



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA UNICELULAR PARA
ESTUDIAR LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN EL HONGO
*ASPERGILLUS NIDULANS***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ANATOLE SILVANA RAMÍREZ SORIA



CIUDAD DE MÉXICO.

AÑO 2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

VOCAL: Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

SECRETARIO: Profesor: JESÚS AGUIRRE LINARES

1er. SUPLENTE: Profesor: GENARO JIMENEZ REYES

2° SUPLENTE: Profesor: SARA MARGARITA GARZA AGUILAR

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA
CELULAR, LABORATORIO 107 ORIENTE.**

ASESOR DEL TEMA: DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

SUPERVISOR TÉCNICO: BIOL. ALMA OLIVIA SÁNCHEZ GONZÁLEZ

SUSTENTANTE: ANATOLE SILVANA RAMÍREZ SORIA

AGRADECIMIENTOS

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). Se agradece a la Bióloga Olivia Sánchez por su valioso apoyo técnico y académico, durante el desarrollo de esta tesis.

La elaboración de este trabajo fue posible gracias a los Proyectos Fronteras de la Ciencia 2015-I-319 y PAPIIT-UNAM IN208916.

Se agradece al Dr. Arturo Hernández Cruz y a la alumna de Doctorado Johanna Peña Del Castillo por su valiosa asesoría técnica para las observaciones en el microscopio confocal.

CONTENIDO

1. ABREVIATURAS	6
2. RESUMEN	7
3. INTRODUCCIÓN	10
<i>ASPERGILLUS NIDULANS</i> COMO MODELO DE ESTUDIO	12
GENÉTICA DE LA CONIDIACIÓN	13
EL GEN <i>BRLA</i>	15
EL GEN <i>ABAA</i>	16
EL GEN <i>WETA</i>	17
LA REGULACIÓN DEL GEN <i>ALCA</i>	18
LA DINÁMICA DE ORGANELOS DURANTE LA CONIDIACIÓN.....	20
4. HIPOTESIS	22
5. OBJETIVO	22
6. OBJETIVOS PARTICULARES	22
7. MATERIALES Y MÉTODOS	23
CEPAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE <i>A. NIDULANS</i>	23
GENERACIÓN DE CEPAS DIPLOIDES	24
ESTADÍSTICA	25
<i>Estadística de la cuantificación de la conidiación en Medio Mínimo Sólido de cepas haploides y diploides con la construcción $alcA(p)::brlA$</i>	25
<i>Estadística de la cuantificación de la conidiación en microcultivo líquido estático de cepas haploides y diploides con la construcción $alcA(p)::brlA$</i>	26
CONIDIACIÓN UNICELULAR EN CEPAS DIPLOIDES CON LA CONSTRUCCIÓN <i>ALCA(P)::BRLA</i>	26
<i>Inducción de la conidiación unicelular en Medio Mínimo líquido con Glucosa, Treonina o Etanol en matraz</i>	26
VIABILIDAD DE ESPORAS DIPLOIDES CON LA CONSTRUCCIÓN <i>ALCA(P)::BRLA</i>	27
CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE CONIDIACIÓN POR VIDEOMICROSCOPIA	29
TINCIONES DE CEPAS DIPLOIDES	29
<i>Tinción con Mito Tracker® Red</i>	29
<i>Tinción con DAPI</i>	30
<i>Tinción con Calcofluor</i>	30
MICROSCOPIA	30
CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DIPLOIDES	31
<i>Conservación en sílica gel</i>	31
<i>Conservación en glicerol</i>	31
8. RESULTADOS	32

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DIPLOIDES CON LA CONSTRUCCIÓN <i>ALCA(P)::BRLA</i>	32
LAS ESPORAS DIPLOIDES CON LA CONSTRUCCIÓN <i>ALCA(P)::BRLA</i> GERMINAN NORMALMENTE EN UN MEDIO CON GLUCOSA, EN EL QUE LA EXPRESIÓN DE LA FUSIÓN <i>ALCA(P)::BRLA</i> ESTA REPRIMIDA.	34
LA INDUCCIÓN DEL PROMOTOR <i>ALCA</i> EN ESPORAS DIPLOIDES CON LA CONSTRUCCIÓN <i>ALCA::BRLA</i> CONDUCE A LA CONIDIACIÓN.....	35
EL GEN <i>ABA</i> ES ESENCIAL PARA LA CONIDIACIÓN DE LAS CONIDIAS DIPLOIDES	41
LAS NUEVAS CONIDIAS GENERADAS A PARTIR DE UNA ESPORA DIPLOIDE CON LA CONSTRUCCIÓN <i>ALCA(P)::BRLA</i> SON VIABLES.....	43
DINÁMICA DE LA CONIDIACIÓN UNICELULAR Y LA DIVISIÓN NUCLEAR DURANTE EL PROCESO.....	46
LOCALIZACIÓN DE DISTINTAS PROTEÍNAS DURANTE LA CONIDIACIÓN UNICELULAR.	50
LA DINÁMICA NUCLEAR Y MITOCONDRIAL DURANTE LA CONIDIACIÓN UNICELULAR.	52
9. DISCUSIÓN	57
LA INDUCCIÓN DEL PROMOTOR <i>ALCA</i> EN CONIDIAS INDUCE LA CONIDIACIÓN SOLO EN CÉLULAS DIPLOIDES	57
10. CONCLUSIONES	61
11. PERSPECTIVAS.....	61
12. REFERENCIAS.....	62
13. ANEXOS	68

ABREVIATURAS

ADN= Ácido desoxirribonucleico

Bio= Biotina

C:F= Contraste de fases

EtOH= Etanol

GFP= Green Fluorescent Protein

MM= Medio Mínimo

Met= Metionina

Treo= Treonina

RESUMEN

Aspergillus nidulans, siendo un hongo filamentoso, crece formando largos filamentos denominados hifas. Se ha empleado como modelo experimental desde hace varias décadas debido principalmente a su fácil manipulación genética y a que presenta patrones definidos de diferenciación celular, que incluyen fases de desarrollo sexual, parasexual y asexual. El ciclo sexual incluye la diferenciación de cuerpos fructíferos denominados cleistotecios, los cuales producen miles de ascosporas, que son producto de la meiosis. El ciclo parasexual se inicia con la formación de un heterocarión, producto de la fusión o “anastomosis” de hifas de distintos individuos seguido de la fusión nuclear, para formar un micelio diploide estable que bajo ciertas condiciones puede haploidizarse y generar cepas con cromosomas provenientes de las dos cepas progenitoras. La diferenciación asexual o conidiación ocurre normalmente en una interfase aérea e implica la formación de cientos de estructuras multicelulares complejas denominadas conidióforos. Cada conidióforo consiste en una célula tallo, la cual se forma a partir de una célula pie que crece una longitud determinada hasta formar una vesícula multinucleada, de la cual se generan múltiples células uninucleadas llamadas métulas. Las métulas producen dos fiálides uninucleadas cada una y cada fiálide produce una cadena de aproximadamente 100 conidias uninucleadas, mediante gemaciones sucesivas. El estudio de este proceso a nivel subcelular se ha visto severamente limitado ante la imposibilidad de seguir el proceso en un conidióforo silvestre que contiene varios tipos celulares y demasiadas estructuras esporulantes en distintos planos. Por ello, el desarrollo de un sistema de esporulación unicelular resultaría sumamente útil.

La conidiación está regulada por una red de genes regulatorios entre los que destacan *brlA* (“bristle” o cerda), *abaA* (“abacus” o abaco), *wetA* (“wet-white” o conidias blancas húmedas), *stuA* (“stunted” o atrofiado) y *medA* (“medusa”). Las mutaciones nulas de estos genes alteran la expresión de otros genes específicos de la conidiación, bloqueando el desarrollo o resultando en la formación de conidióforos aberrantes. El gen *brlA* es esencial para la conidiación ya que las

mutantes nulas de este gen solo producen tallos de conidióforos (cerdas), incapaces de diferenciar vesículas, métulas, fiálides o conidias. Notablemente, cuando este gen se expresa desde el promotor inducible *alcA* (*alcA(p)::brlA*) en hifas crecidas en medio líquido, condiciones en las que *brlA* no se expresa normalmente, se produce la diferenciación de fiálides y conidias a partir de las puntas de algunas hifas. Sin embargo, cuando las conidias de una cepa que contiene la fusión *alcA(p)::brlA* se inoculan en medio sólido en condiciones de inducción del gen *alcA* (etanol o treonina), éstas se hinchan, pero son incapaces de germinar o de producir estructuras esporulantes, por lo que se ha considerado que la expresión de *brlA* en conidias es un evento letal.

En este trabajo mostramos que contrariamente a lo que ocurre en cepas haploides, la inoculación de conidias diploides, con una copia de la fusión *alcA(p)::brlA*, en medio inductor (etanol o treonina), resulta en un aumento inicial en el volumen de la conidia, seguido por la producción directa de fiálides y una sola conidia, las cuales se encuentran delimitadas por un septo. Esto constituye un novedoso sistema de esporulación unicelular que ocurre tanto en medio sólido como líquido, y al igual que la esporulación silvestre, depende de un gen *abaA* funcional. Hemos determinado que cerca del 80% de las conidias diploides son capaces de conidiar, mientras que el resto solamente se hincha o germina normalmente. Para determinar la división nuclear y la dinámica mitocondrial durante este proceso, construimos cepas diploides fusionando una cepa haploide con la fusión *alcA(p)::brlA* con una cepa que contiene los núcleos marcados con la histona H2A etiquetada con la proteína fluorescente mRFP y con otra cepa en la que las mitocondrias están marcadas con la proteína fluorescente mCherry. Nuestros resultados muestran a), la conidiación ocurre de manera asincrónica, es decir a distintos tiempos en distintas conidias; b), durante las primeras horas de incubación se produce un aumento en el volumen de la espora inicial y un aumento en el tamaño del núcleo, antes de que se observe la primera división nuclear; c), el primer cambio en la polaridad ocurre cuando se produce una protuberancia que inicialmente se asemeja a un tubo germinal y posteriormente dará lugar a la fiálide o estructura conidiante; d), la primera división nuclear ocurre

en el cuerpo de la conidia original mientras dicha protuberancia crece y posteriormente uno de los 2 núcleos de la conidia madre migra a esta estructura; e), una misma conidia madre puede formar 2 o 3 protuberancias de manera asincrónica y en estos casos primero ocurre la división nuclear en la conidia madre y la migración posterior del núcleo a dicha protuberancia; f), las proyecciones pueden formar directamente una conidia terminal uninucleada, funcionando como fiálides o formar un segundo compartimento celular antes de formar la conidia terminal; g), al menos parte de las conidias producidas en este sistema son viables.

Respecto a las mitocondrias, estas se encuentran fragmentadas en la conidia diploide original y forman redes continuas durante el proceso de conidiación unicelular. Parte de estas estructuras mitocondriales filamentosas son dirigidas hacia las conidias recién formadas.

Nuestros resultados indican que este nuevo sistema de conidiación unicelular constituye una nueva herramienta para estudiar los cambios temporales y espaciales que ocurren a nivel subcelular durante la conidiación.

INTRODUCCIÓN

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso perteneciente a la familia Trichocomaceae, phylum Ascomycota (Pontecorvo et al., 1953). Crece rápido ya sea en medio sólido o en líquido en una variedad de condiciones nutricionales, forma largos filamentos con ramificaciones laterales denominados hifas, las cuales están compuestas por compartimentos celulares multinucleados delimitados por septos incompletos.

En el ciclo reproductivo de este hongo se pueden diferenciar 3 fases de desarrollo: sexual, asexual y parasexual (Timberlake, 1980).

- 1) Ciclo asexual
- 2) Ciclo sexual
- 3) Ciclo parasexual

El ciclo asexual de *Aspergillus nidulans* es precedido de una fase de crecimiento vegetativo, la cuál es necesaria para que las células adquieran la capacidad de responder a señales de inducción, y culminando con la producción de esporas asexuales o conidias (Adams et al., 1998). Este proceso implica diversos eventos de requiere de comunicación intercelular, regulación temporal y espacial de la expresión génica y especialización celular (Adams et al., 1998).

El desarrollo asexual se inicia cuando el micelio se expone al aire (Adams et al., 1998) o la limitación de nutrientes (Skromne et al., 2017) y se caracteriza por la sustitución del crecimiento polarizado por un crecimiento por gemación que termina en la formación de cientos de estructuras multicelulares complejas denominadas conidióforos, cada uno de los cuales produce múltiples cadenas de conidias. Las conidias se forman por divisiones mitóticas repetidas, cada conidia es uninucleada y todas comparten la misma dotación genética que el micelio homocariótico. La formación de las estructuras reproductoras asexuales suele

venir seguida de la iniciación del ciclo de reproducción sexual del hongo (Lee et al., 2010; Pontecorvo et al., 1953).

El ciclo sexual comprende la formación de cuerpos fructíferos denominados cleistotecios, los cuales se producen en condiciones de limitación de oxígeno o ausencia de luz (El-zayat, 1989). En este cuerpo fructífero, un par de núcleos que está destinado a la meiosis se divide en sincronía para formar una masa de células denominadas hifas ascógenas. Estas hifas son altamente ramificadas y cada célula pie se convierte en un asca (célula especializada) en la que se fusionan los dos núcleos haploides. El núcleo diploide sufre una meiosis seguido de una mitosis posmeiótica, lo cual da como resultado la producción de ocho ascosporas haploides. Este cleistotecio, puede contener miles de ascosporas, las cuales se liberan en el medio ambiente cuando este se rompe (Casselton and Zolan, 2002; Scott and Kafer).

La fase de vida vegetativa comienza con la germinación de una espora asexual (conidia) o sexual (ascospora), lo cual da lugar a un entramado de hifas interconectadas o micelio. *A. nidulans* es generalmente haploide pero sus hifas tienen la capacidad de fusionarse mediante anastomosis e intercambiar material celular y dar lugar, en el caso de que las hifas fusionadas pertenezcan a cepas genéticamente diferentes, a un micelio heterocariótico con núcleos haploides con distinta dotación genética (Pontecorvo et al., 1953). Adicionalmente, tras la anastomosis, se puede producir la fusión de algunos núcleos haploides para dar lugar a núcleos diploides experimentalmente, es posible seleccionar cepas homocarióticas diploides, las cuales son estables y pueden crecer y reproducirse asexualmente de una manera indistinguible de las cepas haploides originales. Sin embargo, en ciertas condiciones se puede producir la haploidización del diploide dando lugar a un micelio haploide “recombinante” que contiene cromosomas de ambas cepas originales. Este ciclo de diploidización-haploidización se le conoce como ciclo parasexual y constituye una herramienta adicional para el análisis genético.

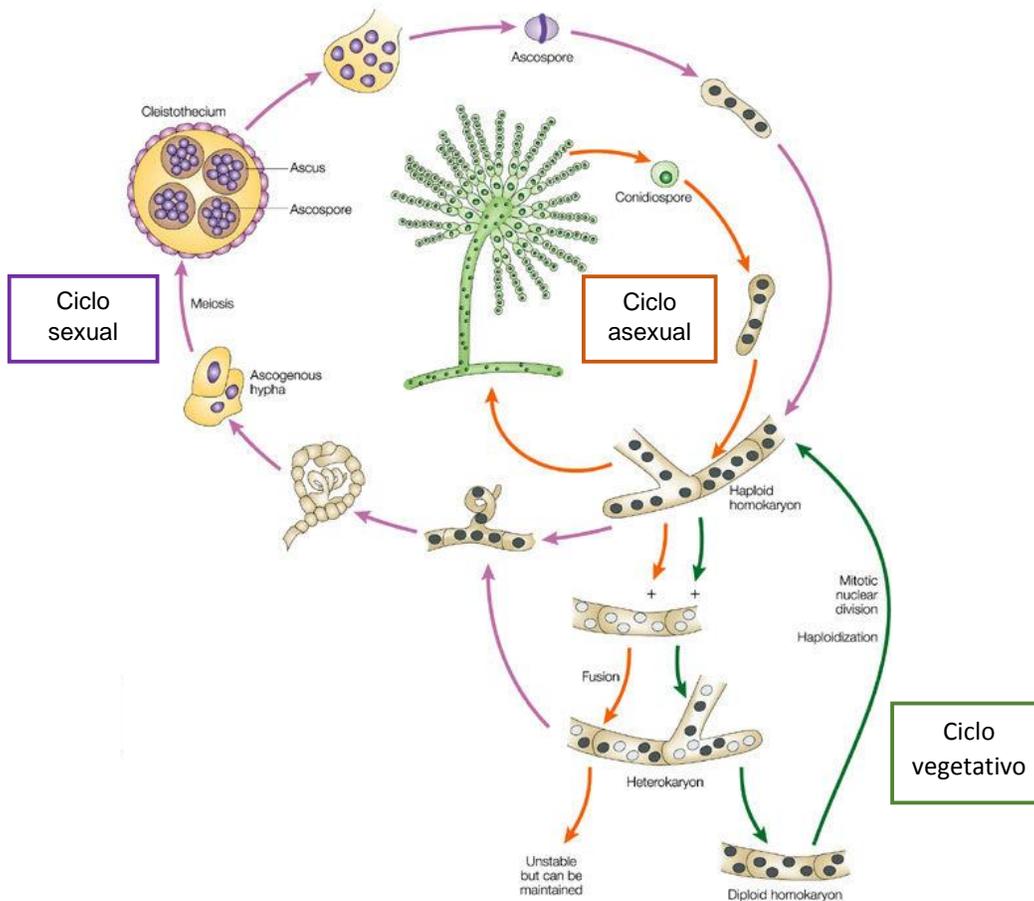


Figura 1. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. (Timberlake, 1980)

Aspergillus nidulans como modelo de estudio

Aspergillus nidulans se ha empleado como organismo modelo debido a sus características genéticas y ha sido ampliamente utilizado para estudios de biología celular y regulación genética. Es un eucariote saprófito, posee una gran capacidad para adaptarse y vivir en ambientes muy diversos y posee ciclos sexuales y asexuales cortos y un ciclo parasexual muy útil. Sus esporas asexuales, al ser uninucleadas y haploides son perfectas para estudios de mutagénesis. Los heterocariones se emplean para realizar cruza sexuales y parasexuales y determinar relaciones de alelismo y dominancia. El ciclo sexual se emplea para estudios de mapeo genético, análisis de epistasis y la obtención de mutantes en múltiples genes (Adams et al., 1998; Etxebeste et al., 2010; Pontecorvo et al.,

1953; Summerbell, 2005). También se dispone de herramientas genéticas moleculares sofisticadas para el análisis funcional específico. La transformación mediada por ADN permite el aislamiento relativamente sencillo de genes mediante la complementación de fenotipos mutantes (Timberlake et al., 2018).

Su genoma de 30 millones de pares de bases está organizado en 8 cromosomas y alberga alrededor de 10687 genes (Galagan et al., 2005). Su secuencia genómica anotada está disponible en The Aspergillus Genome Data Base (<http://www.aspgd.org>).

Aspergillus nidulans ha contribuido a comprender la mitosis, la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos y las funciones intracelulares de los motores mitóticos de kinesina y dineína citoplasmática. También ha ayudado a entender la regulación del metabolismo del carbono y del nitrógeno así como el metabolismo secundario en los hongos (Keller and Hohn, 1997).

Genética de la conidiación

La diferenciación de los diferentes tipos celulares del conidióforo implica la activación controlada de varios cientos de genes (Clutterbuck, 1969; Timberlake, 1980). Los análisis moleculares y genéticos de *A. nidulans* durante la esporulación asexual han llevado a identificar y definir una vía reguladora central que controla el desarrollo del conidióforo. Se sabe que tres genes específicos de la esporulación, *brlA*, *abaA* y *wetA* están involucrados en el control del desarrollo del conidióforo ya que mutaciones en cualquiera de estos tres genes bloquean la esporulación asexual en una etapa específica de la morfogénesis del conidióforo, resultando en la formación de conidióforos aberrantes, los cuales no pueden producir conidias viables y maduras (Clutterbuck, 1969).

