

A
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**EFFECTO DEL STRESS NUTRICIONAL SOBRE LA
EXRESION DEL GENE REGULADOR BRLA DE
ASPERGILLUS NIDULANS.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA
BASICA
P R E S E N T A :
ISAAC SKROMNE EISENBERG

MEXICO, D.F.,

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

Para todas aquellas personas que
han hecho de mi, lo que soy.
Por su guía y apoyo.
Por todo.
A ellos:

A mis abuelos, padres y hermanos.
A mis tíos y primos, y demás familiares.

A mis amigos del colegio y de la universidad.
A mis maestros y profesores.

Un agradecimiento especial a los doctores Alicia González, Sergio Sanchez y Wilhelm Hansberg por sus valiosas lecciones, pero en especial al Dr. Jesús Aguirre por no ser sólo mi guía durante las penurias de este trabajo, sino un amigo con el cual compartí fracasos y triunfos y cuya mente abierta siempre fue un campo fértil de discusión y enseñanza.

Agradezco a Paula González por los resultados de la figura 6, a Olivia Sanchez por realizar los Northernms que aparecen en esta tesis, y en especial a todos y cada uno de los miembros del laboratorio por su constante apoyo y horas de productiva discusión.

Indice.

Introducción.	1.
Diferenciación celular.	1.
<i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de diferenciación celular.	3.
La genética de la conidiación de <i>Aspergillus nidulans</i> .	8.
El papel del gene <i>brlA</i> en la conidiación.	11.
Factores genéticos que regulan la expresión de <i>brlA</i> .	15.
Objetivos.	21.
Materiales y métodos	23.
Análisis genético y cepas empleadas de <i>Aspergillus nidulans</i> .	23.
Cultivos líquidos de <i>Aspergillus nidulans</i> .	28.
Microscopía .	30.
Determinación de la actividad específica de β -galactosidasa.	31.
Determinación de glucosa	34.
Extracción de RNA de <i>Aspergillus nidulans</i> .	36.
Otras técnicas de biología molecular empleadas en este trabajo.	38.
Resultados.	41.
La privación de carbono o nitrógeno inducen la expresión del gene <i>brlA</i> a distintos niveles, causando distintos patrones de esporulación.	41.
Efecto de distintas fuentes de carbono sobre la expresión de <i>brlA</i> y la esporulación.	46.

Efecto del pH durante la inducción de <i>brlA</i> por limitación de nutrientes.	53.
Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de <i>brlA</i> y la esporulación.	60.
Efecto de las mutaciones <i>creA</i> y <i>areA</i> sobre la expresión de <i>brlA</i> .	64.
Obtención y caracterización parcial de mutantes de <i>Aspergillus nidulans</i> que presentan una esporulación anticipada.	72.
Conclusiones y perspectivas.	77.
Referencias.	80.

Introducción.

Diferenciación celular.

El estudio de la diferenciación celular consiste en tratar de comprender las causas y procesos que llevan a un tipo celular a transformarse en otros tipos. Con el auge de la biología molecular, iniciado con la publicación del modelo de regulación de la expresión genética propuesto por Jacob y Monod (Jacob y Monod, 1961), la diferenciación celular se ha considerado como consecuencia de una expresión secuencial y diferencial de genes. Así, parte de la pregunta sobre como se inicia el proceso de la diferenciación celular se ha convertido en la pregunta de como se inicia la expresión de genes claves en el proceso. Aún con esta simplificación, el problema es complejo, ya que modelos de regulación genética tan sencillos como el operón de lactosa de *Escherichia coli* son controlados por múltiples señales (por ejemplo: la presencia de lactosa (inductor) o de glucosa (represor)) y mediadas por diferentes factores transcripcionales (las proteínas LacI y CAP-cAMP; Reznikoff, 1992). La expresión genética y los procesos de diferenciación tanto en procariontes como en eucariontes suelen ser controlados por múltiples señales fisiológicas y ambientales tales como el estado nutricional, el ciclo celular e inclusive diversas señales hormonales y contactos célula-célula, donde cierta combinación de condiciones es necesaria para que los procesos de diferenciación ocurran. La esporulación en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* esta sujeta tanto a controles nutricionales como a controles del ciclo celular (Fantès, 1989). La formación de cuerpos fructíferos y la formación de esporas en la bacteria *Myxococcus xanthus* requiere la privación de nutrientes

así como de contactos célula-célula (Kim, *et al*, 1992). Se requiere limitación nutricional para la diferenciación de la forma ameboidea a la forma flagelada en la amiba *Naegleria gruberi* (Fulton, 1983), y para que *Escherichia coli* sufra distintos cambios fisiológicos que le permitan sobrevivir fases adversas de crecimiento (Hengge-Aronis, 1993). Las interacciones entre célula y célula son muy importantes para establecer los distintos tipos celulares durante la formación y migración de la forma multicelular de *Dictyostelium discoideum* (Gerisch, 1987), el desarrollo vulvar en *Caenorhabditis elegans* (Ferguson, *et al*, 1987), la neurogénesis en insectos (Doe y Goodman, 1985) así como en la inducción de mesodermo en vertebrados (Smith, 1987). En todos estos organismos deben existir mecanismos que registren e integren las diversas señales que disparan los distintos procesos de diferenciación, para coordinarlos de manera adecuada. Afortunadamente, son muchos los mecanismos regulatorios que se encuentran conservados en los distintos organismos empleados como modelos de estudio, tales como: cascadas y redes de regulación, reiteración de muchas vías regulatorias, señales análogas y patrones de desarrollo con características comunes (Cove, *et al*, 1992).

No obstante los múltiples modelos, estrategias y técnicas experimentales desarrolladas, la gran cantidad de conocimientos acumulados durante este último siglo en torno a los procesos de diferenciación, aún no es posible comprender en su totalidad la naturaleza de los controles regulatorios que determinan si un microorganismo continúa creciendo vegetativamente o entra en un ciclo de diferenciación. Se ha observado que los procesos de diferenciación celular en microorganismos pueden ser inducidos frecuentemente en condiciones que tienen efectos negativos sobre el crecimiento. Poco se sabe sobre estas señales ambientales y como disparan los procesos de diferenciación (ver Hansberg y Aguirre, 1990).

Aspergillus nidulans como modelo de diferenciación celular.

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso ascomiceto (Fennell, 1977) cuyas múltiples ventajas genéticas, bioquímicas y fisiológicas, que aunadas al desarrollo de técnicas sofisticadas de biología molecular, lo han convertido en un modelo ideal para el estudio de los controles genéticos y moleculares de la diferenciación en hongos (Timberlake y Marshall, 1988; Aguirre, 1992). Este microorganismo fue introducido al mundo experimental por el Dr. Pontecorvo de la Universidad de Glasgow, Escocia, buscando un organismo adecuado para estudiar los problemas espacio-temporales a los que se enfrentan las células, y cuyo trabajo pionero (Pontecorvo, 1953) sentó las bases del estudio de la genética y fisiología de *A. nidulans*.

Muchas son las ventajas que facilitan el estudio de los procesos de diferenciación en *A. nidulans* tales como: capacidad de crecer en diversos medios de cultivo definidos, tiempo de duplicación de aproximadamente 2.5 horas, formación de colonias compactas que permite utilizar técnicas de replicación en placa, ser homotálico (no existen distintos tipos sexuales) lo cual permite cruzar cualquier par de cepas, y tener conidias uninucleadas capaces de ser mutagenizadas y transformadas (Timberlake y Marshall, 1988; Aguirre, 1992; Yager, 1992).

El ciclo de vida de *A. nidulans* consta de tres fases: crecimiento vegetativo, ciclo sexual y ciclo asexual (Fig. 1). El crecimiento vegetativo ocurre por extensión apical y ramificación de las hifas. Este crecimiento polar es una característica de los hongos (Cole, 1986) y se efectúa al depositarse

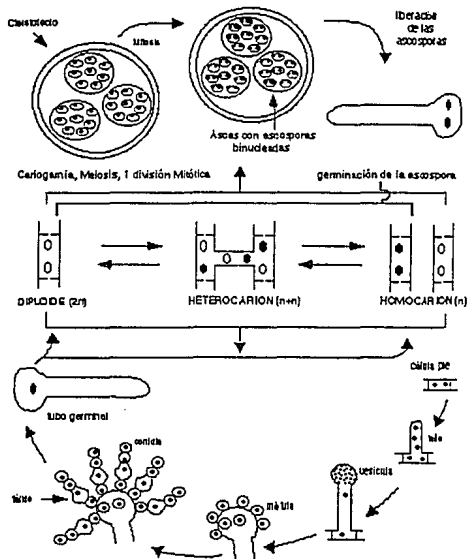


Figura 1. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*.

La porción central muestra a las células vegetativas (hifas) que crecen por extensión apical. Las hifas tienen entre 3 y 5 μm de diámetro. Núcleos genéticamente distintos (indicados por círculos vacíos y rellenos dentro de las hifas) pueden encontrarse separados como en los homocariones, o en citoplasmas comunes para producir

selectivamente vesículas citoplasmicas que acarrean precursores de la pared celular y enzimas polimerizantes en el extremo apical de la hifa (Bartnicki-García, *et al*, 1978; McKerracher y Heath, 1987). Las hifas se dividen en compartimentos por paredes perforadas llamadas septos.

Cuando el micelio vegetativo es expuesto al aire, se induce el desarrollo asexual, que se caracteriza por la sustitución del crecimiento polarizado por un crecimiento por gemación, que culmina en la formación de una compleja estructura multicelular llamada conidióforo (Fig. 2; Smith, *et al*, 1977; Cole, 1986; Timberlake y Marshall, 1988). El desarrollo de los conidioforos inicia con la diferenciación de algunas células de las hifas en células pie, células que sostendrán toda la estructura del conidióforo (Smith, *et al*, 1977; Clutterbuck, 1977; Boylan, *et al*, 1987; Mims, *et al*, 1988; Timberlake, 1991). Las células pie producen hifas aéreas que, aunque crecen por extensión apical, solo

(cont.) heterocariontes. Los núcleos también se pueden fusionar y producir diploides.

Los homocariontes y los heterocariontes tanto haploides como diploides pueden reproducirse de manera sexual (porción superior) o asexual (porción inferior). La reproducción sexual consiste en la formación de cuerpos fructíferos multicelulares o cleistotecios. La fusión nuclear (cariogamia) y la meiosis ocurren dentro de hifas fértiles especializadas (hifas ascógenas) que se encuentran en el cleistotecio. Ocho ascosporas se forman en cada asca como resultado de la secuencia de una meiosis y una mitosis. Una segunda división mitótica ocurre durante la diferenciación de las ascosporas, por lo que cada ascospora madura contiene dos núcleos genéticamente idénticos.

La reproducción asexual consiste en la formación de conidióforos y esporas uninucleadas llamadas conidias. Las conidias se forman por mitosis repetidas de los núcleos de las filídes.

alcanzan una altura determinada. Posteriormente el extremo apical se hincha para formar una vesícula globosa multinucleada. La gemación de dicha vesícula da lugar a una capa de células uninucleadas llamadas méticas, que a su vez sufren una gemación para formar una segunda capa de células uninucleadas llamadas filídes. Las cadenas de conidias o esporas surgen a través de divisiones asimétricas repetidas de las filídes, donde las últimas conidias de cada cadena son las más viejas (Oliver, 1972). Estas conidias se encuentran en un estado de latencia que al activarse por señales adecuadas generaran un nuevo micelio (Clutterbuck, 1977; Timberlake, 1991; Yager, 1992).

