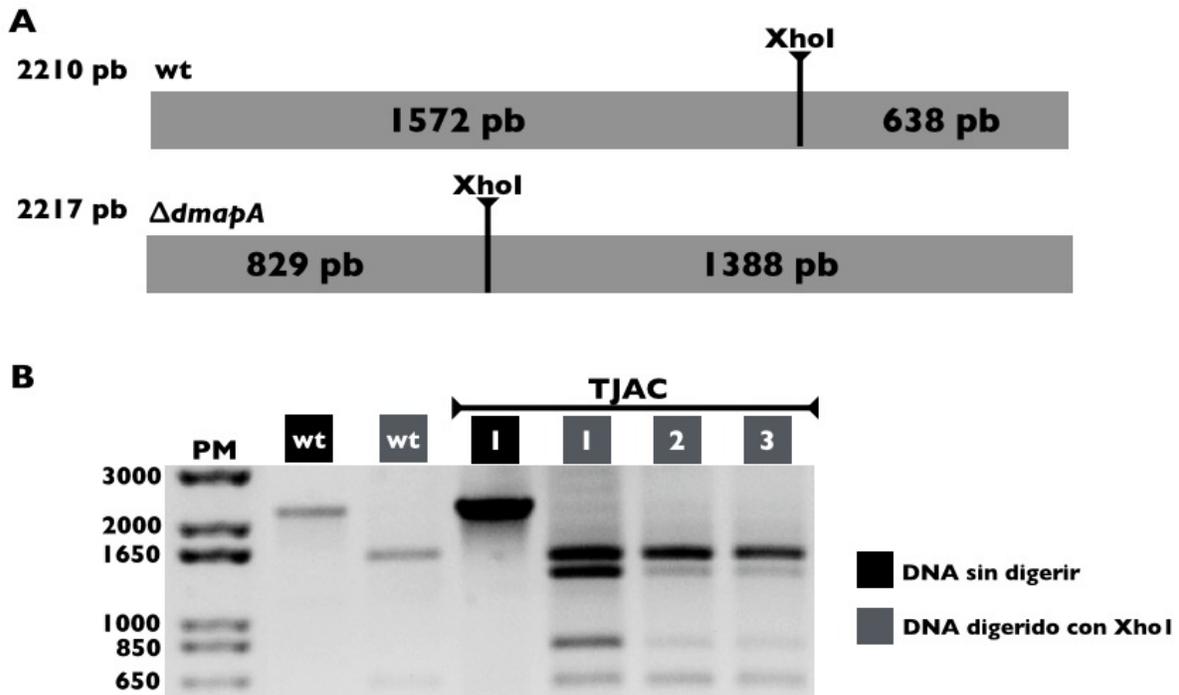


Figura 14. Comprobación del estado heterocariótico de las transformantes obtenidas con el producto de PCR para eliminar el gen *dmapA*. A) El patrón de restricción esperado para una cepa silvestre (CLK43) es de dos fragmentos de 1.5 kb y 650 pb. Para una cepa $\Delta dmapA$ la restricción esperada es de dos bandas de 1.3 kb y 829 pb. B) El patrón de 4 bandas en los carriles de las cepas TJAC1-3 muestra que las transformantes $\Delta dmapA$ se encuentran en estado heterocariótico.

Este resultado muestra que las cepas transformantes se encuentran en estado heterocariótico y que contienen núcleos silvestres y núcleos en los cuales el gen *dmapA* ha sido eliminado. La intensidad de las diferentes bandas obtenidas con el DNA de las transformantes, sugiere que la proporción de núcleos silvestres y mutantes es variable en cada transformante, lo cual podría relacionarse con las distintas morfologías observadas en dichas transformantes.

Las cepas transformadas con la construcción para eliminar el gen *dmapA* presentan fenotipos variables e inestables genéticamente

Durante las resiembras subsecuentes de una misma cepa transformante se obtuvieron colonias con fenotipos diferentes. Por ejemplo colonias zonadas, con bandas concéntricas que delimitan regiones de esporulación con aspecto variegado y vetulino y zonas alternadas de crecimiento con un aspecto algodónoso y conidióforos sin pigmentar (ver Figura 15).

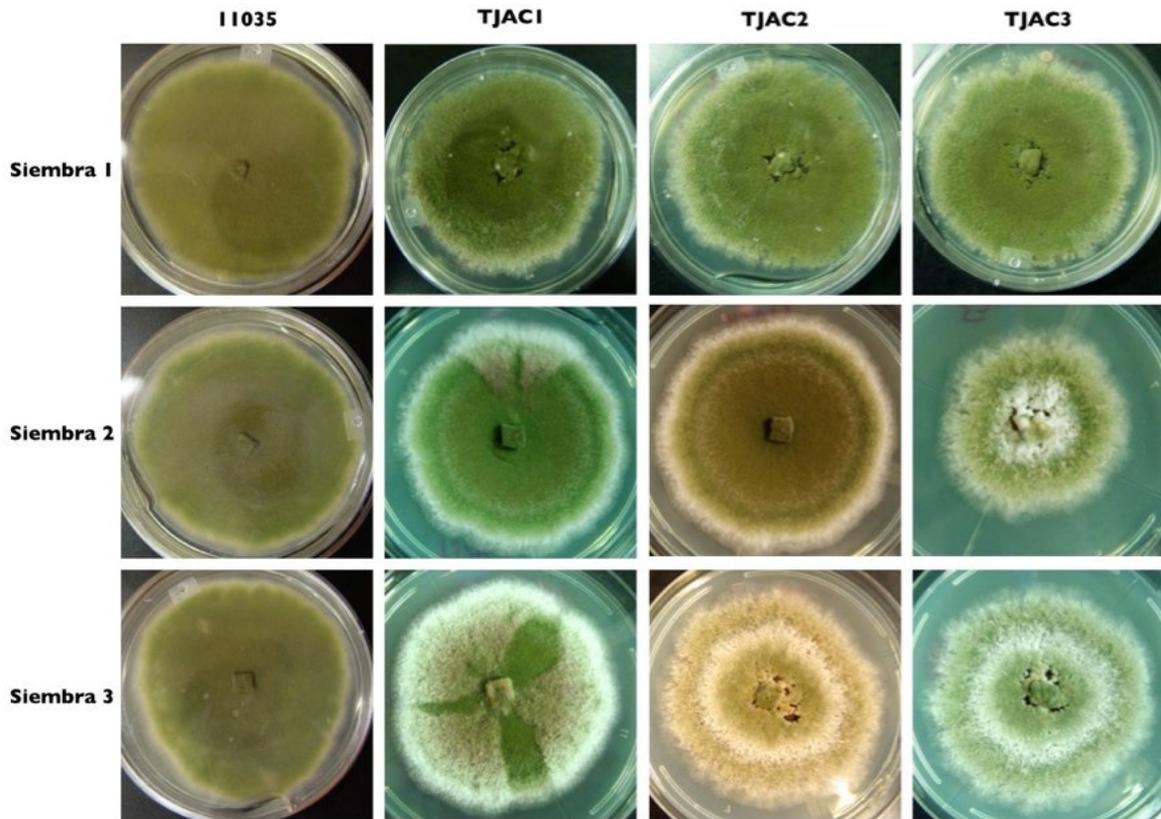


Figura 15. Cambio en los patrones de esporulación de las transformantes TJAC1-3 con respecto a la cepa parental 11035. Se cortó micelio de una colonia y se sembró en medio selectivo (ver cuadro 1) Las cepas se incubaron durante 5 días a 37 °C y posteriormente se resembraron en medio nuevo dos veces más y se fotografiaron las colonias.

En las cepas analizadas, se observaron tanto regiones con conidióforos de tipo silvestre como sectores con una densidad de esporas menor acompañados de pigmentación roja. Este fenotipo es similar al observado en cepas mutantes

ΔcpsA, así como la producción de pigmentos en la parte inferior de las cajas Petri. En la figura 16 se puede observar que las cepas TJAC1, TJAC2 y TJAC3, presentan una mayor deposición de pigmentos y metabolitos secundarios con respecto a la cepa parental 11035.

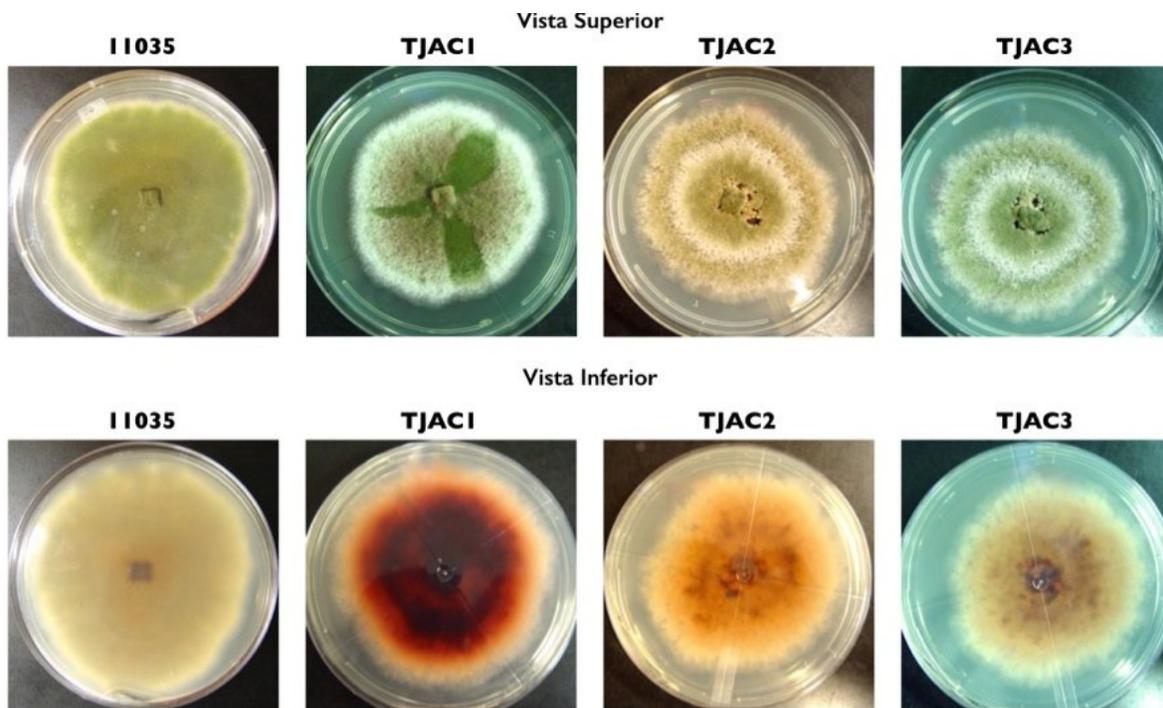


Figura 16. Las cepas *ΔdmapA* presentan un incremento en la producción de pigmentos. Vista superior e inferior de las cajas Petri de la tercer resiembra mostradas en la figura anterior. Cepa silvestre 1035, cepas *ΔdmapA* (TJAC1-3) Las cepas se incubaron durante 5 días a 37 °C.

Otro fenotipo observado se caracterizó por un crecimiento lento de colonias sectorizadas con un aspecto algodonoso (figura 15 D), y la secreción de un exudado de aspecto rórico (figura 16 E). El micelio también presentó una esporulación retardada y de tipo variegada (figura 16 F) junto con la secreción de una mayor cantidad pigmento rojo que rodea a la colonia, nótese el agar oscurecido similar al observado en la figura 16.

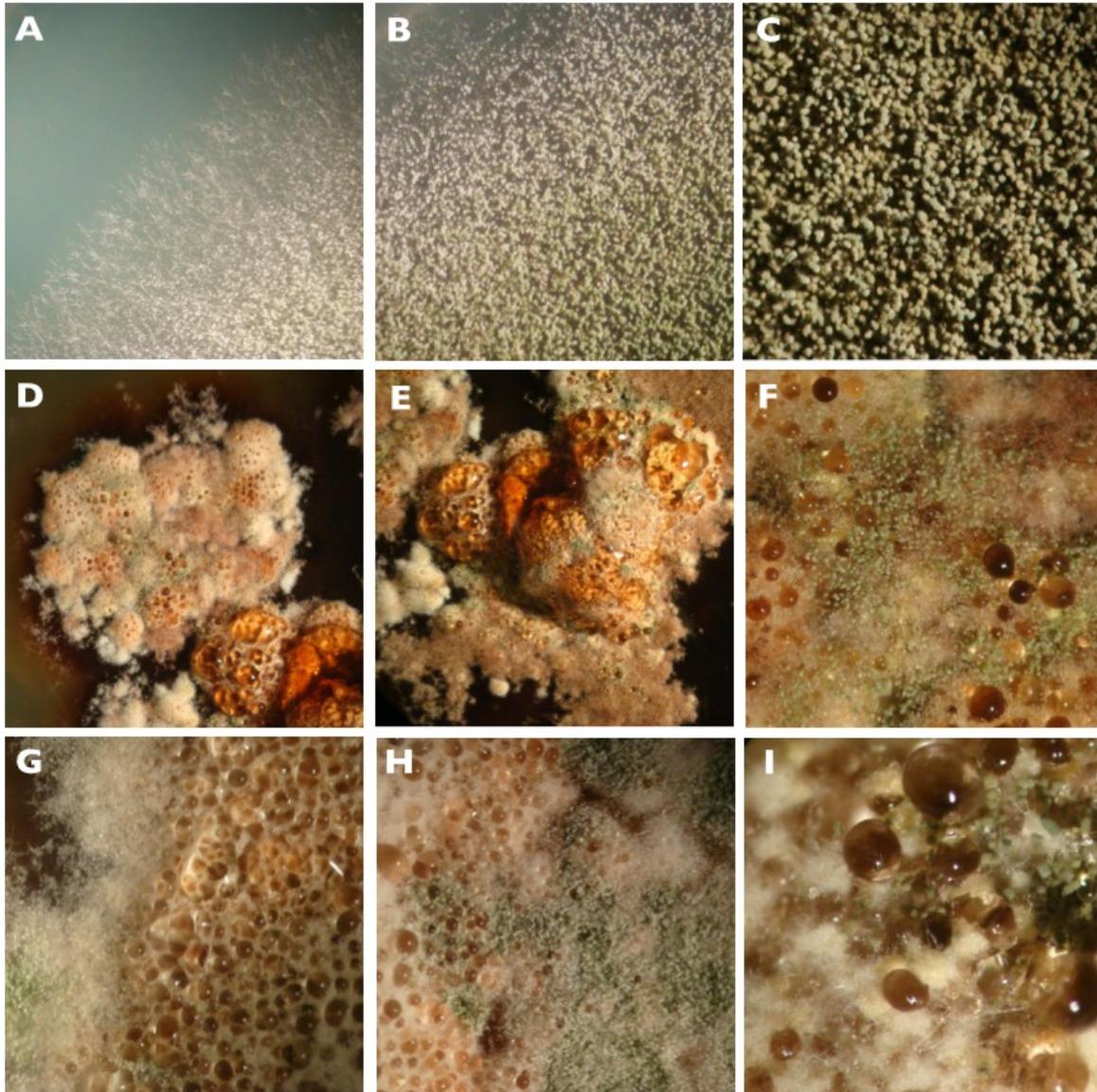


Figura 17. Las cepas $\Delta dmapA$ presentan un incremento en la producción de pigmentos. Vista superior e inferior de las cajas Petri de la tercer resiembra mostradas en la figura anterior. Cepa silvestre 1035, cepas $\Delta dmapA$ (TJAC1-3) Las cepas se incubaron durante 5 días a 37 °C.