Los genes *brlA* y *abaA*, se requieren específicamente para la conidiación (su mutación no afecta el crecimiento vegetativo) y son absolutamente necesarios para la formación de conidias (Clutterbuck, 1969). Junto con un tercer gen llamado

wetA, *brlA* y *abaA* actúan en conjunto con otros genes para controlar la expresión génica específica de la conidiación y determinar el orden de activación durante el desarrollo de los conidióforos y la maduración de las esporas (Mirabito et al., 1988; Timberlake et al., 1987).

La inactivación de estos genes no solo causa anomalías importantes en la morfología del conidióforo, sino que impide la expresión de muchos genes cuya expresión se regula durante el desarrollo (Timberlake et al., 1987).

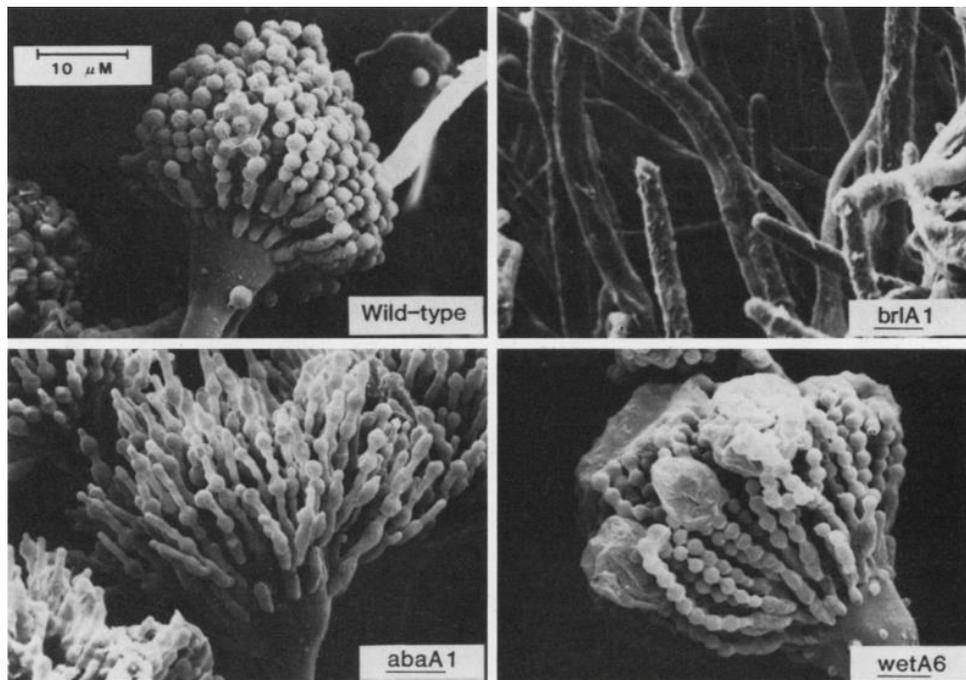


Figura 2. Morfología de conidióforos silvestres y conidióforos mutantes visualizados con micrografía electrónica de barrido (Timberlake et al., 1987).

La mutación en *brlA* no interfiere con la iniciación de la conidiogénesis, pero las cepas mutantes producen tallos de conidióforos que continúan creciendo en lugar de formar vesículas apicales, métulas, fiálides y conidias. (Clutterbuck, 1969). La mutación en *abaA* no interfiere con las etapas anteriores de desarrollo del conidióforo, pero causan la formación de métulas anormales que proliferan en vez

de continuar con el desarrollo de fiálides y conidias. La mutación en *wetA* tiene poco o ningún efecto en la formación del conidióforo, sin embargo, causa que las esporas se autolisen durante las etapas finales de la diferenciación (Timberlake et al., 1987).

El gen *brlA*

El fenotipo de mutantes nulas en *brlA* se ha descrito como “*cerda (bristle)*” porque en estas mutantes no ocurre la transición del crecimiento polar del tallo del conidióforo a la hinchazón de la vesícula (Clutterbuck, 1969) y por lo tanto se generan múltiples cerdas en la colonia. La proteína BrlA corresponde a un factor transcripcional con dedos de Zinc que se requiere para la expresión de múltiples genes durante la conidiación. Notablemente, *brlA* no solo es necesario para la conidiación, sino que su expresión forzada conduce a la conidiación (Adams et al., 1988). Esto se demostró construyendo una cepa de *A. nidulans* que permitía la transcripción controlada de *brlA* en células vegetativas, fusionando el ORF del gen *brlA* con el promotor del gen *alcA* (*alcA(p)*), el cual codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual se requiere para utilizar etanol como única fuente de carbono (Gwynne and Wayne, 1987; Pateman et al., 1983). Debido a que la transcripción de *alcA* se induce por treonina o etanol y se reprime por la presencia de glucosa, en esta cepa fue posible inducir *brlA* en las células vegetativas simplemente cambiando el micelio de un medio con glucosa a un medio con etanol o treonina. En efecto, cuando la cepa con la fusión *alcA(p)::brlA* se transfirió de un medio con glucosa a un medio con treonina, las puntas de las hifas dejaron de crecer y algunas de las hifas fueron capaces de diferenciar una sola fiálide capaz de producir una o más conidias viables (Adams and Timberlake, 1990). Además, esta activación forzada de *brlA* dio lugar a la activación de los genes reguladoras *abaA* y *wetA*, así como otros genes específicos de la conidiación, pero de función desconocida (Adams et al., 1998).

El gen *abaA*

AbaA se ha caracterizado como un factor transcripcional ATTS / TEA con propiedad de unión al ADN (Andrianopoulos and Timberlake, 1994). Se ha demostrado que *AbaA* se une a la secuencia de consenso CATTG (C / T) (Andrianopoulos and Timberlake, 1994). Este sitio de unión específico de *AbaA* está presente en muchos genes reguladores que incluyen *brlA*, *wetA*, *yA*, *rodA* y, por lo tanto, *abaA* en sí (Adams et al., 1998). *AbaA* se activa mediante *BrlA* durante la etapa intermedia de desarrollo (Adams et al., 1998). La transcripción de *abaA* se inicia entre 10-15 horas después de la inducción del momento de la formación de la fiálide (Timberlake et al., 1987). La mutante Δ *abaA* representa el desarrollo repetido de células esterigmata para formar estructuras de ábaco, y no tiene conidiación (Sewall et al., 1990).

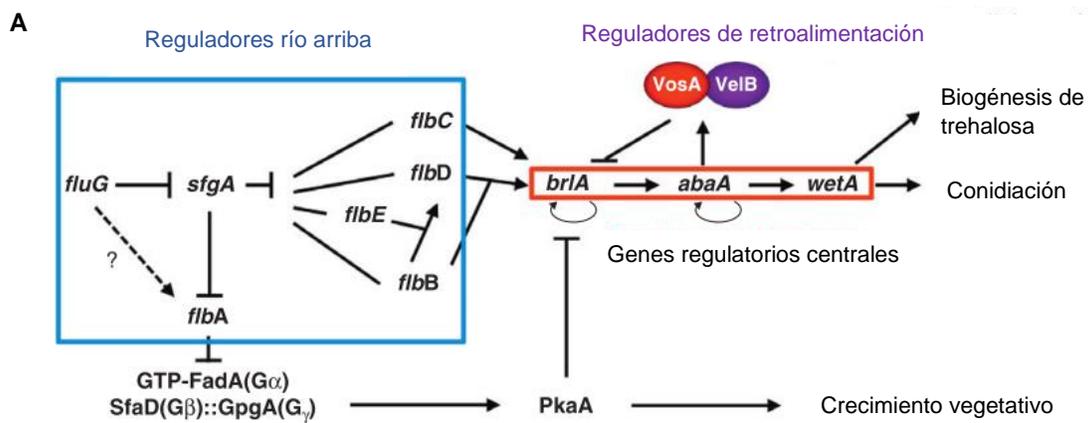
AbaA se requiere para la activación transcripcional de numerosos genes específicos de la esporulación (Mirabito et al., 1988; Timberlake et al., 1987). La expresión del último gen de la vía reguladora *wetA*, requiere la expresión de *abaA* (Timberlake et al., 1987) y es responsable de la maduración y el mantenimiento de la latencia del conidio (Sewall et al., 1990).

La activación forzada de *abaA* empleando el promotor *alcA* en hifas vegetativas da lugar a la cesación del crecimiento y a la vacuolización celular acentuada. (Adams and Timberlake, 1990). *brlA* y *abaA* son inductores recíprocos pero la expresión de *brlA* ocurre antes que la expresión de *abaA* para el desarrollo del conidióforo (Adams et al., 1998).

AbaA parece funcionar como un represor transcripcional de *brlA* cuando está presente en bajas concentraciones, y como activador cuando está presente a altas concentraciones, como ocurre después de la expresión inducida por el promotor *alcA* (Aguirre, 1993).

El gen *wetA*

El gen *wetA* se requiere en el desarrollo tardío, para la síntesis del componente crucial de la pared celular (Marshall and Timberlake, 1991). El fenotipo de una mutante nula *wetA* se describe como “*wet-white*.”. Estas mutantes se diferencian por tener conidióforos normales, pero las conidias producidas son defectuosas ya que nunca se pigmentan y se autolisan. Se ha propuesto que el gen *wetA* codifica para un regulador de la expresión génica específica de esporas (Marshall and Timberlake, 1991), basado en el hallazgo de que las mutantes *wetA* no acumulan diversos mRNAs específicos de la esporulación (Timberlake et al., 1987). Además, la activación forzada de *wetA* en células vegetativas causa una inhibición del crecimiento y una ramificación excesiva, lo cual da lugar a la acumulación de transcripciones de varios genes que se expresan normalmente durante la formación de la espora (Marshall and Timberlake, 1991). La activación de *wetA* en hifas no da lugar a la activación de *brlA* o de *abaA* y nunca lleva a la conidiación prematura (Adams et al., 1988).



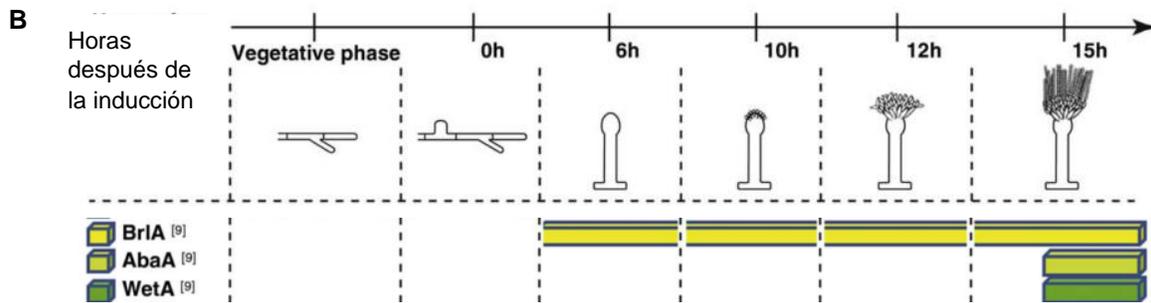
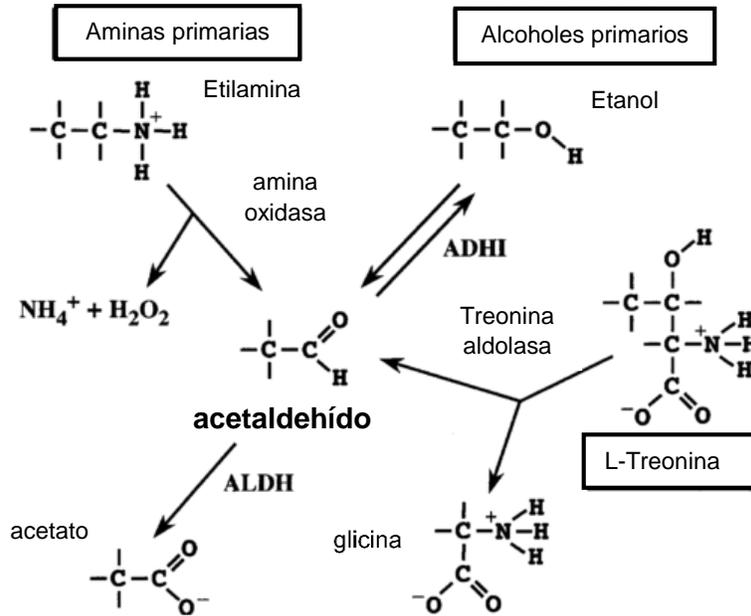


Figura 3. A. Modelo genético de los reguladores de la conidiación en *Aspergillus nidulans* río arriba de *briA* y centrales (Park and Yu, 2012). **B.** El diagrama muestra los intervalos de tiempo en que se detecta el mRNA de los genes *briA*., *abaA* y *wetA*, durante la conidiación (Etxebeste et al., 2010).

La regulación del gen *alcA*

En los hongos, un gran número de vías de expresión inducibles son responsables de la utilización de fuentes de carbono menos favorables. La vía de la utilización del etanol en el hongo *Aspergillus nidulans* está compuesta un sistema de genes altamente inducible llamado *alc*, el cual ha sido ampliamente estudiado tanto a nivel genético (Felenbok et al., 2001). El sistema de etanol está compuesto por genes *alcP*, *alcR*, *alcO*, *alcA*, *alcM*, *alcS* y *alcU*, todos agrupados en el cromosoma VII y *aldA* ubicados en el cromosoma VIII. Los genes *alc* comparten la misma regulación, siendo fuertemente inducidos por el acetaldehído inductor fisiológico y el inductor no fisiológico 2-butanona (Flipphi et al., 2002). También están sujetos a un control estricto por el activador transcripcional *AlcR* y son reprimidos por la glucosa a través del represor *CreA* (Fillinger, 1996). Sin embargo, solo se requieren *AlcR*, alcohol deshidrogenasa I *AlcA* y aldehído deshidrogenasa *AldA* para la utilización de etanol, se desconoce la función específica de los otros genes *alc*. Sin embargo, *AlcS* es una proteína de membrana con homología con transportadores de acetato que, sin embargo, es prescindible para el crecimiento en etanol, acetaldehído o acetato (Flipphi and Kocialkowska, 2003). Además del etanol, el sistema *alc* se induce por otros alcoholes primarios, monoaminas primarias, el aminoácido L-treonina y algunas cetonas (Waring et al., 1989).



Esquema 1. Catabolismo relacionado con el etanol, etilamina y la L-Treonina en *Aspergillus nidulans* (Flipphi et al., 2002).

El acetato formado por el acetaldéido es más activo que la acetyl-CoA para entrar en el metabolismo. Los mutantes en *alc* y *ald* utilizan monoaminas primarias como fuentes únicas de nitrógeno como el tipo silvestre, indicando que la Amina oxidasa responsable de la desaminación, se expresa independientemente de la vía de utilización del etanol. El aminoácido L-treonina también puede servir como única fuente de carbono y nitrógeno para *Aspergillus nidulans*. Este aminoácido se convierte en acetaldéido y glicina por la enzima treonina aldolasa (Creaser et al., 1987).

La dinámica de organelos durante la conidiación

La dinámica de organelos celulares como los endosomas, peroxisomas y mitocondrias se ha estudiado en los hongos filamentosos durante el crecimiento polar (Lin et al., 2016; Neubauer et al., 2015), pero se sabe muy poco sobre estos procesos durante la reproducción asexual. Las mitocondrias juegan un papel fundamental en la mantención de la homeostasis metabólica, principalmente a través de la fosforilación oxidativa.

Las mitocondrias son organelos particularmente complejos, envueltos por dos membranas: la membrana mitocondrial externa (OMM) y la membrana interna mitocondrial (IMM), las cuales encierran dos compartimentos, el espacio intermembranal y la matriz. La matriz alberga el ADN mitocondrial (ADNmt) (Benard et al., 2007; Pagliuso et al., 2018)

La dinámica mitocondrial está determinada por eventos de fusión y fisión, transporte (movimiento dirigido dentro de la célula) y mitofagia (destrucción dirigida a través de la vía de la autofagia) (Mishra and Chan, 2016).

La Fisión es esencial para la distribución de mitocondrias durante la división celular y también puede ocurrir cuando hay un daño mitocondrial significativo lo cual le permitirá a la célula segregar la porción dañada. La Fusión también puede compensar defectos en las mitocondrias y maximizar la capacidad oxidativa (Giedt et al., 2012; Jang et al., 2017).

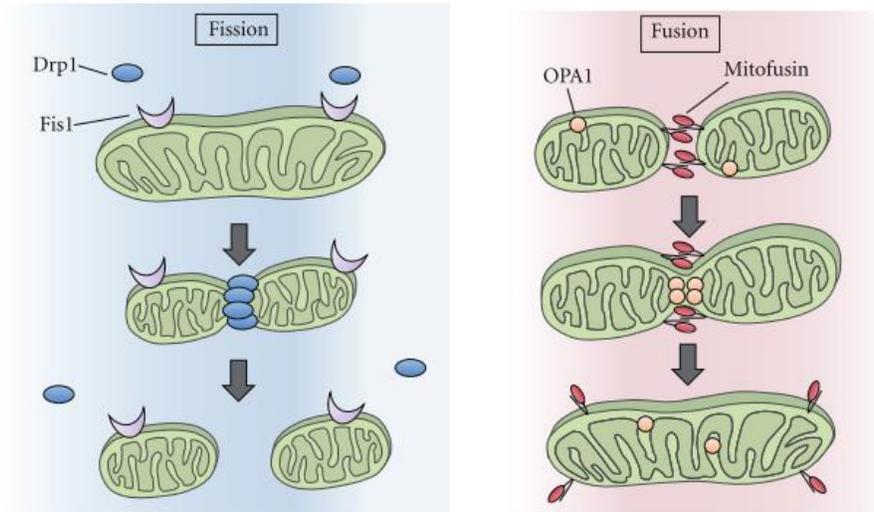


Figura 4. Fisión y fusión mitocondrial. (Kanamaru et al., 2012)

HIPOTESIS

Proponemos que un sistema de esporulación unicelular, basado en la expresión inducible del gen *brlA* en esporas diploides, debe representar una ventaja para estudiar la biología celular de la reproducción asexual en el hongo *Aspergillus nidulans*.