La diferenciación sexual requiere de la fusión de hifas (ya sean de la misma colonia o de colonias distintas) y de núcleos para formar un diploide ($2n$) que puede ser estable o inestable (Fig. 1). Las células diploides, por una baja tensión de oxígeno o por obscuridad, se enrollan y forman agregados de donde algunas células se van a hinchar para formar las células Hülle (células cascara) que se encuentran asociadas al cleistotecio o cuerpo fructífero. En el interior del cleistotecio se efectúa una cariogamia, una meiosis y varias divisiones mitóticas consecutivas para formar las ascas que contienen a las ascosporas (esporas binucleadas haploides, n), que al germinar reiniciarán el ciclo de vida del hongo dando origen a un micelio haploide (Zonneveld, 1977; Timberlake y Marshall, 1988; Yager, 1992).

El momento en donde el hongo adquiere la capacidad de conidiar, además de poder seguir creciendo vegetativamente, no se alcanza sino hasta después de un periodo de crecimiento de aproximadamente 18-20 horas (a partir de la germinación de las conidias). A este punto de "madurez" se le ha denominado competencia (Axelrod, 1972; Axelrod, *et al*, 1973; Champe, *et al*, 1981). Antes de alcanzar la competencia, la exposición al aire le resulta indiferente al microorganismo, sin embargo, después de alcanzada la

competencia, la inducción de la conidiación por los estímulos adecuados resulta en la expresión secuencial de numerosos genes específicos del proceso (Timberlake, 1980; Zimmerman, *et al*, 1980; Boylan, *et al*, 1987).

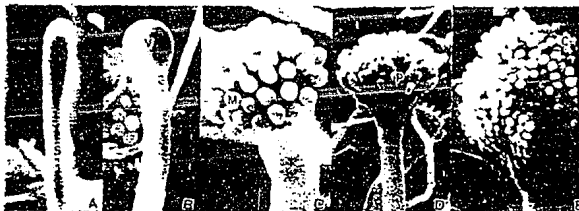


Figura 2. Fases del desarrollo del conidióforo de *Aspergillus nidulans*.

Los paneles de A-E presentan micrografías de los principales estadios que conducen a la formación de un conidióforo maduro de *Aspergillus nidulans* (microscopía electrónica de barrido). Una hifa aérea (A) se genera a partir de una célula pie que crece a una altura aproximada de 100 μm . El tallo del conidióforo (s) que se forma contiene muchos núcleos, ya que en el proceso de elongación ocurren muchas divisiones mitóticas. Una vez que el crecimiento apical se ha completado, la punta se hincha (B) para formar la vesícula del conidióforo (v). Numerosas gemaciones (C) forman las métulas (m) en la superficie de la vesícula. Las métulas sufren una o más divisiones mitóticas (D) para producir las fiálides (P). Las fiálides dan origen a las conidias (c) por divisiones mitóticas repetidas, donde cada núcleo hijo generado se incorpora en la espora naciente y el otro núcleo se retiene en la fiálide. El conidióforo maduro (E) contiene numerosas esporas.

La genética de la conidiación en *Aspergillus nidulans*.

Mediante el uso de genética clásica y el aislamiento de mutantes afectadas en distintos puntos de la conidiación, se ha logrado disectar el proceso de la esporulación asexual (Clutterbuck, 1969; Clutterbuck, 1970; Yager, *et al*, 1982; Tamame, *et al*, 1983; Butnick, *et al*, 1984; Clutterbuck y Timberlake, 1992). El análisis genético ha demostrado que la reproducción asexual en *A. nidulans* esta controlada de manera jerárquica por un número determinado de genes (Clutterbuck, 1977; Martinelli, 1979). Del análisis de aproximadamente 50,000 colonias de *A. nidulans* obtenidas después de varias mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y comparando la frecuencia de mutantes afectadas en la conidiación contra la frecuencia de mutantes auxótroficas obtenidas, se estimó que entre 45 y 100 genes están involucrados directamente en la conidiación (Martinelli y Clutterbuck, 1971). Posteriormente, empleando técnicas sofisticadas de hibridación diferencial de RNA se lograron aislar aproximadamente 1200 RNAs mensajeros específicos de la conidiación (Timberlake, 1980). La discrepancia de los números obtenidos con ambos métodos se debe a que el análisis genético no consideró muchas mutantes afectadas tanto en el crecimiento vegetativo como en la conidiación, por lo que este número esta subestimado (Martinelli y Clutterbuck, 1971), mientras que en el método de hibridación diferencial de RNA la cantidad de genes esta sobrestimado, ya que muchos genes pueden codificar para isoenzimas (Boylan, *et al*, 1987).

Con el propósito de facilitar la comprensión de la jerarquía de los genes involucrados en la conidiación dentro de un marco de eventos secuenciales, se ha propuesto la siguiente clasificación (Clutterbuck, 1977; Timberlake, 1991). Primero, aquellos genes que median la decisión de las células vegetativas a

comprometerse a conidiar se les ha denominado "genes estratégicos". Aquellos genes que regulan los patrones espaciales y temporales de la diferenciación y que se requieren para el desarrollo del conidióforo como tal, pertenecen a la categoría de "genes regulatorios". La tercera categoría incluiría a los genes que directamente determinan la estructura y fisiología del conidióforo, y se les ha denominado "genes estructurales". Un cuarto grupo de genes llamados "genes de mantenimiento" serían los encargados de suplir los materiales necesarios para el desarrollo de las nuevas estructuras. Debido a que en esta última categoría se incluirían genes que son necesarios tanto para la fase vegetativa del crecimiento como para la reproducción asexual, estos genes se han estudiado bajo contextos de fisiología general de hongos y no como propios de la diferenciación (Clutterbuck, 1977; Clutterbuck y Timberlake, 1992).

Durante la conidiación, un grupo de genes regulatorios define una vía lineal de genes de diferenciación que controlan la formación del conidióforo (Fig. 3). Los genes que forman esta secuencia son los genes *bristle* o "cerda" (*brlA*), *abacus* o "abaco" (*abaA*) y *wet-white* conidia o "conidias blancas-húmedas" (*wetA*) (Clutterbuck, 1969; Clutterbuck, 1977; Boylan, *et al*, 1987; Mirabito, *et al*, 1989; Aguirre, *et al*, 1990; Timberlake, 1991; Clutterbuck y Timberlake, 1992). Esta secuencia de activación de genes se determinó por un análisis de epistasis entre los distintos genes de la vía, que posteriormente se comprobó mediante técnicas de biología molecular (Clutterbuck, 1969; Boylan, *et al*, 1987). Existen otros genes del tipo regulatorio que modulan la organización espacial del conidióforo, tales como los genes *stunted* o "atrofiado" (*stuA*) y *medusa* o "medusa" (*medA*) (Fig. 3; Clutterbuck, 1969; Martinelli, 1979; Miller, *et al*, 1991; Timberlake, 1991; Clutterbuck y Timberlake, 1992; Miller, 1992).

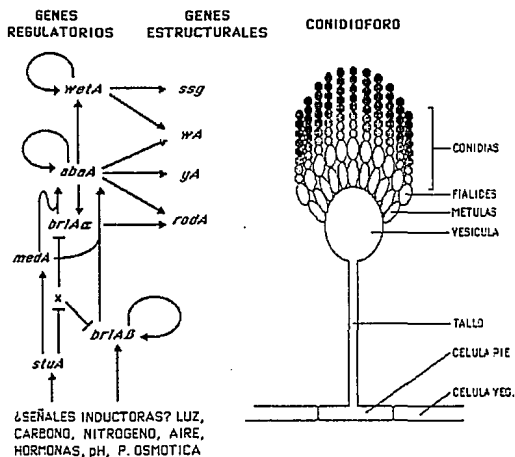


Figura 3. Vía regulatoria propuesta para el desarrollo del conidióforo.

Los genes reguladores más importantes son *briA*, *abaA* y *watA*. La vía de regulación central que controla el desarrollo en *A. nidulans* se muestra paralela con un diagrama que representa al conidióforo, para relacionar los tiempos de expresión de los genes con el desarrollo. Los tipos celulares del conidióforo están indicados. Las actividades de estos genes son modificadas por genes reguladores auxiliares tales como *stuA* y *medA*. Los productos de los genes morfogenéticos tales como *rodA*, *yA* y *wA* contribuyen directamente a los fenotipos especializados de los distintos tipos celulares. *ssg* indica genes específicos de las esporas cuya función se desconoce. Las flechas indican regulación positiva y las barras indican regulación negativa. Señales de inducción aún no caracterizadas

También se han aislado muchos genes estructurales específicos de la conidiación como son los genes ivory o "marfil" (*ivoA* e *ivoB*), yellow o "amarillo" (*yA*), white o "blanco" (*wA*), rodletless (*rodA*) entre otros (Clutterbuck, 1969; Martinelli y Clutterbuck, 1971; Clutterbuck y Timberlake, 1992). Se han observado que estos genes están regulados por la vía que define el gene bristle y por los genes stunted y medusa (Brise y Clutterbuck, 1990; Clutterbuck, 1990; Brise y Clutterbuck, 1991; Clutterbuck y Timberlake, 1992; Aramayo y Timberlake, 1993). Las fuertes interacciones existentes entre la vía del gene bristle y los genes stunted y medusa regulan de manera precisa el desarrollo del conidióforo (Fig. 3; Clutterbuck y Timberlake, 1992; Miller, *et al*, 1992; Aguirre, 1993).

El papel del gene *brlA* en la conidiación.

El gene que hasta la fecha se ha encontrado que juega un papel central en la conidiación es el gene bristle (*brlA*). Mutantes en el gene *brlA* son incapaces de efectuar la transición de la elongación del tallo del conidioforo a la formación de la vesícula y al subsecuente crecimiento por gemación. Por

(cont.) disparan la vía de diferenciación, activando a *brlA α* o *brlA β* . La regulación inicial de *brlA β* puede ocurrir a nivel de la traducción. La actividad de *brlA* es modulado por *stuA* y un represor *x*. *brlA α* y/o *brlA β* activan al gene *abaA* con la ayuda de *medA*. *AbaA* activa a *brlA α* , y refuerza su propia transcripción, además de activar a *wetA* y a numerosos genes estructurales, cuyos productos contribuyen a la forma y función del conidióforo (por ejemplo: *rodA*, *yA* y *wA*). *wetA* activa a numerosos genes específicos de las esporas (*ssg*) requeridos para la maduración de las conidias.

esta razón, las mutantes *brlA* forman colonias con hifas aéreas profusas con apariencia de cerdas (Clutterbuck, 1969). Mutantes en el gene *brlA* que conservan distintos grados de la función pueden ser ordenados en series morfológicas; desde mutantes sin función (nulas) que producen únicamente hifas aéreas no diferenciadas, hasta mutantes prácticamente silvestres con hifas aéreas muy ramificadas, lo que sugiere que el producto génico de *brlA* controla una gran variedad de genes (Clutterbuck y Spathas, 1984; Clutterbuck, 1990; Brise y Clutterbuck, 1991), posiblemente a través de gradientes espacio-temporales en el conidióforo (Aguirre, 1993).

El mensajero para *brlA* se acumula durante el desarrollo del conidióforo a partir de la formación de la vesícula, principalmente en las vesículas, metulas y filides (Johnstone, *et al*, 1985; Boylan, *et al*, 1987; Aguirre, *et al*, 1990), y su actividad se requiere de manera continua para completar todos los pasos del desarrollo del conidióforo (Mirabito, *et al*, 1990).