En estas colonias hubo una mayor producción de células de Hülle y una producción exacerbada de cleistotecios de tamaño pequeño (no se muestra), posiblemente, producto de autocruzamientos de los núcleos silvestres para el gen *dmapA*.

Discusión

Nuestros resultados muestran que el hongo *A. nidulans* posee una proteína ortóloga a DMAP1 de humanos. Esta posee varias inserciones de acuerdo con la posición consenso, la primera en la posición 123, antes del dominio SANT, con una extensión de 25 aminoácidos. En el dominio SANT se presenta una inserción de 15 aminoácidos que se encuentra en otros aspergilli. Hacia la región amino terminal otra inserción en los hongos va de la posición 361 a la 384. Otra inserción va de la posición consenso 397 a la 448. Y en la región amino terminal se encuentra otro grupo de inserciones importantes de menor tamaño. Cabe resaltar que esta zona es muy variable (ver material suplementario) en proteínas ortólogas presentes en otros aspergilli. Así DmapA es cerca de 115 aminoácidos mas grande que los ortólogos presentes en animales y levaduras (ver figura 6). La secuenciación parcial realizada en nuestro laboratorio (no se muestra) confirmó la existencia de *dmapA*. Sin embargo, es necesario secuenciar un cDNA para confirmar las posibles diferencias en la distribución de los sitios de *splicing* del gen que encontramos mediante el análisis *in silico*, en donde se obtuvieron versiones mas cortas de la proteína DmapA. Sin embargo, en todas se conserva el dominio SANT (ver material suplementario), importante para la función.

Nuestros resultados muestran que no es posible eliminar el gen *dmapA* en estado homocariótico, pero sí en estado heterocariótico, con lo cual se puede concluir que *dmpA* es un gen esencial en *A. nidulans*.

Las mutantes en estado heterocariótico forman dos poblaciones de conidios uninucleados; unos carentes del gen *dmapA* (*dmapA*-) pero con la capacidad de crecer en ausencia de uridina y uracilo (PyrG+) y otros incapaces de sintetizar estos compuestos (PyrG-), pero con un gen *dmapA* silvestre (*dmapA*+). Siendo *dmapA* un gen esencial, ambos tipos de conidios son incapaces de crecer en un medio selectivo. Sin embargo, a alta densidad ambos tipos de conidios son capaces de germinar y crecer por un periodo muy corto durante el cual pueden establecer anastomosis y originar nuevamente un micelio heterocariótico capaz de

crecer en el medio selectivo. Una vez que la colonia logra establecerse y posteriormente conidiar ambos tipos de núcleos son nuevamente segregados durante la conidiación.

La esencialidad de DmapA sugiere que al igual que en otros organismos, esta proteína se requiere para la activación de genes que participan en diferentes procesos del ciclo de vida de este hongo. En *N. crassa* se ha detectado que el gen NCU04002, ortólogo a *dmapA*, incrementa sus niveles de expresión durante las primeras fases del ciclo sexual (Wang *et al.*, 2012).

Algunos genes que son esenciales en otros organismos, no lo son en ciertos hongos filamentosos. Así, la eliminación del gen de la histona H1 no produce un fenotipo evidente (Ramón *et al.*, 2000), mientras que la eliminación de los genes que forma parte de la maquinaria de siRNA no altera la viabilidad celular (Alexander *et al.*, 2008; Hammond *et al.*, 2008). En el caso de las proteínas tipo Dnmt, algunas de las cuales contribuyen a la formación de esporas sexuales (Lee *et al.*, 2008; Malagnac *et al.*, 1997) o el silenciamiento de genes (Cambareri *et al.*, 1989), estas no son esenciales para la sobrevivencia de los hongos.

Cuadro 6. Complejos remodeladores de histonas relacionados con *dmapA*/AN4445. Se encuentran subrayadas las subunidades que comparten ambos complejos; hipotéticamente AN4445/*dmapA* forma parte de dos de estos complejos. El cuadro se realizó con base en las anotaciones de la base AspGD.

Complejo	Número de Subunidades	Subunidades caracterizadas	Subunidades no caracterizadas
Acetiltransferasa de Histonas NuA4	6	<u><i>actA</i>/AN6542,</u> <u><i>dmapA</i>/AN445</u>	AN1859, AN1976, AN6567, AN7441
Swr1/SWR-C	10	<u><i>actA</i>/AN6542,</u> <u><i>dmapA</i>/AN445</u>	H2A.Z/AN8039, AN0327, AN1859, AN1971, AN1984, AN7009, AN7441, AN9077
Piccolo NuA4 Acetiltransferasa de Histonas	3	<u><i>esa</i>/AN10956</u>	AN6567, AN9126

La parte esencial en las proteínas ortólogas a DmapA, entre ellas Eaf2 y Swc4, se encuentra hacia su extremo amino terminal en lo que comprende el dominio SANT (Micialkiewicz & Chelstowska, 2008). La letalidad de la eliminación del gen probablemente se deba a que su producto tiene un papel como proteína de andamiaje en diferentes complejos remodeladores de la cromatina, entre ellos NuA4 y SWR1 (Doyon & Cote, 2004; Doyon *et al.*, 2004), los cuales en *A. nidulans* están compuestos por diferentes subunidades (ver cuadro 6). DmapA/Swc4 en *A. nidulans* se encuentra codificada por un gen único, de modo que su ausencia no permitiría remodelar el estado de la cromatina.

Los defectos en el crecimiento, la producción de conidios, pigmentos y estructuras asociadas a cuerpos fructíferos en las cepas con la mutación del gen *dmapA*, sugieren que la remodelación de la cromatina juega un papel central en la regulación de genes asociados a la diferenciación celular y el metabolismo secundario en *A. nidulans*. En el caso del metabolismo secundario, se sabe que varios clústeres de genes tienen una posición subtelomérica y que mutantes en la metiltransferasa LaeA no expresan estos clústeres, por lo que la producción de diversos metabolitos secundarios como la esterigmatocistina, la lovastatina y la penicilina se ve disminuida. Por el contrario, la sobreexpresión de LaeA dispara la expresión de los genes relacionados con la producción y la formación de estos compuestos (Bok & Keller, 2004).

En un análisis para encontrar mutantes que supriman los efectos de la eliminación de LaeA, se encontró al gen *esaA* que codifica para la subunidad catalítica del complejo acetiltransferasa de histonas NuA4. En un fondo $\Delta laeA$, la sobreexpresión de EsaA rescata la producción de metabolitos secundarios y en un fondo *laeA* silvestre la producción de metabolitos secundarios se ve incrementada notablemente. Además se activa la expresión de algunos clústeres silenciados cuya posición es subtelomérica. La acetilación de la histona 4 en la lisina 12 (H4K12ac) coincide con la expresión de estos clústeres al relajar el estado de la

cromatina y exponer las regiones promotoras de los genes de estos clústeres. Por ello, se ha propuesto a esta marca epigenética como un indicador de la inducción del metabolismo secundario en los hongos (Soukup *et al.*, 2012).

Las alteraciones en el metabolismo secundario podrían sugerir una posible interacción de DmapA con proteínas que forman parte de los complejos remodeladores de la cromatina Swr1 y de acetilación de histonas NuA4, así como de la maquinaria general de transcripción impedirían la expresión normal de clústeres de metabolismo secundario.

Es de hacer notar que los fenotipos de conidiación defectuosa en los heterocariones afectados en el gen *dmapA* son parecidos a los observados en las mutantes $\Delta cpsA$, que están impedidas en el proceso de conidiación. Sin embargo esto no demuestra una relación directa entre CpsA y DmapA, la cual queda aún pendiente de demostrar.

Conclusiones

El gen AN4445 codifica para una proteína funcional que hemos denominado DmapA, la cual es ortóloga a DMAP1 y es esencial para la sobrevivencia de *A. nidulans*.

La eliminación del gen *dmapA* en estado heterocariótico tiene efectos pleiotrópicos, que afectan el crecimiento y la diferenciación del hongo.

Se encontró que las proteínas de la familia CPS1/DIP2 también se encuentran conservadas en hongos basales del phylum Zygomycota, así como en los coanoflagelados que filogenéticamente son más cercanos a los metazoarios (ver figura 2). Esto indica que esta proteína se originó antes de la divergencia de estos tres taxa (Fungi, Metazoa, Choanozoa), los cuales son agrupados en conjunto como Opisthokonta.

Los defectos causados por la eliminación del gen $\Delta dmapA$ entre ellos, la disminución en la conidiación y la alteración en la producción de metabolitos secundarios, sugieren una relación de DmapA con la vía de la conidiación que regula CpsA.

Perspectivas

- Crear versiones truncas de la proteína DmapA permitiría establecer que dominios son importantes para su función y su relación con eventos de diferenciación celular en *A. nidulans*.
- Determinar si el dominio de unión a DmapA presente en la proteína CpsA es funcional y su importancia en la regulación de la conidiación y el metabolismo secundario, por medio de mutagénesis dirigida.
- Establecer si DmapA y CpsA interaccionan mediante técnicas de bifluorescencia molecular.
- Estudiar la red de interacciones entre DmapA y CpsA y otras proteínas, mediante ensayos de co-precipitación de proteínas y espectrometría de masas.

Referencias

- Aasland, R., Stewart, A.F., & Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends in biochemical sciences* 21, 87-88.
- Adams, T.H., Wieser, J.K., & Yu, J.H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 62, 35-54.
- Adams, T.H., & Yu, J.H. (1998). Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Current opinion in microbiology* 1, 674-677.
- Alexander, W.G., Raju, N.B., Xiao, H., Hammond, T.M., Perdue, T.D., Metzenberg, R.L., Pukkila, P.J., & Shiu, P.K.T. (2008). DCL-1 colocalizes with other components of the MSUD machinery and is required for silencing. *Fungal Genetics and Biology* 45, 719-727.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25, 3389-3402.
- Auger, A., Galarneau, L., Altaf, M., Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R.T., Cronier, D., Allard, S., & Cote, J. (2008). Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionarily links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Molecular and cellular biology* 28, 2257-2270.
- Axelrod, D.E., Gealt, M., & Pastushok, M. (1973). Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Developmental biology* 34, 9-15.
- Bao, Y., & Shen, X. (2011). SnapShot: Chromatin remodeling: INO80 and SWR1. *Cell* 144, 158-158 e152.
- Bayram, O., & Braus, G.H. (2011). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS microbiology reviews* 36, 1-24.
- Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R., & Ingram, V. (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *Journal of molecular biology* 203, 971-983.
- Bittner, C.B., Zeisig, D.T., Zeisig, B.B., & Slany, R.K. (2004). Direct physical and functional interaction of the NuA4 complex components Yaf9p and Swc4p. *Eukaryotic cell* 3, 976-983.

- Bok, J.W., & Keller, N.P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryotic cell* 3, 527-535.
13. Boyer, L.A., Latek, R.R., & Peterson, C.L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 158-163.
- Brakhage, A.A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature reviews Microbiology* 11, 21-32.
- Brosch, G., Loidl, P., & Graessle, S. (2008). Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews* 32, 409-439.
- Browne, A.G.P., Fisher, M.C., & Henk, D.A. (2013). Species-specific PCR to describe local-scale distributions of four cryptic species in the *Penicillium chrysogenum* complex. *Fungal Ecol* 6, 419-429.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., & Keller, N.P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 66, 447-459, table of contents.
- Cambareri, E.B., Jensen, B.C., Schabtach, E., & Selker, E.U. (1989). Repeat-induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*. *Science* 244, 1571-1575.
- Casselton, L., & Zolan, M. (2002). The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nature reviews Genetics* 3, 683-697.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution* 17, 540-552.
- Clutterbuck, A.J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63, 317-327.
- Doyon, Y., & Cote, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current opinion in genetics & development* 14, 147-154.
- Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W.S., Tan, S., & Cote, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Molecular and cellular biology* 24, 1884-1896.
- Dyer, P.S., & O'Gorman, C.M. (2011). A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Current opinion in microbiology* 14, 649-654.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32, 1792-1797.
- Elliott, C.G. (1960). The Cytology of *Aspergillus nidulans*. *Genet Res* 1, 462-&.

- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A., & Ugalde, U. (2010). *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends in microbiology* *18*, 569-576.
- Finking, R., & Marahiel, M.A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides¹. *Annual review of microbiology* *58*, 453-488.
- Fischer, R., & Timberlake, W.E. (1995). *Aspergillus nidulans* *apsA* (anucleate primary sterigmata) encodes a coiled-coil protein required for nuclear positioning and completion of asexual development. *The Journal of cell biology* *128*, 485-498.
- Freitag, M., Williams, R.L., Kothe, G.O., & Selker, E.U. (2002). A cytosine methyltransferase homologue is essential for repeat-induced point mutation in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 8802-8807.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Basturkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., *et al.* (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* *438*, 1105-1115.
- Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular biology and evolution* *14*, 685-695.
- Geiser, D.M., Samson, R.A., Varga, F., Rokas, A., & Witiak, S.M. (2008). A review of molecular phylogenetics in *Aspergillus*, and prospects for a robust genus-wide phylogeny. In *Aspergillus in the genomic era*, J.n. Varga, & R.A. Samson, eds. (Wageningen, Netherlands: Wageningen Academic Publishers), p. 334 p.
- Goll, M.G., & Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual review of biochemistry* *74*, 481-514.
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution* *27*, 221-224.
- Gruenbaum, Y., Szyf, M., Cedar, H., & Razin, A. (1983). Methylation of replicating and post-replicated mouse L-cell DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *80*, 4919-4921.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* *59*, 307-321.