OBJETIVO

Desarrollar un sistema de esporulación unicelular, basado en la expresión inducible del gen *brlA* en esporas diploides y como prueba de concepto, documentar la dinámica de núcleos, mitocondrias, dos factores transcripcionales y dos cinasas, durante el proceso.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Generar cepas diploides entre la cepa *TTA292-1 (alcA(p)::brlA)* y cepas que contienen núcleos y mitocondrias marcadas con proteínas fluorescentes, así como con otras cepas en las que las cinasas SakA, SrkA o los factores transcripcionales NapA y SrrA se encuentran marcados con proteínas fluorescentes.
2. Inducir la conidiación utilizando las cepas diploides anteriores en medio sólido y líquido, así como determinar la frecuencia de conidiación unicelular, el papel del gen *abaA* en este proceso y la viabilidad de las conidias producidas.
3. Desarrollar la metodología para seguir y cuantificar el proceso de conidiación unicelular.
4. Determinar la dinámica nuclear y mitocondrial durante el proceso y la localización subcelular de las cinasas y factores transcripcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas, medios y condiciones de crecimiento de *A. nidulans*

Todas las cepas de *Aspergillus nidulans* se crecieron en Medio Mínimo con glucosa al 1% más los requerimientos necesarios para cada cepa (Scott and Kafer, 1977). Los diploides se crecieron en Medio Mínimo con glucosa al 1% ó con treonina al 1% ó con etanol al 1% sin ningún requerimiento. Los medios sólidos se prepararon con agar al 1.25%. Todos los medios y material empleado se esterilizaron a 121°C durante 20 min.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Origen
TTA292-1	<i>biA1 argB::alcA(p)::brlA metG1 veA1</i>	Adams et al., 1988
TFL6	<i>pyrG89 pyroA4 sakA::GFP::AfpYrG; ΔnkuA::bar veA1</i>	Lara-Rojas et al., 2011
TRJ5	<i>pyrG89 pyroA4 srkA::GFP bio::pyroA::gpdA::h2A::mrfp::bio nkuA::bar veA1</i>	Jaimes Arroyo et al., 2015
TRJ6	<i>pabaA1 yA2 argB::trpCB ΔsakA::argB srkA::GFP ph2A::h2A::mrfp-PtrA trpC801 veA1</i>	Jaimes Arroyo et al., 2015
CAM20	<i>pabaA1 yA2 napA::GFP veA1</i>	Mendoza Martínez et al., 2017
CAM21	<i>pabaA1 yA2 srrA::GFP::AfpYrG veA1</i>	Mendoza Martínez et al., no publicado
Trv1	<i>pabaA1 yA2 veA1 pgapdh(p)::atp9-7 (mts)::mCherry^c</i>	Garrido et al., sin publicar
AJC 6.39	<i>ornB7, fwA1, ve+, abaA1, veA1</i>	J. Clutterbuck
TTA021	<i>biA1, pabaA1, alcA(p)::brlA, abaA14, veA1</i>	Mirabito et al., 1989
DSR1	(CAM 20 X TTA292-1) <i>pabaA1 yA2 napA::GFP veA1/ biA1 argB::alcA (p)::brlA metG1 veA1</i>	Este trabajo
DSR7	(CAM 21 X TTA292-1) <i>pabaA1 yA2 srrA::GFP::AfpYrG veA1/ biA1 argB::alcA (p)::brlA metG1 veA1</i>	Este trabajo
DSR 16	(TFL6 X TTA292-1) <i>pyrG89 pyroA4 sakA::GFP::AfpYrG; DnkuA::bar veA1/biA1 argB::alcA (p)::brlA metG1 veA1</i>	Este trabajo
DSR 20	(TRJ5 X TTA292-1) <i>pyrG89 pyroA4 srkA::GFP bio::pyroA::gpdA::h2A::mrfp::bio nkuA::bar veA1/ biA1 argB::alcA (p)::brlA metG1 veA1</i>	Este trabajo
DSR 24	(TRJ6 X TTA292-1) <i>pabaA1 yA2 argB::trpCB sakA::argB srkA::GFP ph2A::h2A::mrfp-PtrA trpC801 veA1 /biA1 argB::alcA (p)::brlA metG1 veA1</i>	Este trabajo
DSR 26	(Trv1 X TTA292-1) <i>pabaA1, yA2, veA1; pgapdh(p)::atp9-7 (mts)::mCherry^c/ biA1 argB::alcA (p)::brlA metG1 veA1</i>	Este trabajo
DSR 31	(TTA021 x AJC 6.39) <i>biA1, pabaA1, alcA(p)::brlA, abaA14, veA/ ornB7, fwA1, ve+, abaA1, veA1</i>	Este trabajo

Generación de cepas diploides

Se generaron cepas diploides entre la cepa *TTA292-1* (*alcA(p)::briA*) y otras cepas en las que los factores transcripcionales NapA, SrrA y las cinasas SakA y SrkA estaban fusionados a la proteína fluorescente GFP, con el objeto de poder observar estas proteínas in vivo durante la esporulación unicelular. Para esto se siguió la metodología de Pontecorvo (Pontecorvo et al., 1953), la cual consiste en crecer contiguas las cepas mencionadas anteriormente. Para fines prácticos solo se describe la obtención del diploide entre las cepas *TTA292-1* (*biA1 argB::alcA(p)::briA metG1 veA1*) y *TRJ6* (*pabaA1 yA2 argB::trpCB sakA::argB srkA::GFP ph2A::h2A::mrfp-ptrA trpC801 veA1*).

En condiciones estériles, se tomaron esporas de la cepa *TRJ6* con un palillo estéril y se picó el agar una sola vez, se repitió el proceso para la cepa de *TTA292-1*, inoculando esta última a 2 mm de la primera. Las cajas Petri se incubaron a una temperatura de 37° durante 2-3 días aproximadamente. Posteriormente con ayuda de un palillo estéril y un bisturí, se cortaron pequeños trozos de la periferia de las colonias en donde ambos micelios se unieron, tratando de no tomar agar, y se transfirieron a MM con glucosa y sin suplementos. Las cajas Petri inoculadas con el micelio de ambas cepas parentales se incubaron durante 6-8 días a una temperatura de 37°C; transcurrido ese tiempo se observó el crecimiento de micelio heterocariótico. Se rasparon las esporas de los heterocariones con ayuda de un hisopo estéril y se transfirieron a un tubo falcón con agua estéril en un volumen final de 5 mL.

Para obtener los diploides, se tomaron distintos volúmenes de cada una de las suspensiones de esporas de los heterocariones (ver tabla complementaria 1) y se colocaron en el fondo de cajas Petri vacías, a las cuales posteriormente se les vació Medio Mínimo a una temperatura de 40°C aproximadamente y se dejó solidificar durante 10 minutos (técnica de vaciado en placa).

Después de un tiempo de incubación de 3-4 días a 37°C, se obtuvieron colonias circulares, con los bordes homogéneos y una esporulación homogénea de color

verde. Estas colonias se estriaron en MM, con el fin de obtener diploides puros a partir de una colonia aislada (las esporas son uninucleadas). Se tomaron esporas de una colonia aislada y se transfirieron nuevamente a MM sólido con glucosa mediante la técnica de colonia aislada. Se dejaron incubar 2-3 días aproximadamente a una temperatura de 37°C. Se tomaron esporas de una colonia aislada y se transfirieron a MM con glucosa mediante la técnica de inoculación a confluencia. Se dejaron incubar 6-8 días a una temperatura de 37°C.

Después del tiempo de incubación se colectaron las esporas con ayuda de un asa de metal, se transfirieron a un tubo falcón de 15 mL con 5mL de agua estéril y se lavaron 5 veces con ayuda de una centrífuga clínica y se resuspendieron en 1 mL de agua estéril.

Para cuantificar la concentración de esporas, se preparó una dilución del stock de esporas obtenido anteriormente. En tubos de 1.5 mL se mezclaron 990 µL de H₂O y 10 µL del stock de esporas.

Con ayuda de un hemocitómetro (cámara de Neubauer) se contaron las conidias en los cuadros de los cuatro ángulos y el centro, empezando por el primero de la parte superior izquierda, se contaron 10 campos en total. Para obtener el número de esporas/mL se obtuvo un promedio de los 10 campos, se multiplicó por el factor de dilución y por 25x10⁴ de acuerdo con el hemocitómetro.

$$\left(\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = \left[\frac{\# \text{esporas}}{10} \right] \times 25 \times [\text{dilución}] \times 10^4 \right)$$

Obtenidos estos resultados se realizaron los cálculos necesarios para inocular a una concentración final de 10⁶ esporas/mL.

Estadística

Estadística de la cuantificación de la conidiación en Medio Mínimo Sólido de cepas haploides y diploides con la construcción *alcA(p)::brlA*

En una caja Petri con Medio Mínimo sólido con glucosa, treonina o con etanol se inocularon 2×10^4 esporas contenidas en un volumen de 20 μL , las cuales se depositaron en áreas pre definidas en el medio. Se dejaron incubar 18 horas a temperatura ambiente (22°C). Se observaron 70 campos al azar y se contaron aproximadamente 300 esporas totales las cuales representaban el 100%. De estas se contaron las que presentaban una conidia nueva. El experimento se hizo por triplicado. Este experimento se realizó para una cepa haploide y para una cepa diploide.

Estadística de la cuantificación de la conidiación en microcultivo líquido estático de cepas haploides y diploides con la construcción *alcA(p)::briA*

En un cubreobjetos estéril se colocaron 400 μL de Medio Mínimo líquido con glucosa o con treonina o etanol. Se inocularon 2×10^4 esporas contenidas en un volumen de 20 μL . Se dejaron incubar 18 horas a temperatura ambiente (22°C) dentro de una caja Petri sin agitación. Se observaron 70 campos al azar y se contaron aproximadamente 300 esporas totales para determinar cuáles presentaban una conidia nueva. El experimento se hizo por triplicado. Este experimento se realizó para una cepa haploide y para una cepa diploide.

Conidiación unicelular en cepas diploides con la construcción *alcA(p)::briA*

Inducción de la conidiación unicelular en Medio Mínimo líquido con Glucosa, Treonina o Etanol en matraz

Los cultivos en medio líquido de *A. nidulans* se realizaron en matraces Erlenmeyer manteniendo una relación volumen de medio: volumen del matraz de 1:5 (por ejemplo: 25 mL en un matraz de 125 mL). Se preparó Medio Mínimo líquido con glucosa (control) otro con treonina al 1% y otro con etanol al 1%. Se realizaron los siguientes cálculos para llegar a una concentración final de [10^6 esporas/mL].

$$\left[\frac{\left(\frac{1 \times 10^6 \text{ esporas}}{\text{mL}} \right) \times 25 \text{ mL}}{\text{Concentración inicial}} \right] = \text{Volumen necesario}$$

*25 mL= Volumen de medio líquido contenido en el matraz.

*Concentración inicial= Concentración original del stock de esporas.

Se incubaron a 37°C, 300 rpm durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación cada uno de los matraces se centrifugó con ayuda de una centrífuga clínica durante 10 minutos esto con el fin de concentrar la muestra.

Viabilidad de esporas diploides con la construcción *alcA(p)::briA*

Para realizar este experimento se utilizaron dos metodologías las cuales se mencionan a continuación:

1. En una caja Petri con Medio Mínimo sólido con Treonina se plaquearon 1.175×10^9 esporas contenidas en un volumen de 300 μL , se dejaron incubar a temperatura ambiente (22°C-23°C) durante 2 días. Transcurrido el tiempo con ayuda de un hisopo estéril se rasparon las esporas y se transfirieron a un tubo falcón con 3 mL de agua estéril. Se centrifugó la muestra durante 5 minutos con ayuda de una centrífuga clínica. Transcurrido el tiempo se decantó el sobrenadante y el pellet formado se resuspendió en 1 mL de agua estéril. Este volumen se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL y se centrifugo durante 2 minutos a 13000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 μL . Para cuantificar la concentración de esporas, se preparó una dilución del stock de esporas obtenido anteriormente. En tubos de 1.5 mL se añadieron 990 μL de H_2O y 10 μL del stock de esporas. Se realizó el procedimiento mencionado anteriormente para el conteo de esporas. Concluido esto, se añadió el equivalente a 500 μL de perlas de vidrio de 0.75mm a 500 μL de la muestra obtenida. Se

aplicó vortex durante 8 minutos continuos. Transcurrido el tiempo, se tomaron fotos en el microscopio de epifluorescencia para observar si la espora nueva se había separado de la espora parental y si esta última había sido destruida por el procedimiento. Confirmado esto, se tomó el sobrenadante (aproximadamente 500 μL) y se plaquearon en cajas con Medio Mínimo sólido con glucosa. Se delimitó un campo en el cuál estaban presentes varias esporas y se incubaron a 37°C durante 6 horas.

2. En una caja Petri con Medio Mínimo sólido con Treonina se plaquearon 1.175×10^9 esporas contenidas en un volumen de 300 μL , se dejaron incubar a temperatura ambiente (22°C-23°C) durante 2 días. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron directamente a la caja 1.5 mL de agua estéril + Tween al 0.01%. Se colocó la caja en un agitador de balance (speci mix ThermoLyne) y se dejó durante 30 minutos, cambiando la caja de posición cada 5 minutos. Transcurrido el tiempo se recolectó el sobrenadante en un tubo eppendorf de 2 mL y se centrifugo durante 2 minutos a 13000 rpm. Transcurrido el tiempo, se decantó el sobrenadante y en la parte inferior del tubo se formó un pellet el cual se lavó 3 veces con agua destilada estéril. Finalizado esto, se resuspendió en 250 μL de agua estéril. Para cuantificar la concentración de esporas, se preparó una dilución del stock de esporas obtenido anteriormente. En tubos de 1.5 mL se añadió 990 μL de H_2O y 10 μL del stock de esporas. Se realizó el procedimiento mencionado anteriormente para el conteo de esporas. Se tomaron fotos en el microscopio de epifluorescencia para comparar tamaños de las esporas y determinar si se trataba de una espora nueva o de la espora parental, concluido esto, se tomó todo el sobrenadante (200 μL) y se plaqueó en cajas con Medio Mínimo sólido con glucosa. Se delimitó un campo en el cuál estaban presentes varias esporas y se incubaron a 37°C durante 6 horas.

Caracterización del proceso de conidiación por videomicroscopía

Para realizar esta metodología se inocularon 4.1×10^7 esporas contenidas en un volumen de 200 μL en toda la caja Fluoro Dish-FD35-100. Posteriormente se añadió 5.5 mL de medio mínimo sólido con Treonina. Se dejó solidificar aproximadamente 5 minutos. El equipo tomó fotos cada 10 minutos durante 30 horas a una temperatura de 20°C . La lámpara del equipo solo se encendió cuando se iba a tomar una foto. El equipo empleado fue un microscopio invertido Leica EL600, con una lámpara de metal-haluro mercurio, se empleó un filtro N3 (excitation band pass (BP) 546/12 nm, dichromatic mirror 505 nm and emission filter BP 520/30nm). Las imágenes tomadas se adquirieron con una cámara digital CCD (DFC320; Leica Microsystems) y se procesaron utilizando el programa Leica LAS 5.0.

Tinciones de cepas diploides

Tinción con Mito Tracker® Red

Se preparó una dilución de Mito Tracker Red® CMXRos (ThermoFisher Scientific) cat: M7512 (ANEXO 1). En una caja Petri con Medio Mínimo sólido más treonina se inocularon 2×10^4 esporas contenidas en un volumen de 20 μL las cuales se depositaron en áreas pre definidas en el medio. Se dejaron incubar 17-18 horas a temperatura ambiente. Se cortó un pedazo de agar, se añadió 200 μL de la solución de Mito Tracker® Red y se dejó reposar 5 minutos. Transcurrido el tiempo se lavó con abundante agua aproximadamente 5 mL y se hicieron las observaciones usando un filtro C-FL G-2E/C TRITC. Ref. NIKO-96312. Código de producto (Interprise): 56254.

Tinción con DAPI

En una caja Petri con Medio Mínimo sólido más treonina se inocularon 2×10^4 esporas contenidas en un volumen de 20 μL las cuales se depositaron en áreas pre definidas en el medio. Se dejaron incubar 17-18 horas a temperatura ambiente. Se cortó un pedazo de agar, se añadió acetona-metanol hasta cubrir y se dejó reposar durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se enjuagó con suficiente agua y se añadió 200 μL de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI-SIGMA) cat: D9542 SIGMA, se dejó reposar 10 minutos en oscuridad y se enjuagó con abundante agua aproximadamente 5 mL y se hicieron las observaciones usando un filtro UV, C-FL UV-2E/C DAPI. Ref. NIKO-96310. Código de producto (Interprise): 56252.

Tinción con Calcofluor

Se preparó una solución de blanco de calcofluor 1mM (Fluorescent Brightener 28 Sigma) cat: F3543-5G (ANEXO1). En una caja Petri con Medio Mínimo sólido más treonina se inocularon 2×10^4 esporas contenidas en un volumen de 20 μL las cuales se depositaron en áreas pre definidas en el medio. Se dejaron incubar 17-18 horas a temperatura ambiente. Se cortó un pedazo de agar y se añadió esta solución. Se dejó reposar durante 10 minutos protegiéndolo de la luz, transcurrido el tiempo se enjuagó con suficiente agua aproximadamente 5mL y se hicieron las observaciones usando C-FL G-2E/C TRITC. Ref. NIKO-96312. Código de producto (Interprise): 56254.

Microscopía

Se empleó un microscopio NIKON Eclipse E600 y una cámara Neo Andor Scmos con sistema de enfriamiento. Las imágenes obtenidas se procesaron empleando el programa ImageJ. Para la caracterización del proceso de conidiación por

videomicroscopía el equipo empleado fue un microscopio invertido Leica EL600, con una lámpara de metal-haluro mercurio. Las imágenes tomadas se adquirieron con una cámara digital CCD (DFC320; Leica Microsystems) y se procesaron utilizando el programa Leica LAS 5.0.

Conservación de las cepas diploides

Conservación en sílica gel

Se sembró la cepa a confluencia en Medio Mínimo con glucosa, se dejó incubar a 37°C durante 6 días. Transcurrido el tiempo, se añadieron 2 mL de agua directamente a la caja y se rasparon las esporas con ayuda de un asa de metal. Se tomó este volumen y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm. Transcurrido el tiempo se decantó el volumen de agua y se añadió 100 µL de leche estéril. Este volumen se transfirió a un tubo con sílica gel y con ayuda de un palillo estéril se integró.

Conservación en glicerol

Se sembró la cepa a confluencia en Medio Mínimo con glucosa, se dejó incubar a 37°C durante 6 días. Transcurrido el tiempo, con ayuda de un bisturí estéril se cortaron 3 pequeños trozos de agar, estos se transfirieron a un tubo eppendorf de 2 mL con 1 mL de Glicerol al 80% (ANEXO 1). Se aplicó vortex y se guardaron a una temperatura de -74°C.

RESULTADOS

Construcción de cepas diploides con la construcción *alcA(p)::brlA*

Como se indicó antes, la expresión del gen *alcA(p)::brlA* en conidias haploides resulta en una inhibición de la germinación y el crecimiento y se considera letal (Adams and Timberlake, 1990). Dado que las conidias tienen un volumen del doble que una conidia haploide, y que existe una relación entre el tamaño celular y la mitosis, decidimos explorar si la expresión del gen *alcA(p)::brlA* en conidias diploides podría resultar en un ciclo de microconidiación. Para ello, se generaron cepas diploides entre la cepa *TTA292-1 (alcA(p)::brlA)* y otras cepas disponibles en nuestro laboratorio, las cuales poseen los núcleos marcados con la proteína fluorescente mRFP, con el objeto de seguir la dinámica de la mitosis durante la expresión de *alcA(p)::brlA*. También se emplearon otras cepas que contienen diversas proteínas marcadas con GFP o mCherry, con el objeto de saber si es posible observar cambios en la localización de estas proteínas durante la expresión de *alcA(p)::brlA* en conidias diploides. Específicamente, se utilizaron cepas que contienen los factores transcripcionales NapA (Mendoza-Martínez et al., 2017), SrrA y las cinasas SakA y SrkA (Jaimes-Arroyo et al., 2015; Lara-Rojas et al., 2011) fusionados a la proteína fluorescente GFP. En la figura 1 se muestra un caso específico (*CAM21 X TTA292-1* ver genotipo completo en tabla de cepas), como ejemplo de la técnica usada para generar todas las cepas diploides que se obtuvieron en este trabajo. Esencialmente, dicha técnica inicia con el crecimiento contiguo de cepas que poseen diferentes marcadores genéticos, tales como el color de las esporas (la mutación del gen *yA* resulta en la producción de conidias amarillas en lugar de verdes) y sobre todo otras mutaciones que generan distintas auxotrofías complementarias, en las cepas a diploidizar (figura 1A). Dado que algunas de las hifas de ambas cepas se fusionan espontáneamente, se transfirieron pequeños fragmentos de micelio de ambas cepas a medio mínimo sin suplementos, condición en la que ninguna de las dos cepas progenitoras puede crecer (figura 1B). Con esto se forzó la producción y estabilización de micelio

heterocariótico, el cual se caracteriza por un crecimiento y apariencia irregular, debido a que el micelio contiene núcleos de ambas cepas (yA^+ y yA^-) y puede producir conidióforos verdes y amarillos, así como conidióforos con esporas verdes y amarillas, dependiendo del núcleo heredado por la conidia uninuclear (figura 1C). De manera espontánea algunos núcleos del heterocarión se fusionan, generando así unos cuantos núcleos diploides. Estos núcleos diploides se segregan en los conidióforos del heterocarión y se seleccionan colectando esporas del heterocarión, las cuales se inoculan nuevamente en MM si suplementos. Las conidias diploides germinan rápidamente y forman colonias con crecimiento y esporulación regulares y forman conidióforos solo con esporas verdes (figura 1C). Una vez seleccionada, una cepa diploide es estable y puede mantenerse como tal.