La expresión ectópica del gene *brlA* en condiciones donde no hay esporulación, resulta en la interrupción del crecimiento vegetativo, alteraciones metabólicas e inducción de la esporulación (Adams, *et al*, 1988 y 1990; Adams y Timberlake, 1990a; Han, *et al*, 1993). Este resultado sugiere que en estas condiciones la expresión de *brlA* es suficiente para disparar los eventos que conducen a la esporulación (Adams, *et al*, 1988), sin embargo, el patrón normal de diferenciación requiere controles regulatorios adicionales (Clutterbuck, 1969; Martinelli, 1979; Champe, 1987; Mazur, 1990; Mooney, 1990; Miller, 1992; Aguirre, 1993; Timberlake, 1993).

El gene *brlA* es un gene que consta de dos unidades de transcripción sobrelapadas (Fig. 4), donde el sitio de inicio de la transcripción del gene *brlA α* se encuentra dentro del único intrón de 392 pares de bases (pb) de la unidad de transcripción del gene *brlA β* (Prade y Timberlake, 1993). Salvo por la adición

de 23 aminoácidos en el extremo amino terminal del polipéptido *BrlA β* , ambas proteínas son idénticas con 432 residuos (Adams, *et al*, 1988; Prade y Timberlake, 1993). La comparación de la secuencia de aminoácidos de *BrlA* con otras secuencias de proteínas sólo revela similitud con los sitios de coordinación de 2cisteínas-2histidinas para el zinc II ("dedos de zinc"), reconocidos en el factor transcripcional III-A (TFIIIA) de *Xenopus laevis* (Müller, *et al*, 1985; Klug y Rhodes, 1987), lo que sugiere que se trata de una proteína capaz de unirse al DNA. No se han encontrado similitudes adicionales con otras proteínas (Adams, *et al*, 1988).

Cepas que expresan solamente *BrlA α* o *BrlA β* poseen fenotipos claramente distintos. Cepas que expresan solamente *BrlA α* son incapaces de comprometerse al programa de diferenciación, y sólo llegan a formar mánulas, muchas de las cuales reinician el desarrollo de conidioforos secundarios (Prade y Timberlake, 1993), fenotipo similar a las de las mutantes en el gene medusa (*med4*; Miller, 1993; Timberlake, 1993). Cepas que expresan solamente el transcrito de *BrlA β* , forman pequeñas cadenas de mánulas que en algunos casos producen una única conidia en la punta (Prade y Timberlake, 1993). No obstante, la expresión de varias copias de sólo uno de los mensajes de *brlA* (α o β) en una cepa carente del gene silvestre, genera conidioforos silvestres, sugiriendo que las proteínas *BrlA α* y *BrlA β* son funcionalmente equivalentes (Prade y Timberlake, 1993).

El RNA mensajero de *brlA β* posee una región líder 5' de 752 pb, una región muy larga y poco usual en genes de hongos (Prade y Timberlake, 1993). Dentro de esta región líder se localiza un pequeño marco de lectura (μ ORF) de 123 pb (41 amino ácidos), un rasgo característico de los RNA mensajeros sujetos a regulación traduccional (Han, *et al*, 1993; Prade y

Timberlake, 1993). Debido a que tanto los mecanismos transcripcionales como los traduccionales juegan un papel en la expresión de *brlA*, ha sido difícil comprender su regulación. Aunque hay pocas evidencias, en el modelo actual se propone que niveles bajos pero constantes de transcripción del gene *brlA β* se localizan en hifas vegetativas (Han, *et al*, 1993). Al alcanzar la

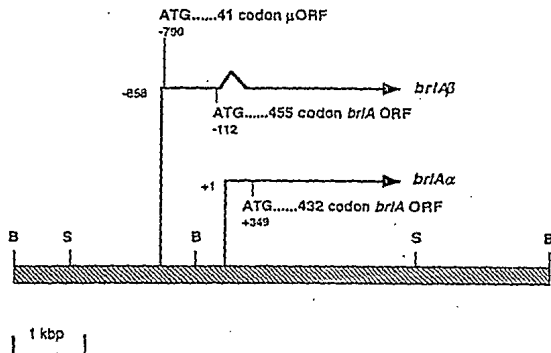


Figura 4. Organización del gene *brlA*.

Los transcritos de *brlA α* y *brlA β* se indican con las flechas, donde el sitio del inicio de la transcripción de *brlA α* tiene asignada la posición +1 y el de *brlA β* la posición -858. *brlA β* consiste de dos exones que codifican para un polipéptido idéntico a *BrlA α* excepto por la adición de 23 amino ácidos en el extremo amino terminal. El único intron presente abarca desde los -99 pb a los +293 pb (392 nucleotidos). *brlA β* también contiene corriente arriba un marco de lectura pequeño designado μ ORF. Los sitios de restricción abreviados son: B, *Bam*HI; S, *Sal*I.

competencia, se propone que modificaciones en la maquinaria traduccional impiden la traducción del μ ORF del transcrito de *brlA β* , ya que su traducción labilizaría de alguna manera el RNA mensajero haciendolo susceptible a la degradación (aparentemente el péptido generado del μ ORF carece de función). Una vez estabilizado el mensaje y traducida la proteína *BrlA β* , esta actúa sobre sus genes blanco a través de elementos de respuesta (*BrlA* responsive elements o BRE; Chang y Timberlake, 1993). Uno de estos genes es el gene *abacA* (*abaA*) que a través de un circuito regulatorio activa la transcripción de *brlA α* (Mirabito, *et al*, 1989; Aguirre, 1993; Han, *et al*, 1993; Timberlake, 1993; Andrianopolous y Timberlake, 1994). *BrlA α* y β incrementan su propia expresión, y al igual que *BrlA β* , *BrlA α* activa a *abaA* (Adams, *et al*, 1988; Aguirre, 1993). Este modelo situa a la activación del gene *brlA* en el centro de un circuito regulatorio que permite comprometer al sistema en la formación del conidioforo, a través de incrementos controlados en la concentración de la proteína *BrlA* (Aguirre, 1993; Han, *et al*, 1993; Miller, 1993; Timberlake, 1993; Andrianopolous y Timberlake, 1994). Los fenotipos observados en las cepas que carecen de *BrlA α* o de *BrlA β* son consistentes con este modelo de regulación que sugiere que *BrlA β* se requiere para comprometer el hongo a esporular, y *BrlA α* se requiere para mantener dicho compromiso (Han, *et al*, 1993; Miller, 1993; Timberlake, 1993).

Factores genéticos que regulan la expresión de *brlA*.

Los genes *stunted* (*stuA*) y *medusa* (*medA*) intervienen en el esquema de regulación de *brlA* (Fig. 3). La estructura del gene *stuA* es análoga a la del gene *brlA* y codifica un polipéptido de 63.5 Kilodaltones (KDa) que contiene dos regiones ricas en lisinas y argininas (cargas positivas) separadas por 18

residuos, muy similar a varios factores de transcripción de mamíferos y del ciclo celular en levaduras (Robbins, *et al.*, 1991; Miller, *et al.*, 1992; Priming, *et al.*, 1992; Miller, 1993). Se ha encontrado (Aguirre, 1993) que una fusión entre el promotor del gene *brlA* y el gene reportero *lacZ* de *E. coli* (Fig. 5), se expresa de manera aberrante en las hifas y conidioforos de una mutante *stuA*. Como se había observado que la expresión de *stuA* es paralela a la de *brlA*, y que *stuA* puede estar parcialmente bajo el control de *brlA* (Miller, *et al.*, 1992), se ha propuesto que *brlA* esta bajo el control de un represor "x" y que este a su vez puede ser reprimido por *stuA*, por lo que *StuA* ayuda a través de un circuito regulatorio a localizar correctamente a *BrlA* en el conidioforo (Fig. 3; Aguirre, 1993).

Mutantes en el gene medusa (*medA*) forman niveles reiterados de mótulas que ocasionalmente se desdiferencian para formar conidioforos secundarios anormales, fenotipo muy similar a las cepas carentes de *brlA β* . Al igual que en la cepa carente de *brlA β* copias extras del gene silvestre *brlA* suprimen el fenotipo mutante (Prade y Timberlake, 1993), la pérdida de la función *MedA* puede ser compensada por niveles elevados de *BrlA* (Miller, 1993). Debido a que en las mutantes *medA* los niveles de expresión de *abaA* son muy reducidos, se ha propuesto que *MedA* y *BrlA* se requieren para inducir la transcripción normal de *abaA*, y que la pérdida de la función de *medA* afecta el circuito regulatorio que existe entre *AbaA* y la transcripción de *brlA* (Fig. 3; Aguirre, 1993; Miller, 1993; Timberlake, 1993).

Señales ambientales que regulan la expresión de *brlA*.

Poco se sabe de los factores que inducen a las células vegetativas a comprometerse a la vía de conidiación, y en particular las señales primarias que

activan a *brlA* (Yager, 1992). De las señales que pudieran controlar el inicio de la conidiación como son; limitación de nutrientes, pH, tensión de oxígeno, etc., sólo dos se han caracterizado parcialmente: el efecto de la luz y el de las señales hormonales (Timberlake, 1991; Timberlake 1993).

La luz tiene un efecto notable sobre la conidiación, ya que las cepas silvestres de *A. nidulans* producen colonias con pocos conidioforos cuando se cultivan en la obscuridad, mientras que conidian profusamente cuando se les expone a luz blanca. La conidiación inducida por luz depende del gene *veA* (terciopelo) cuya mutación permite la esporulación en la obscuridad (Kafer, 1965). El gene *veA* codifica a un regulador controlado por un fotoreceptor que se activa por luz roja durante un periodo fotosensible (las primeras cinco horas después de haber inducido el micelio a esporular exponiendolo al aire), y cuya activación puede ser revertida por luz rojo-lejano, efecto reminicente del mediado por los fitocromos en plantas (Pratt, 1982; Chroy, *et al*, 1989). Se ha propuesto que el producto génico de *veA* es un regulador negativo que afecta a un represor de los genes de la esporulación, incluyendo posiblemente a *brlA* (Fig. 3; Mooney y Yager, 1990; Mooney, *et al*, 1990).

Se han descrito en *A. nidulans* tres factores químicos muy relacionados que influncian la desición de las células en tomar la vía de la esporulación sexual o asexual, y que actuan como hormonas o morfógenos. Estas hormonas o inductores sexuales precoces (PSI: precocious sexual inducers) son derivados del ácido linoleico y son interconvertibles unos en otros. PsiC (ácido 5,8 dihidroxilinoico, muy similar al leucotrieno B4) es una hormona que inhibe fuertemente la conidiación y estimula la reproducción sexual, mientras que PsiA (la δ -lactona de PsiC) estimula la conidiación e inhibe la reproducción sexual (Champe, *et al*, 1987; Mazur, *et al*, 1990). Se ha

propuesto que PsiA se produce en la periferia de la colonia induciendo la conidiación, y que lentamente se convierte en PsiC a través de un intermediario PsiB poco activo, inhibiéndose la conidiación e induciéndose la reproducción sexual (Champe y Simon, 1992). Este modelo pudiera explicar el control spatiotemporal del crecimiento vegetativo, la reproducción

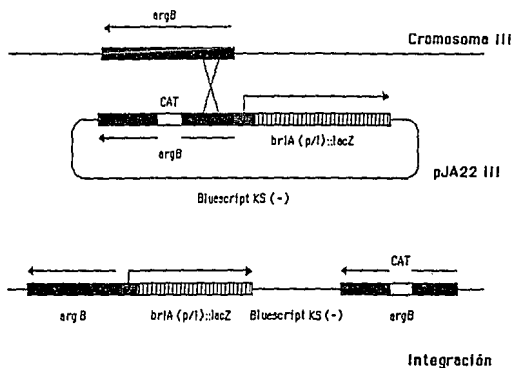


Figura 5. Integración de la fusión genica *pbrlA::lacZ* en el gen *argB* de la cepa TJA22.