- Guzmán-de-Peña, D., Aguirre, J., & Ruíz-Herrera, J. (1998). Correlation between the regulation of sterigmatocystin biosynthesis and asexual and sexual sporulation in *Emericella nidulans*. *Antonie van Leeuwenhoek* *73*, 199-205.
- Haas, C.N. (2011). Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control, 2nd edition. *Risk Anal* *31*, 1327-1327.
- Hammond, T.M., Bok, J.W., Andrews, M.D., Reyes-Domínguez, Y., Scazzocchio, C., & Keller, N.P. (2008). RNA silencing gene truncation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell* *7*, 339-349.
- Hawksworth, D.L., Crous, P.W., Redhead, S.A., Reynolds, D.R., Samson, R.A., Seifert, K.A., Taylor, J.W., Wingfield, M.J., Abaci, O., Aime, C., *et al.* (2011). The amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA fungus* *2*, 105-112.
- Henikoff, S., & Comai, L. (1998). A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics* *149*, 307-318.
- Hermann, T.E., Kurtz, M.B., & Champe, S.P. (1983). Laccase localized in hulle cells and cleistothecial primordia of *Aspergillus nidulans*. *Journal of bacteriology* *154*, 955-964.
- Horbach, R., Graf, A., Weihmann, F., Antelo, L., Mathea, S., Liermann, J.C., Opatz, T., Thines, E., Aguirre, J., & Deising, H.B. (2009). Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase is indispensable for fungal pathogenicity. *The Plant cell* *21*, 3379-3396.
- Houbraken, J., de Vries, R.P., & Samson, R.A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in applied microbiology* *86*, 199-249.
- Houbraken, J., & Samson, R.A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Stud Mycol*, 1-51.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X., & Jacobsen, S.E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* *416*, 556-560.
- Kafer, E. (1961). The processes of spontaneous recombination in vegetative nuclei of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* *46*, 1581-1609.
- Kafer, E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Advances in genetics* *19*, 33-131.

- Kawasaki, L., Sánchez, O., Shiozaki, K., & Aguirre, J. (2002). SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* 45, 1153-1163.
- Keating, T.A., & Walsh, C.T. (1999). Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Current opinion in chemical biology* 3, 598-606.
- Kelley, L.A., & Sternberg, M.J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature protocols* 4, 363-371.
- Keszenman-Pereyra, D., Lawrence, S., Twfieg, M.E., Price, J., & Turner, G. (2003). The *npgA/ cfwA* gene encodes a putative 4'-phosphopantetheinyl transferase which is essential for penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Current genetics* 43, 186-190.
- Khorram, O., Garthwaite, M., Johnson, M.S., Denessiouk, K.A., Han, G., Guo, T., McPhaul, L.W., Magee, T.R., Westerman, B., & Golos, T.G. (2004). Identification and characterization of a novel luciferase-like protein in the human female reproductive tract. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 5837-5846.
- Kouzminova, E., & Selker, E.U. (2001). *dim-2* encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*. *The EMBO journal* 20, 4309-4323.
- Krogan, N.J., Baetz, K., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Kwok, T.C., Thompson, N.J., Davey, M.G., Pootoolal, J., Hughes, T.R., *et al.* (2004). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13513-13518.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., & Walsh, C.T. (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & biology* 3, 923-936.
- Le, S.Q., & Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular biology and evolution* 25, 1307-1320.
- Lee, D.W., Freitag, M., Selker, E.U., & Aramayo, R. (2008). A cytosine methyltransferase homologue is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PloS one* 3, e2531.
- Lee, T.F., Zhai, J., & Meyers, B.C. (2010). Conservation and divergence in eukaryotic DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 9027-9028.

- Li, M., Tromp, J., & Zhang, L.X. (1996). On the nearest neighbour interchange distance between evolutionary trees. *Journal of theoretical biology* *182*, 463-467.
- Lu, S.W., Kroken, S., Lee, B.N., Robbertse, B., Churchill, A.C., Yoder, O.C., & Turgeon, B.G. (2003). A novel class of gene controlling virulence in plant pathogenic ascomycete fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 5980-5985.
- Magis, C., Taly, J.F., Bussotti, G., Chang, J.M., Di Tommaso, P., Erb, I., Espinosa-Carrasco, J., & Notredame, C. (2014). T-coffee: tree-based consistency objective function for alignment evaluation. *Methods in molecular biology* *1079*, 117-129.
- Malagnac, F., Wendel, B., Goyon, C., Faugeron, G., Zickler, D., Rossignol, J.L., Noyer-Weidner, M., Vollmayr, P., Trautner, T.A., & Walter, J. (1997). A gene essential for de novo methylation and development in *Ascomobolus* reveals a novel type of eukaryotic DNA methyltransferase structure. *Cell* *91*, 281-290.
- Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., *et al.* (2013). CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic acids research* *41*, D348-352.
- Márquez-Fernández, O., Trigos, A., Ramos-Balderas, J.L., Viniegra-González, G., Deising, H.B., & Aguirre, J. (2007). Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryotic cell* *6*, 710-720.
- Martinelli, S.D. (1994). *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. *Progress in industrial microbiology* *29*, 33-58.
- Matsuzawa, T., Tanaka, R., Horie, Y., Hui, Y., Abliz, P., & Yaguchi, T. (2012). The correlation among molecular phylogenetics, morphological data, and growth temperature of the genus *Emericella*, and a new species. *Mycoscience* *53*, 433-445.
- Micialkiewicz, A., & Chelstowska, A. (2008). The essential function of Swc4p - a protein shared by two chromatin-modifying complexes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* - resides within its N-terminal part. *Acta biochimica Polonica* *55*, 603-612.
- Moretti, A., Susca, A., Mule, G., Logrieco, A.F., & Proctor, R.H. (2013). Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. *International journal of food microbiology* *167*, 57-66.

- Mukhopadhyay, M., Pelka, P., DeSousa, D., Kablar, B., Schindler, A., Rudnicki, M.A., & Campos, A.R. (2002). Cloning, genomic organization and expression pattern of a novel *Drosophila* gene, the disco-interacting protein 2 (dip2), and its murine homolog. *Gene* 293, 59-65.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A., & Oakley, B.R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172, 1557-1566.
- Negishi, M., Chiba, T., Saraya, A., Miyagi, S., & Iwama, A. (2009). Dmap1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity through the DNA repair process. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 14, 1347-1357.
- Notredame, C., Higgins, D.G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology* 302, 205-217.
- Okano, M., Xie, S., & Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature genetics* 19, 219-220.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & team, U. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28, 1166-1167.
- Ouchi, N., Asaumi, Y., Ohashi, K., Higuchi, A., Sono-Romanelli, S., Oshima, Y., & Walsh, K. (2010). DIP2A functions as a FSTL1 receptor. *The Journal of biological chemistry* 285, 7127-7134.
- Peterson, S.W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100, 205-226.
- Pöggelker, S.N., M.; Kück, U. (2006). Fruiting-body development in Ascomycetes. In *The mycota I Growth, Differentiation and Sexuality*, Kües/Fischer, ed. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).
- Pontecorvo, G., & Kafer, E. (1958). Genetic analysis based on mitotic recombination. *Advances in genetics* 9, 71-104.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D., & Bufton, A.W. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics* 5, 141-238.
- Ramón, A., Muro-Pastor, M.I., Scazzocchio, C., & Gonzalez, R. (2000). Deletion of the unique gene encoding a typical histone H1 has no apparent phenotype in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* 35, 223-233.
- Roper, J.A. (1952). Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 14-15.

- Rountree, M.R., Bachman, K.E., & Baylin, S.B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature genetics* 25, 269-277.
- Samson, R.A., & Varga, J. (2009). What is a species in *Aspergillus*? *Medical Mycology* 47, S13-S20.
- Sánchez, O., & Aguirre, J. (1996). Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genet Newsl* 43, 48–51.
- Sánchez, O., Navarro, R.E., & Aguirre, J. (1998). Increased transformation frequency and tagging of developmental genes in *Aspergillus nidulans* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Molecular & general genetics* : MGG 258, 89-94.
- Schrödinger, L. (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
89. Shin, J.H., Kang, H.C., Park, Y.Y., Ha, D.H., Choi, Y.H., Eum, H.Y., Kang, B.G., Chae, J.H., Shin, I., Lee, J.H., *et al.* (2010). Corepressor MMTR/DMAP1 is an intrinsic negative regulator of CAK kinase to regulate cell cycle progression. *Biochemical and biophysical research communications* 402, 110-115.
- Soukup, A.A., Chiang, Y.M., Bok, J.W., Reyes-Domínguez, Y., Oakley, B.R., Wang, C.C., Strauss, J., & Keller, N.P. (2012). Overexpression of the *Aspergillus nidulans* histone 4 acetyltransferase EsaA increases activation of secondary metabolite production. *Molecular microbiology* 86, 314-330.
- Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic biology* 56, 564-577.
- Tanaka, M., Murakami, K., Ozaki, S., Imura, Y., Tong, X.P., Watanabe, T., Sawaki, T., Kawanami, T., Kawabata, D., Fujii, T., *et al.* (2010). DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (*Drosophila*) is a candidate receptor for follistatin-related protein/follistatin-like 1--analysis of their binding with TGF-beta superfamily proteins. *The FEBS journal* 277, 4278-4289.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., & Fisher, M.C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31, 21-32.
- Timberlake, W.E., & Clutterbuck, A.J. (1994). Genetic regulation of conidiation. *Progress in industrial microbiology* 29, 383-427.
- Todd, R.B., Davis, M.A., & Hynes, M.J. (2007). Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nature protocols* 2, 822-830.

- Toth, V., Nagy, C.T., Miskei, M., Pocsi, I., & Emri, T. (2011). Polyphasic characterization of "*Aspergillus nidulans* var. *roseus*" ATCC 58397. *Folia microbiologica* 56, 381-388.
- Walsh, C.T., Gehring, A.M., Weinreb, P.H., Quadri, L.E., & Flugel, R.S. (1997). Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Current opinion in chemical biology* 1, 309-315.
- Wang, Z., Lehr, N., Trail, F., & Townsend, J.P. (2012). Differential impact of nutrition on developmental and metabolic gene expression during fruiting body development in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 49, 405-413.
- Winnepenninckx, B., Debacker, K., Ramsay, J., Smeets, D., Smits, A., FitzPatrick, D.R., & Kooy, R.F. (2007). CGG-repeat expansion in the DIP2B gene is associated with the fragile site FRA12A on chromosome 12q13.1. *American journal of human genetics* 80, 221-231.
- Yoder, J.A., & Bestor, T.H. (1998). A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Human molecular genetics* 7, 279-284.
- Yoon, K.T.S.a.K.S. (2002). Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. *Mycobiology* 30, 117-127
- Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Domínguez, Y., & Scazzocchio, C. (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal genetics and biology : FG & B* 41, 973-981.

Anexos y Material Suplementario

Cuadro S1. Sinonimia para *Aspergillus nidulans*, los nombres se obtuvieron del Index Fungorum, (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>) realizando la búsqueda con el nombre de la fase asexual, *Aspergillus nidulans* y de la sexual *Emericella nidulans*.

	Nombre Válido	Sinónimos
1	<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) G. Winter	
2		<i>Aspergillus heterothallicus</i> Kwon-Chung, Fennell & Raper
4		<i>Aspergillus nidulans</i> mut. <i>fertilior</i> Henrard
5		<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>acristatus</i> Fennell & Raper
6		<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>albus</i> J.L. Yuill
7		<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>cesarii</i> Pinoy
8		<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>dentatus</i> D.K. Sandhu & R.S. Sandhu
9		<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>echinulatus</i> Fennell & Raper
10		<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>fertilior</i> Henrard
11		<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>imminutus</i> Henrard
12		<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>latus</i> Thom & Raper
13		<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>nicollei</i> (Pinoy) Pinoy
14		<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) G. Winter
15		<i>Aspergillus nidulellus</i> Samson & W. Gams
16		<i>Diplostephanus nidulans</i> (Eidam) Langeron
17		<i>Diplostephanus nidulans</i> var. <i>nicollei</i> (Pinoy) Neveu-Lem
18		<i>Diplostephanus nidulans</i> (Eidam) Langeron
19		<i>Emericella acristata</i> (Fennell & Raper) Y. Horie
20		<i>Emericella dentata</i> (D.K. Sandhu & R.S. Sandhu) Y. Horie
21		<i>Emericella echinulata</i> (Fennell & Raper) Y. Horie
22		<i>Emericella heterothallica</i> (Kwon-Chung, Fennell & Raper) Malloch & Cain
23		<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill
24		<i>Emericella nidulans</i> var. <i>acristata</i> Subram
25		<i>Emericella nidulans</i> var. <i>dentata</i> Subram
26		<i>Emericella nidulans</i> var. <i>echinulata</i> Godeas
27		<i>Emericella nidulans</i> var. <i>lata</i> (Thom & Raper) Subram
28		<i>Emericella nidulans</i> (Eidam) Vuill.
29		<i>Sterigmatocystis nidulans</i> Eidam
30		<i>Sterigmatocystis nidulans</i> var. <i>nicollei</i> Pinoy
31		<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>roseus</i> Boeck & Kastner

1

Consenso	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. nidulans	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. versicolor	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. sydowii	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. flavus	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. oryzae	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. terreus	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. niger	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. clavatus	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	GSVLDIQY	MDANNHDT	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. fischeri	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	ETDVQAS	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. fumigatus	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. glaucus	MAAADVRDM	LDLPAE	QO	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. wentii	MAAADVRDM	LDLPAE	Q	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG
A. acidus	MAAADVRDM	LDLPAE	---	QPRPHKKQK	VVEKRF	---	---	---	---	EGITRELYA	LLGERAPPI	AINENRYKG