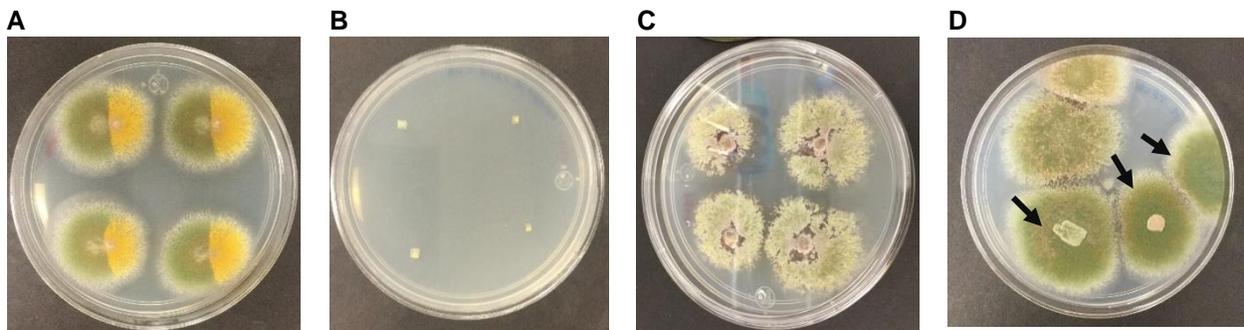


Figura 1. Generación de cepas diploides con la construcción *alcA(p)::briA*. **A.** Las cepas a diploidizar se inocularon una cerca de la otra en MM con suplementos para las auxotrofías de ambas cepas progenitoras (cepa yA^+ *alcA(p)::briA* (verde) y yA^- (cepas amarillas; mutación recesiva), y se incubaron durante 3 días a 37°C. **B.** Se transfirieron pequeños fragmentos de agar con micelio de ambas cepas a MM sin ningún suplemento. **C.** Después de 7 días a 37°C, se obtuvo micelio heterocariótico que crece de manera irregular y produce conidias uninucleadas. **D.** Las conidias de los heterocariotes se recolectaron, se reinoculadaron en MM y se crecieron durante 3 días a 37°C para seleccionar diploides formados espontáneamente en el micelio heterocariótico. A diferencia del micelio heterocariótico, el micelio diploide forma colonias que crecen y conidian de manera homogénea y solo producen conidias verdes (flechas negras).

Las esporas diploides con la construcción *alcA(p)::brlA* germinan normalmente en un medio con glucosa, en el que la expresión de la fusión *alcA(p)::brlA* esta reprimida

Para caracterizar la germinación de esporas diploides con la construcción *alcA(p)::brlA*, se utilizaron conidias de la cepa diploide *DSR 24* ($\Delta sakA::argB$ *srkA::GFP* *ph2A::h2A::mrfp-ptrA/ argB::alcA(p)::brlA* ver genotipo completo en la tabla de cepas), principalmente porque en este diploide los núcleos están marcados con la histona H2A etiquetada con la proteína roja fluorescente mRFP (*h2A::mrfp*) y se realizaron ensayos en medio sólido y líquido. Se inocularon 2×10^4 esporas en un volumen de 20 μ L y se incubaron durante 18 horas a temperatura ambiente (22°C). Pasado este tiempo, se cuantificaron las esporas con un tubo germinal (figura 2) y se calculó el porcentaje de germinación en medio sólido y líquido.

Se observó que, tanto en medio sólido como líquido, la tasa de germinación de esta cepa diploide es semejante a la observada en cepas silvestres haploides (aproximadamente un 85%). En experimentos subsecuentes se decidió utilizar medio sólido, debido a que en estas condiciones las conidias permanecen fijas en el substrato y es posible hacer observaciones prolongadas en una célula individual.

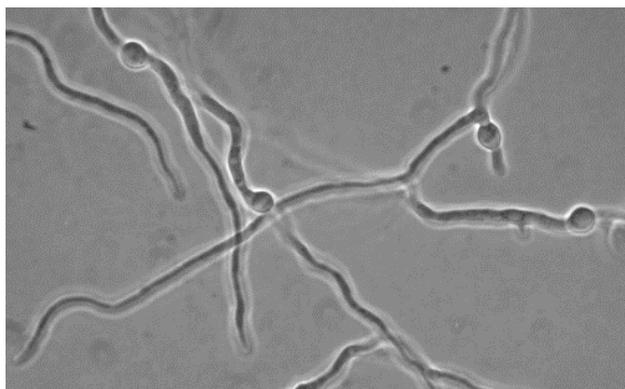
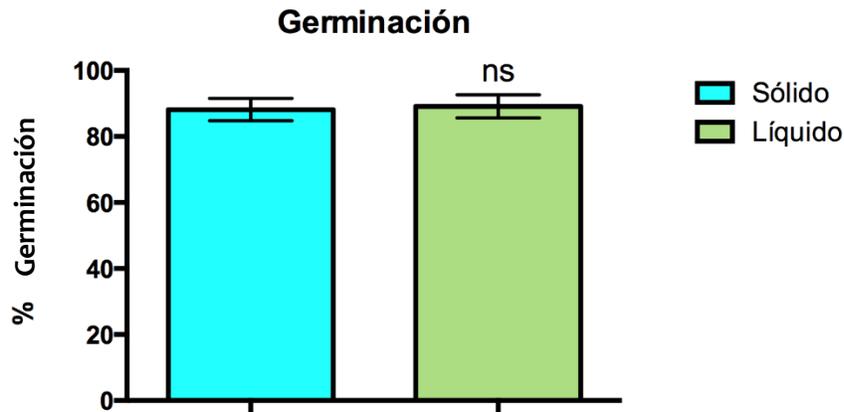


Figura 2. Germinación de conidias diploides con la construcción *alcA(p)::brlA* en condiciones de represión del promotor *alcA*. Cepa diploide *DSR 24* ($\Delta sakA::argB$ *srkA::GFP* *ph2A::h2A::mrfp-ptrA/ argB::alcA(p)::brlA* ver genotipo completo en la tabla

de cepas). Medio Mínimo sólido con glucosa a temperatura ambiente (22°C) durante 18 h. Observado en Contraste de Fases (C:F).

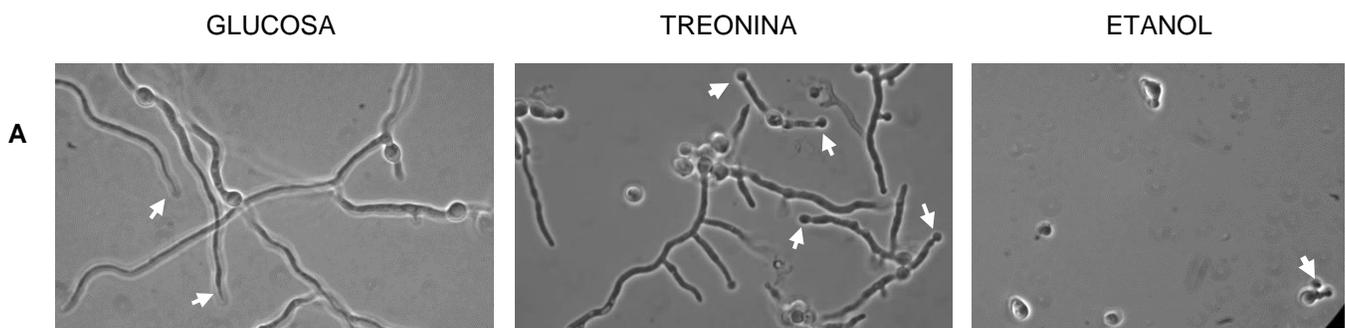


Gráfica 1. Comparación del porcentaje de germinación de conidias diploides con la construcción *alcA(p)::brlA* en medio sólido y líquido en condiciones de represión del promotor *alcA*. Cepa diploide **DSR 24 ($\Delta sakA::argB$ *srkA::GFP* *ph2A::h2A::mrfp-ptrA/argB::alcA(p)::brlA* ver genotipo completo en la tabla de cepas). Medio Mínimo sólido con glucosa a temperatura ambiente (22°C) durante 18 h. Observado en Contraste de Fases (C:F). Datos \pm SEM $t_4 = 0.2388$, $p = 0.823$, ns: no significativo.**

La inducción del promotor *alcA* en esporas diploides con la construcción *alcA::brlA* conduce a la conidiación

Datos preliminares del laboratorio mostraron que conidias diploides con la construcción *alcA(p)::brlA* inoculadas en medio mínimo sólido con treonina, como única fuente de carbono, parecían capaces de generar conidias a partir de las esporas originales. Por esta razón, decidimos corroborar estas observaciones y de ser posible, establecer las condiciones para la inducción de la conidiación unicelular de manera reproducible. Inicialmente inoculamos 2×10^4 esporas contenidas en un volumen de 20 μ L en MM sólido con glucosa, etanol o treonina, lo cual corresponde a condiciones de represión, inducción y superinducción de la fusión *alcA(p)::brlA*. Estas conidias se incubaron durante 17-18 horas a

temperatura ambiente (22°C). En la figura 3A se observa que cuando la célula diploide crece en un medio que contiene glucosa como fuente de carbono, ésta germina sin ningún problema, debido a que el promotor *alcA* se encuentra reprimido. Por el contrario, cuando inducimos al promotor *alcA* empleando etanol, observamos que en lugar de un tubo germinal normal, conidias forma uno o 2 protuberancias que finalmente en la punta forman una estructura parecida a una fiálide, la cual a su vez forma una estructura parecida a una conidia. Algunas otras conidias germinan y forman hifas ramificadas que finalmente pueden o no producir conidias en las puntas. Cuando se emplea treonina como fuente de carbono, la mayor parte de las conidias no germinan (la treonina es peor fuente de carbono que el etanol y además un inductor más fuerte de la fusión *alcA(p)::briA*) y parecen formar fiálides y conidias directamente desde la conidia original. Comparando nuestra cepa diploide con una cepa haploide con la construcción *alcA(p)::briA* (figura 3B) se observó que en glucosa las células haploides germinan, mientras que en etanol y treonina las esporas sólo se hincharon y no formaron ningún tubo germinal, ni fiálides o conidias. Estos resultados confirman las observaciones iniciales e indican que por razones aún desconocidas, una conidia diploide con una sola copia de la construcción *alcA(p)::briA* es capaz de conidiar directamente, mientras que en las mismas condiciones una cepa haploide con la misma construcción es incapaz de germinar o conidiar.



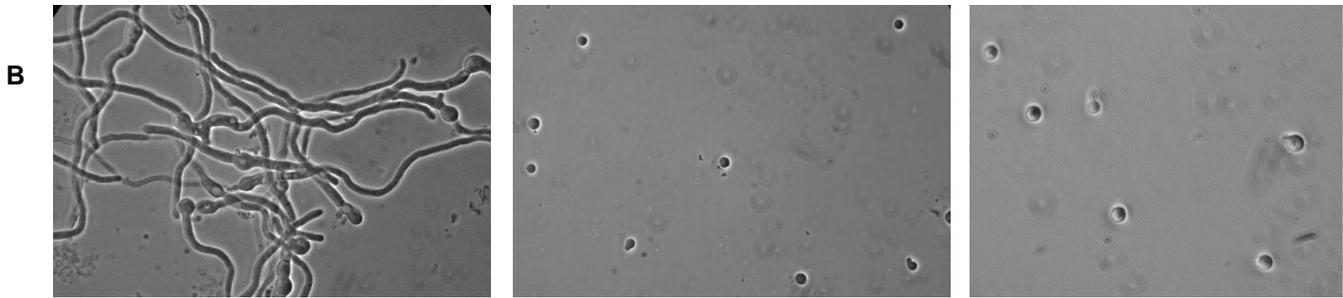


Figura 3. Represión e inducción del promotor *alcA* en conidias haploides y conidias diploides con la construcción *alcA(p)::briA*. A. Cepa diploide **DSR 24 ($\Delta sakA::argB$ *srkA::GFP* *ph2A::h2A::mrfp-ptrA/argB::alcA(p)::briA* ver genotipo completo en la tabla de cepas) B. Cepa haploide **TTA292-1** (*alcA(p)::briA* ver genotipo completo en la tabla de cepas). Medio Mínimo sólido con glucosa, treonina o etanol para la cepa diploide **DSR 24** y MM con glucosa, treonina o etanol y los suplementos metionina y biotina para la cepa haploide **TTA292-1**. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (22°C) durante 18 horas. Al cabo de este tiempo, las placas se observaron en un microscopio Nikon Eclipse E-600 con contraste de fases (C:F).**

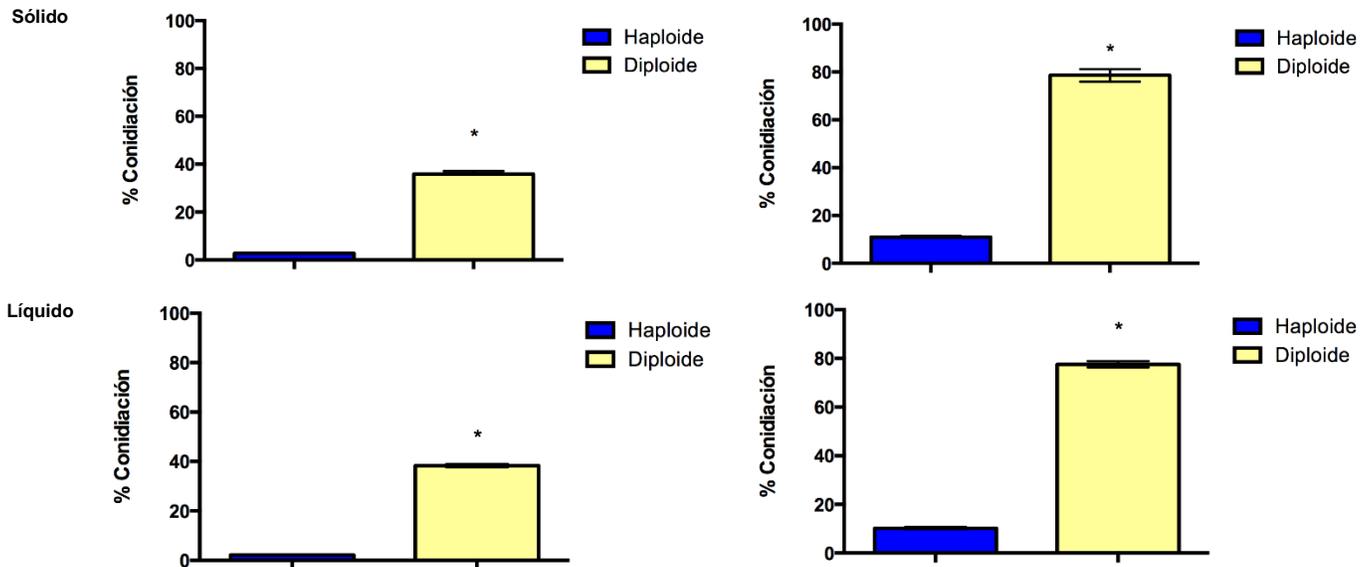
Con el objeto de cuantificar este fenómeno, se repitió el proceso utilizando conidias diploides y haploides en medio sólido y después de una incubación de 17-18 h se observaron 70 campos al azar y se contaron aproximadamente 300 esporas y se registró cuantas de estas presentaban estructuras esporulantes. Este experimento se realizó por triplicado para aumentar la confiabilidad.

Para las condiciones de medio líquido se inocularon 2×10^4 esporas haploides o diploides contenidas en un volumen de 20 μ L de la cepa haploide en 400 μ L de Medio líquido con las diferentes fuentes de carbono y se incubó sin agitación durante 18 h.

En la gráfica 2 se observa que el porcentaje de conidiación de la cepa control (haploide) la cual contiene la construcción *alcA(p)::briA* es virtualmente inexistente en comparación con la cepa diploide. También se observa que no hay diferencias entre el medio sólido y líquido y que la conidiación de la cepa diploide es el doble en treonina que etanol, llegando a representar el 80% de las conidias observadas.

Etanol

Treonina



Gráfica 2. Comparación del porcentaje de conidiación y eficiencia de ambos inductores del promotor *alcA* en conidias haploides y diploides con la construcción *alcA(p)::brlA*. Cepa haploide (control): *TTA292-1 (alcA(p)::brlA* ver genotipo completo en la tabla de cepas) Cepa diploide: *DSR 24 ($\Delta sakA::argB srkA::GFP ph2A::h2A::mrfp-ptrA/ argB::alcA(p)::brlA$* ver genotipo completo en la tabla de cepas) en MM sólido o líquido empleando diferentes fuentes de carbono como la Treonina o el Etanol. Temperatura ambiente (22°C) / 18 horas. Los datos mostrados se encuentran en % de conidiación \pm SEM, * $p < 0.0001$. $t(3,1)=1.33$

Aunque los sistemas probados anteriormente permiten la observación detallada del proceso de conidiación, no es posible obtener suficiente biomasa de las estructuras esporulantes para el análisis bioquímico o el análisis de la expresión genética. Por ello, decidimos explorar si el sistema de esporulación unicelular también ocurre en volúmenes grandes, utilizando matraces en agitación. Para ello, se realizaron cultivos en medio líquido en matraces Erlenmeyer, manteniendo una relación medio/volumen del matraz de 1:5. Se inoculó el medio a una concentración final de 1×10^6 esporas/mL y se incubó durante 24 horas. En glucosa, la cepa haploide *TTA292-1 (alcA(p)::brlA* ver genotipo completo en la tabla de cepas) creció formando los “pellets” que son característicos en *A. nidulans*. Por el contrario, prácticamente no se observó ningún crecimiento cuando la cepa se creció en etanol o treonina. En el caso del modelo diploide, se observó el mismo fenómeno (Figura suplementaria 1).

A nivel microscópico la cepa haploide *TTA292-1 (alcA(p)::brlA*, ver genotipo completo en la tabla de cepas) en treonina mostró esporas hinchadas que no germinaron, de manera semejante a lo observado antes en medio sólido. La cepa

diploide *DSR7* ($\Delta sakA::argB$ *srkA::GFP* *ph2A::h2A::mrfp-ptrA/ argB::alcA(p)::brlA* ver genotipo completo en la tabla de cepas) mostró el mismo proceso de conidiación unicelular, también observado antes en medio sólido. Sin embargo, el proceso ocurrió en un mayor tiempo, ya que después de 24 horas solo algunas células diploides presentaban nuevas conidias. Dado que la cepa diploide utilizada en estos experimentos contiene una copia del gen *srrA* (el cual codifica para un factor transcripcional que responde al estrés oxidativo; (Vargas-Pérez et al., 2007) fusionado a *GFP*, observamos la localización de dicho factor transcripcional, encontrando que en células haploides y diploides, *SrrA* se detectó localizado en el núcleo, según lo reportado en hifas en crecimiento (figura 4). Estos resultados sugieren que la reproducción unicelular en diploides es menos eficiente en cultivos líquidos con agitación que en medio sólido.