Estructura del plásmido pJA22 integrado en el gen de *argB* en el cromosoma III de *A. nidulans*. La secuencia del promotor de *brlA* se indica por la caja gris, la secuencia de *lacZ* por una caja con rayas verticales, *argB* por la caja negra. La dirección de los transcritos se indica por las flechas. Las secuencias de Bluescript y CAT (cloranfenicol acetil transferasa) están indicadas en la figura.

asexual y sexual en la colonia; pero aún falta conocer los mecanismos moleculares de su acción y de si PsiA o PsiC afectan los patrones de expresión de *brlA* (Timberlake, 1991; Champe y Simon, 1992).

El estudio del efecto de otras señales ambientales en *A. nidulans* (por ejemplo: limitación nutricional, pH, presión osmótica) se reduce a unos cuantos reportes: uno sobre un microciclo de conidiación inducido por baja glucosa (Crebelli y Bandiera, 1982), y otros más sobre esporulación de *A. nidulans* en cultivo líquido (Saxena y Sinha, 1973; Martinelli, 1976), estudios han sido ignorados ya que la esporulación en *A. nidulans* es típicamente inducido en medio sólido por exposición al aire (Morton, 1961).

Debido a que los mecanismos que controlan la adquisición de la competencia no han podido ser identificados (Axelrod, 1972; Axelrod, *et al*, 1973; Champe, *et al*, 1981), y de que se requiere una fase aerea para inducir la esporulación (Morton, 1961; Axelrod, 1972; Timberlake, 1980), algunos grupos han sugerido, que la conidiación se encuentra predeterminada en un "programa de eventos" dentro del ciclo celular, cuya respuesta no se ve influenciada por condiciones ambientales (Pastushok y Axelrod, 1976; Adams, *et al*, 1992; Lee y Adams, 1994), por lo que se carece de información sobre condiciones ambientales específicas pudieran regular la expresión del gene *brlA* y al inicio de la conidiación.

A. nidulans es el hongo filamentoso en el que mejor se entiende la conidiación, y sin embargo, no se conocen las señales y mecanismos que disparan este proceso. Los diversos estudios sobre la inducción de la esporulación en otros hongos filamentosos tales como; *Aspergillus niger*, *Giberella fujikuroi*, *Penicillium chrysogenum*, han demostrado que las señales ambientales juegan un papel fundamental en la inducción de la esporulación

(Morton, 1961; Vézina, *et al.*, 1965; Galbraith y Smith, 1969). Es por esto que se ha decidido estudiar el efecto que el medio ambiente pudiera tener sobre el inicio de la esporulación y la regulación del gene *brlA* en *A. nidulans*.

Objetivos.

La expresión del gene *brlA* en *A. nidulans* juega el papel principal en el cambio del crecimiento vegetativo a la reproducción asexual (Fig. 3). Aproximadamente la mitad de la inducción de *brlA* es *BrlA* independiente (Aguirre, 1993) y pudiera estar controlada por señales ambientales. La atención principal se ha situado en comprender los mecanismos que conducen a la elaboración del conidióforo, y se ha tenido poco interés en las señales que disparan el proceso de esporulación. Para completar el modelo de regulación con el que actualmente se cuenta, resulta conveniente incluir el tipo de señales externas que regulan el proceso, principalmente las que activan y regulan al gene *brlA*.

Debido a las limitaciones que presentan las técnicas actuales de conidiación en medio sólido, nos propusimos los siguientes objetivos:

- a) Definir las condiciones experimentales que nos permitieran inducir la esporulación de *A. nidulans* en cultivo líquido y evaluar el efecto de diversas señales ambientales sobre la expresión de *brlA*.
- b) Evaluar los efectos del stress nutricional, particularmente la privación de carbono y nitrógeno, sobre la expresión del gene *brlA* y la esporulación.
- c) Estudiar el efecto que distintas proteínas regulatorias tales como *CreA* (repressor del catabolismo de carbono) y *AreA* (activador del metabolismo) tienen sobre la inducción de *brlA*.
- d) Analizar la posibilidad de obtener mutantes con expresión prematura del gene *brlA* (esporulación precoz), en cultivos líquidos.

Para poder realizar un seguimiento de la inducción del gene *brlA*, se decidió emplear la construcción entre el promotor del gene *brlA* fusionado al gene *lacZ* de *E. coli* como marcador de expresión genética (Fig. 5), lo que nos permitiría analizar los niveles de expresión de *brlA* cuantificando la actividad de β -galactosidasa.

Materiales y Métodos.

Análisis genético y cepas empleadas de *Aspergillus nidulans*.

Los genotipos de las cepas de *A. nidulans* que se utilizaron en este trabajo se muestran en la tabla I, y la relación marcadores genéticos-fenotipo se encuentra en la tabla II. Se emplearon procedimientos genéticos estándar para cruzar las cepas y obtener la progenie requerida (Pontecorvo, *et al*, 1953; Clutterbuck, 1974). La cruce de las cepas se efectuó inoculando las cepas padres (que posean marcadores genéticos complementarios) de manera proximal, en medio mínimo sólido suplementado con todos los requerimientos. Después de que las cepas crecieron, se cortó un fragmento de micelio de la región donde ambas cepas se juntan y se transfirió a medio mínimo sólido que carecía de suplementos, donde sólo los heterocariontes son capaces de crecer. De las zonas de las cuales hay conidiación, se colectaron las esporas y se plaquearon empleando la técnica de vaciado en placa en medio mínimo sin suplementos y se recuperaron colonias diploides. Una vez colectadas las esporas se rodeó la caja con Masking tape para reducir la tensión de oxígeno, y las cajas se continuaron incubando hasta observar la formación de cleistotecios. Se recuperaron los cleistotecios grandes (los pequeños son el resultado de una autocruza), y se limpiaron de restos de micelio rodándolos en medio sólido. Posteriormente se transfirió cada cleistotecio a un tubo Eppendorf en donde se rompió apretándolo contra las paredes del tubo, y las ascosporas se resuspendieron en 200 μ l de agua estéril.

Para efectuar el análisis de los productos de la cruce sexual, se plaquearon 20 μ l de la solución de ascosporas por caja de Petri con medio

mínimo sólido suplementado con los requerimientos de las cepas padres. Una vez recuperada la progenie, se transfirieron las esporas de las colonias a una caja maestra que poseía todos los requerimientos, y de la cual se replicaron las colonias a los medios que nos permitían identificar los marcadores genéticos.

Tabla I. Cepas de *Aspergillus nidulans* empleadas en este trabajo.

Cepas empleadas	Genotipo	Origen
PW1	<i>biA1, argB2, metG1, veA1.</i>	P. Weglenski
MH440	<i>yA1, suAadE20, adE20, ripoB2, areA217, creA204, veA1.</i>	M.J. Hynes
TJA22	<i>brlA(-2900 p/l)::lacZ (argB⁻::argB::CAT), biA1, metG1, veA1.</i>	J. Aguirre
TJA16	<i>brlA(-885 p/l)::lacZ (argB⁻::argB::CAT), biA1, metG1, veA1.</i>	J. Aguirre
TJA12	<i>brlA(-413 p/l)::lacZ (argB⁻::argB::CAT), biA1, metG1, veA1.</i>	J. Aguirre
A242	<i>biA1, pacC5, veA1.</i>	FGSC
A283	<i>suAadE20, yA2, adE50; acrA1; galA1; pyroA4; facA303; sB3; nicB8; ripoB2, veA1.</i>	FGSC
A456	<i>proA1, yA2; galE9, adl50, methH2, dilA1; veA1.</i>	FGSC
A516	<i>galE9, meaB6, adl50, actA1; veA1; chaA1, sE15, nirA15.</i>	FGSC

Cepas empleadas	Genotipo	Origen
CPG1	<i>brlA(-2900 p/l)::lacZ (argB+::argB::CAT), biA1, metG1, riboB2, creA204, veA1.</i>	TJA22 x MH440
CPG3	<i>biA1, metG1, riboB2, creA204, veA1.</i>	TJA22 x MH440
CPG5	<i>brlA(-2900 p/l)::lacZ (argB+::argB::CAT), biA1, metG1, riboB2, areA217, veA1.</i>	TJA22 x MH440
CPG8	<i>biA1, metG1, riboB2, areA217, veA1.</i>	TJA22 x MH440
CIS9	<i>brlA(-2900 p/l)::lacZ (argB+::argB::CAT), biA1, metG1, veA1, cis9.</i>	Mutagenesis u.v. TJA22 (este trabajo)
CIS10	<i>brlA(-2900 p/l)::lacZ (argB+::argB::CAT), biA1, metG1, veA1, cis10.</i>	Mutagenesis u.v. TJA22 (este trabajo)
CIS13	<i>brlA(-2900 p/l)::lacZ (argB+::argB::CAT), biA1, metG1, veA1, cis13.</i>	Mutagenesis u.v. TJA22 (este trabajo)
CIS17	<i>brlA(-2900 p/l)::lacZ (argB+::argB::CAT), biA1, metG1, veA1, cis17.</i>	Mutagenesis u.v. TJA22 (este trabajo)
CIS18	<i>brlA(-2900 p/l)::lacZ (argB+::argB::CAT), biA1, metG1, veA1, cis18.</i>	Mutagenesis u.v. TJA22 (este trabajo)
CIS19	<i>brlA(-2900 p/l)::lacZ (argB+::argB::CAT), biA1, metG1, veA1, cis19.</i>	Mutagenesis u.v. TJA22 (este trabajo)

El medio de selección de las mutantes *creA* contenía alcohol alílico 1 mM y el medio de selección para las mutantes *areA* contenía nitrato de sodio en lugar de cloruro de amonio (Arst y Cove, 1973). Para identificar

las colonias que poseían la fusión *pbrlA α / β :lacZ*, estas se dejaron crecer hasta que conidiaran y entonces se permeabilizaron con vapores de cloroformo durante 30 minutos para después inundar la caja con Buffer fosfatos 50 mM, pH 7.5 con 0.02% peso/volumen del colorante X-gal. La formación de un precipitado azul en la colonia revelaba la presencia de actividad de β -galactosidasa (Aguirre, *et al*, 1990). Para la detección de las colonias mutantes en el gene *pacC5*, estas se crecieron durante 24 horas en medio mínimo sólido sin fosfatos y después, las cajas se inundaron con Buffer de acetato 0.6 M, pH 4.8 con 0.5 mg/ml de α -naftil fosfato de sodio y 5 mg/ml de la sal G.B.C. Granate rápido (Fast Garnet G.B.C. salt, Sigma Co. St. Louis, MO, E.U.), donde en las colonias mutantes no se forma un precipitado café resultado de la reacción del α -naftol liberado por las fosfatasas, acoplado al colorante azo (Dorn, 1965). Para la detección de proteasa extracelular, las cepas se crecieron en medio con y sin fuente de nitrógeno (nitrato, nunca amonio) suplementado con 1% de leche descremada (skim milk), donde las colonias que poseen proteasa extracelular degradan la leche y forman un halo.