82

Consenso	RPKWSKLR	VRPWRMXP	TNXARSDGL	VLRHWRQX	EKXXXPAL	GX-EXEXDE	XXK---XEX	GAXKX---X	X	DEYXFAKY
A. nidulans	RPKWSKLR	VRPWRMXP	TNSARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	DT-RAE-GE	TK----EQ	GEHKT---A	DREYFFAKY	
A. versicolor	RPKWSKLR	VRPWRMXP	SNDARTDGL	VLRHWRQES	EATNAPAIE	GP-ETE-DD	QKK---EQ	GENKD---AE	KDEYFFAKY	
A. sydowii	RPKWSKLR	VRPWRMXP	SNDARTDGL	VLRHWRQES	EATNAPAIE	GP-ETE-GD	QTK---EQ	GEPKT---AE	KDEYFFAKY	
A. flavus	RPKWSKLR	VRPWRMXP	TNEARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	GP-ETE-GE	EQK---QDE	GAPQT---P	DDEYLFYKY	
A. oryzae	RPKWSKLR	VRPWRMXP	TNEARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	GP-ETE-GE	EQK---QDE	GAPQT---P	DDEYLFYKY	
A. terreus	RPKWSKLR	VRPWRMXP	TNSARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	GP-ETE-GE	QOK---PEE	DASKP---L	DEYFFAKY	
A. niger	RPKWSKLR	VRPWRMXP	INSARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	GP-ETE-GE	-KE---DNA	DASTSDNVP	QDSDYFAKY	
A. clavatus	RPKWSKLR	VRPWRMXP	TNSARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	GP-ETE-GE	-AK---VED	GAVKP---A	DRTYSFAKY	
A. fischeri	RPKWSKLR	VRPWRMXP	TNSARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	GP-ETE-GE	-AK---AEG	GAAKP---	GDEYFAKY	
A. fumigatus	RPKWSKLR	VRPWRMXP	TNSARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	GP-ETE-GE	-AK---AGG	GAATP---	EKEYFFAKY	
A. glaucus	RPKWSKLR	VRPWRMXP	TNSARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	GP-ETE-GE	EKKEPEEEE	GVPKP---R	EDEYFFVYKY	
A. wentii	RPKWSKLR	VRPWRMXP	TNSARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	GP-ETE-GE	--K---NEE	GAPKP---P	EDEYSFAKY	
A. acidus	RPKWSKLR	VRPWRMXP	INSARSDDL	VLRHWRQEP	EYTNLPAIE	GP-ETE-GE	GS-EMDVE	DASTSDNVP	QDSDYFAKY	

163

Consenso	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	QPDXXXNX	-X	ALVPAKX	YRTMEQMKA
A. nidulans	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	QVVDNTEET	SS	ALVPSKQ	FRTMEQMKA
A. versicolor	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	QPIDNTESS	-T	ALVPSKR	YRTMEQMKA
A. sydowii	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	QPIDNTESS	-T	ALVPSKR	YRTMEQMKA
A. flavus	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	HPVDAETNN	-S	ALVPAQ	YRTMEHMKA
A. oryzae	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	HPVDAETNN	-S	ALVPAQ	YRTMEHMKA
A. terreus	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	RSEDSTSN	-N	ALVPAK	YRTMEQMS
A. niger	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	HSVDGTSNN	AS	ALVPAK	YRTMEQMS
A. clavatus	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	QPADSEANA	-T	ALVPAK	YRTMEQMKA
A. fischeri	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	QPIDAANA	-T	ALVPAK	YRTMEQMKA
A. fumigatus	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	QPIDAANA	-T	ALVPAK	YRTMEQMKA
A. glaucus	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	QPIDAANA	-T	ALVPAK	YRTMEQMKA
A. wentii	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	QALDAANA	-S	ALVPAK	YRTMEQMKA
A. acidus	NXKARVPXR	YTDEEYNRH	LKSDWSRQ	ETDYLMDLV	EYDLRWVV	IADRYDFQP	HSVDGTSNN	TS	ALVPAK	YRTMEQMS

244

Consenso	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. nidulans	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. versicolor	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. sydowii	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. flavus	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. oryzae	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. terreus	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. niger	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. clavatus	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. fischeri	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. fumigatus	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. glaucus	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. wentii	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR
A. acidus	RYFFXAASM	LALHPHPPSE	MSEAEFDLH	EKMMKFDPX	RERXKELA	ALQLNRTAD	EVREEGILL	EELKRITAN	EQXFIXERR

325

Consenso	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	QSSQGLSQL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. nidulans	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. versicolor	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. sydowii	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. flavus	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. oryzae	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. terreus	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. niger	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. clavatus	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. fischeri	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. fumigatus	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. glaucus	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. wentii	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX
A. acidus	ELYSRLEVP	ISVGNNTMY	HNSQGLSHL	LQTLQADK	SKKRRSILG	PE-GAASP	AGQTHX-PN	APXSARD-S	RADTPSXXX

406

Consenso	-AAPTXXKA	A-----	-----XAAA	AAANKEXXQ	QXXKTLTPA	EEARYGVQH	HDRLAPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSNVQT
A._nidulans	TQSTTTKKA	A-----	-----AAANREAAQ	QAIRTLTPA	EEARYGVQH	HDRLAPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSHVQT	
A._versicolor	AQPPTTKKA	A-----	-----AAV	AAANKEAAQ	QAIRKNSLPA	EEARYGVQH	HDRLAPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSHVQT
A._sydowii	AQPPTTKKA	A-----	-----AAA	AAANKEAAQ	QAIRKNSLPA	EEARYGVQH	HDRLAPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSHVQT
A._flavus	-AAPTNNKA	A-----	-----AA	AAANKEA-Q	QSIIRTLTPS	EEARYGVQH	HDRLAPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSNVQT
A._oryzae	-AAPTNNKA	A-----	-----AA	AAANKEA-Q	QSIIRTLTPS	EEARYGVQH	HDRLAPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSNVQT
A._terreus	-AAPTSKKA	A-----	-----AAAA	AAAKQQAQ	QIVRTLTPA	EEAKYGVQH	HERLAPSVQ	FRSDRAQKL	TQAKSNVQT
A._niger	AAAPTNNKA	A-----	-----AAAAAA	AAANKEAAQ	QAVRTLTPA	EEAKYGVQH	HDRLAPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSNVQT
A._clavatus	-AAPTNNKA	SNAAAAAA	AAASTAASS	AAAKEP-Q	HTVKTLLTA	EEARYGVQH	HDRLAPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSNVQS
A._fischeri	-AGPSNKKG	S-----	-----AAAA	AAAKEP-P	QIVKTLTPA	EEARYGVQH	HDRLVPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSNVQS
A._fumigatus	-AGPSSKKG	S-----	-----T	AAAKEP-P	QIVKTLTPA	EEARYGVQH	HDRLVPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSNVQS
A._glaucus	--APATKKA	A-----	-----AAAA	AAANKEPQQ	QIVKTLTPA	EESRYGVQH	HERLTPSVQ	FRSDRPAKL	THAKSNVQS
A._wentii	-AALSNNKA	A-----	-----AAA	AAATKDT-P	PAAKTLTPA	EEARYGVQH	HERLAPSVQ	FRSDRAQKL	TQAKSNVQS
A._acidus	AAAPTNNKA	A-----	-----AAAAAA	AAANKEAAQ	QAVRTLTPA	EEAKYGVQH	HDRLAPGVQ	FRSDRAQKL	TQAKSNVQT

487

Consenso	QKLAALAE	LEXPLRLVM	PTERVCKEF	EKLIHSVNL	LLDARKVSE	KVESEIRVL	EAAKEERER	KAKEXXEKE	K-PEVKXE-
A._nidulans	QKLASALAE	LEVPLRLFM	PTERVVKEF	EKLIHSVNL	LLDARKVAE	KVESEIRVL	EAAKEERER	KAKELREKD	K-PEVKSE-
A._versicolor	QKLASALAE	LEIPLRLVM	PTERVVKDF	EKLIHSVNL	LLEARKVSE	KVESEIRVL	ESAKEERER	KAKELREKE	K-PEVKSE-
A._sydowii	QKLASALAE	LEIPLRLVM	PTERVVKDF	EKLIHSVNL	LLEARKVAE	KVESEIRVL	ESAKEERER	KAKELREKE	K-PEVKSE-
A._flavus	QKLAALAE	LEVPLRLVM	PTERVCKEF	EKLIHSVNL	LLDARKVAE	KVESEIRVL	EAAKQERER	KAKEAKEKE	K-PEVKTE-
A._oryzae	QKLAALAE	LEVPLRLVM	PTERVCKEF	EKLIHSVNL	LLDARKVAE	KVESEIRVL	EAAKQERER	KAKEAKEKE	K-PEVKTE-
A._terreus	QKLAALAE	LEVPLRLVM	PTERVCKEF	EKLIHSVNL	LLDARKVSE	KVESEIRVL	EAAKEERER	KEREAKEKE	N-POVKTE-
A._niger	QKLAALAE	LEVPLRLVM	PTERVCKDF	EKLIHSVNL	LLEARKVSE	KVESEIRVL	EAAKEEREK	KAKEALEKD	SHPEVKSEQ
A._clavatus	QKLAALAE	LEIPPLRLVM	PTERVCKEF	ERLIHSVNL	LLDARKVSE	KVESEIRVL	ESAREERER	KTKESKEKE	K-PEVKAE-
A._fischeri	QKLATALSE	LEIPPLRLM	PTERVCKEF	EKLIHSVNL	LLDARKVSE	KIESEIRVL	EAAAREERER	KTKEVKDKG	K-PEVKSE-
A._fumigatus	QKLATALAE	LEIPPLRLM	PTERVCKEF	EKLIHSVNL	LLDARKVSE	KIESEIRVL	EAAAREERER	KTKEVKDKG	K-PEVKSE-
A._glaucus	QKLAALAE	LEVPPRLVM	PTERLCKEF	ERLIVSVNA	LLDARKMGE	KVESEIRVL	EAAKEERER	KEQANEKE	N-POVKTE-
A._wentii	QKLAALAE	LEIPPLRLVM	PTERVCKDF	EKLIHSVNL	LLDARKVSE	KVESEIRVL	EAAAREERQ	KAGEVGGKE	K-PEVKTE-
A._acidus	QKLAALAE	LEVPLRLVM	PTERVCRDF	EKLIHSVNL	LLEARKVSE	KVESEIRVL	EAAKEEREK	KAKEALEKD	GHPEVKSEQ

568

Consenso	QXDNXXPXA	XXXXXXXX-	XAXXAXXX	XXXXXXXXG	XXXXXA-G	XXXXXXXXX	----XXG	XS-	HKRSAS	VLSNXSDKS
A._nidulans	QQDNDVPIP	PAPAPV---	AAGDASQTG	QPAKTNQEG	AELNGSSTT	NNVADSEPS	---TQEQEG	VS-	HKRSAS	VLSNGSDKS
A._versicolor	QQDDEAPIP	PAPESA---	SAGGAPQTE	KPASTGDGQ	NDSSIPT-G	DTVRRGGEPS	---TGDQEG	AS-	HKRSAS	VLSNGSDKS
A._sydowii	QQDDEAPIL	PAPESA---	SAGGAHRTE	KPSTGDGQ	PDSSISA-G	DTVRRGGEPS	---AGDQEG	AS-	HKRSAS	VLSNGSDKS
A._flavus	QDDNPAPTA	DVATESTS-	AAAAALPSA	EGQETAGGT	EDKEAEA-G	S-GDTGEAT	----AREG	TS-	QKRSAS	VLSNTSDKS
A._oryzae	QDDNPAPTA	DVATESTS-	AAAAALPSA	EGQETAGGT	EDKEAEA-G	S-GDTGEAT	----AREG	TS-	QKRSAS	VLSNTSDKS
A._terreus	QDDNPAP-A	PDPANSAVP	APSTAETAT	EASSGTGN	RAGNPDA-G	ADGNTAQAS	---AKDQEA	TS-	HKRSAS	VLSNSSDND
A._niger	QEDQPLPAA	AEIEIEIEA	GAGDAEQE	KGATDKSGE	KAEGGAA-G	EEG-----	----DV	TS-	HKRSAS	VLSNASDKS
A._clavatus	ESEETAGGE	NAHAA----	SSMGSIKTS	GGGDEKTP	AAETGQQ-G	ADADAGDP-	-----EHEG	AP-	HKRSAS	VLSNGSDKS
A._fischeri	EVENPDSTA	GDS-----	ATAAPAAD	RADKGRQA	EDADQSA-G	-----	-----DRDG	VS-	HKRSAS	VLSNGSDKS
A._fumigatus	EVENSDSA	GDSASAA--	PTADERADE	RADKGLQGA	EDPDQST-G	-----	-----DRDG	VS-	HKRSAS	VLSNGSDKS
A._glaucus	SDHNDTSLA	SAAPAESTD	GANDGKDLA	AAAPSVQEG	EAGDGMA-G	DAS-----	-----	-----	HKRSAS	VLSNGSDKS
A._acidus	TDDNPVPPS	GEPSD'TAVH	PTDAASVVE	PTAEGQAGP	AAEVGDKAG	TEGDAAAAS	AEAAQDQGG	SAT	HNKRSAS	VLSNSSDKS
A._acidus	QEDQPLPAA	AEE-----	SAGDAEQE	KGATDESGE	KAGGAGA-G	EEG-----	-----DG	PS-	HKRSAS	VLSNASDKS

649

Consenso	TKRQKK
A._nidulans	SKRQKK
A._versicolor	SKRQKK
A._sydowii	SKRQKK
A._flavus	TKRQKK
A._oryzae	TKRQKK
A._terreus	SKRQKK
A._niger	TKRQKK
A._clavatus	TKRQKK
A._fischeri	TKRQKK
A._fumigatus	TKRQKK
A._glaucus	TKRQKK
A._wentii	SKRQRR
A._acidus	TKRQKK

Figura S2. Alineamiento entre proteínas de la familia dmap1 en los aspergilli. Para alinear las secuencias se utilizó el algoritmo T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) y posteriormente se refinó con MUSCLE (Edgar, 2004) en el programa UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012) Los sitios variables se muestran en negro, mientras que el dominio de SANT en rojo. Los bloques variables se determinaron con Gblocks usando los parámetros más estrictos y seleccionando los sitios no resaltados (Castresana, 2000; Talavera & Castresana, 2007) en el programa Seaview (Gouy *et al.*, 2010).