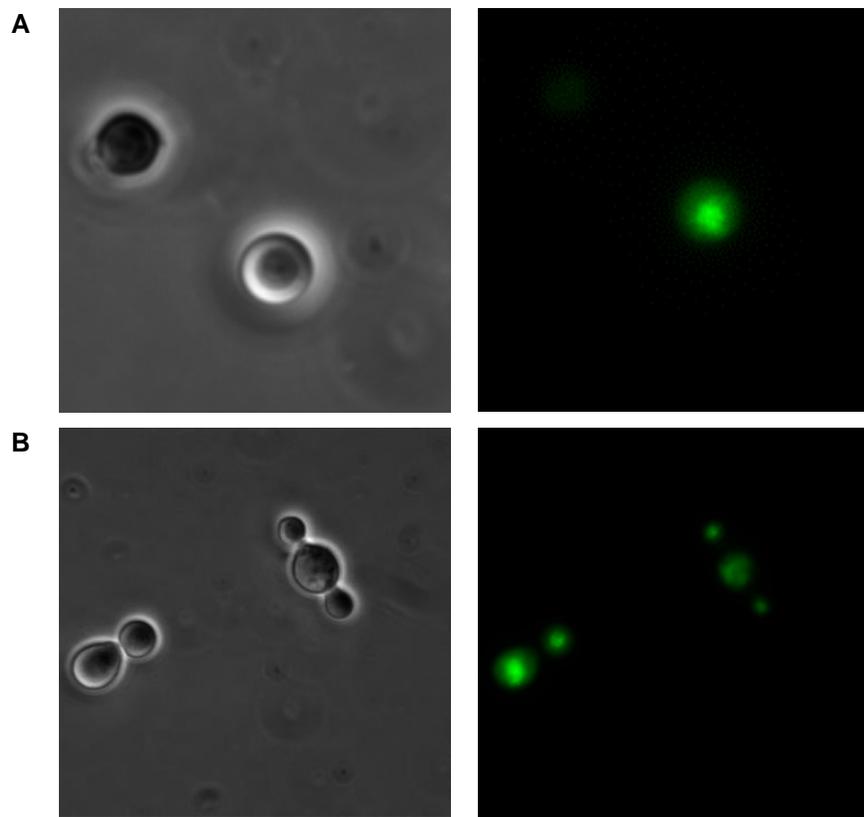
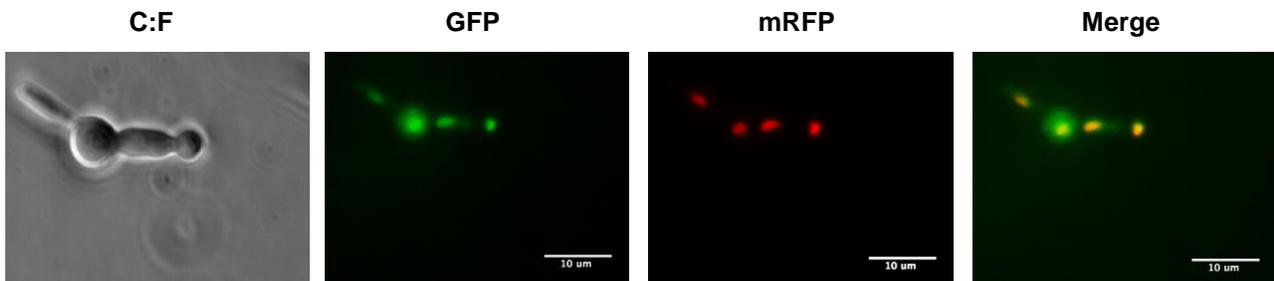


Figura 4. Esporulaci3n unicelular en crecimiento l3quido en matraz. **A.** Cepa haploide **CAM 21** (*srrA::GFP* ver genotipo completo en tabla de cepas), MM l3quido con Treonina m3s el suplemento paba. **B.** Cepa diploide **DSR7** (*srrA::GFP/alcA(p)::brlA* ver genotipo completo en tabla de cepas), MM l3quido con treonina. Matraz (25 mL)/ 24 h/300 rpm/ 37°C. Observado en contraste de

fases o epifluorescencia para GFP.

Dado el resultado anterior, decidimos probar a inducir la conidiación en un volumen reducido de medio líquido, directamente sobre un cubreobjetos. Esto permitiría una alta aeración, la observación microscópica y la posibilidad de reemplazar el medio o de añadir diversos compuestos a las conidias diploides, durante la esporulación. Con este fin, se inocularon 2×10^4 esporas contenidas en un volumen de 20 μL en un 400 μL de medio líquido con treonina, depositado previamente en un cubreobjetos estéril, el cual se incubó a temperatura ambiente durante 17-18 horas, dentro de una caja Petri sin agitación. Como se muestra en la figura 5, en estas condiciones se logró observar una conidiación semejante a la que ocurre en medio sólido. El diploide utilizado en este experimento contenía los núcleos marcados con mRFP y una copia del gen *srkA*, el cual codifica para una cinasa tipo CMK que se transporta al núcleo en condiciones de estrés oxidativo y se encuentra parcialmente localizada en el núcleo en conidias intactas (Jaimes-Arroyo et al., 2015), fusionado a GFP. En la figura 5 se muestra que la señal de esta cinasa se localiza principalmente en el núcleo de la fiálide y de la conidia naciente y menos en el núcleo de la conidia diploide original. Este es un resultado interesante, que sugiere que al igual que durante la conidiación normal, el proceso de conidiación en diploides inducida por la sobreexpresión del gen *brlA* ocurre en condiciones de estrés.



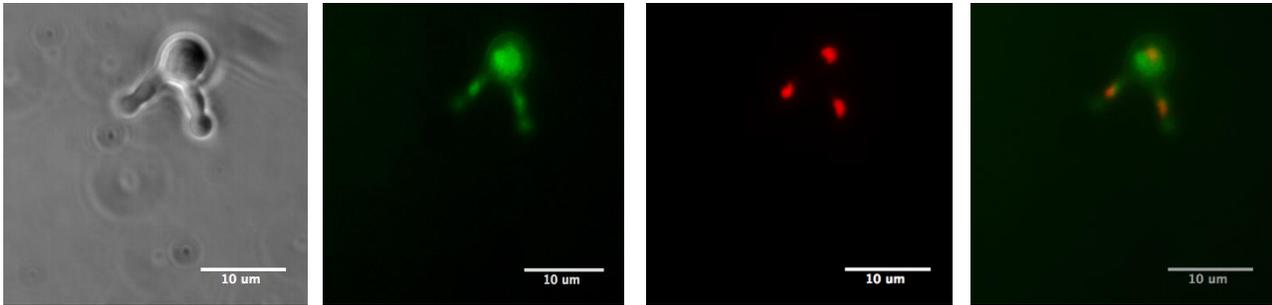


Figura 5. Inducción del promotor *alcA* en conidias diploides, empleando 400 µL de medio mínimo líquido con treonina depositado en un cubreobjetos. Cepas diploide *DSR 24* ($\Delta sakA::argB$ *srkA::GFP* *ph2A::h2A::mrfp-ptrA* / *argB::alcA(p)::brlA* ver genotipo completo en la tabla de cepas). Se incubó a temperatura ambiente por 18 horas. Observado con Contraste de Fases (C:F) y epifluorescencia para GFP y mRFP.

El gen *abaA* es esencial para la conidiación de las conidias diploides

Establecida la morfología y cuantificación de estructuras conidiantes que se producen al sobreexpresar el gen *brlA* en esporas diploides, decidimos probar que al igual que lo que ocurre en un conidióforo normal, la conidiación unicelular observada también depende del gen *abaA* o *abacus*. Para ello empleamos una cepa haploide *AJC 6.39*, la cual contiene el alelo *nulo abaA1* y forma conidióforos aberrantes incapaces de formar conidias (Figura suplementaria 2), así como la cepa haploide *TTA021*, la cual contiene la fusión *alcA(p)::brlA* y el alelo sensible a temperatura *abaA14*. Esta cepa forma conidióforos normales a 25 C y conidióforos abacoides y carentes de conidias a una temperatura restrictiva de 38°C (figura 6).

Temperatura ambiente

38°C

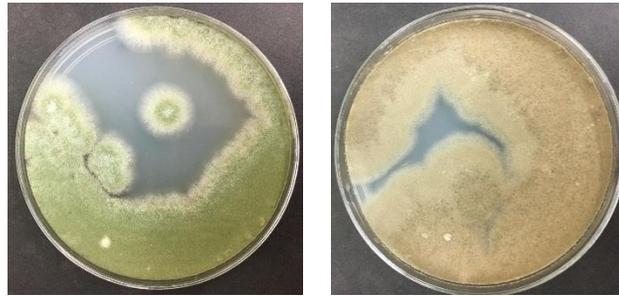


Figura 6. La cepa haploide *TTA021* (*alcA(p)::brlA*, *abaA14*) presenta fenotipo silvestre a temperatura ambiente (22 C) y fenotipo abacoide a la temperatura restrictiva (38 C). La cepa *TTA021* (*biA1*, *pabaA1*, *alcA(p)::brlA*, *abaA14*, *veA1*) se incubó a las temperaturas indicadas durante 3 días.

Utilizando las auxotrofías complementarias de ambas cepas (ver tabla de cepas para los genotipos completos), se generó y mantuvo una cepa diploide a la temperatura permisiva, la cual se comprobó que mostraba un fenotipo abacoide a 38°C. Posteriormente esta cepa, denominada *DSR 31* se utilizó para inducir la conidiación unicelular con treonina, como se muestra en la figura 7. Se observó que en la mayoría de los casos el diploide *DSR 31* es incapaz de formar estructuras conidiantes a 38° C, aunque las conidias si producen las protuberancias iniciales. En algunos casos dichas protuberancias forman varios compartimentos celulares, delimitados por septos (ver tinción con calcofluor en la figura 7) y al final lo que parece ser una conidia, que podría deberse a la actividad residual del alelo *abaA14*. En general, estos resultados muestran que la conidiación unicelular en diploides requiere de un gen *abaA* funcional.

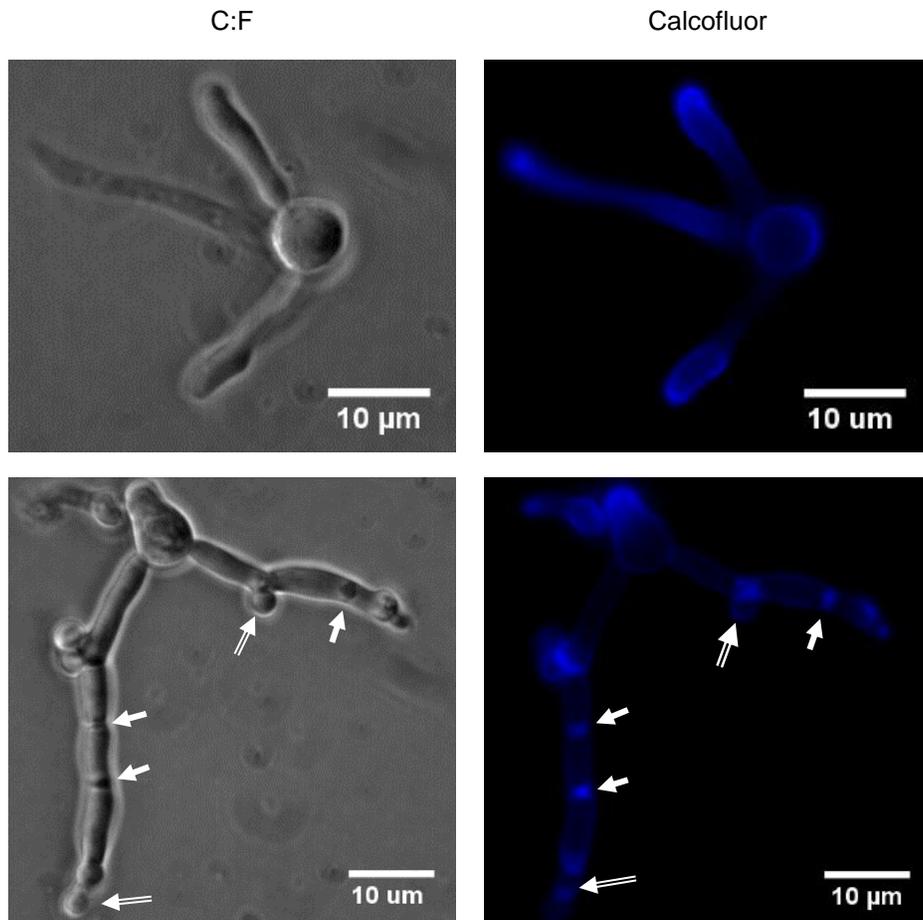


Figura 7. La inactivación parcial del gen *abaA1* causa morfología aberrante y una conidiación unicelular muy reducida. Esporas de la cepa diploide **DSR 31** (*biA1*, *pabaA1*, *alcA(p)::brlA*, *abaA14*, *veA/ ornB7*, *fwA1*, *ve+*, *abaA1*, *veA1*) se inocularon en MM sólido con treonina y se incubaron a 38°C durante 17 horas. Se tiñeron con calcofluor y se observaron en C:F (contraste de fases) y epifluorescencia. Las flechas sencillas indican la presencia de septos y la doble flecha muestra dos posibles conidias.

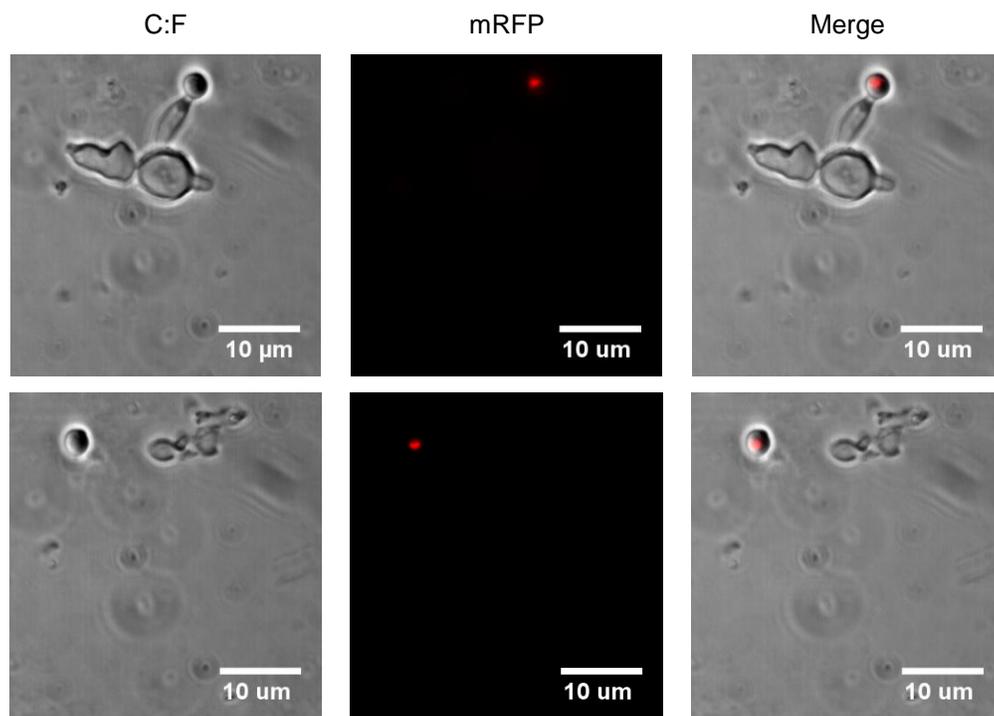
Las nuevas conidias generadas a partir de una espora diploide con la construcción *alcA(p)::brlA* son viables

Las conidias producidas en el sistema de conidiación unicelular desarrollado en este trabajo tienen la apariencia de una conidia normal, están delimitadas por un septo, contienen un núcleo y su producción depende del gen específico de la conidiación *abaA*. Sin embargo, ignorábamos si dichas conidias eran viables y capaces de germinar. Para explorar la viabilidad de las nuevas conidias se

emplearon dos metodologías para tratar de separar las conidias recién formadas de la conidia madre original (ver materiales y métodos). Esencialmente se colectaron los diploides esporulados en medio sólido mediante las dos metodologías propuestas. Los resultados que se obtienen al emplear ambas metodologías son similares, la ventaja que presenta la metodología 2 es que al emplear Tween al 0.01% solo se recolectan esporas.

En la Figura 8 se muestran las estructuras conidiantes después del tratamiento con perlas de vidrio de 0.75 mm. Mientras que las nuevas conidias parecen intactas y contiene un núcleo, las conidias madre son destruidas por el tratamiento con las perlas de vidrio.

Las conidias colectadas con ambas metodologías se reinocularon en MM sólido con glucosa y se incubó durante 5 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se observó que las esporas inoculadas fueron capaces de formar tubos germinales y de reiniciar el crecimiento (figura 8B) por lo que podemos concluir que al menos parte de las conidias nuevas generadas en nuestro sistema de esporulación unicelular son viables.



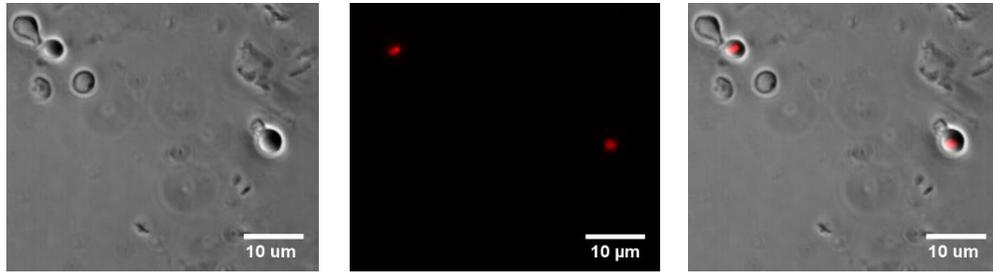


Figura 8. Separación de las conidias nuevas formadas en el sistema de esporulación unicelular, mediante el tratamiento con perlas de vidrio de 0.75mm. Cepa diploide **DSR 24** ($\Delta sakA::argB$ $srkA::GFP$ $ph2A::h2A::mrfp-ptrA/argB::alcA(p)::briA$ ver genotipo completo en la tabla de cepas). Observado para C:F (Contraste de fases) mRFP y merge.

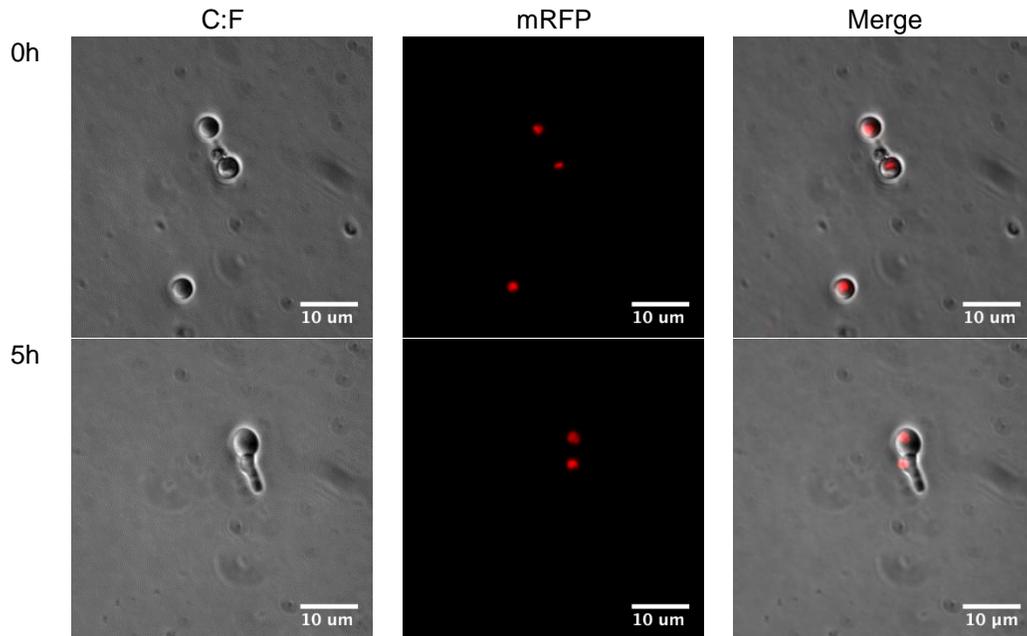


Figura 8B. Germinación de las conidias nuevas formadas en el sistema de esporulación unicelular. Cepa diploide: **DSR 24** ($\Delta sakA::argB$ $srkA::GFP$ $ph2A::h2A::mrfp-ptrA/argB::alcA(p)::briA$ ver genotipo completo en la tabla de cepas). MM con glucosa, observado a los tiempos indicados. Observado para C:F (Contraste de fases) mRFP y merge.

Concluido esto, el método que resultó mejor fue al emplear Tween al 0.01 %, ya que se recolectan solamente esporas parentales e hijas, sin embargo, se podrían combinar ambos métodos para obtener mejores resultados, ya que al emplear el Tween al 0.01% no podemos discriminar si se trata de una espora madre o de una nueva, solo con el tamaño lo que resulta un poco complicado. También se podrían utilizar enzimas líticas esto con el fin de conservar solamente las conidias nuevas.