Tabla II. Relación entre los marcadores genéticos de las cepas empleadas y el fenotipo que presentan.

Genotipo	Fenotipo
<i>acrA1</i>	resistencia a acriflavina
<i>actA1</i>	resistencia a cicloheximida
<i>adE20</i>	requerimiento de adenina
<i>adI50</i>	requerimiento de adenina
<i>areA217</i>	mutación en el activador de los genes del metabolismo de nitrógeno (incapacidad de crecer en nitrato)
<i>argB2</i>	requerimiento de arginina

Genotipo	Fenotipo
<i>biA1</i>	requerimiento de biotina
<i>chaA1</i>	conidias de color amarillo-verdoso (Chartreuse)
<i>creA204</i>	mutación en el represor de los genes del metabolismo de carbono (tiene desreprimida el gene de la alcohol deshidrogenasa)
<i>dilA1</i>	conidias de color diluido
<i>facA303</i>	resistencia a fluoroacetato e incapacidad de emplear el acetato como única fuente de carbono (acetil-CoA sintetasa)
<i>galA1</i>	incapacidad de crecer en galactosa como única fuente de carbono (regulador de las enzimas galactocinasa y galactosa-1-P-uridil transferasa).
<i>galE9</i>	incapacidad de crecer en galactosa como única fuente de carbono
<i>meaH2</i>	resistencia a metilamonio
<i>metG1</i>	requerimiento de metionina
<i>methH2</i>	requerimiento de metionina
<i>nicB8</i>	requerimiento de nicotinamida
<i>nirA15</i>	imposibilidad de utilizar nitrito y nitrato como fuente de nitrógeno (regulador de la nitrito y nitrato reductasa)
<i>pacC5</i>	mutación en el regulador de la expresión de los genes regulados por el pHi, no sintetiza fosfatasa ácida
<i>proA1</i>	requerimiento de prolina
<i>pyroA4</i>	requerimiento de piridoxina
<i>riboB2</i>	requerimiento de riboflavina
<i>sB3</i>	requerimiento de azufre reducido como el tiosulfato o metionina, (transportador de azufre)
<i>sE15</i>	requerimiento de azufre reducido como el tiosulfato o metionina, (PAPS reductasa).
<i>suAadE50</i>	supresor del requerimiento de adenina adE50
<i>veA1</i>	mutación que le da una apariencia tersa a las colonias (velvet), elimina el requerimiento de luz para esporular
<i>yA1</i>	conidias amarillas (fenol oxidasa)

La asignación de los genes definidos por mutantes nuevas a alguno de los 8 cromosomas de *A. nidulans*, se realizó recurriendo al empleo de cepas maestras con marcadores en cada uno de los cromosomas (por ejemplo, la cepa A286) y al ciclo parasexual del microorganismo (Fig. 1). Una vez obtenidos los diploides de la cepa maestra y la cepa cuya mutación queremos asignar a un cromosoma, se procedió a haploidizar al diploide. La haploidización se realizó en medio mínimo sólido suplementado con los requerimientos de las cepas padres, y al cual se le adicionaron entre 70 y 100 mg/ml del inhibidor de microtubulos *p*-fluoro-fenilalanina. Las conidias se inocularon mediante un palillo en un punto en el centro de la caja y se incubaron aproximadamente una o dos semanas. En ese lapso de tiempo se observó la formación de distintos sectores en la colonia. Estos sectores son regiones donde ha habido pérdida de algunos cromosomas, lo que le permite al micelio crecer de manera más vigorosa que el resto de la colonia. Se recuperaron las conidias de cada uno de los sectores de la periferia de la colonia y se analizó la progenie de manera similar a la progenie obtenida de una cruce sexual (McKully y Forbes, 1965).

Cultivos líquidos de *Aspergillus nidulans*.

Los cultivos en medio líquido de *A. nidulans* se realizaron en matraces Erlenmeyer manteniendo un volumen de medio de 1/5 del volumen del matraz (por ejemplo, 50 ml. de medio en un matraz de 250 ml.). El medio de cultivo empleado es el descrito por Käfer (Käfer, 1977) suplementado con los requerimientos apropiados.

La solución de esporas empleada para inocular los cultivos líquidos se obtuvo de cajas con medio mínimo sólido que se inoculó a confluencia y que se

dejó crecer durante 5 días a 37°C. Las esporas se colectaron raspando las cajas con una asa de metal y una solución de Tween 80 al 0.01% estéril. La suspensión de esporas se centrifugó y se lavó 5 veces con la misma solución, resuspendiendo las esporas después del último lavado en agua destilada estéril. Para cuantificar la concentración de esporas, se tomó una alícuota de la suspensión de esporas y se diluyó 100 veces. Las esporas se contaron en un hemocitómetro siguiendo un patrón en forma de X, leyendo los cuadros de las esquinas y el cuadro central. Para obtener el número de esporas, el número obtenido se dividió por el número de cuadros empleados para contar y se multiplicó por el factor de dilución, por 25 y por un factor de 1×10^4 (esporas/ml = [# esporas+5] \times 25 \times [dilución] \times 1×10^4). Los matraces se inocularon a una densidad de 5×10^5 esporas/ml.

El precultivo se realizaba generalmente en matraces de 2 litros con 400 ml de medio de cultivo durante 18 horas a 37°C y 300 r.p.m. La transferencia de micelio se realizó tomando alícuotas de 50 ml. del precultivo, las cuales se filtraron por Miracloth (Calbiochem) estéril y se lavó con 1 volumen de agua destilada estéril (50 ml) y 2 volúmenes de medio mínimo (100 ml) suplementado carente de glucosa y/o de nitrógeno (precalentado a 37°C). Posteriormente el micelio se transfirió con una espátula estéril al nuevo medio de cultivo y la incubación se prosigió a 37°C y 300 r.p.m.

A distintos tiempos, las muestras se colectaron filtrando todo el cultivo de 50 ml. por Miracloth (Calbiochem), se eliminó el exceso de líquido empleando papel absorbente e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras se conservaron a -70°C hasta que se liofilizaron empleando vacío en un Speed-Vac (Savant) durante 4.5 horas. Las muestras liofilizadas se molieron ya sea manualmente con una espátula, o con un triturador de tejidos eléctrico, sin que esto afectara a las muestras o la

reproducibilidad de los experimentos. Las muestras secas molidas se guardaron a -70°C hasta ser utilizadas para diversas determinaciones. También se colectaron muestras del medio de cultivo para determinaciones de glucosa, nitrato, pH, etc., y muestras de micelio para observaciones en el microscopio. Para colectar las esporas producidas durante el cultivo, el medio filtrado se centrifugo, y las esporas se resuspendieron en 500 μl de agua destilada esteril. De manera alternativa, y para evitar los riesgos de concentrar las esporas al centrifugarlas, se tomo 1 ml del medio de cultivo sin pellets. Las esporas se contaron empleando el hemocitómetro.

Microscopia.

A las muestras de micelio de las diferentes condiciones de cultivo se le añadió glicerol para llevarlo a una concentración final del 20% volumen a volumen, y se almacenaron a -20°C . Estas muestras se emplearon para realizar inspecciones bajo el microscopio y verificar la formación de estructuras conidiogénicas y la producción de esporas.

El conteo de esporas se realizó empleando un hemocitómetro y diluyendo las esporas a una concentración adecuada, como ya se describió.

Se empleó un microscopio de marca Carl Zeiss con microscopia de contraste de fases. La fotografía se realizo empleando un filtro verde y rollo fotográfico Kodak Tri-X-Pan 400. Los aumentos se indican en el pie de cada figura.

Determinación de la actividad específica de β -galactosidasa.

La determinación de β -galactosidasa se realizó siguiendo el protocolo de Miller (Miller, 1972). Este método se basa en la hidrólisis del compuesto orntonitrofenil- β -D-galactopiranososa (ONPG) por la β -galactosidasa, liberando en el proceso el compuesto cromogénico orntonitrofenol, cuya concentración se puede determinar espectrofotométricamente.

Soluciones:

Buffer de extracción	Buffer de Fosfatos 0.2 M, pH 7. Cloruro de Potasio 20 mM. EDTA 1 mM.
Buffer Z	Buffer de Fosfatos 0.1 M, pH 7. Cloruro de Potasio 10 mM. Sulfato de Magnesio 1 mM. β -mercaptoetanol 25 mM.
Buffer de paro	Bicarbonato de sodio (Na_2CO_3) 1 M.
Solución ONPG (4 mg/ml)	Orntonitrofenil- β -D-galactopiranososa 200 mg. Buffer Z 50 ml.
Reactivo de Bradford	Bio-Rad Protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).

1. Resuspender las muestras liofilizadas y molidas de micelio (aproximadamente el volumen del polvo no debe pasar de la línea de 500

μl de un tubo Eppendorff de 1.5 ó 2 ml) en 1 ml de Buffer de extracción a 4°C. Ayudarse con un palillo y con el vortex.

2. Mantener los extractos cuando menos durante 1 hora en hielo con agitación ocasional para resuspender las proteínas.
3. Centrifugar las muestras a 4°C y 10,000 r.p.m. durante 15 minutos.
4. Correr las siguientes reacciones a 30°C empleando los extractos de las proteínas resuspendidas.
5. Preparar los siguientes tubos por cada muestra de extracto:

Tubo 1.	0 minutos de tiempo de reacción
Tubo 2.	2.5 o 5 minutos de tiempo de reacción
Tubo 3.	5 o 10 minutos de tiempo de reacción

Utilizar 2.5 y 5 minutos como tiempo de reacción cuando la concentración de enzima es muy alta, de lo contrario, emplear los tiempos más largos de 5 y 10 minutos.

6. Al tubo que va a servir de fondo durante cada reacción (0 minutos de reacción) se adicionan las siguientes soluciones en el orden indicado:

720 μl	Buffer Z
500 μl	Buffer de paro
50 μl	Extracto
160 μl	Solución de ONPG

7. Para cada tubo donde se efectuaran las reacciones mezclar:

720 μl	Buffer Z
50 μl	Extracto

8. Para iniciar las reacciones agregar 160 μl de la solución de ONPG e inmediatamente mezclar e incubar a 30°C. Correr las reacciones iniciando primero los tiempos largos y después los tiempos cortos.
9. Parar las reacciones agregando 500 μl de Buffer de paro, comenzando con los tiempos cortos y después los tiempos largos. La reacción no se detiene totalmente al añadir el Buffer de paro, y aunque el tubo de fondo es un control adecuado, no es conveniente guardar las reacciones por tiempos prolongados (>1 hr.) antes de ser leídas en el espectrofotómetro.
10. Preparar los tubos del blanco (fondo) mezclando:

770 μl	Buffer Z
500 μl	Buffer de paro
160 μl	Solución de ONPG
11. Leer las muestras a 420 n.m. usando el blanco (tubo de fondo el cual no tiene extracto de proteína) para calibrar el espectrofotómetro en cero. Leer los tubos de fondo (0 minutos de reacción) y los tubos de los dos tiempos de reacción de cada extracto.
12. Para medir la proteína soluble diluir 50 μl del extracto en 950 μl de agua (dilución de 20 veces), y de esta dilución tomar 25 μl y llevarlos a 800 μl con agua.
13. Agregar a la segunda dilución de la muestra 200 μl del reactivo de Bradford y mezclar (la segunda dilución es de 40 veces).
14. Leer las muestras a 595 n.m. y comparar las lecturas contra una curva patrón de albumina, cuyo rango abarque de 0 a 16 mg/ml de proteína. Las concentraciones recomendadas para hacer la curva son: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 mg/ml de proteína a partir de una solución stock de

- 1 mg/ml de albumina. Calcular la proteína por 50 μ l de extracto multiplicando la concentración reportada por el espectrofotómetro por la dilución (40 veces) entre 1000 ([reportada] \times 40 + 1000).
15. Obtener la diferencia de densidad óptica por minuto de las reacciones restando el valor del primer tiempo de reacción (2.5 o 5 minutos) menos el valor del fondo observado, y el resultado dividirlo por el tiempo (2.5 o 5 minutos dependiendo del caso).
 16. Dividir el valor obtenido de la diferencia de densidad óptica por minuto (Δ OD/min) entre la concentración de proteína en 50 μ l.
 17. Obtener las unidades de actividad específica de β -galactosidasa dividiendo el resultado anterior (Δ OD/min/proteína en 50 μ l) entre un factor de corrección 0.0045 .