161

Consenso	XGXYPXX	XXXXXK	XXDFXXG	LXXXAXT	XXXXXNP	XIXXXXX	PXXXXXD	XALRSGX	XXXXXXI	VNPETXX
A. queenslandica-2Clike	SGVYPMW	LTVLSSGK	IRDFGIVG	LPSRAVSA	AFGCRVNP	MICFGQPE	SSSVYVDS	RALRSAKI	VNGCQIVI	VNPETKTP
C. elegans	SSVYPSLF	LTTLNSLK	VRDFAPLA	LNNRAIST	SFSSRVNA	AICMQGAE	PSTVYVDA	RALRSGLM	LPGVKVII	VNPETKGP
D. melanogaster_2-D	IGVYPSLV	LSTLSQHR	VRDFQALG	LNTRCVST	SFGCRVNP	AICVQGAE	SAQVYVDM	RALRSGKL	LPGVKVII	VNPETKGH
D. melanogaster_2A	IGVYPSLV	LSTLSQHR	VRDFQALG	LNTRCVST	SFGCRVNP	AICVQGAE	SAQVYVDM	RALRSGKL	LPGVKVII	VNPETKGH
D. rerio_2_B-A	SSVYPLW	LSTLSQYK	IRDFKDLG	LSPRAVST	AFGSRVNL	AICLQGTD	PSTVYVDM	KSLRSGTM	LPGVKVII	VNPETKGP
G. gallus_2B	CSVYLSLV	LSTVSOHQ	IRDFKDLG	LSSRAVST	TFGSRVNV	AICLQGTD	PTTVYVDL	KSLRSGKI	LPGVKVII	VNPETKGP
M. musculus_2B1	CSVYFLW	LATVNQYK	IRDFKDLG	LSPRAVST	TFGSRVNV	AICLQGTD	PTTVYVDL	KSLRSGKI	LPGVKVII	VNPETKGP
H. sapiens_2B	CSVYFLW	LSTVNQYK	IRDFKDLG	LSPRAVST	TFGSRVNV	AICLQGTD	PTTVYVDL	KSLRSGKI	LPGVKVII	VNPETKGP
G. gallus_2A	CSVYPSLV	LSAVSQYK	VRVFKDLG	LSARAVST	TFGCRVNV	AICLQGTD	PTTVYVDM	RALRSGKI	LPGVKVII	AHTETKGP
M. musculus_2A	CSVYPSLV	LSAVSQYK	VRVFKDLG	LSARAVST	TFGCRVNV	AICLQGTD	PTTVYVDM	RALRSGKI	LPGVKVII	AHTETKGP
D. rerio_2C	CSVYPALW	LQAVSQFK	VRDFKDLG	LHPRAVST	AFGCRVNL	AICLQGTD	PTTVYVDM	RALRSGKI	LPGVRII	VNPETKGP
H. sapiens_2C	CSVYPALW	LLAVSQYK	VRDFKDLG	LHPRAVST	SFGCRVNL	AICLQGTD	PTTVYVDM	RALRSGKI	LPGVRII	VNPETKGP
M. musculus_2C	CSVYPALW	LLAVSQYK	VRDFKDLG	LHPRAVST	SFGCRVNL	AICLQGTD	PTTVYVDM	RALRSGKI	LPGVRII	VNPETKGP
M. brevicollis	VPLFPQW	LELASREQ	VDTTSATG	MPTALQT	VLENRNP	FLAGTMGP	NQPVYVDA	RLLQLGLR	APAVQAVV	VNPKTEAK
M. circinelloides	CGVYASAY	FELISRNK	CSTLSLGS	LERRAINT	VYSHVLPN	MVTRSYE	PIAISVDP	YWLRSQIV	PSNTQIAI	VNPETLTI
R. oryzae	CGVYASAY	FELISRNK	CSTLSLGS	LERRAINT	VYSHVLPN	MVTRSYE	PIAISVDP	YWLRSQIV	PSNTQIAI	VNPETLTI
S. rosetta	LHLIPLW	LHLVAKLD	VEVFKLMK	LRRALCP	VLETRPNA	FVSMVPPD	RQOAFVDL	LKLSLGEF	VPKTKIAV	LTPDKNLL
N. crassa	MGIYPVSL	FLILSRK	IKDFDFTG	LDRTAINT	VYSHVLPN	MIASRSYE	PIELHLDP	KALRSGMV	PVSTQIAI	VNPESRML
P. anserina	MGIYPASL	FLILSRK	IKDFDFTG	LDRTAINT	VYSHVLPN	MIASRSYE	PIELWLDL	KALRSGMV	PVSTQIAI	VNPETCML
F. graminearum	MGIYPMSL	FVTLRSYK	IKDFAGAG	LDRTAINT	VYSHVLPN	MVASRSYE	PIELWLDL	QALRSGMV	PVSTQIAI	VNPESRIH
T. virens	MGIYPSLV	FVTLRSYK	IKDFAGAG	LDRTAINT	VYSHVLPN	MIASRSYE	PIELWLDL	QALRSGMV	PVSTQIAI	VNPESRAH
S. sclerotiorum	MGIYPMSL	FVTLRSYK	IKDFAGAG	LDRTAINT	VYSHVLPN	MIASRSYE	PIELWLDL	QALRSGMV	PVSTQIAI	VNPESRCL
A. niger	MGIYPMTL	FVTLRSYK	IKDFASAS	LDRTAINT	VYSHVLPN	MVTRSYE	PVELWLDI	RALRSGMV	PVNTQIAI	VNPETCTL
A. fumigatus	MGIYPMTL	FVTLRSYK	IKDFASAS	LDRTAINT	VYSHVLPN	MVTRSYE	PVELWLDI	RALRSGMV	PVNTQIAI	VNPETCTL
N. fischeri	MGIYPMTL	FVTLRSYK	IKDFASAS	LDRTAINT	VYSHVLPN	MVTRSYE	PVELWLDI	RALRSGMV	PVNTQIAI	VNPETCTL
A. nidulans	MGIYPMTL	FVTLRSYK	IKDFASAS	LDRTAINT	VYSHVLPN	MVTRSYE	PVELWLDI	RALRSGMV	PVNTQIAI	VNPETCTL
C. heterostrophus	MGIYPMTL	FVTLRSYK	IKDFASAS	LDRTAINT	VYSHVLPN	MVTRSYE	PVELWLDI	RALRSGMV	PVNTQIAI	VNPETCTL
Y. lipolytica	LGVPYPLT	FLAYSRYK	VKDFLSTQ	LDNTAISL	LYCHTLNP	MVASRSYE	PIDLWLDL	IALRSGMV	PVSTQIASI	VNPETNQL
S. pombe	MGVFPPLL	FQIISKYK	IKDFVKHG	LSPYAFST	VYSNCLNP	FISTRYSI	PTPQLLDD	RALRSGMV	PVSTQIAI	VNPETRLP
S. cerevisiae	LGIYKPEF	LIGLQNLN	VKDYSTIS	CRSTQISY	VYQHFFNP	LISLRSYP	PVDLYLDP	FSLRSGMV	PVCTDVSV	VNPETLLP
K. lactis	VGIYKPKF	LLGIQNLG	VKDYSHLG	VSSSQVNY	VYEHFFNP	FISMRSYP	PVDIYLEP	ICFRSGIV	PVCTDVSV	VNPETLLP

241

Consenso	XXXXXXG	IWVXSLV	XGXXETX	EXXGLXX	PXDIEXS	XRHXHXIV	PXXXNXL	XEHXXIV	XVXXV
A. queenslandica-2Clike	CAHTEIGE	IWVXSLV	IGSVDESL	TVRGRYH	PVDLEATV	IRCHKNIV	PVITPSSL	EEHQVAVG	IVVVA
C. elegans	CADSHLGE	IWVQAVYV	VGALNESL	VLRGMRYH	PFVDESTV	SKAHRFV	PAITSAVL	EEHHLIVG	VVVVV
D. melanogaster_2-D	CGDSSLGE	IWVQAVYV	VGAVDEVI	SLRGMNYH	PIDIENSV	MRCHKKIV	PLVNTNVL	EDHQLIVG	VVVVV
D. melanogaster_2A	CGDSSLGE	IWVQAVYV	VGAVDEVI	SLRGMNYH	PIDIENSV	MRCHKKIV	PLVNTNVL	EDHQLIVG	VVVVV
D. rerio_2_B-A	LGDSLHGE	IWVNSLYV	VGSLDETL	ELRGLRYH	PIDIETSV	SRAHRSIV	PLVNTNVL	KEHHLIVG	VVVVV
G. gallus_2B	LGDSLHGE	IWVNSLYV	VGSLDETL	ELRGLRYH	PIDIETSV	SRAHRSIV	PLVNTNVL	KEHHLIVG	VVVVV
M. musculus_2B1	VGDSLHGE	IWVNSLYV	VGALDETL	ELRGLRYH	PIDIETSV	SRVHRSIV	PLVNTNVL	EEHYLIVG	VVVVV
H. sapiens_2B	VGDSLHGE	IWVNSLYV	VGALDETL	ELRGLRYH	PIDIETSV	SRIHRSIV	PLVNTNVL	EEHYLIVG	VVVVV
G. gallus_2A	LGDSLHGE	IWVSSLYV	VGSLDETL	ELRGMRYH	PIDIETSV	IRAHSKIV	ALVNTNVL	EEHYLIVG	VVVVV
M. musculus_2A	LGDSLHGE	IWVSSLYV	VGSLDETL	ELRGMRYH	PIDIETSV	IRAHSKIV	ALVNTNVL	EEHYLIVG	VVVVV
D. rerio_2C	IGDSLHGE	IWVHSLYV	VGALDEAM	ELRGMRYH	PIDIETSI	IRAHRNIV	PMVNTNVL	EEHYLIVG	VVVVV
H. sapiens_2C	IGDSLHGE	IWVHSLYV	VGALDEAM	ELRGMRYH	PIDIETSV	IRAHSKIV	PLVNTNVL	EEHYLIVG	VVVVV
M. musculus_2C	IGDSLHGE	IWVHSLYV	VGALDEAM	ELRGMRYH	PIDIETSV	IRAHSKIV	PLVNTNVL	EEHYLIVG	VVVVV
M. brevicollis	CTADGIGE	IWVSSLYV	TGHLEDCI	LVDRRFN	PLDLEAV	ERCHPSLA	PLVMRALL	EKHDLQVD	AIVVL
M. circinelloides	CPSNVVGE	IWVSSLYV	LGPANETI	VNGLIYF	PIDVELSI	ERCHPAIV	PLVNVAVL	DHHSFLVD	TVIVV
R. oryzae	CPTHVIGE	IWVSSLYV	LGHLSSEV	MSKGLLHF	AVDVEETV	ETCNAMII	PLIVSAIL	ERHALLVD	TVIVV
S. rosetta	CGAQQIGE	ICVSSVVF	VGNREDDV	TQLGLRHH	PVDIEDTI	ERAFTFIA	PRIISLCH	NKHRVVVN	AVMFL
N. crassa	CSDGEYGE	IWVDSLFF	LGSIGETF	EINGLSHF	PMDIEASV	ERCHRIVV	PVIVNAVL	NEHQIIVD	IVAFV
P. anserina	CSEGEFGE	IWVDSLFF	LGNIGETF	EINGLSHF	PMDIEFSV	ERCHHSIV	PVIVNAVL	NEHQIIVD	IVAFV
F. graminearum	CLDGEYGE	IWVDSLFF	LGNIGETF	EINGLSHF	PMDIENSV	EKCHRNIV	PVIVNAIL	NEHQIIVD	IVAFV
T. virens	CYDGEYGE	IWVDSLFF	LGSIGETF	EINGLSHF	PMDIELSV	ERCHRNIV	PVIVNAIL	SEHQIIVD	IVAFV
S. sclerotiorum	CHEGEYGE	IWVDSLFF	LGSVGETF	EINGLSHF	PMDIESSI	EKCHRNIV	PVIVNAIL	NEHQIIVD	IVAFV
A. niger	SHVGEYGE	IWIQSLFF	LGGIGETF	EVNGLNHF	PMDIEYSV	ERCHRNIV	PVIVDAIL	NEHQVIAD	IVAFV
A. fumigatus	SHVGEYGE	IWIQSLFF	LGGIGETF	EVNGLNHF	PMDIENSV	EKCHRNIV	PVIVDAIL	GEHQVIAD	IVAFV
N. fischeri	SHVGEYGE	IWIQSLFF	LGGIGETF	EVNGLNHF	PMDIENSV	EKCHRNIV	PVIVDAIL	GEHQVIAD	IVAFV
A. nidulans	SQVGEYGE	IWIQSLFF	LGGIGETF	EVNGLNHF	PMDIENSV	EKCHRNIV	PVIVNAIL	NEHQVIAD	IVAFV
C. heterostrophus	CLNGEYGE	IWVQSLFF	LGSIGDTF	EVNGLNHF	SMDEIQSV	ERCHRNIV	PVIVNAIL	NEHQVIAD	IVSFF
Y. lipolytica	CKVGEFGE	IWVQSLFF	LGSIGDTF	EVNGLNHF	ESLGLSHF	PDVENTI	EGSHRHLV	PVIASTVL	DEHQLIIN
S. pombe	CRVGEYGE	IWMRSLFF	LGPIGETF	EVNGLSHF	PSDIEDTI	ERSHPRIV	PVIVNSIL	DEHQIIVD	VVAFV
S. cerevisiae	CVDGEFGE	IWCCSLFF	LGSIHESI	EILGLTHF	VSDLERTV	KDVHSDIT	TLIVSELL	KNHGVILD	LCTFT
K. lactis	CYEKEIGE	IWCCSLFF	LGSIHESI	EVLGLTHF	VSDLEMTV	RCHAAVT	PLIVSALL	KNHGVILD	MCTFI

Figura S3. Selección de los sitios conservados de las proteínas Cps1/DIP2. Las secuencias se alinearon con el algoritmo T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) y posteriormente se refinó con MUSCLE (Edgar, 2004) en el programa UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012). Los sitios conservados se seleccionaron con Gblocks usando los parámetros más estrictos (Castresana, 2000; Talavera & Castresana, 2007) en el programa Seaview (Gouy *et al.*, 2010).

Cuadro S3. Matriz de identidad simple (sin gaps) de los sitios conservados de las proteínas Cps1/Dip2, de la figura S3. La matriz se construyó en el programa UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012).