Dinámica de la conidiación unicelular y la división nuclear durante el proceso

Para caracterizar el proceso de conidiación y la dinámica nuclear, se indujo la conidiación en medio sólido con treonina y se siguió el proceso durante 30 h, registrando el proceso un microscopio invertido Leica EL600 cada 10 min. Es importante hacer notar que en este experimento la temperatura de conidiación no estaba controlada y podría haber variado entre 15-22°C y por otro lado, la muestra estuvo expuesta a la lámpara del confocal durante la 30 h del experimento.

Los resultados están incluidos en un video con una duración de 43 segundos, del cual se obtuvieron los datos para la figura 9, en donde se indican los tiempos en los que las distintas conidias madre incluidas en el campo incrementaron su tamaño y formaron las distintas estructuras, los septos y las conidias y la manera en que estos procesos se correlacionan con la división nuclear.

Lo primero que es evidente es la asincronía del proceso, ya que distintas conidias esporulan a distintos tiempos en un intervalo que va de las 9 a las 23 horas (tabla 1), en el campo observado (figura 9). La figura 9 muestra los cambios observados en la conidia 3, la cual desarrolló una protuberancia inicial a las 13 h con 10 min. Antes de este tiempo, los únicos cambios morfológicos observables consistieron en incremento en el tamaño (volumen) de la conidia diploide original y de su núcleo, sin que se observara aún la división nuclear. El crecimiento del diámetro de las esporas parentales incluidas en el campo de observación se muestra en la tabla suplementaria 2 y figura suplementaria 3. Una hora más tarde (14 h 20 min)

se observó un ligero crecimiento de la protuberancia inicial y la presencia de dos núcleos y tan solo 10 min más tarde se detectó la migración de uno de los 2 núcleos a la protuberancia inicial. Cerca de 1 h más tarde (15 h 20 min) se detectó el crecimiento de una segunda protuberancia y a las 17 h la presencia de 2 núcleos pequeños en la conidia madre, uno de los cuales migró a esta segunda protuberancia 10 min más tarde. A las 18 h con 50 min se observó un alargamiento en el núcleo de la primera protuberancia y 1 h más tarde la presencia de 2 núcleos en este compartimento. A las 21 h con 30 min el núcleo de la conidia madre se ha dividido y se ha formado un septo en la primera protuberancia, el cual genera dos compartimentos, cada uno con un núcleo. A las 21 h con 50 min, el compartimento distal inicia la formación de una conidia todavía uninucleada y casi 2 h más tarde la conidia presenta ya un núcleo. Seis horas más tarde la segunda protuberancia ha iniciado directamente la formación de una conidia que aún carece de núcleo. Es importante notar que esta conidia madre en particular formó 2 estructuras conidiantes; la primera formó un tipo celular, que podría corresponder a una métula, antes de formar la célula conidiogénica o fiálide, mientras que la segunda estructura correspondería directamente a una fiálide que no completó el proceso de conidiación en el tiempo registrado. La formación de 2 estructuras conidiantes a partir de una conidia madre es un proceso relativamente frecuente y en la figura 9 se puede observar que es el caso de las conidias 3, 5 y 6.

En este experimento se cuantificó el número de esporas iniciales que después de 30 h mostraban una o más estructuras conidiantes, a partir de una muestra de 10 conidias y se encontró que 70 % de las conidias madres conidieron.

En resumen, en este experimento se observó lo siguiente:

- a) El proceso de conidiación unicelular es asincrónico, ocurriendo a distintos tiempos en distintas conidias madre.
- b) El crecimiento de la conidia original ocupa el mayor tiempo del proceso, requiriendo de al menos 9 h.

c) El crecimiento polar y la formación de compartimentos celulares (posibles métulas, proto fiálides y conidias) precede a la migración del núcleo a estas estructuras y esta migración nuclear es un proceso rápido (10 min aprox.).

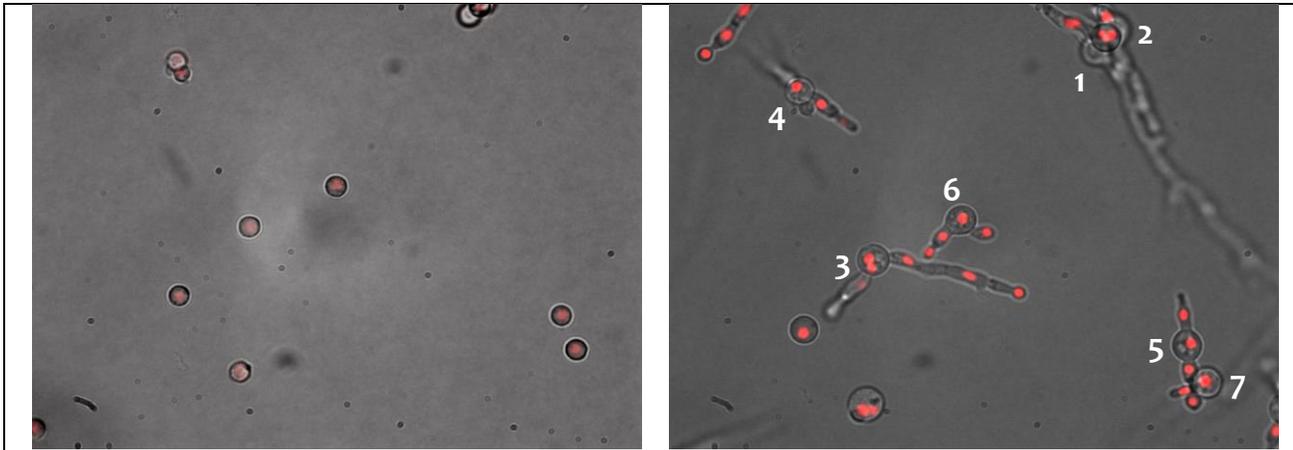


Figura 9. La conidiación unicelular ocurre a distintos tiempos en distintas conidias madre. La figura muestra el tiempo cero, es decir, al momento de inocular las conidias diploides y el tiempo final del experimento (30 h). Cepa diploide **DSR 24** ($\Delta sakA::argB$ $srkA::GFP$ $ph2A::h2A::mrfp-ptrA/argB::alcA(p)::brlA$ ver genotipo completo en la tabla de cepas) en MM sólido con treonina como fuente de carbono. Temperatura aproximada de 20°C.

Espora	Tiempo de inicio de la conidiación
1	9h, 40 min
2	12h, 40 min
3	13h, 10 min
4	14h
5	14h, 40 min
6	18h
7	23h, 10 min

Tabla 1. Tiempo en el que se observó la formación de la primera protuberancia en las conidias indicadas en la figura 9. Cepa diploide **DSR 24** ($\Delta sakA::argB$ $srkA::GFP$ $ph2A::h2A::mrfp-ptrA/argB::alcA(p)::brlA$ ver genotipo completo en la tabla de cepas).

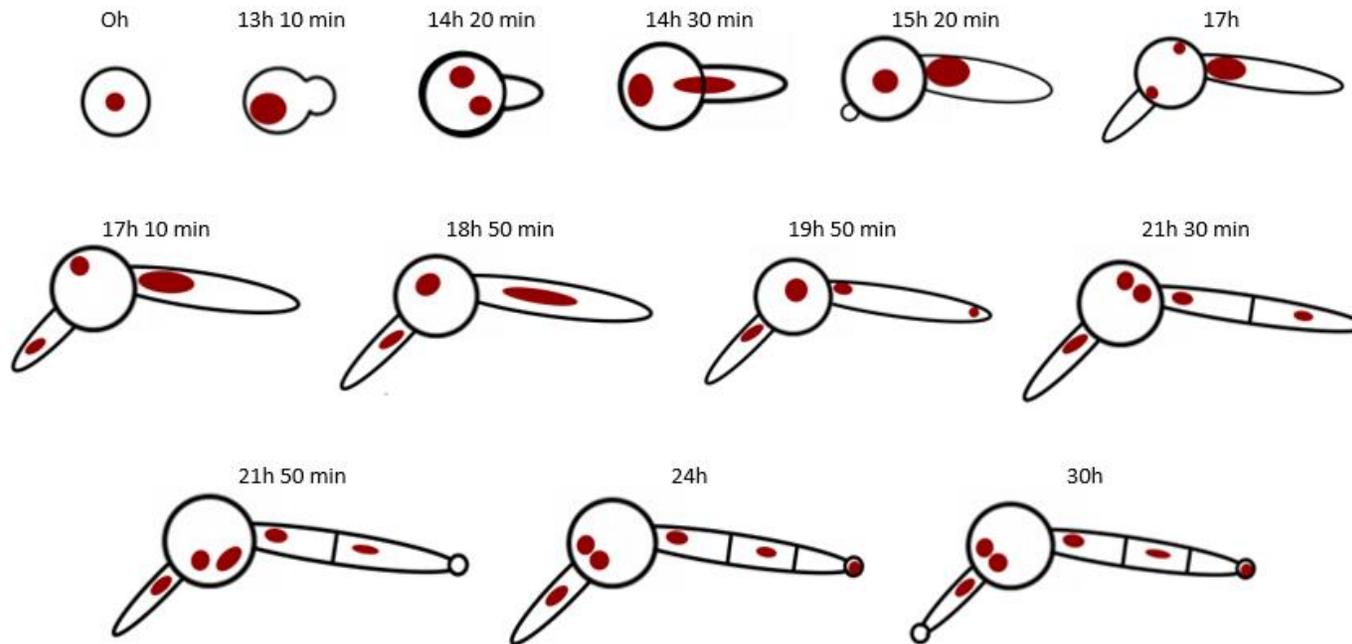


Figura 9B. Representación esquemática de la dinámica de la morfología y división nuclear durante la esporulación unicelular de la cepa diploide *DSR 24* ($\Delta sakA::argB$ *srkA::GFP* *ph2A::h2A::mrp-ptrA* / *argB::alcA(p)::briA* ver genotipo completo en la tabla de cepas) en MM sólido con treonina como única fuente de carbono. Temperatura aproximada 20°C, tiempo total de incubación 30 horas.

Localización de distintas proteínas durante la conidiación unicelular.

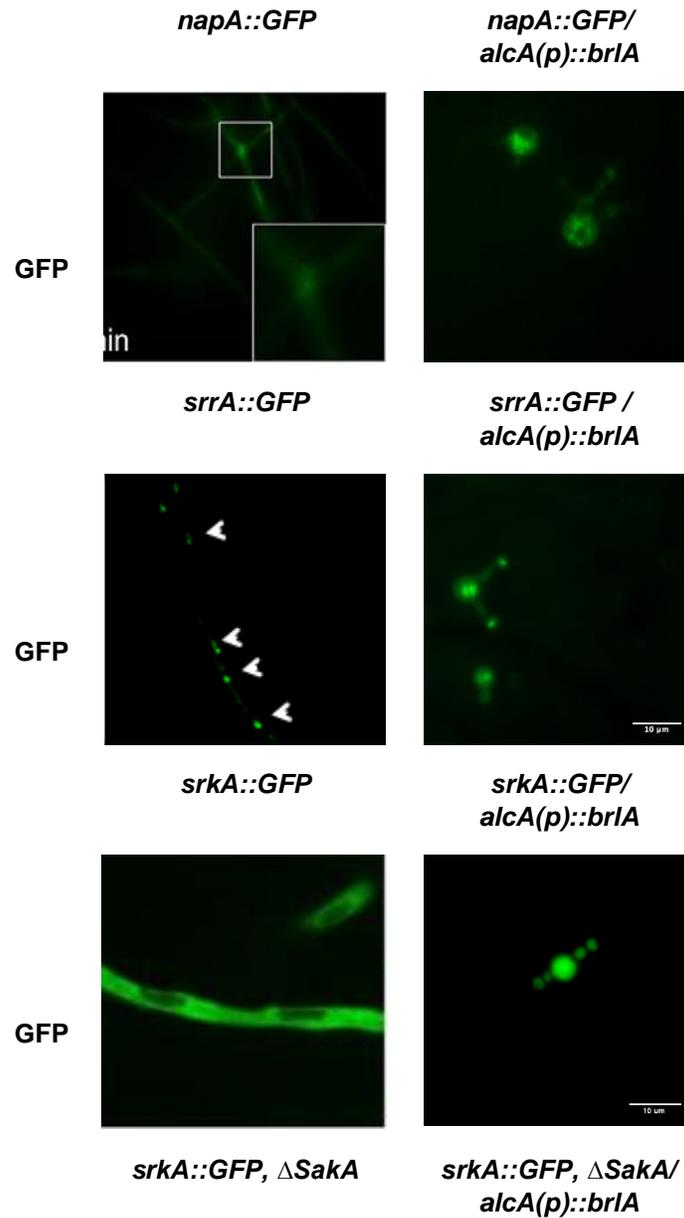
La principal razón para desarrollar el sistema de esporulación unicelular está relacionada con la posibilidad de estudiar la biología celular de todo el proceso mediante microscopía confocal, en una sola célula que se encuentra fija en un substrato sólido. Como prueba de este concepto, decidimos seguir la localización subcelular de varias proteínas que se estudian en nuestro laboratorio, como parte de otros proyectos. Para ello, generamos diploides entre la cepa con la fusión *alcA(p)::briA* y cepas que contienen los factores transcripcionales NapA y SrrA fusionados a GFP, así como una cepa con la cinasa SrkA fusionada a GFP.

Los resultados en la figura 10 muestran que tal como se ha reportado anteriormente (Mendoza-martínez et al., 2017), en micelio de una cepa haploide el factor transcripcional NapA se localiza en el citoplasma en ausencia de estrés. Al final del proceso de conidiación unicelular NapA parece enriquecida en algunas regiones, pero no muestra la localización discreta que correspondería a los núcleos. Por el contrario, en estas condiciones la proteína SrrA se observó principalmente en el núcleo tanto en el micelio haploide, como durante la conidiación unicelular. Esto concuerda con lo reportado anteriormente (Mendoza-martínez et al., 2017).

Para observar la cinasa SrkA se emplearon dos cepas diferentes: una cepa que contenía la cinasa SrkA fusionada a GFP y otra con esta misma construcción, pero en un fondo $\Delta sakA$ (carente de la MAPK SakA). SakA regula a SrkA y se requiere para la acumulación nuclear de SrkA en respuesta al estrés oxidativo. En ausencia de SakA, SrkA no se acumula en el núcleo, sino en la mitocondria (Jaimes-Arroyo et al., 2015). En el modelo de esporulación unicelular y un fondo silvestre, SrkA::GFP se localizó en los núcleos, aún en ausencia de estrés.

Cuando se empleó la cepa diploide con la cinasa SrkA fusionada a GFP y carente de una sola copia del gen *sakA*, se observó que durante la conidiación unicelular SrkA mostró un patrón en puntos, en lugar del patrón nuclear. En las conidias, las mitocondrias se encuentran fisionadas, por lo que es posible que este patrón

corresponda a una localización mitocondrial de SrkA, lo cual indicaría que la concentración de SakA es limitante para determinar la localización subcelular de SrkA.



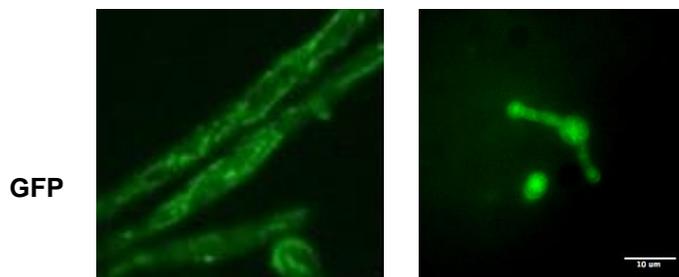
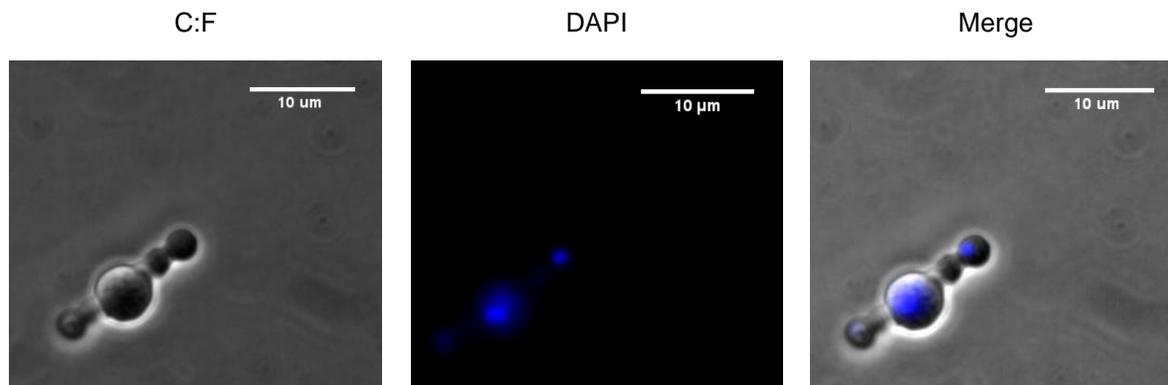


Figura 10. Comparación de la localización de diferentes factores transcripcionales o cinasas fusionadas a la proteína GFP en células haploides y en células diploides. (ver genotipo completo en la tabla de cepas)

La dinámica nuclear y mitocondrial durante la conidiación unicelular

Se etiquetaron o tiñeron las mitocondrias, el núcleo y la pared celular, con el fin de observar la morfología mitocondrial, la presencia de septos y el número de núcleos que se forman en los distintos compartimentos celulares.

El DAPI es un colorante nuclear fosforescente, este se excita con luz ultravioleta y se produce una fuerte fluorescencia azul cuando se encuentra unido al DNA en regiones de alto contenido de A=T. Al teñir esporas diploides con este colorante, se confirmó la presencia de núcleos tanto en la espora parental como en la nueva conidia y se demostró que es posible usar el DAPI en el proceso, cuando no se cuenta con cepas con núcleos marcados.



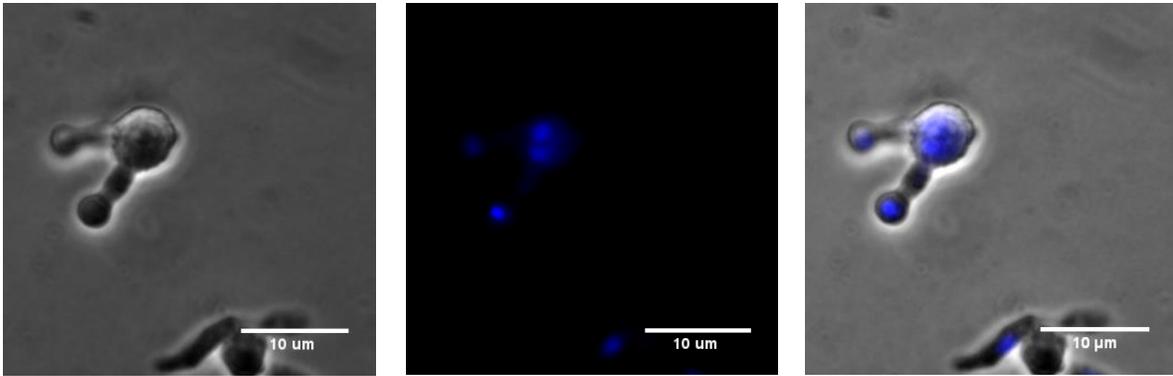


Figura 11. Las conidias generadas a partir de una espora madre con la construcción *alcA(p)::brlA* también poseen núcleo. Cepa diploide: *DSR 20* (*srkA::GFP* / *alcA (p)::brlA* ver genotipo completo en la tabla de cepas) MM sólido con Treonina/ Temperatura ambiente (22°C) / 18 horas. Observado en C:F Contraste de fases u observado para DAPI.

Para teñir la pared celular se empleó blanco de calcofluor, dicha sustancia tiene afinidad por la celulosa y la quitina, componentes presentes en la pared celular de los hongos y tiene la propiedad de emitir fluorescencia al ser activada por radiación ultravioleta.