Determinación de glucosa.

La cuantificación de glucosa se realizó empleando el Kit de determinación de glucosa de Sigma (St. Louis, MO, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Este método hace uso simultáneo de la glucosa oxidasa y de la peroxidasa. La glucosa oxidasa en presencia de glucosa genera peróxido de hidrógeno que la peroxidasa emplea para oxidar un compuesto cromogénico. El desarrollo de color es proporcional a la cantidad de glucosa, y la cuantificación se realiza espectrofotométricamente. Este método está basado en el desarrollado por Kenston (Kenston, 1956) modificado por Raabo y Terkildsen (Raabo y Terkildsen, 1960).

Soluciones:

- Solución de Enzimas** Disolver una capsula de enzimas en 100 ml de agua destilada. Esta solución contendrá 500 unidades de glucosa oxidasa y 100 unidades de peroxidasa en Buffer.
- Solución de colorante** Disolver todo el colorante (50 mg de cloruro de *o*-dianisidina) en 20 ml de agua destilada.
- Solución Enzimas + colorante** Por cada 100 ml de solución de Enzimas agregar 1.6 ml de solución de colorante.

Cada capsula disuelta en 100 ml de agua destilada sirve para realizar 20 reacciones.

1. Diluir las muestras 200 y 400 veces con agua destilada. Tomar 1 ml de cada una de las muestras diluidas en tubos separados.
2. Agregar 5 ml de la solución de Enzimas + colorante. Mezclar.
3. Incubar las muestras durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad.
4. Leer las muestras a 450 n.m. y comparar las lecturas contra una curva patrón de glucosa, cuyo rango abarque de 0 a 128 mg/ml de glucosa. Las concentraciones recomendadas para hacer la curva son: 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 mg/ml de glucosa a partir de una solución stock de 128 g/ml de glucosa.

Extracción de RNA de *Aspergillus nidulans*.

La extracción de RNA de micelio es un proceso delicado que requiere soluciones tratadas con dietilpircarbonato (DPC), material estéril y uso de guantes. El micelio a utilizar debe de ser manipulado lo menos posible y una vez colectado debe ser congelado inmediatamente en nitrógeno líquido. El siguiente método (Timberlake, 1980) se basa en el uso de fenol ácido para separar el RNA del DNA.

Soluciones:

Solución PAS	Acido <i>p</i> -aminosalicilico de sodio (PAS)	1.2 gr
	Agua tratada con DPC 0.1%	10 ml.
Solución TNS	Acido tri-isopropilnafteno sulfato de sodio (TNS)	0.2 gr.
	Agua tratada con DPC 0.1%	10 ml.
Solución RNB 5x	Tris•HCl	1 M
	NaCl	1.25 M
	EGTA	0.25 M
	pH	8.5
Solución TELS	Tris•HCl	200 mM
	EDTA	2 mM
	SDS	1 %
	pH	7.6
Fenol saturado con agua	GIBCO BRL (Life Technologies, Inc., N.Y., U.S.A.)	
Fenol:Cloroformo	Mezclar un volumen de fenol saturado con agua y un volumen de cloroformo. Mezclar bien y utilizar la fase orgánica.	

Cloruro de Litio 10 M

Agua desionizada tratada con DPC al 0.1 % esteril

Las soluciones se tratan con dietilpirocarbonato (DPC) al 0.1 % y se esterilizan. Si la solución no se puede esterilizar, emplear desde el principio agua tratada con DPC. El material que se utilice debe ser tratado con esta misma agua y de ser posible se esteriliza.

1. A un tubo Eppendorff de 2 ml con aproximadamente 500 μ l de micelio en polvo agregar 600 μ l de la siguiente solución:
 - Para 25 ml: A) Tomar 10 ml de la solución de PAS fresca fría.
 - B) Agregar 10 ml de la solución de TNS fresca fría.
 - C) Agregar 5 ml de la solución de RNB 5x.
 - D) Mezclar hasta obtener una suspensión (pH aprox. 8.9).
2. Resuspender muy bien el micelio. Agregar 500 μ l de Fenol saturado con agua. Agitar de manera vigorosa constantemente y mantener en hielo.
3. Mezclar con vortex para homogeneizar perfectamente. Si es necesario, agregar 300 μ l más de la suspensión PAS/TNS/RNB.
4. Agregar 200 μ l de Cloroformo (300 μ l si se agregaron 300 μ l de más de la suspensión PAS/TNS/RNB) y mezclar muy bien con vortex.
5. Calentar a 68°C durante 5 minutos. Mezclar en el vortex y dejar en hielo. Centrifugar a 10,000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C.
6. Recuperar tanto la fase acuosa y añadir 1 volumen de fenol:cloroformo y mezclar con el vortex durante 1 minuto. Centrifugar las muestras a 10,000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C.

7. Recuperar la fase acuosa y repetir la extracción con el fenol:cloroformo (punto 6) 4 veces más.
8. Recuperar la fase acuosa y extraerla con cloroformo, de la misma manera como se hizo con el fenol:cloroformo.
9. Recuperar la fase acuosa y agregar LiCl 10 M para alcanzar una concentración final de 2 M, tomando 1/5 del volumen de la fase acuosa. Añadirlo cuidadosamente para evitar la formación de precipitados. Si esto ocurre, calentar la muestra a 65°C hasta que entre en solución.
10. Incubar las muestras a 4°C durante toda la noche. Centrifugar las muestras a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
11. Decantar la solución y resuspender el pellet de RNA en 200 µl de agua tratada con DPC al 0.1 %.
12. Añadir 20 µl de LiCl 10 M y 500 µl de etanol. Mezclar e incubar en hielo 20 minutos. Centrifugar las muestras a 10,000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
13. Decantar la solución y lavar el pellet con etanol absoluto.
14. Secar las muestras y resuspender el RNA en 100 µl de TELS. Cuantificar el RNA a 260 n.m. y guardar las muestras a -70°C.

Otras técnicas de biología molecular empleadas en este trabajo.

La electroforesis de RNA se realizó en geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído corriendo las muestras a 60 volts durante 5-6 horas.

Una vez concluida la electroforesis se transfirió el RNA a membranas de nitrocelulosa con soporte de nylon Hybond-N (Amersham, Inglaterra) y se dejó transferir toda la noche (Timberlake, 1980; Sambrook, *et al*, 1989).

Para el marcaje de la sonda con radioactividad se empleo el Kit de Random Priming de GIBCO BRL (Life Technologies Inc., N.Y., U.S.A.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y manteniendo las normas de seguridad adecuadas para el trabajo con radioactividad. Este método consiste en incubar el DNA desnaturalizado con dodecameros (oligómeros de 12 nucleósidos) de DNA de secuencia al azar y nucleótidos (uno de ellos radioactivo) en presencia del fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*, por lo que se sintetizan hebras complementarias del DNA con algunos grupos fosfato radioactivos (Sambrook, *et al*, 1989). La sonda empleada para identificar el gene *brlA* es el fragmento BamHI-EcoRI de 2.5 Kbs del plásmido pBS2.5 (Boylan, *et al*, 1987) y el fragmento pequeño HindIII-HindIII de 1.7 Kbs del plásmido pDGH25 (Gems, *et al*, 1990) se empleo como sonda específica del gene de *argB*. El gene de *argB* se empleo como control para confirmar que se cargo la misma cantidad de RNA en cada carril del gel.

La hibridización de la membrana con la sonda radioactiva se realizó siguiendo un protocolo estandar (Sambrook, *et al*, 1989). La formación de los híbridos entre el RNA y la sonda marcada de DNA se efectuo a una temperatura elevada (65°C) ya que la solución de hibridización no contiene agentes desnaturalizantes como la formamida. La hibridización se llevo a cabo toda la noche y para remover la sonda inespecifica la membrana se lavó en condiciones de alta astringencia. Para desnudar la membrana para volver a utilizarla, ésta se incubo con agua destilada con 0.1% de SDS y se hirvió durante 4 minutos en el horno de microondas. Para las autoradiografías se empleo película X-OMAT AR de Kodak que se expuso a la membrana durante

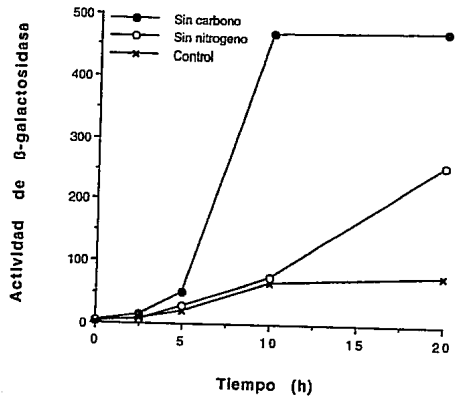
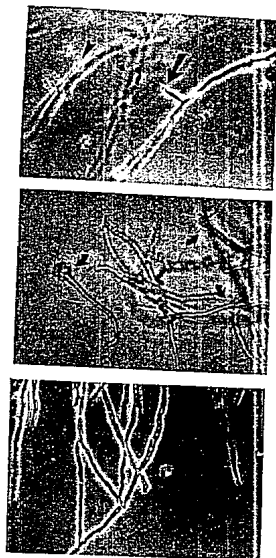
periodos de entre 5 horas a 6 días dependiendo de lo caliente que estuviera la señal radioactiva.

Resultados y Discusión.

La privación de carbono o nitrógeno inducen la expresión del gene *brlA* a distintos niveles, causando distintos patrones de esporulación.

Generalmente la esporulación en *A. nidulans* es inducida exponiendo el micelio a una fase aerea, en medio solido. Este método de inducción dificulta los estudio de los efecto que el medio externo pudiera tener sobre el inicio de la conidiación. Sin embargo, son pocos los reportes en donde se ha estudiado la esporulación de *A. nidulans* en cultivos sumergidos (Saxena y Sinha, 1973; Martinelli, 1976). Esos experimentos han sido ignorados debido a que los experimentos no se describieron con suficiente detalle (Saxena y Sinha, 1973) o las condiciones experimentales empleadas arrojan resultados dudosos, que no excluyen la esporulación en interfase aerea, ya que se empleo un radio aire/liquido elevado de 1/12.5 (Martinelli, 1976). Debido a que la optimización de un medio de cultivo quedaba fuera de los objetivos del trabajo, se decidió emplear el medio minimo de Käfer (Käfer, 1977) conservando radios aire/liquido de 1/5 de medio de cultivo con respecto al volumen del matraz, para investigar el efecto que la privación de nitrógeno o de carbono pudieran tienen sobre la inducción del gene *brlA*.