	D_riero_2_B-A	G_gallus_2B	M_musculus_2B1	H_sapiens_2B	G_gallus_2A	M_musculus_2A	D_riero_2C	H_sapiens_2C	M_musculus_2C	D_melanogaster_2-D	D_melanogaster_2A	C_elegans	A_queenslandica_2Clike	M_brevicollis
D_riero_2_B-A	100%	88%	87%	87%	82%	80%	78%	80%	80%	64%	64%	63%	53%	32%
G_gallus_2B	88%	100%	95%	96%	83%	82%	78%	80%	81%	66%	66%	63%	53%	32%
M_musculus_2B1	87%	95%	100%	98%	82%	81%	78%	80%	80%	64%	64%	61%	53%	32%
H_sapiens_2B	87%	96%	98%	100%	82%	81%	78%	80%	80%	65%	65%	61%	52%	32%
G_gallus_2A	82%	83%	82%	82%	100%	95%	83%	85%	85%	69%	69%	62%	54%	34%
M_musculus_2A	80%	82%	81%	81%	95%	100%	81%	83%	84%	68%	68%	61%	54%	32%
D_riero_2C	78%	78%	78%	78%	83%	81%	100%	88%	88%	69%	69%	64%	55%	31%
H_sapiens_2C	80%	80%	80%	80%	85%	83%	88%	100%	100%	70%	70%	65%	56%	33%
M_musculus_2C	80%	81%	80%	80%	85%	84%	88%	100%	100%	70%	70%	65%	56%	33%
D_melanogaster_2-D	64%	66%	64%	65%	69%	68%	69%	70%	70%	100%	100%	64%	52%	33%
D_melanogaster_2A	64%	66%	64%	65%	69%	68%	69%	70%	70%	100%	100%	64%	52%	33%
C_elegans	63%	63%	61%	61%	62%	61%	64%	65%	65%	64%	64%	100%	53%	32%
A_queenslandica_2Clike	53%	53%	53%	52%	54%	54%	55%	56%	56%	52%	52%	53%	100%	33%
M_brevicollis	32%	32%	32%	32%	34%	32%	31%	33%	33%	33%	33%	32%	33%	100%
S_rosetta	33%	31%	32%	31%	35%	34%	33%	32%	33%	30%	33%	33%	31%	34%
M_circinelloides	38%	38%	37%	37%	36%	38%	37%	37%	37%	37%	37%	34%	34%	28%
R_oryzae	34%	36%	34%	34%	34%	35%	33%	35%	35%	34%	34%	36%	35%	30%
N_crassa	42%	41%	41%	41%	40%	40%	40%	41%	41%	40%	40%	38%	39%	31%
P_anserina	42%	41%	41%	41%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	40%	39%	40%	31%
F_graminearum	40%	39%	39%	39%	38%	38%	38%	39%	38%	39%	39%	38%	38%	29%
T_virens	42%	42%	40%	40%	38%	38%	39%	40%	40%	40%	40%	39%	40%	29%
S_sclerotiorum	41%	39%	39%	39%	39%	39%	40%	39%	39%	39%	39%	38%	39%	30%
A_niger	40%	39%	39%	39%	38%	38%	39%	39%	39%	38%	38%	37%	41%	29%
A_fumigatus	39%	39%	38%	38%	38%	38%	38%	38%	39%	37%	37%	36%	39%	29%
N_fischeri	40%	39%	38%	38%	38%	38%	38%	38%	38%	38%	38%	36%	39%	29%
A_nidulans	40%	39%	39%	39%	38%	39%	39%	39%	39%	38%	38%	37%	40%	29%
C_heterostrophus	40%	39%	39%	39%	38%	39%	39%	38%	39%	37%	37%	36%	38%	29%
Y_lipolytica	40%	39%	38%	38%	37%	38%	37%	38%	38%	34%	34%	36%	36%	27%
S_pombe	42%	42%	42%	42%	41%	40%	41%	41%	41%	39%	39%	36%	35%	29%
S_cerevisiae	33%	32%	33%	32%	32%	31%	31%	32%	32%	30%	30%	31%	31%	28%
K_lactis	34%	32%	32%	32%	33%	32%	30%	32%	32%	31%	31%	32%	32%	31%

	S_rosetta	M_circinelloides	R_oryzae	N_crassa	P_anserina	F_graminearum	T_virens	S_sclerotiorum	A_niger	A_fumigatus	N_fischeri	A_nidulans	C_heterostrophus	Y_lipolytica	S_pombe	S_cerevisiae	K_lactis
D_riero_2_B-A	33%	38%	34%	42%	42%	40%	42%	41%	40%	40%	40%	40%	40%	42%	33%	34%	34%
G_gallus_2B	31%	38%	36%	41%	41%	39%	42%	39%	39%	39%	39%	39%	39%	39%	42%	32%	32%
M_musculus_2B1	32%	37%	34%	41%	41%	39%	40%	39%	39%	38%	38%	39%	38%	42%	33%	32%	32%
H_sapiens_2B	31%	37%	34%	41%	41%	39%	40%	39%	39%	38%	38%	39%	39%	42%	32%	32%	32%
G_gallus_2A	35%	36%	34%	40%	40%	38%	38%	39%	38%	38%	38%	38%	38%	37%	41%	32%	33%
M_musculus_2A	34%	38%	35%	40%	40%	38%	39%	39%	38%	38%	38%	39%	39%	38%	40%	31%	32%
D_riero_2C	33%	37%	33%	40%	40%	39%	39%	40%	39%	38%	38%	39%	39%	37%	41%	31%	30%
H_sapiens_2C	32%	37%	35%	41%	40%	38%	40%	39%	39%	38%	38%	39%	38%	41%	32%	32%	32%
M_musculus_2C	33%	37%	35%	41%	40%	38%	40%	39%	39%	38%	38%	39%	38%	41%	32%	32%	32%
D_melanogaster_2-D	30%	37%	34%	40%	40%	39%	40%	39%	38%	37%	38%	38%	37%	34%	39%	30%	31%
D_melanogaster_2A	30%	37%	34%	40%	40%	39%	40%	39%	38%	37%	38%	38%	37%	34%	39%	30%	31%
C_elegans	33%	34%	36%	38%	39%	38%	39%	38%	37%	36%	36%	37%	36%	38%	36%	31%	32%
A_queenslandica_2Clike	31%	34%	35%	39%	40%	38%	40%	39%	41%	39%	39%	40%	38%	36%	35%	31%	32%
M_brevicollis	34%	28%	30%	31%	31%	29%	29%	30%	29%	29%	29%	29%	29%	27%	29%	28%	31%
S_rosetta	100%	26%	29%	30%	30%	29%	29%	30%	30%	30%	30%	30%	28%	30%	30%	28%	28%
M_circinelloides	26%	100%	56%	51%	52%	51%	50%	51%	52%	53%	53%	53%	51%	47%	49%	38%	39%
R_oryzae	29%	56%	100%	49%	49%	49%	49%	49%	50%	50%	50%	49%	47%	46%	36%	39%	39%
N_crassa	30%	51%	49%	100%	88%	86%	90%	85%	80%	78%	78%	80%	80%	64%	67%	46%	46%
P_anserina	30%	52%	49%	88%	100%	87%	87%	83%	80%	78%	79%	82%	79%	64%	67%	47%	47%
F_graminearum	29%	51%	49%	86%	87%	100%	89%	86%	80%	80%	81%	81%	81%	64%	66%	47%	44%
T_virens	29%	50%	49%	80%	87%	89%	100%	86%	83%	81%	81%	82%	82%	64%	65%	45%	45%
S_sclerotiorum	30%	51%	49%	85%	83%	86%	86%	100%	80%	81%	81%	82%	80%	64%	67%	45%	45%
A_niger	30%	52%	50%	80%	80%	83%	80%	100%	94%	92%	92%	92%	81%	65%	67%	46%	46%
A_fumigatus	30%	53%	50%	78%	78%	80%	81%	81%	94%	100%	100%	93%	80%	66%	66%	46%	45%
N_fischeri	30%	53%	50%	78%	79%	81%	81%	81%	94%	100%	100%	93%	80%	66%	66%	46%	45%
A_nidulans	30%	53%	50%	80%	82%	81%	82%	82%	92%	92%	92%	100%	82%	65%	67%	46%	46%
C_heterostrophus	28%	51%	49%	80%	79%	81%	82%	80%	92%	80%	80%	82%	100%	65%	66%	45%	45%
Y_lipolytica	30%	47%	47%	64%	64%	64%	64%	64%	65%	66%	66%	65%	65%	100%	63%	44%	43%
S_pombe	30%	49%	46%	67%	67%	66%	65%	67%	67%	66%	66%	66%	66%	63%	100%	41%	43%
S_cerevisiae	28%	38%	36%	46%	47%	47%	45%	45%	46%	46%	46%	46%	45%	44%	41%	100%	69%
K_lactis	28%	39%	39%	46%	47%	44%	45%	45%	46%	45%	45%	46%	45%	43%	43%	69%	100%