Para detectar mitocondrias, se generó una cepa diploide entre la cepa *TTA292-1* (*alcA(p)::brlA*) y la cepa *Trv1* (*pgapdh(p)::atp9-7 (mts)::mCherry^c* ver genotipo completo en la tabla de cepas) la cual posee mitocondrias marcadas con la proteína fluorescente mCherry. El diploide con las mitocondrias marcadas se indujo a conidiar durante 18 horas y posteriormente se cortó un fragmento al cuál se le añadió calcofluor por 10 min (ver materiales y métodos). Posteriormente las células se observaron con microscopía de epifluorescencia. En la figura 11 se observa que las mitocondrias aparecen fisionadas en la conidia madre y en forma filamentosa en la fiálide y que parte de estos filamentos migran a la conidia recién formada. La tinción con calcofluor revela que la fiálide está claramente delimitada por un septo.

La detección de núcleos y tinción con calcofluor revela que las fiálides y conidia se encuentran delimitadas por un septo y que en algunos casos los núcleos de la conidia madre y de la fiálide sufren divisiones posteriores.

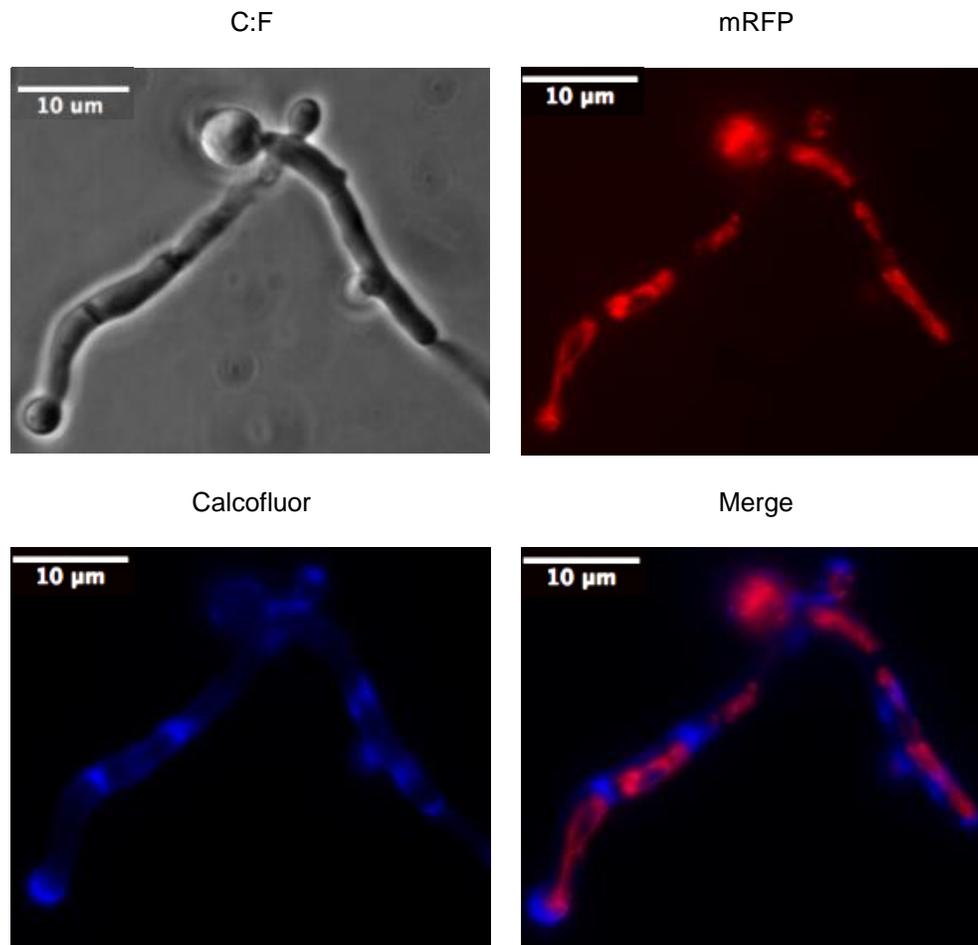


Figura 12. Visualización de mitocondrias y septos durante la conidiación unicelular. *DSR 26* (*Trv1/alcA(p)::briA 1.118* ver genotipo completo en la tabla de cepas), Temperatura ambiente (22°C)/ 18 horas. Calcofluor [1mM]. Observado en Contraste de Fases (C:F), mRFP, Calcofluor y Merge.

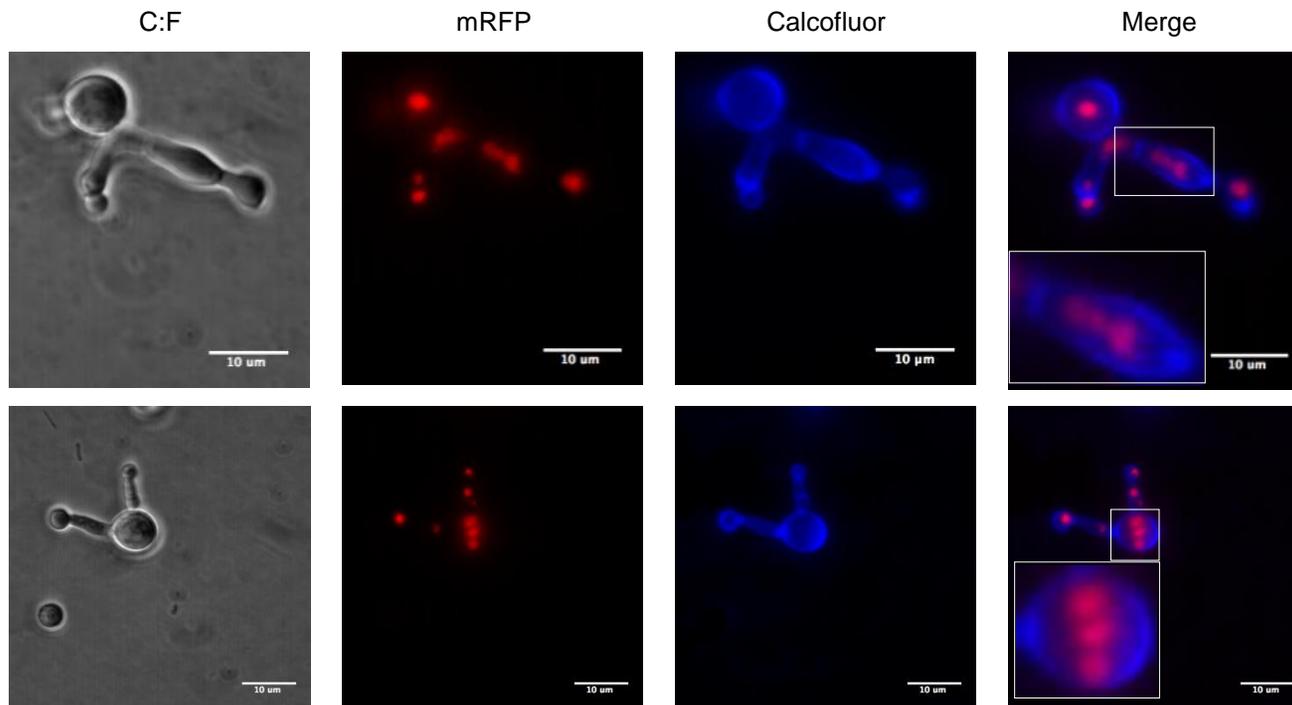


Figura 12 B. Visualización de núcleos y septos durante la conidiación unicelular. Ceba diploide *DSR 24* ($\Delta sakA::argB$ *srkA::GFP* *ph2A::h2A::mrfp-ptrA* / *argB::alcA(p)::briA* ver genotipo completo en la tabla de cepas) MM sólido con Treonina. Temperatura ambiente (22°C)/ 18 horas. Calcofluor [1mM]. Observado en Contraste de Fases (C:F), para Calcofluor, RFP y Merge.

También nos interesó saber si es posible teñir las mitocondrias con Mito Tracker Red® CMXRos, en el caso de no contar con cepas con mitocondrias etiquetadas y porque este colorante tiñe mitocondrias activas, ya que su acumulación depende del potencial de membrana. Al emplear una cepa haploide, se observó que la morfología de las mitocondrias es en forma de filamentos, estos organelos se encuentran a lo largo de toda la hifa, en pocas regiones de la hifa se observó que estas mitocondrias se aglomeraban, formando pequeñas pelotitas, pero la mayoría se encontraba en forma de filamentos.

Durante la conidiación unicelular, las mitocondrias se detectaron distribuidas en la célula en forma de filamentos delgados y en el caso de la conidia madre, en forma más fragmentada (figura 13).

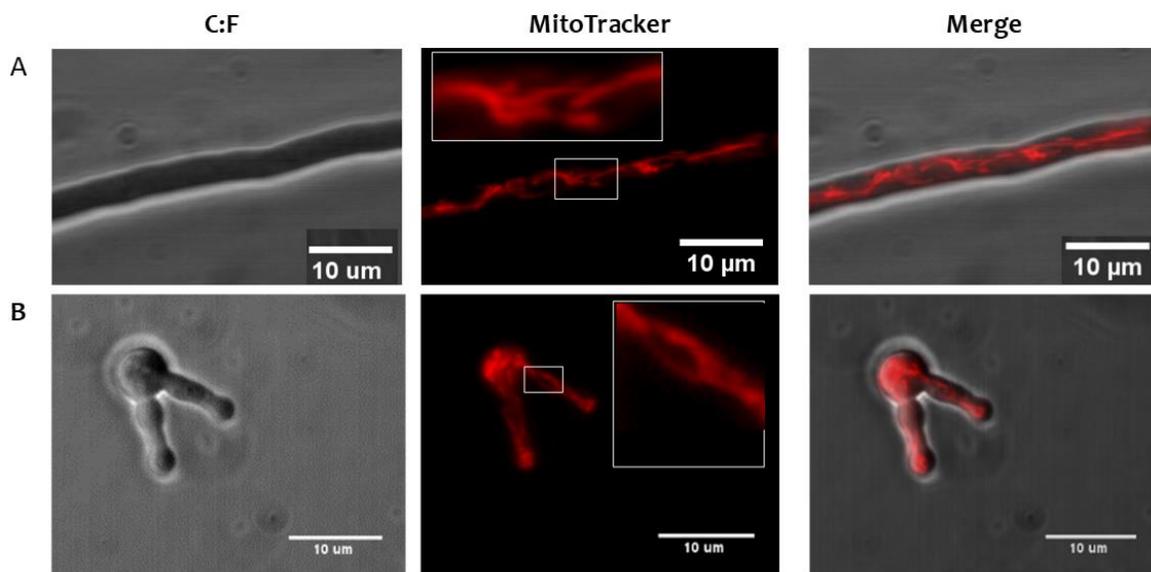


Figura 13. Morfología mitocondrial durante la conidiación unicelular detectada con Mitotracker red. A. Cepa haploide: **CAM 20** (*napA::GFP*), MM sólido más el suplemento Paba, 37°C/ 18 h. **B.** Cepa diploide: **DSR 1** (*napA::GFP / alcA (p)::briA* ver genotipo completo en la tabla de cepas) (*NapA::GFP x alcA(p)::briA 3.118*), MM sólido con Treonina. Temperatura ambiente/ 18h. Observado para C:F (Contraste de Fases), MitoTracker y Merge.

DISCUSIÓN

La inducción del promotor *alcA* en conidias induce la conidiación solo en células diploides

Desconocemos aún la razón por la que la expresión del gen *brlA* en conidias haploides resulta en un arresto de la germinación, mientras que el mismo fenómeno en conidias diploides conduce directamente a la esporulación, a partir de la conidia original. Una diferencia importante entre las conidias haploides y las diploides es que las últimas poseen un volumen 2 veces mayor que las conidias diploides (Clutterbuck, 1969). Se sabe también que en general, las células necesitan alcanzar un tamaño crítico, antes de poder dividirse (Miettinen et al., 2017). De hecho, es notable que el proceso de conidiación unicelular caracterizado en este trabajo requiere de un periodo largo de tiempo, durante el cual el único evento morfológico notable es un incremento en el tamaño de la conidia diploide original. Es posible que el mayor tamaño de las células diploides les permita responder a la expresión del gen *brlA* y llevar a cabo la división nuclear, necesaria para la conidiación. Otra diferencia importante entre haploides y diploides expresando el gen *brlA*, tiene que ver con la dosis génica. En la conidia haploide existe una copia de la fusión *alcA(p)::brlA* por genoma, mientras que en la conidia diploide hay también una copia de la fusión *alcA(p)::brlA* pero por dos genomas. Es posible que en el haploide se produzca un alto número de moléculas del factor transcripcional BrIA y que la rápida unión a sus genes blanco impida avanzar en el proceso, mientras que en el diploide BrIA se “diluya” entre el doble de genes blanco, produciendo una respuesta más gradual. Esta posibilidad parece poco probable porque en la conidia haploide una menor inducción de la fusión *alcA(p)::brlA* con etanol, tampoco resulta en la producción de conidias. De cualquier forma vale la pena analizar esta hipótesis generando conidias diploides con 2 copias de la fusión *alcA(p)::brlA* y determinar si la esporulación se ve inhibida o si por el contrario, ésta se ve estimulada.

Tampoco entendemos por qué a pesar de que todas las conidias diploides deben encontrarse detenidas en la fase G1 del ciclo celular, estas inician la conidiación a distintos tiempos, habiendo diferencias de hasta 13 h entre ellas. Aparentemente las esporas tienen una heterogeneidad original que no les permite responder al mismo tiempo a la inducción del gen *brlA*. Aunque estas esporas se colectan de conidióforos normales después de 6-8 días de esporulación, las conidias se producen por gemaciones sucesivas y en una cadena de esporas, la más cercana a la fiálide es más reciente que la que se encuentra al final de la cadena de esporas. Es posible que haya ligeras diferencias en el grado de madurez de la espora y que esto impacte la capacidad de responder a BrIA. También existe un porcentaje de esporas que no logra esporular después de mucho tiempo y otras que germinan y producen un tubo germinal que crece por un tiempo e incluso se ramifica antes de eventualmente formar algunas conidias.

La existencia de heterogeneidad celular se ha documentado en células sincronizadas en el ciclo celular y crecidas en las mismas condiciones, las cuales al ser sujetas a condiciones de estrés responden inmediatamente o con un retraso notable, una respuesta que parece azarosa y no heredable (Klosinska et al., 2011). También se ha reportado que es posible detectar ciclos metabólicos en ausencia de división celular (Slavov et al., 2018). Notablemente, se ha reportado que, en células de levadura en estado estacionario, la salida de la quiescencia depende de su volumen celular y edad cronológica. En particular, el efecto de la edad cronológica parece depender de la concentración de trehalosa intracelular (Laporte et al., 2018). Las conidias de *A. nidulans* acumulan trehalosa (Ni and Yu, 2007) y es posible que exista cierta heterogeneidad en la concentración de este azúcar en distintas conidias, de acuerdo a su edad.

Existe heterogeneidad a nivel de una misma célula, ya que en la conidiación unicelular una conidia puede producir una fiálide que directamente produce una espora y también una estructura con un tipo celular previo, reminiscente de una métula, antes de producir la célula conidiogénica. Creemos que el estudio de la conidiación unicelular podrá responder de qué depende esta heterogeneidad. La

producción de conidias en nuestro sistema requiere de la actividad del factor transcripcional AbaA. Utilizando un diploide con un alelo nulo *abaA1* y un alelo termosensible *abaA14* observamos que éste desarrolla estructuras aberrantes que no parecen ni métulas ni fiálides y no se producen conidias. En pocos casos, las conidias de este diploide forman varios compartimentos celulares, delimitado por septos (en la conidiación normal una mutante nula *abaA* forma métulas reiteradas), y una célula conidiogénica con una espora al final. Creemos que esto se debe a cierta actividad residual de la proteína AbaA a la temperatura restrictiva.

Es notable que en el sistema de conidiación unicelular, la fiálide produce una sola espora, en lugar de las largas cadenas que se observan en un conidióforo multicelular. Por alguna razón la fiálide así formada pierde la capacidad para sufrir divisiones mitóticas sucesivas. Hemos demostrado que las conidias producidas en el sistema de conidiación unicelular desarrollado en este trabajo tienen la apariencia de una conidia normal, su producción depende del gen específico de la conidiación *abaA*, están delimitadas por un septo y contienen un núcleo. Aunque también hemos demostrado que al menos una parte de estas conidias es viable, es necesario determinar con exactitud su tasa de viabilidad.

Resulta interesante que cuando se empleó la cepa diploide con la cinasa SrkA fusionada a GFP y carente de una sola copia del gen *sakA*, se observó un fenotipo intermedio entre la carencia total de SakA y la presencia de un nivel silvestre de SakA en haploides. Esto indica que el sistema de esporulación unicelular en diploides permite evaluar la dosis génica y los efectos de la función de un gen en condiciones homocigas y heterocigas.

A pesar de la asincronía de la conidiación unicelular y tal vez a causa de ello, creemos que este sistema permitirá estudiar con detalle la biología celular de todo el proceso, porque solo se requiere seguir el proceso en una sola célula. Como prueba de concepto, observamos la localización de dos factores transcripcionales y dos cinasas y la distribución de núcleos y mitocondrias durante el proceso, aunque en estos casos no seguimos el proceso a lo largo del tiempo. Para poder hacer esto de manera efectiva, creemos que será necesario automatizar el

proceso de adquisición de imágenes minimizando la exposición a la lámpara UV y obteniendo suficientes imágenes para obtener una estadística y cuantificación de fluorescencia robustos. También será necesario desarrollar técnicas de montaje para hacer microscopía confocal de mayor resolución.

CONCLUSIONES

- ✓ Hemos desarrollado un nuevo sistema experimental para estudiar la diferenciación asexual del hongo *Aspergillus nidulans*.
- ✓ Las conidias producidas en el sistema de conidiación unicelular desarrollado en este trabajo tienen la apariencia de una conidia normal, su producción depende del gen específico de la conidiación *abaA*, están delimitadas por un septo, contienen un núcleo y son viables.
- ✓ Es posible utilizar este sistema experimental para seguir la dinámica de diferentes organelos y estructuras durante este proceso de diferenciación.

PERSPECTIVAS

- Generar una cepa diploide con dos copias de la construcción *alcA(p)::brlA*.
- Cuantificar cuántas estructuras forman una conidia al estar ausente el gen *abacus* y cuántas no forman ninguna.
- Generar una cepa diploide en la cual esté ausente el gen *WetA*.
- Generar una cepa, la cual contenga la construcción *alcA(p)::brlA* fusionada a la proteína GFP, y con esta generar cepas diploides para observar la cinética de inducción de *brlA* y su localización.
- Generar cepas diploides empleando cepas con proteínas fluorescentes para detectar proteínas “cell-end markers”, el citoesqueleto de actina, microtúbulos y septinas, y organelos como endosomas, cuerpos lipídicos y peroxisomas y poder así estudiar la dinámica de estos componentes en relación a los cambios en la polaridad celular y la diferenciación celular.

REFERENCIAS

- Adams, T. H., Boylan, M. T., and Timberlake, W. E. (1988). *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 54, 353–362. doi:10.1016/0092-8674(88)90198-5.
- Adams, T. H., and Timberlake, W. E. (1990). Developmental repression of growth and gene expression in *Aspergillus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5405–5409. doi:10.1073/pnas.87.14.5405.
- Adams, T. H., Wieser, J. K., and Yu, J. H. (1998). Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 35–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529886> %5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC98905>.
- Aguirre, J. (1993). Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. 8, 211–218.
- Andrianopoulos, A., and Timberlake, W. E. (1994). The *Aspergillus nidulans*. 14, 2503–2515.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., et al. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* 120, 838–848. doi:10.1242/jcs.03381.
- Casselton, L., and Zolan, M. (2002). THE ART AND DESIGN OF GENETIC SCREENS : FILAMENTOUS FUNGI. 3. doi:10.1038/hrg889.
- Clutterbuck, A. J. (1969). (hadorn 1955). 317–327.
- Creaser, E. H., Porter, R. L., and Pateman, J. A. (1987). Purification and properties of aldehyde dehydrogenase from *Aspergillus nidulans*. *Int. J. Biochem.* 19, 1009–1012. doi:10.1016/0020-711X(87)90185-6.