Se empleó la cepa TJA22 la cual contiene una copia única del promotor de *brlA α ' β* fusionado al gene reportero *lacZ* de *E. coli* (*pbrlA α ' β ::lacZ*) integrada en el gene de *argB* (Fig. 5). La cepa se creció en medio líquido durante 18 horas a 37°C y 300 r.p.m., y el micelio resultante se transfirió a medios carentes de glucosa, nitrato o a un medio mínimo estandar (control).

A**B**

Se colectaron muestras a distintos tiempos, utilizando un matraz por muestra, las cuales se procesaron para determinar la actividad de β -galactosidasa, para extraer RNA y para examinar el micelio bajo el microscopio. La figura 6A muestra la actividad de β -galactosidasa. Se puede observar que tanto la limitación de glucosa como la limitación de nitrógeno indujeron la expresión de la fusión *pbrlA α / β ::lacZ*, sin embargo la limitación de glucosa indujo al gene *brlA* de manera más rápida y a niveles más elevados que la limitación de nitrógeno. Cuando el cambio se realizó al medio control, sólo se produjo un ligero incremento en la actividad de β -galactosidasa a las 20 horas. La actividad específica de la β -galactosidasa endógena fué menor a 10 unidades.

Figura 6. Inducción de *brlA* por privación de glucosa o nitrato en cultivos líquidos.

(A) Acumulación de β -galactosidasa en la cepa TJA22 crecida en medio mínimo con 1% de glucosa y 70 mM de NaNO_3 durante 18 horas y transferida a medios sin glucosa, sin nitrato o medio mínimo estandar, como se describe en materiales y métodos. La incubación se continuó bajo las mismas condiciones y el micelio de cultivos completos se congeló y liofilizó a los tiempos indicados. Parte de las muestras se procesaron para determinar la actividad de β -galactosidasa, siendo que la actividad específica corresponde a U mg proteína⁻¹ (Miller, 1972). Cada punto es el promedio de cuando menos dos experimentos independientes, siendo el porcentaje de variación menor al 15%.

(B) Morfología de los conidióforos 20 horas después del cambio del micelio a los medios sin glucosa (panel superior), sin nitrato (panel intermedio) o a medio mínimo estandar (panel inferior). La flecha grade en el panel superior indica un conidióforo reducido típico, y las puntas de flechas indican esporas libres. Las flechas cortas en el panel intermedio indican conidióforos complejos. En el panel inferior se muestran hifas no diferenciadas. Amplificación: 400x.

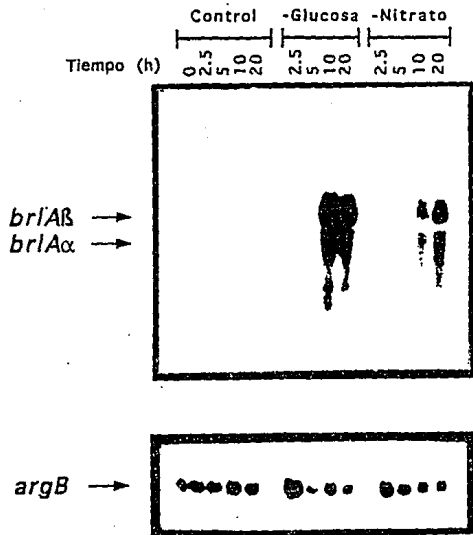


Figura 7. Acumulación de los mensajes de *brlAα* y *brlAβ* inducidos por privación de glucosa o nitrógeno.

El RNA mensajero total se aisló de una parte de las muestras procesadas en la figura 6. El RNA se analizó en un Northern blot y se hibridizó con una sonda específica para *brlAα/β*. Los carriles corresponden a los distintos tiempos después del cambio del micelio a los distintos medios indicados. El tiempo cero corresponde a un crecimiento de 18 horas en el medio mínimo estandar. La confirmación de que se cargó en todos los carriles la misma cantidad de RNA se realizó desnudando la membrana y rehibridizandola con una sonda específica para el gene de *argB*.

En ambas condiciones de privación se generaron conidiofóforos en medio líquidos, pero con morfologías muy distintas. En el medio carente de carbono se produjeron conidiofóforos muy reducidos con esporas en la punta (Fig. 6B, panel superior), morfología semejante a la que se genera cuando se induce al gene *brlA α* o *brlA β* a partir del promotor de la alcohol deshidrogenasa (Adams, *et al*, 1988; Han, *et al*, 1993). En cambio, los conidiofóforos producidos en el medio carente de nitrógeno fueron muy elaborados (Fig. 6B, panel intermedio) y se asemejan a los generados en una interfase aérea. En el control no se observó ninguna señal de esporulación (Fig. 6B, panel inferior).

Las distintas morfologías observadas podrían deberse a la expresión diferencial de cualquiera de los transcritos de *brlA* (α o β), por lo que decidimos analizar los RNA mensajeros en un "Northern blot". Este análisis reveló que la acumulación de ambos transcritos era paralela a la actividad de β -galactosidasa reportada por la fusión, y no se observó ninguna diferencia salvo la cuantitativa (Fig. 7). Análisis densitométrico de la figura 7 mostró que la proporción de los transcritos *brlA α /brlA β* era alrededor de 1.4 en todos los casos (*brlA β* es más abundante que *brlA α* , Prade y Timberlake, 1993).

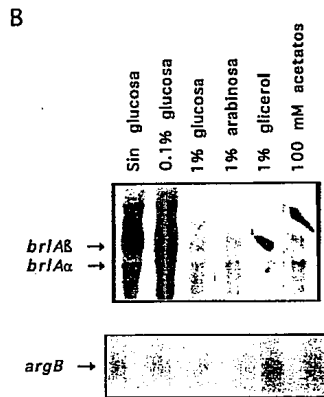
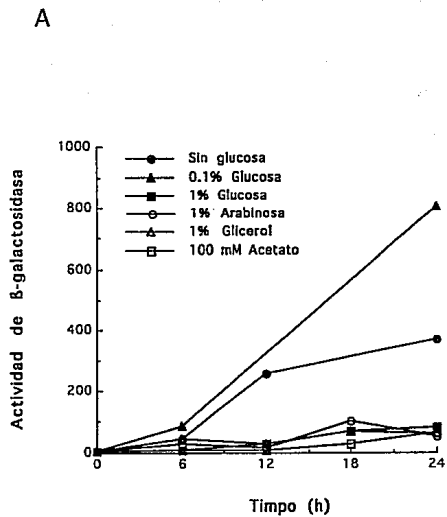
Estos resultados muestran que: a) Tanto el gene *brlA* como la esporulación pueden ser inducidas en cultivos líquidos de composición definida, y que la inducción del gene *brlA* puede ser monitoreada a través de cuantificar la actividad de β -galactosidasa proveniente del gene reportero *brlA α / β ::lacZ*. b) La privación de carbono o nitrógeno son capaces de inducir al gene *brlA* a distintos niveles. c) Los niveles de expresión del gene *brlA* (tanto α como β) correlacionan inversamente con la complejidad del conidioforo generado. Creemos que el empleo de esta metodología puede ser una herramienta experimental muy útil para realizar estudios sobre el inicio de la esporulación,

ya que el medio de cultivo líquido ofrece un ambiente homogéneo que permite modificar y medir los retos ambientales a los que el hongo puede ser sometido. Es necesario enfatizar que aunque la esporulación asexual se comprende mucho mejor en *A. nidulans* que en cualquier otro hongo filamentoso, la esporulación sumergida ha sido considerada rara o inexistente, y se ha pensado que los factores nutricionales no juegan ningún papel en el inicio de la conidiación (Adams, *et al*, 1988; Adams, *et al*, 1992; Han, *et al*, 1993; Lee y Adams, 1994).

El hecho de que los distintos grados morfológicos alcanzados por el conidioforo correlacionen con la tasa de inducción del gene *brlA* y no con la acumulación preferencial de un transcrito sobre otro (α sobre β o al revés), sugiere que los distintos tipos celulares del conidioforo son el resultado de un incremento gradual en la dosis de la proteína *BrlA*. La dosis menor correspondería a la formación de vesículas y la mayor a la de las filides y esporas. Esta propuesta será elaborada en la siguiente sección.

Efecto de distintas fuentes de carbono sobre la expresión de *brlA* y la esporulación.

Para comprender mejor el efecto represivo de la glucosa sobre la expresión del gene *brlA*, se decidió estudiar el efecto de fuentes de carbono caracterizadas como no represivas (arabinosa, glicerol y acetato, McCullough, *et al*, 1977) sobre la inducción de este gene. Para este efecto, se creció la cepa TJA22 como en el experimento anterior y se transfirió el micelio a medios que contenían 0, 0.1 y 1% de glucosa, 1% de arabinosa, 1% de glicerol o 100 mM de acetatos. Se colectaron muestras de estas condiciones utilizando un matraz por tiempo, que se procesaron para determinar la actividad



de β -galactosidasa (Fig. 8A), estudiar la morfología (Fig. 9) y cuantificar el número de esporas generadas (Tabla III). 24 horas después del cambio del micelio a los distintos de medios, los niveles de β -galactosidasa alcanzados en los cultivos que conterían 0.1% de glucosa fueron los más elevados, seguido por el medio que carecía completamente de fuente de carbono. Los medios con 1% de arabinosa, 1% de glicerol o 100 mM acetatos presentaron niveles bajos de expresión de *brlA α :lacZ*, similares a los alcanzados en el medio control (medio mínimo con 1% de glucosa). Debido a que la expresión de *brlA* no se desreprimió cuando el micelio se transfirió a los medios que contenían fuentes de carbono no represoras (arabinosa, glicerol y acetato), es poco probable que la inducción de *brlA* por

Figura 8. Expresión del gene *brlA* en cultivos sumergidos con distintas fuentes de carbono tanto represoras como no represoras.

(A) La cepa TJA22 se creció durante 18 horas en medio mínimo con 1% de glucosa y 70 mM de NaNO₃, y a este tiempo se transfirió el micelio a distintos medios que contenían las fuentes de carbono indicadas. Se tomaron muestras de micelio utilizando un matraz por tiempo y las muestras se procesaron para determinar la actividad de β -galactosidasa. Cada punto corresponde al promedio de cuando menos dos experimentos independientes, con un porcentaje de variación no mayor al 16%.

(B) El RNA mensajero se aisló de las muestras cosechadas 24 horas después del cambio del micelio a los medios con las distintas fuentes de carbono, indicadas en la parte superior. El RNA se sometió a un análisis por Northern blot usando una sonda específica para *brlA α :lacZ*. Se confirmó que en cada carril se cargo una cantidad de RNA equivalente desnudando la membrana y rehibridizandola con una sonda específica para *argB*.

Tabla III

Producción de esporas y variación del pH externo después del cambio del micelio a distintas fuentes de carbono.