Porcentaje de Identidad 10% 25% 50% 70% 90%

1												
ORF dmapA	ATGGCTGC	CGCCGATG	TCCGCGAC	ATGCTCGA	CTTGCCCG	CGGAGGGC	CAACCGCG	GCCTCATA	AAAAGCAG	AAGGTCGT	GGAAAAGA	
Exones AspGDB	ATGGCTGC	CGCCGATG	TCCGCGAC	ATGCTCGA	CTTGCCCG	CGGAGGGC	CAACCGCG	GCCTCATA	AAAAGCAG	AAGGTCGT	GGAAAAGA	
Exones CADRE	ATGGCTGC	CGCCGATG	TCCGCGAC	ATGCTCGA	CTTGCCCG	CGGAGGGC	CAACCGCG	GCCTCATA	AAAAGCAG	AAGGTCGT	GGAAAAGA	
KEGG	ATGGCTGC	CGCCGATG	TCCGCGAC	ATGCTCGA	CTTGCCCG	CGGAGGGC	CAACCGCG	GCCTCATA	AAAAGCAG	AAGGTCGT	GGAAAAGA	
NetAsp	ATGGCTGC	CGCCGATG	TCCGCGAC	ATGCTCGA	CTTGCCCG	CGGAGGGC	CAACCGCG	GCCTCATA	AAAAGCAG	AAGGTCGT	GGAAAAGA	
M @todo Manual	ATGGCTGC	CGCCGATG	TCCGCGAC	ATGCTCGA	CTTGCCCG	CGGAGGGC	CAACCGCG	GCCTCATA	AAAAGCAG	AAGGTCGT	GGAAAAGA	
Raspberry	ATGGCTGC	CGCCGATG	TCCGCGAC	ATGCTCGA	CTTGCCCG	CGGAGGGC	CAACCGCG	GCCTCATA	AAAAGCAG	AAGGTCGT	GGAAAAGA	
89												
ORF dmapA	GGCCAGGT	CGCTCCTT	CGACTGTC	GCAATAGA	CGAATACT	AACGCTTC	TATAGAGG	GCATCACC	CGCGAGCT	CTTTGCTC	TTTTAGGA	
Exones AspGDB	GGCCA---	-----	-----	-----	-----	-----	-----GAGG	GCATCACC	CGCGAGCT	CTTTGCTC	TTTTAGGA	
Exones CADRE	GGCCA---	-----	-----	-----	-----	-----	-----GAGG	GCATCACC	CGCGAGCT	CTTTGCTC	TTTTAGGA	
KEGG	GGCCA---	-----	-----	-----	-----	-----	-----GAGG	GCATCACC	CGCGAGCT	CTTTGCTC	TTTTAGGA	
NetAsp	GGCCA---	-----	-----	-----	-----	-----	-----GAGG	GCATCACC	CGCGAGCT	CTTTGCTC	TTTTAGGA	
M @todo Manual	GGCC---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGGA	
Raspberry	GGCC---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----AGGA	
177												
ORF dmapA	GAACGAGC	ACCTCCGA	TCGCAATC	AACGAGAA	TAGATACA	AGGGTCGG	CCGAAATG	GCAGACGA	AAGCTCGT	GTACGGCC	TTGGTATG	
Exones AspGDB	GAACGAGC	ACCTCCGA	TCGCAATC	AACGAGAA	TAGATACA	AGGGTCGG	CCGAAATG	GCAGACGA	AAGCTCGT	GTACGGCC	TTG-----	
Exones CADRE	GAACGAGC	ACCTCCGA	TCGCAATC	AACGAGAA	TAGATACA	AGGGTCGG	CCGAAATG	GCAGACGA	AAGCTCGT	GTACGGCC	T-----	
KEGG	GAACGAGC	ACCTCCGA	TCGCAATC	AACGAGAA	TAGATACA	AGGGTCGG	CCGAAATG	GCAGACGA	AAGCTCGT	GTACGGCC	T-----	
NetAsp	GAACGAGC	ACCTCCGA	TCGCAATC	AACGAGAA	TAGATACA	AGGGTCGG	CCGAAATG	GCAGACGA	AAGCTCGT	GTACGGCC	TTG-----	
M @todo Manual	GAACGAGC	ACCTCCGA	TCGCAATC	AACGAGAA	TAGATACA	AGGGTCGG	CCGAAATG	GCAGACGA	AAGCTCGT	GTACGGCC	TT-----	
Raspberry	GAACGAGC	ACCTCCGA	TCGCAATC	AACGAGAA	TAGATACA	AGGGTCGG	CCGAAATG	GCAGACGA	AAGCTCGT	GTACGGCC	TTG-----	
265												
ORF dmapA	CGATGAGC	ACTGAGAT	CAGAGTGC	TTCAGATG	CTAATCAG	AAACAAGG	CGAATGAC	ACCTTTCA	CCAATAGC	GCACGATC	GGACGACC	
Exones AspGDB	-----	-----	-----	-----	-----	-----G	CGAATGAC	ACCTTTCA	CCAATAGC	GCACGATC	GGACGACC	
Exones CADRE	-----	-----	-----	-----	-----	-----TGC	-----	-----	-----TGC	GCACGATC	GGACGACC	
KEGG	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----TGC	GCACGATC	GGACGACC	
NetAsp	-----	-----	-----	-----	-----	-----G	CGAATGAC	ACCTTTCA	CCAATAGC	GCACGATC	GGACGACC	
M @todo Manual	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----GC	GCACGATC	GGACGACC	
Raspberry	-----	-----	-----	-----	-----	-----G	CGAATGAC	ACCTTTCA	CCAATAGC	GCACGATC	GGACGACC	
353												
ORF dmapA	TTGTGCTA	CGGCACTG	GCAGAGAG	AGCCCGAA	TCGACGAA	TATACCGG	CTATCGAA	GACACCAG	AGCAGAGG	GAGAGACG	AAAGAGCA	
Exones AspGDB	TTGTGCTA	CGGCACTG	GCAGAGAG	AGCCCGAA	TCGACGAA	TATACCGG	CTATCGAA	GACACCAG	AGCAGAGG	GAGAGACG	AAAGAGCA	
Exones CADRE	TTGTGCTA	CGGCACTG	GCAGAGAG	AGCCCGAA	TCGACGAA	TATACCGG	CTATCGAA	GACACCAG	AGCAGAGG	GAGAGACG	AAAGAGCA	
KEGG	TTGTGCTA	CGGCACTG	GCAGAGAG	AGCCCGAA	TCGACGAA	TATACCGG	CTATCGAA	GACACCAG	AGCAGAGG	GAGAGACG	AAAGAGCA	
NetAsp	TTGTGCTA	CGGCACTG	GCAGAGAG	AGCCCGAA	TCGACGAA	TATACCGG	CTATCGAA	GACACCAG	AGCAGAGG	GAGAGACG	AAAGAGCA	
M @todo Manual	TTGTGCTA	CGGCACTG	GCAGAGAG	AGCCCGAA	TCGACGAA	TATACCGG	CTATCGAA	GACACCAG	AGCAGAGG	GAGAGACG	AAAGAGCA	
Raspberry	TTGTGCTA	CGGCACTG	GCAGAGAG	AGCCCGAA	TCGACGAA	TATACCGG	CTATCGAA	GACACCAG	AGCAGAGG	GAGAGACG	AAAGAGCA	
441												
ORF dmapA	AGGAGAAC	ACAAAACT	GCCGACCG	AGAATACC	CATTTGCG	AAATATAA	CATCAAAC	TGAAGTTT	TCCAACCG	GTACACTA	CGGACGAA	
Exones AspGDB	AGGAGAAC	ACAAAACT	GCCGACCG	AGAATACC	CATTTGCG	AAATATAA	CATCAAAC	TGAAGTTT	TCCAACCG	GTACACTA	CGGACGAA	
Exones CADRE	AGGAGAAC	ACAAAACT	GCCGACCG	AGAATACC	CATTTGCG	AAATATAA	CATCAAAC	TGAAGTTT	TCCAACCG	GTACACTA	CGGACGAA	
KEGG	AGGAGAAC	ACAAAACT	GCCGACCG	AGAATACC	CATTTGCG	AAATATAA	CATCAAAC	TGAAGTTT	TCCAACCG	GTACACTA	CGGACGAA	
NetAsp	AGGAGAAC	ACAAAACT	GCCGACCG	AGAATACC	CATTTGCG	AAATATAA	CATCAAAC	TGAAGTTT	TCCAACCG	GTACACTA	CGGACGAA	
M @todo Manual	AGGAGAAC	ACAAAACT	GCCGACCG	AGAATACC	CATTTGCG	AAATATAA	CATCAAAC	TGAAGTTT	TCCAACCG	GTACACTA	CGGACGAA	
Raspberry	AGGAGAAC	ACAAAACT	GCCGACCG	AGAATACC	CATTTGCG	AAATATAA	CATCAAAC	TGAAGTTT	TCCAACCG	GTACACTA	CGGACGAA	
529												
ORF dmapA	TATAACCG	CCATCTGA	GGAGCGAA	GATTGGTC	GCGAGAAG	AGACAGAC	TATTTGAT	GGATTTGG	TCGAGGAG	TATGATCT	CCGCTGGG	
Exones AspGDB	TATAACCG	CCATCTGA	GGAGCGAA	GATTGGTC	GCGAGAAG	AGACAGAC	TATTTGAT	GGATTTGG	TCGAGGAG	TATGATCT	CCGCTGGG	
Exones CADRE	TATAACCG	CCATCTGA	GGAGCGAA	GATTGGTC	GCGAGAAG	AGACAGAC	TATTTGAT	GGATTTGG	TCGAGGAG	TATGATCT	CCGCTGGG	
KEGG	TATAACCG	CCATCTGA	GGAGCGAA	GATTGGTC	GCGAGAAG	AGACAGAC	TATTTGAT	GGATTTGG	TCGAGGAG	TATGATCT	CCGCTGGG	
NetAsp	TATAACCG	CCATCTGA	GGAGCGAA	GATTGGTC	GCGAGAAG	AGACAGAC	TATTTGAT	GGATTTGG	TCGAGGAG	TATGATCT	CCGCTGGG	
M @todo Manual	TATAACCG	CCATCTGA	GGAGCGAA	GATTGGTC	GCGAGAAG	AGACAGAC	TATTTGAT	GGATTTGG	TCGAGGAG	TATGATCT	CCGCTGGG	
Raspberry	TATAACCG	CCATCTGA	GGAGCGAA	GATTGGTC	GCGAGAAG	AGACAGAC	TATTTGAT	GGATTTGG	TCGAGGAG	TATGATCT	CCGCTGGG	
617												
ORF dmapA	TGGTGATT	GCCGATCG	ATACGACT	TCCAACCG	CAACCGCT	CGATAATA	CAGAAGAG	ACCTCAAG	CGCACTGG	TACCTAGC	AAACAGTT	
Exones AspGDB	TGGTGATT	GCCGATCG	ATACGACT	TCCAACCG	CAACCGCT	CGATAATA	CAGAAGAG	ACCTCAAG	CGCACTGG	TACCTAGC	AAACAGTT	
Exones CADRE	TGGTGATT	GCCGATCG	ATACGACT	TCCAACCG	CAACCGCT	CGATAATA	CAGAAGAG	ACCTCAAG	CGCACTGG	TACCTAGC	AAACAGTT	
KEGG	TGGTGATT	GCCGATCG	ATACGACT	TCCAACCG	CAACCGCT	CGATAATA	CAGAAGAG	ACCTCAAG	CGCACTGG	TACCTAGC	AAACAGTT	
NetAsp	TGGTGATT	GCCGATCG	ATACGACT	TCCAACCG	CAACCGCT	CGATAATA	CAGAAGAG	ACCTCAAG	CGCACTGG	TACCTAGC	AAACAGTT	
M @todo Manual	TGGTGATT	GCCGATCG	ATACGACT	TCCAACCG	CAACCGCT	CGATAATA	CAGAAGAG	ACCTCAAG	CGCACTGG	TACCTAGC	AAACAGTT	
Raspberry	TGGTGATT	GCCGATCG	ATACGACT	TCCAACCG	CAACCGCT	CGATAATA	CAGAAGAG	ACCTCAAG	CGCACTGG	TACCTAGC	AAACAGTT	
705												
ORF dmapA	CAGAACGA	TGGAGCAG	ATGAAAGC	CGGCTACT	ATTTGCTG	GCGGCCTC	AATGCTCG	CACTGGAA	CACCCACC	CTCCGAAA	TGTCGCGAG	
Exones AspGDB	CAGAACGA	TGGAGCAG	ATGAAAGC	CGGCTACT	ATTTGCTG	GCGGCCTC	AATGCTCG	CACTGGAA	CACCCACC	CTCCGAAA	TGTCGCGAG	
Exones CADRE	CAGAACGA	TGGAGCAG	ATGAAAGC	CGGCTACT	ATTTGCTG	GCGGCCTC	AATGCTCG	CACTGGAA	CACCCACC	CTCCGAAA	TGTCGCGAG	
KEGG	CAGAACGA	TGGAGCAG	ATGAAAGC	CGGCTACT	ATTTGCTG	GCGGCCTC	AATGCTCG	CACTGGAA	CACCCACC	CTCCGAAA	TGTCGCGAG	
NetAsp	CAGAACGA	TGGAGCAG	ATGAAAGC	CGGCTACT	ATTTGCTG	GCGGCCTC	AATGCTCG	CACTGGAA	CACCCACC	CTCCGAAA	TGTCGCGAG	
M @todo Manual	CAGAACGA	TGGAGCAG	ATGAAAGC	CGGCTACT	ATTTGCTG	GCGGCCTC	AATGCTCG	CACTGGAA	CACCCACC	CTCCGAAA	TGTCGCGAG	
Raspberry	CAGAACGA	TGGAGCAG	ATGAAAGC	CGGCTACT	ATTTGCTG	GCGGCCTC	AATGCTCG	CACTGGAA	CACCCACC	CTCCGAAA	TGTCGCGAG	
793												
ORF dmapA	GCGGAATT	CGATCTGC	ACGAAAGG	ATGATGAA	GTTTCGATC	CTGAGCGC	GAACGCCA	CCGCAAAG	AACTCGCC	GCCTCCA	GCTAAACC	
Exones AspGDB	GCGGAATT	CGATCTGC	ACGAAAGG	ATGATGAA	GTTTCGATC	CTGAGCGC	GAACGCCA	CCGCAAAG	AACTCGCC	GCCTCCA	GCTAAACC	
Exones CADRE	GCGGAATT	CGATCTGC	ACGAAAGG	ATGATGAA	GTTTCGATC	CTGAGCGC	GAACGCCA	CCGCAAAG	AACTCGCC	GCCTCCA	GCTAAACC	
KEGG	GCGGAATT	CGATCTGC	ACGAAAGG	ATGATGAA	GTTTCGATC	CTGAGCGC	GAACGCCA	CCGCAAAG	AACTCGCC	GCCTCCA	GCTAAACC	
NetAsp	GCGGAATT	CGATCTGC	ACGAAAGG	ATGATGAA	GTTTCGATC	CTGAGCGC	GAACGCCA	CCGCAAAG	AACTCGCC	GCCTCCA	GCTAAACC	
M @todo Manual	GCGGAATT	CGATCTGC	ACGAAAGG	ATGATGAA	GTTTCGATC	CTGAGCGC	GAACGCCA	CCGCAAAG	AACTCGCC	GCCTCCA	GCTAAACC	
Raspberry	GCGGAATT	CGATCTGC	ACGAAAGG	ATGATGAA	GTTTCGATC	CTGAGCGC	GAACGCCA	CCGCAAAG	AACTCGCC	GCCTCCA	GCTAAACC	

881

ORF dmapA	GCACAGCC	GACGAAGT	CCGTGAGG	AAACCGTC	CTCCTAGA	AGAGCTCA	AGAGGATC	ACAGCCAA	CGAGCAGG	AATTCGTC	ACCGAACG
Exones AspGDB	GCACAGCC	GACGAAGT	CCGTGAGG	AAACCGTC	CTCCTAGA	AGAGCTCA	AGAGGATC	ACAGCCAA	CGAGCAGG	AATTCGTC	ACCGAACG
Exones CADRE	GCACAGCC	GACGAAGT	CCGTGAGG	AAACCGTC	CTCCTAGA	AGAGCTCA	AGAGGATC	ACAGCCAA	CGAGCAGG	AATTCGTC	ACCGAACG
KEGG	GCACAGCC	GACGAAGT	CCGTGAGG	AAACCGTC	CTCCTAGA	AGAGCTCA	AGAGGATC	ACAGCCAA	CGAGCAGG	AATTCGTC	ACCGAACG
NetAsp	GCACAGCC	GACGAAGT	CCGTGAGG	AAACCGTC	CTCCTAGA	AGAGCTCA	AGAGGATC	ACAGCCAA	CGAGCAGG	AATTCGTC	ACCGAACG
M @todo Manual	GCACAGCC	GACGAAGT	CCGTGAGG	AAACCGTC	CTCCTAGA	AGAGCTCA	AGAGGATC	ACAGCCAA	CGAGCAGG	AATTCGTC	ACCGAACG
Raspberry	GCACAGCC	GACGAAGT	CCGTGAGG	AAACCGTC	CTCCTAGA	AGAGCTCA	AGAGGATC	ACAGCCAA	CGAGCAGG	AATTCGTC	ACCGAACG

969

ORF dmapA	CCGAGAAC	TCTACTCC	CGCCTCGA	CGTCCCCA	TCAGCGTC	AGTAAACG	TACAAACT	ACCACAAC	AGCCAGGG	CCTCTCCC	ATCTCCTC
Exones AspGDB	CCGAGAAC	TCTACTCC	CGCCTCGA	CGTCCCCA	TCAGCGTC	AGTAAACG	TACAAACT	ACCACAAC	AGCCAGGG	CCTCTCCC	ATCTCCTC
Exones CADRE	CCGAGAAC	TCTACTCC	CGCCTCGA	CGTCCCCA	TCAGCGTC	AGTAAACG	TACAAACT	ACCACAAC	AGCCAGGG	CCTCTCCC	ATCTCCTC
KEGG	CCGAGAAC	TCTACTCC	CGCCTCGA	CGTCCCCA	TCAGCGTC	AGTAAACG	TACAAACT	ACCACAAC	AGCCAGGG	CCTCTCCC	ATCTCCTC
NetAsp	CCGAGAAC	TCTACTCC	CGCCTCGA	CGTCCCCA	TCAGCGTC	AGTAAACG	TACAAACT	ACCACAAC	AGCCAGGG	CCTCTCCC	ATCTCCTC
M @todo Manual	CCGAGAAC	TCTACTCC	CGCCTCGA	CGTCCCCA	TCAGCGTC	AGTAAACG	TACAAACT	ACCACAAC	AGCCAGGG	CCTCTCCC	ATCTCCTC
Raspberry	CCGAGAAC	TCTACTCC	CGCCTCGA	CGTCCCCA	TCAGCGTC	AGTAAACG	TACAAACT	ACCACAAC	AGCCAGGG	CCTCTCCC	ATCTCCTC

1057

ORF dmapA	CAAACACT	CCTTCAAG	CTGACAAA	AGCAAAAA	ACGCCGCT	CCATATCT	GGCCCCGA	TGGTATCG	CTCCACAC	TCCGGCGG	CCAAACCC
Exones AspGDB	CAAACACT	CCTTCAAG	CTGACAAA	AGCAAAAA	ACGCCGCT	CCATATCT	GGCCCCGA	TGGTATCG	CTCCACAC	TCCGGCGG	CCAAACCC
Exones CADRE	CAAACACT	CCTTCAAG	CTGACAAA	AGCAAAAA	ACGCCGCT	CCATATCT	GGCCCCGA	TGGTATCG	CTCCACAC	TCCGGCGG	CCAAACCC
KEGG	CAAACACT	CCTTCAAG	CTGACAAA	AGCAAAAA	ACGCCGCT	CCATATCT	GGCCCCGA	TGGTATCG	CTCCACAC	TCCGGCGG	CCAAACCC
NetAsp	CAAACACT	CCTTCAAG	CTGACAAA	AGCAAAAA	ACGCCGCT	CCATATCT	GGCCCCGA	TGGTATCG	CTCCACAC	TCCGGCGG	CCAAACCC
M @todo Manual	CAAACACT	CCTTCAAG	CTGACAAA	AGCAAAAA	ACGCCGCT	CCATATCT	GGCCCCGA	TGGTATCG	CTCCACAC	TCCGGCGG	CCAAACCC
Raspberry	CAAACACT	CCTTCAAG	CTGACAAA	AGCAAAAA	ACGCCGCT	CCATATCT	GGCCCCGA	TGGTATCG	CTCCACAC	TCCGGCGG	CCAAACCC