- El-zayat, A. A. E. (1989). Isolation of a Sexual Sporulation Hormone from *Aspergillus nidulans*. 171, 3982–3988.
- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E. A., and Ugalde, U. (2010). *Aspergillus nidulans* asexual development: Making the most of cellular modules. *Trends Microbiol.* 18, 569–576. doi:10.1016/j.tim.2010.09.007.
- Felenbok, B., Flipphi, M., and Nikolaev, I. (2001). Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 69, 149–204. doi:10.1016/S0079-6603(01)69047-0.
- Fillinger, S. (1996). A newly identified gene cluster in *Aspergillus nidulans* comprises five novel genes localized in the alc region that are controlled both by the specific transactivator AlcR and the general carbon-catabolite repressor CreA. 20, 475–488.
- Flipphi, M., and Kocialkowska, J. (2003). Relationships between the ethanol utilization (alc) pathway and unrelated catabolic pathways in *Aspergillus nidulans*. 3564, 3555–3564. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03738.x.
- Flipphi, M., Kocialkowska, J., and Felenbok, B. (2002). Characteristics of physiological inducers of the ethanol utilization (alc) pathway in *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J.* 364, 25–31.
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L., Wortman, J. R., Batzoglou, S., et al. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. 438, 1105–1115. doi:10.1038/nature04341.
- Giedt, R. J., Pfeiffer, D. R., Matzavinos, A., Kao, C. Y., and Alevriadou, B. R. (2012). Mitochondrial dynamics and motility inside living vascular endothelial cells: Role of bioenergetics. *Ann. Biomed. Eng.* 40, 1903–1916. doi:10.1007/s10439-012-0568-6.
- Gwynne, I., and Wayne, R. (1987). Comparison of the c&acting control regions of two coordinately controlled genes involved in ethanol utilization in. 51, 205–216.

- Jaimes-Arroyo, R., Lara-Rojas, F., Bayram, ?zg?r, Valerius, O., Braus, G. H., and Aguirre, J. (2015). The SrkA kinase is part of the SakA Mitogen-activated protein kinase interactome and regulates stress responses and development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 14, 495–510. doi:10.1128/EC.00277-14.
- Jang, D. H., Seeger, S. C., Grady, M. E., Shofer, F. S., and Eckmann, D. M. (2017). Mitochondrial dynamics and respiration within cells with increased open pore cytoskeletal meshes. *Biol. Open* 6. doi:10.1242/bio.029009.
- Kanamaru, Y., Sekine, S., Ichijo, H., and Takeda, K. (2012). The Phosphorylation-Dependent Regulation of Mitochondrial Proteins in Stress Responses. *J. Signal Transduct.* 2012, 1–12. doi:10.1155/2012/931215.
- Keller, N. P., and Hohn, T. M. (1997). Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. 29, 17–29.
- Klosinska, M. M., Crutchfield, C. A., Bradley, P. H., Rabinowitz, J. D., and Broach, J. R. (2011). Yeast cells can access distinct quiescent states. *Genes Dev.* 25, 336–349. doi:10.1101/gad.2011311.
- Laporte, D., Jimenez, L., Gouleme, L., and Sagot, I. (2018). Yeast quiescence exit swiftness is influenced by cell volume and chronological age. 5, 104–111. doi:10.15698/mic2018.02.615.
- Lara-Rojas, F., Sánchez, O., Kawasaki, L., and Aguirre, J. (2011). *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol. Microbiol.* 80, 436–454. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07581.x.
- Lee, S. C., Ni, M., Li, W., Shertz, C., and Heitman, J. (2010). The Evolution of Sex: a Perspective from the Fungal Kingdom. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 298–340. doi:10.1128/MMBR.00005-10.
- Lin, C., Schuster, M., Guimaraes, S. C., Ashwin, P., Schrader, M., Metz, J., et al. (2016). oppose myosin forces to position organelles in cells. *Nat. Commun.* 7, 1–14. doi:10.1038/ncomms11814.

- Marshall, M. a, and Timberlake, W. E. (1991). *Aspergillus nidulans* wetA activates spore-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 11, 55–62.
doi:10.1128/MCB.11.1.55.Updated.
- Mendoza-martínez, A. E., Lara-rojas, F., Sánchez, O., and Aguirre, J. (2017). NapA Mediates a Redox Regulation of the Antioxidant Response , Carbon Utilization and Development in *Aspergillus nidulans*. 8, 1–23.
doi:10.3389/fmicb.2017.00516.
- Miettinen, T. P., Caldez, M. J., Kaldis, P., and Björklund, M. (2017). Cell size control – a mechanism for maintaining fitness and function. *BioEssays* 39, 1–12. doi:10.1002/bies.201700058.
- Mirabito, P. M., Adams, T. H., and Timberlake, W. E. (1988). Interactions of Three Sequentially Expressed Genes Control Temporal and Spatial Specificity in *Aspergillus* Development. 57, 659–666.
- Mishra, P., and Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* 212, 379–387. doi:10.1083/jcb.201511036.
- Neubauer, M., Zhu, Z., Penka, M., Helmschrott, C., Wagener, N., and Wagener, J. (2015). Mitochondrial dynamics in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus* : therapeutic and evolutionary implications. 98, 930–945.
doi:10.1111/mmi.13167.
- Ni, M., and Yu, J. H. (2007). A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2, 1–9.
doi:10.1371/journal.pone.0000970.
- Pagliuso, A., Cossart, P., and Stavru, F. (2018). The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 355–374.
doi:10.1007/s00018-017-2603-0.
- Park, H. S., and Yu, J. H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 15, 669–677.
doi:10.1016/j.mib.2012.09.006.

- Pateman, J. a, Doy, C. H., Olsen, J. E., Norris, U., Creaser, E. H., and Hynes, M. (1983). Regulation of alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (AldDH) in *Aspergillus nidulans*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 217, 243–264. doi:10.1098/rspb.1983.0009.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Chemmons, L. M., Macdonald, K. D., and Bufton, A. W. J. (1953). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5, 141–238. doi:10.1016/S0065-2660(08)60408-3.
- Scott, B. R., and Kafer, E. for Detecting a Range of Genetic Damage. 447–448.
- Sewall, T. C., Mims, C. W., and Timberlake, W. E. (1990). *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* 2, 731–9. doi:10.1105/tpc.2.8.731.
- Skromne, I., Sanchez, O., and Aguirre, J. (2017). Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. 21–28.
- Slavov, N., Macinskas, J., Caudy, A., Botstein, D., Slavova, N., Macinskasb, J., et al. (2018). Linked references are available on JSTOR for this article : Metabolic cycling without cell division cycling in respiring yeast. 108, 19090–19095. doi:10.1073/pnas.1116998108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas-1116998108.
- Summerbell, R. C. (2005). Studies in Mycology: Preface. *Stud. Mycol.* 53, 1–29. doi:10.3114/sim0006.
- Timberlake, E. (1980). in *Aspergillus nidulans*. 510.
- Timberlake, W. E., Boylan, M. T., Mirabito, P. M., Willett, C. E., and Zimmerman, C. R. (1987). Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillusnidulans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53, 317. doi:10.1007/BF00400554.
- Timberlake, W. E., Marshall, M. A., Timberlake, W. E., and Marshall, M. A. (2018). Genetic Engineering of Filamentous Fungi Linked references are available on JSTOR for this article : Genetic Engineering of Filamentous Fungi. 244, 1313–

1317.

Vargas-Pérez, I., Sánchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., and Aguirre, J. (2007).

Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 6, 1570–1583.

doi:10.1128/EC.00085-07.

Waring, R. B., May, G. S., and Morris, N. R. (1989). *Aspergillus nidulans*. 79, 119–

130.

ANEXOS

Preparación de una solución de Mito Tracker® Red

1. Se tomó 1 µL de Mito Tracker® Red CMXRos (ThermoFisher Scientific) y se añadieron a 999 µL de agua destilada contenidos en un tubo eppendorf de 1.5 mL ambar.
2. Se aplicó vortex durante unos segundos.
3. Se almacenó a 4 °C.

Preparación de una solución de calcofluor 1mM

1. Se realizaron los cálculos necesarios para llegar a una concentración de 1 mM.

$$0.001 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \left(\frac{916.986 \text{g}}{1 \text{mol}} \right) = 0.916 \text{g/L}$$

0.001 M= concentración de calcofluor deseada.

916.986 g/mol= peso molecular del calcofluor

Se realizó el cálculo necesario para preparar 25 mL.

$$\left(\frac{0.916 \text{g}}{1 \text{L}} \right) (0.025 \text{L}) = 0.0229 \text{g} = 22.9 \text{mg}$$

2. Se pesó la cantidad necesaria de calcofluor y se disolvió en 25 mL de agua destilada contenida en un vaso de precipitados.
3. Esta solución de calcofluor se transfirió a un tubo falcón de 50 mL.
4. Se aplicó vortex durante unos segundos.
5. Se cubrió con papel aluminio esto con el fin de protegerlo de la luz y se almacenó a temperatura ambiente.

Preparación del Glicerol al 80%

1. Se empleó una probeta de 100 mL a la cual se le añadió 80 mL de Glicerol.
2. Se añadió agua destilada hasta llegar al aforo de 100 mL.
3. Se mezcló durante unos minutos y se transfirió a frascos.
4. Los frascos se esterizaron a 120°C durante 20 min.

Preparación de una solución de H₂O₂

1. Se cuantifico el H₂O₂ esto con el fin de obtener su concentración en el momento.
2. Una vez obtenida la concentración se realizaron los siguientes cálculos para obtener una concentración final de 2mM o 5 mM según fuera el caso en 10 mL de medio mínimo líquido contenidos en un tubo falcón de 15 mL.

$$\text{Volumen necesario} = \left(\frac{(0.002M)(10mL)}{11.15M} \right)$$

0.002M= concentración de H₂O₂ deseada.

10mL= volumen de medio mínimo líquido.

11.15M= concentración original de H₂O₂

TABLA COMPLEMENTARIA 1.

Cepa (heterocarion)	Esporas/mL (Suspensión de heterocariones)	Volumen empleado (μL)	Esporas
<i>napA::GFP x alcA::briA</i>	2.58×10^8	50	1.2×10^7
<i>srrA::GFP x alcA::briA</i>	1.5×10^8	75	1.1×10^7
<i>sakA::GFP x alcA::briA</i>	2.05×10^7	75	2.05×10^6
<i>srkA::GFP x alcA::briA</i>	4.4×10^8	50	2.2×10^7
<i>srkA::GFP, H2A x alcA::briA</i>	3.17×10^8	50	1.58×10^7
<i>Trv1 x alcA::briA</i>	1.92×10^8	75	1.4×10^7
Tabla complementaria 1. Cantidad de esporas necesarias para generar cepas diploides.			

FIGURA SUPLEMENTARIA 1

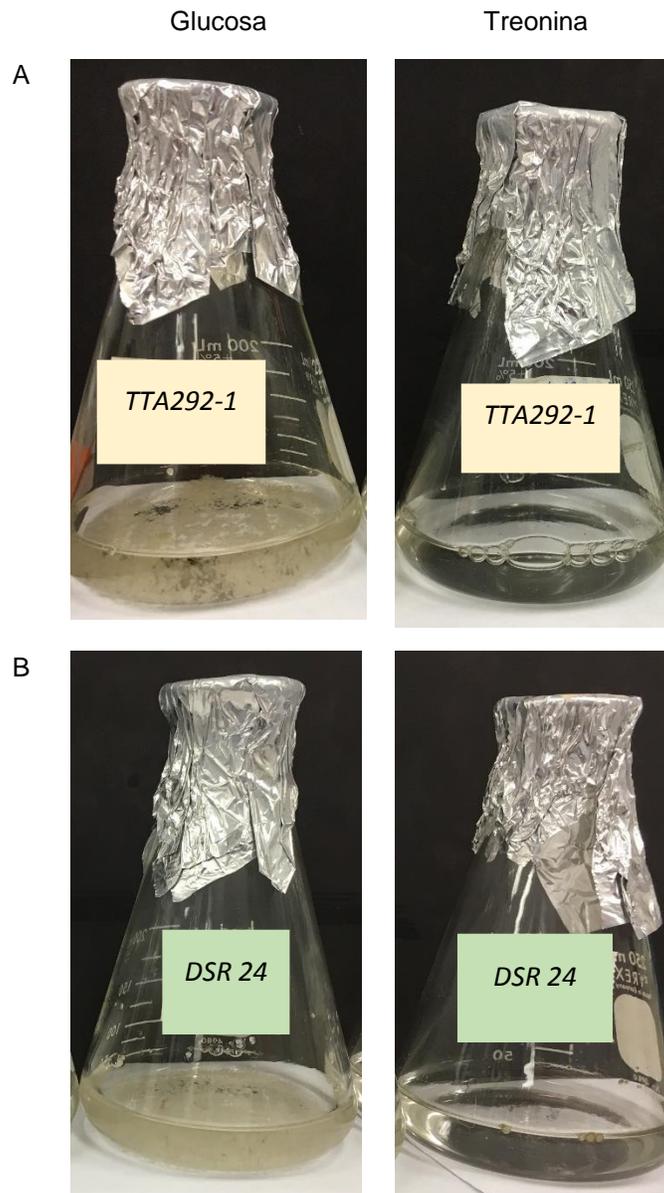


Figura suplementaria 1. Conidiación unicelular en MM líquido contenido en un matraz. **A.** Cepa haploide: **TTA292-1** (*alcA(p)::brlA*) en MM líquido más los suplementos Metionina y Biotina, como se muestra en la figura se emplearon diferentes fuentes de carbono, glucosa o treonina. **B.** Cepa diploide: **DSR 24** (*SrkA::GFP*, Δ *SakA*, *H2A x alcA(p)::brlA* 1.118), en MM líquido sin ningún suplemento, solo con diferentes fuentes de carbono, glucosa o treonina. 24 h, 300rpm.

FIGURA SUPLEMENTARIA 2

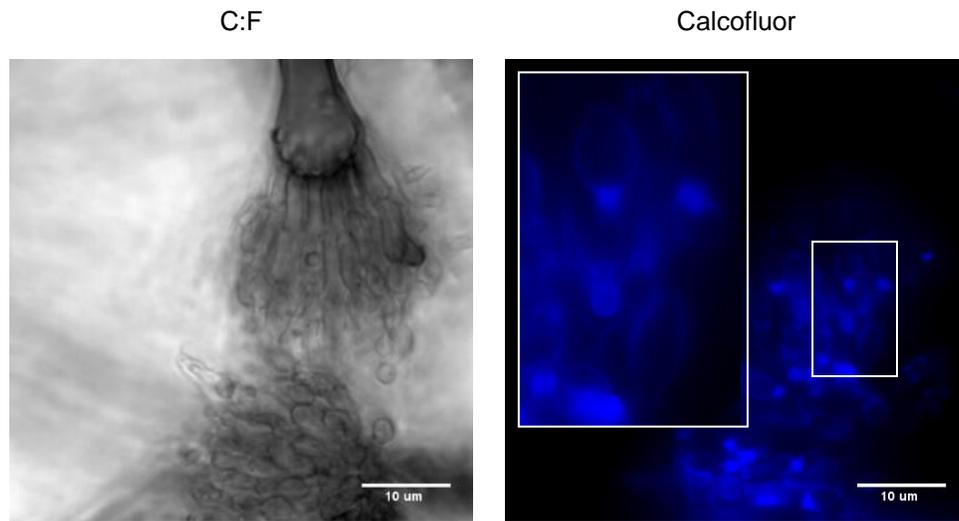


Figura 1. Conidióforos de una cepa *abacus*. Cepa haploide: **AJC 6.39** (*ornB7*, *fwA1*, *ve+*, *abaA1*, *veA1*) MM con arginina, 3 días de incubación a 38°C. Calcofluor [1mM]. Observado en C:F (contraste de fases) y calcofluor.

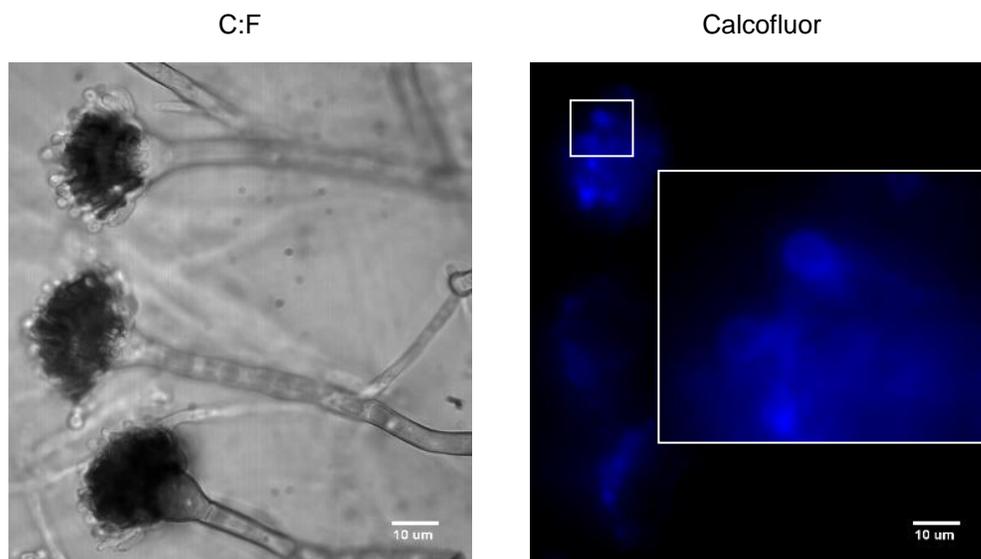


Figura 1B. Conidióforos de una cepa *abacus*. Cepa haploide: **TTA021** (*biA1*, *pabaA1*, *alcA(p)::brlA*, *abaA14*, *veA*) MM con paba y biotina, 3 días de incubación a temperatura ambiente (22°C). Calcofluor [1mM]. Observado en C:F (contraste de fases) y calcofluor.

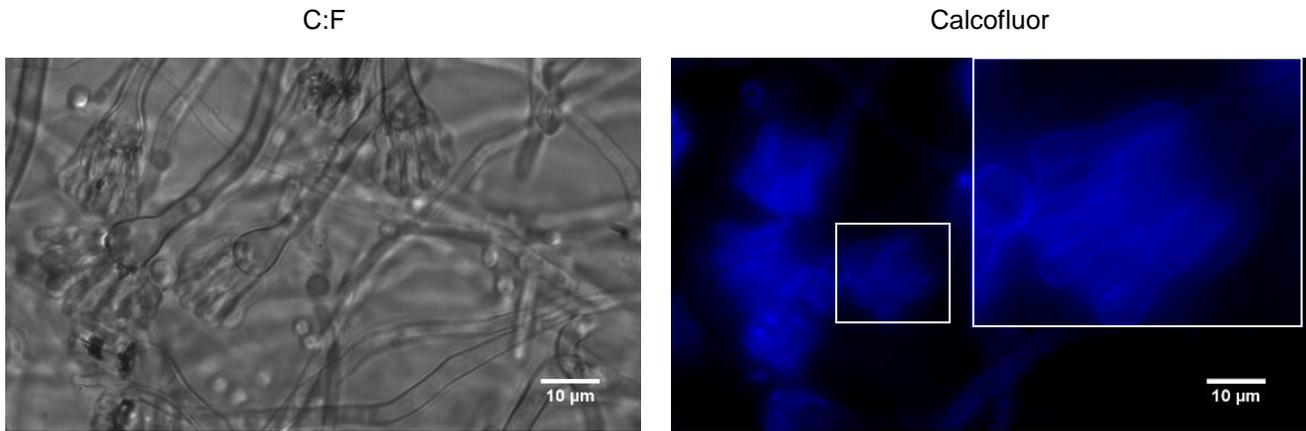


Figura 1B. Conidióforos de una cepa *abacus*. Cepa haploide: *TTA021* (*biA1*, *pabaA1*, *alcA(p)::brlA*, *abaA14*, *veA*) MM con paba y biotina, 3 días de incubación a 38°C. Calcofluor [1mM]. Observado en C:F (contraste de fases) y calcofluor.