1145

ORF dmapA	CCACTATT	CCCAACGC	CCCGGGTA	GGCCCCGC	GACAGCAG	CAGAGCAG	ACACTCCC	AACGGCGG	AACCACAC	AATCTACA	ACGACGAA
Exones AspGDB	CCACTATT	CCCAACGC	CCCGGGTA	GGCCCCGC	GACAGCAG	CAGAGCAG	ACACTCCC	AACGGCGG	AACCACAC	AATCTACA	ACGACGAA
Exones CADRE	CCACTATT	CCCAACGC	CCCGGGTA	GGCCCCGC	GACAGCAG	CAGAGCAG	ACACTCCC	AACGGCGG	AACCACAC	AATCTACA	ACGACGAA
KEGG	CCACTATT	CCCAACGC	CCCGGGTA	GGCCCCGC	GACAGCAG	CAGAGCAG	ACACTCCC	AACGGCGG	AACCACAC	AATCTACA	ACGACGAA
NetAsp	CCACTATT	CCCAACGC	CCCGGGTA	GGCCCCGC	GACAGCAG	CAGAGCAG	ACACTCCC	AACGGCGG	AACCACAC	AATCTACA	ACGACGAA
M @todo Manual	CCACTATT	CCCAACGC	CCCGGGTA	GGCCCCGC	GACAGCAG	CAGAGCAG	ACACTCCC	AACGGCGG	AACCACAC	AATCTACA	ACGACGAA
Raspberry	CCACTATT	CCCAACGC	CCCGGGTA	GGCCCCGC	GACAGCAG	CAGAGCAG	ACACTCCC	AACGGCGG	AACCACAC	AATCTACA	ACGACGAA

1233

ORF dmapA	GAAGGCCG	CCGCTGCA	GCCAACAG	AGAAGCAG	CGCAACAA	GCAATCCG	CACTCTCA	CACCCGCC	GAAGAAGC	CCGATACG	CGGTGCAG
Exones AspGDB	GAAGGCCG	CCGCTGCA	GCCAACAG	AGAAGCAG	CGCAACAA	GCAATCCG	CACTCTCA	CACCCGCC	GAAGAAGC	CCGATACG	CGGTGCAG
Exones CADRE	GAAGGCCG	CCGCTGCA	GCCAACAG	AGAAGCAG	CGCAACAA	GCAATCCG	CACTCTCA	CACCCGCC	GAAGAAGC	CCGATACG	CGGTGCAG
KEGG	GAAGGCCG	CCGCTGCA	GCCAACAG	AGAAGCAG	CGCAACAA	GCAATCCG	CACTCTCA	CACCCGCC	GAAGAAGC	CCGATACG	CGGTGCAG
NetAsp	GAAGGCCG	CCGCTGCA	GCCAACAG	AGAAGCAG	CGCAACAA	GCAATCCG	CACTCTCA	CACCCGCC	GAAGAAGC	CCGATACG	CGGTGCAG
M @todo Manual	GAAGGCCG	CCGCTGCA	GCCAACAG	AGAAGCAG	CGCAACAA	GCAATCCG	CACTCTCA	CACCCGCC	GAAGAAGC	CCGATACG	CGGTGCAG
Raspberry	GAAGGCCG	CCGCTGCA	GCCAACAG	AGAAGCAG	CGCAACAA	GCAATCCG	CACTCTCA	CACCCGCC	GAAGAAGC	CCGATACG	CGGTGCAG

1321

ORF dmapA	CACCACGA	CCGTCTTG	CACCAGGA	GTGCAATT	TCGGAGCG	ACCCGCGG	CAAAAGCT	CACACAGG	CGAAATCC	CACGTACA	GACTCAGA
Exones AspGDB	CACCACGA	CCGTCTTG	CACCAGGA	GTGCAATT	TCGGAGCG	ACCCGCGG	CAAAAGCT	CACACAGG	CGAAATCC	CACGTACA	GACTCAGA
Exones CADRE	CACCACGA	CCGTCTTG	CACCAGGA	GTGCAATT	TCGGAGCG	ACCCGCGG	CAAAAGCT	CACACAGG	CGAAATCC	CACGTACA	GACTCAGA
KEGG	CACCACGA	CCGTCTTG	CACCAGGA	GTGCAATT	TCGGAGCG	ACCCGCGG	CAAAAGCT	CACACAGG	CGAAATCC	CACGTACA	GACTCAGA
NetAsp	CACCACGA	CCGTCTTG	CACCAGGA	GTGCAATT	TCGGAGCG	ACCCGCGG	CAAAAGCT	CACACAGG	CGAAATCC	CACGTACA	GACTCAGA
M @todo Manual	CACCACGA	CCGTCTTG	CACCAGGA	GTGCAATT	TCGGAGCG	ACCCGCGG	CAAAAGCT	CACACAGG	CGAAATCC	CACGTACA	GACTCAGA
Raspberry	CACCACGA	CCGTCTTG	CACCAGGA	GTGCAATT	TCGGAGCG	ACCCGCGG	CAAAAGCT	CACACAGG	CGAAATCC	CACGTACA	GACTCAGA

1409

ORF dmapA	AACTTGCC	TCTGCACT	TGCTGAGC	TCGAGGTA	CCACTTCG	TCTGTTC	TGCCGACA	GAGCGCGT	TGTGAAAG	AATTTGAG	AAACTGAT
Exones AspGDB	AACTTGCC	TCTGCACT	TGCTGAGC	TCGAGGTA	CCACTTCG	TCTGTTC	TGCCGACA	GAGCGCGT	TGTGAAAG	AATTTGAG	AAACTGAT
Exones CADRE	AACTTGCC	TCTGCACT	TGCTGAGC	TCGAGGTA	CCACTTCG	TCTGTTC	TGCCGACA	GAGCGCGT	TGTGAAAG	AATTTGAG	AAACTGAT
KEGG	AACTTGCC	TCTGCACT	TGCTGAGC	TCGAGGTA	CCACTTCG	TCTGTTC	TGCCGACA	GAGCGCGT	TGTGAAAG	AATTTGAG	AAACTGAT
NetAsp	AACTTGCC	TCTGCACT	TGCTGAGC	TCGAGGTA	CCACTTCG	TCTGTTC	TGCCGACA	GAGCGCGT	TGTGAAAG	AATTTGAG	AAACTGAT
M @todo Manual	AACTTGCC	TCTGCACT	TGCTGAGC	TCGAGGTA	CCACTTCG	TCTGTTC	TGCCGACA	GAGCGCGT	TGTGAAAG	AATTTGAG	AAACTGAT
Raspberry	AACTTGCC	TCTGCACT	TGCTGAGC	TCGAGGTA	CCACTTCG	TCTGTTC	TGCCGACA	GAGCGCGT	TGTGAAAG	AATTTGAG	AAACTGAT

1497

ORF dmapA	TCACTCCG	TGAATCTT	TTGCTGGA	TGCCCGCA	AGGTCGCT	GAGAAGGT	GGAGAGTG	AAATTCGT	GTGTTGGA	GGCAGCGA	AGGAGGAG
Exones AspGDB	TCACTCCG	TGAATCTT	TTGCTGGA	TGCCCGCA	AGGTCGCT	GAGAAGGT	GGAGAGTG	AAATTCGT	GTGTTGGA	GGCAGCGA	AGGAGGAG
Exones CADRE	TCACTCCG	TGAATCTT	TTGCTGGA	TGCCCGCA	AGGTCGCT	GAGAAGGT	GGAGAGTG	AAATTCGT	GTGTTGGA	GGCAGCGA	AGGAGGAG
KEGG	TCACTCCG	TGAATCTT	TTGCTGGA	TGCCCGCA	AGGTCGCT	GAGAAGGT	GGAGAGTG	AAATTCGT	GTGTTGGA	GGCAGCGA	AGGAGGAG
NetAsp	TCACTCCG	TGAATCTT	TTGCTGGA	TGCCCGCA	AGGTCGCT	GAGAAGGT	GGAGAGTG	AAATTCGT	GTGTTGGA	GGCAGCGA	AGGAGGAG
M @todo Manual	TCACTCCG	TGAATCTT	TTGCTGGA	TGCCCGCA	AGGTCGCT	GAGAAGGT	GGAGAGTG	AAATTCGT	GTGTTGGA	GGCAGCGA	AGGAGGAG
Raspberry	TCACTCCG	TGAATCTT	TTGCTGGA	TGCCCGCA	AGGTCGCT	GAGAAGGT	GGAGAGTG	AAATTCGT	GTGTTGGA	GGCAGCGA	AGGAGGAG

1585

ORF dmapA	CGGGAACG	CAAGGCCA	AGGAGTTA	AGGGAGAA	AGACAAGC	CTGAAATC	AAGTCGGA	GCAGCAGG	ATAATGAT	GTTCCCAT	CCCACCAG
Exones AspGDB	CGGGAACG	CAAGGCCA	AGGAGTTA	AGGGAGAA	AGACAAGC	CTGAAATC	AAGTCGGA	GCAGCAGG	ATAATGAT	GTTCCCAT	CCCACCAG
Exones CADRE	CGGGAACG	CAAGGCCA	AGGAGTTA	AGGGAGAA	AGACAAGC	CTGAAATC	AAGTCGGA	GCAGCAGG	ATAATGAT	GTTCCCAT	CCCACCAG
KEGG	CGGGAACG	CAAGGCCA	AGGAGTTA	AGGGAGAA	AGACAAGC	CTGAAATC	AAGTCGGA	GCAGCAGG	ATAATGAT	GTTCCCAT	CCCACCAG
NetAsp	CGGGAACG	CAAGGCCA	AGGAGTTA	AGGGAGAA	AGACAAGC	CTGAAATC	AAGTCGGA	GCAGCAGG	ATAATGAT	GTTCCCAT	CCCACCAG
M @todo Manual	CGGGAACG	CAAGGCCA	AGGAGTTA	AGGGAGAA	AGACAAGC	CTGAAATC	AAGTCGGA	GCAGCAGG	ATAATGAT	GTTCCCAT	CCCACCAG
Raspberry	CGGGAACG	CAAGGCCA	AGGAGTTA	AGGGAGAA	AGACAAGC	CTGAAATC	AAGTCGGA	GCAGCAGG	ATAATGAT	GTTCCCAT	CCCACCAG

1673

ORF dmapA	CGCCTGCA	CCTGTTGC	CGCGGGTG	ATGCTTCA	CAGACTGG	GCAACCTG	CCAAAACG	AATGAAGG	ACAAGCAG	AACTGAAT	GGTTCATC
Exones AspGDB	CGCCTGCA	CCTGTTGC	CGCGGGTG	ATGCTTCA	CAGACTGG	GCAACCTG	CCAAAACG	AATGAAGG	ACAAGCAG	AACTGAAT	GGTTCATC
Exones CADRE	CGCCTGCA	CCTGTTGC	CGCGGGTG	ATGCTTCA	CAGACTGG	GCAACCTG	CCAAAACG	AATGAAGG	ACAAGCAG	AACTGAAT	GGTTCATC
KEGG	CGCCTGCA	CCTGTTGC	CGCGGGTG	ATGCTTCA	CAGACTGG	GCAACCTG	CCAAAACG	AATGAAGG	ACAAGCAG	AACTGAAT	GGTTCATC
NetAsp	CGCCTGCA	CCTGTTGC	CGCGGGTG	ATGCTTCA	CAGACTGG	GCAACCTG	CCAAAACG	AATGAAGG	ACAAGCAG	AACTGAAT	GGTTCATC
M @todo Manual	CGCCTGCA	CCTGTTGC	CGCGGGTG	ATGCTTCA	CAGACTGG	GCAACCTG	CCAAAACG	AATGAAGG	ACAAGCAG	AACTGAAT	GGTTCATC
Raspberry	CGCCTGCA	CCTGTTGC	CGCGGGTG	ATGCTTCA	CAGACTGG	GCAACCTG	CCAAAACG	AATGAAGG	ACAAGCAG	AACTGAAT	GGTTCATC

```

1761
ORF dmapA          TACTACCA ATAATGTT GCTGATAG TGAGCCGT CTACGCAA GAGCAAGA GGGCGTCT CGCATAAG CGTTCTGC TAGCGTGC TCAGTAAT
Exones AspGDB     TACTACCA ATAATGTT GCTGATAG TGAGCCGT CTACGCAA GAGCAAGA GGGCGTCT CGCATAAG CGTTCTGC TAGCGTGC TCAGTAAT
Exones CADRE      TACTACCA ATAATGTT GCTGATAG TGAGCCGT CTACGCAA GAGCAAGA GGGCGTCT CGCATAAG CGTTCTGC TAGCGTGC TCAGTAAT
KEGG              TACTACCA ATAATGTT GCTGATAG TGAGCCGT CTACGCAA GAGCAAGA GGGCGTCT CGCATAAG CGTTCTGC TAGCGTGC TCAGTAAT
NetAsp           -----
M @todo Manual    TACTACCA ATAATGTT GCTGATAG TGAGCCGT CTACGCAA GAGCAAGA GGGCGTCT CGCATAAG CGTTCTGC TAGCGTGC TCAGTAAT
Raspberry        TACTACCA ATAATGTT GCTGATAG TGAGCCGT CTACGCAA GAGCAAGA GGGCGTCT CGCATAAG CGTTCTGC TAGCGTGC TCAGTAAT

1849
ORF dmapA          GGGAGCGA CAAAAGCT CGAAGCGG CAGAAGAA ATGA
Exones AspGDB     GGGAGCGA CAAAAGCT CGAAGCGG CAGAAGAA ATGA
Exones CADRE      GGGAGCGA CAAAAGCT CGAAGCGG CAGAAGAA ATGA
KEGG              GGGAGCGA CAAAAGCT CGAAGCGG CAGAAGAA ATGA
NetAsp           GGGAGCGA CAAAAGCT CGAAGCGG CAGAAGAA ATGA
M @todo Manual    GGGAGCGA CAAAAGCT CGAAGCGG CAGAAGAA ATGA
Raspberry        GGGAGCGA CAAAAGCT CGAAGCGG CAGAAGAA ATGA

```

Figura S4. Posibles sitios de “splicing” alternativo del ORF de *dmapA*. Se compararon distintas anotaciones de la secuencia codificante obtenida en diferentes bases de datos, los guiones denotan sitios de “splicing” alternativo. AspGD (<http://www.aspergillusgenome.org/cgi-bin/locus.pl?dbid=ASPL0000078236>), CADRE (<http://www.cadre-genomes.org.uk/index.html>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), o por medio de análisis con software como: NetAspGene 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAspGene/>), manualmente por medio de un alineamiento con otros ortólogos en aspergilli (no se muestra) y utilizando el servidor Softpberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml>).