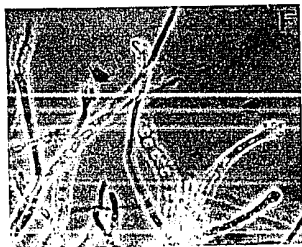
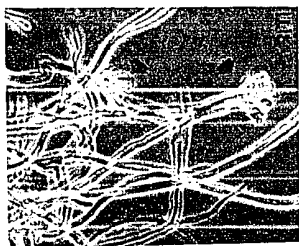
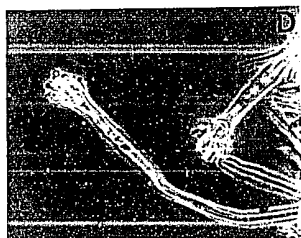
Fuente de carbono	Esporas/cultivo ($\times 10^3$)	pH (6 h)	pH (24 h)
Sin glucosa	50 000	6.8	7.2
0.1% glucosa	130 000	7.1	7.6
1% glucosa	8	7.6	8.4
1% arabinosa	20	7.5	8.3
1% glicerol	14	6.9	8.1
100 mM acetatos	14	8.5	8.8

La cepa TJA22 se creció en medio mínimo con 1% de glucosa y 70 mM de NaNO_3 , y el micelio se transfirió a las fuentes de carbono indicadas. El cultivo se muestreó a las 24 horas para determinar la producción de esporas y a las 6 y 24 horas para medir el pH. El número de esporas que se muestra es el promedio de dos experimentos independientes con un porcentaje de variación menor al 13%.

privación de glucosa este mediada por la represión catabólica por carbono dependiente del gene regulador *CreA* (ver más adelante y a McCullough, *et al*, 1977; Arst y Bailey, 1977; Dowzer y Kelly, 1991).

La complejidad de los conidioforos desarrollados 24 horas después del cambio del micelio a las distintas fuentes de carbono (Fig. 9) correlacionan con las actividades de β -galactosidasa reportada por la fusión (Fig. 8A). Nuevamente, incrementos rápidos en la actividad de β -galactosidasa, y por lo tanto del mensaje de *brlA* (como en 0 y 0.1% de glucosa; fig. 8A), corresponden con un número de esporas elevado y con la formación de conidioforos reducidos (Fig. 9, paneles A y B; Tabla III); mientras que incrementos graduales en actividad corresponden a una ausencia de estructuras esporulantes (1% glucosa) o a la presencia de algunos conidioforos morfogénicamente más complejos y un número de esporas bajo (Fig. 9, paneles C, D, E y F; Tabla III). Alrededor de 100 U son suficientes para formar conidioforos (por ejemplo, ver 1% de arabinosa o 1% de glicerol), sin embargo, los mismos niveles de actividad se alcanzan en el medio con 1% de glucosa y no se generan estructuras conidiantes, debido posiblemente a que otros genes necesarios para la esporulación (pero no *brlA*) se reprimen por glucosa a través de un mecanismo mediado por *CreA*. Las diferencias en la morfología de los conidioforo no se deben a una acumulación diferencial de los transcritos de *brlA* (α o β , fig. 8B), lo que apoya nuestra hipótesis de que la regulación del proceso de conidiación depende de la expresión total de *brlA* y no del tipo de transcrito generado.

Este modelo cuantitativo que correlaciona la expresión de *brlA* y el grado de desarrollo del conidioforo es apoyado por varios tipos de evidencia. Primero, la inducción rápida y a altos niveles de cualquiera de los transcritos de *brlA* (α o β) desde el promotor inducible del gene de la alcohol deshidrogenasa (*alcA*), causa la producción de esporas a partir de las puntas de las hifas (Adams, *et al.*, 1988; Han, *et al.*, 1993). Segundo, *brlA α* y *brlA β* parecen tener una función redundante, ya que copias múltiples de cualquiera



de los transcritos puede sustituir la necesidad del otro durante el desarrollo (Prade y Timberlake, 1993). Tercero, mutantes como *medA* y *stuA* (Clutterbuck, 1969; Müller, *et al*, 1992) presentan conidióforos aberrantes, cuya morfología es consistente con una transcripción desregulada de *brlA*, tanto en el tiempo como en el espacio (Aguirre, 1993).

Muchos genes dependientes de *brlA* poseen una o mas copias de los elementos de respuesta a *brlA* o BREs dentro de sus regiones promotoras (incluyendo al mismo gene *brlA*; Chang y Timberlake, 1993; Müller, 1993), por lo que es factible suponer que el control de *brlA* sobre el desarrollo del conidióforo dependa del lugar y momento de su expresión, así como de la dosis de la proteína *BrlA*. Un ejemplo notable de la regulación dosis dependiente de un proceso morfogénico es el del gene *bicoid* de *Drosophila melanogaster* (Driever y Nüsslein-Volhard, 1988).

Tanto la limitación de glucosa como la nitrógeno podrian afectar la expresión de *brlA* no solo a nivel transcripcional, sino también a nivel de la traducción de los mensajeros (por ejemplo, estabilizando los transcritos de *brlA*), ya que hay evidencia que *brlA β* esta regulada por un mecanismo de represión traduccional (Han, *et al*, 1993) y hemos observado que la tasa de degradación del mensaje de *brlA* es muy alta (Figs. 7 y 8B).

Figura 9. Morfología de los conidióforos 24 horas después de que la cepa TJA22 se transfirió a distintas fuentes de carbono.

A; sin glucosa, B; 0.1% de glucosa, C; 1% de glucosa, D; 1% arabinosa, E; 1% glicerol y F; 100 mM acetato de sodio. Las flechas grandes en A y B indican conidióforos reducidos, y las puntas de flechas indican esporas libres. Las flechas gordas en los paneles D-F muestran conidióforos complejos. Magnificación: 1000x.

Efecto del pH durante la inducción de *brlA* por limitación de nutrientes.

En general los experimentos anteriores muestran una buena correlación entre la dosis de *brlA* y la morfología del conidióforo, sin embargo, no está claro porque se forman conidióforos elaborados en medios con arabinosa, glicerol o acetato, mientras que en 1% de glucosa no hay ninguna señal de esporulación, siendo que en todas las condiciones la actividad de β -galactosidasa es semejante y no se observan diferencias entre los dos transcritos de *brlA* (Figs. 8, A y B). Se ha demostrado que el gene de la isopenicilina N sintetasa (*ipnA*) está sujeto a represión catabólica por carbono independiente del gene *creA*, y cuyo efecto se puede eludir si se cultiva el hongo en un pH alcalino extremo (Shah, *et al.*, 1991; Espeso y Peñalva, 1992; Espeso, *et al.*, 1993). Debido a la semejanza que presenta el modelo de regulación de los genes *ipnA* y *brlA*, decidimos monitorear los cambios del pH en las distintas fuentes de carbono empleadas. En la tabla III se muestra los distintos grados de alcalinización que se produjeron en las distintas condiciones a las 6 y 24 horas después de haber realizado el cambio de medios. Las mayores diferencias ocurrieron durante las primeras 6 horas de incubación, y los medios con 100 mM de acetatos y 1% de glucosa son los que presentaron la alcalinización más fuerte. Este resultado sugiere que el mecanismo de represión por carbono de *brlA* es distinto al de *ipnA*, ya que la represión de *brlA* no se puede sobrepasar incubando el micelio en pH alcalino (Fig. 8A y tabla III), como sucede con *ipnA*, y además, excluye la posibilidad de que el cambio en el pH extremo sea el responsable de las distintas morfologías observadas en las fuentes de carbono empleadas, por lo que en estas condiciones debe existir algún otro factor responsable de la morfología del conidióforo. Por otro lado,

en otro tipo de experimento, el micelio crecido durante 18 horas se transfirió a medio con 1% glucosa/70 mM amonio (MM amonio) en vez de 1% glucosa/70 mM nitrato (MM nitrato), y se encontró

Tabla IV

Producción de esporas, morfología del conidióforo y cambios del pH inducidos por distintos tipos de privación de nutrientes.

Tipo de limitación	Esporas/cultivo ($\times 10^3$)	Morfología del conidióforo	pH (6 h)	pH (24 h)
- Glucosa + Nitrato	50 000	Reducido	6.8	7.2
- Glucosa + Amonio	3 100	Reducido	6.0	6.2
+ Glucosa - Nitrato	64 900	Complejo	6.2	6.1
+ Glucosa - Amonio	52 800	Complejo	6.3	6.2
- Glucosa - Amonio	107 000	Reducido	6.5	6.8

Las condiciones experimentales empleadas son similares a las que se indican en la tabla III, excepto que el cambio del micelio se realizó a medios que carecían de glucosa, nitrato, amonio o glucosa y nitrato simultáneamente. Cuando el cambio se realizó a cultivos con o sin amonio, el cultivo se realizó en medio mínimo con 1% de glucosa y 70 mM de NH_4Cl . La producción de esporas y la morfología del conidióforo son de muestras tomadas 24 horas después del cambio del micelio a los distintos medios, y el pH se determinó de muestras de 6 y 24 horas después del cambio del micelio. Se muestran resultados representativos.

Tabla V

Actividad de β -galactosidasa, producción de esporas y cambios del pH en medios de cultivo ajustados a distintos pH con y sin buffer.

Condiciones	Actividad de β -galactosidasa	Esporas/cultivo ($\times 10^3$)	pH (6 h)	pH (24 h)
pH 4, Sin Fosfatos	46.15	170 000	5.3	6.4
pH 4, Con Fosfatos	95.35	214 000	4.4	5.1
pH 6.5, Sin Fosfatos	157.15	107 000	6.5	6.8
pH 6.5, Con Fosfatos	729.63	450 000	6.5	6.4
pH 8, Sin Fosfatos	204.63	340 000	7.2	7.5
pH 8, Con Fosfatos	88.53	31 400	7.7	7.7

Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la tabla III, excepto que el cambio se realizó a medios con 1% de glucosa y 70 mM de NaNO_3 cuyos pH fueron ajustados a 4, 6.5 y 8, y que carecían o poseían 100 mM de buffer de fosfato de sodio. Las actividades de β -galactosidasa y el número de esporas son de muestras tomadas a las 24 horas después del cambio del micelio a los distintos medios, y El pH se determinó en las muestras de 6 y 24 horas después del cambio. Se muestran resultados representativos.

que *brlA* estaba completamente reprimido, aunque en este caso el medio de cultivo se acidificó (pH final de 2.5). Este experimento demuestra que la glucosa es capaz de prevenir la expresión de *brlA* tanto en pHs alcalinos como ácidos. También, se observó que la esporulación sumergida inducida por privación de glucosa, nitrato, amonio o simultáneamente glucosa y nitrato, siempre resultaba en pH externos cercanos a la neutralidad (Tabla IV). De hecho, la esporulación se vió reducida, aunque no evitada, cuando el micelio se cultivó en medios sin glucosa y sin nitrato y cuyo pHs fueron preajustados a 4 o a 8 (con o sin 100 mM de buffer de fosfato de sodio, tabla V). Durante estos experimentos, es poco probable que los efectos observados se deban a alteraciones en la fase vegetativa del crecimiento, ya que *A. nidulans* puede crecer en pHs desde 2.5 hasta 10.5 (Caddick, *et al*, 1986a; Rossi y Arst 1990).

En resumen, la regulación del gene *brlA* es distinta de la del gene *ipnA*, ya que a diferencia de la regulación de este gene, la inducción de *brlA* y el desarrollo del conidióforo se ven reducidos si el micelio se cultiva en medios con pHs extremos, tanto ácidos como alcalinos. De hecho, medios de cultivo con capacidad de amortiguar el pH alrededor de 6.5-7 son los que inducen mejor al gene *brlA* y favorecen la conidiación.

Cuando se realizó un cultivo prolongado de *A. nidulans* en el medio de Käfer (Käfer, 1977) sin transferirlo de medio de cultivo, no se observó ningún indicio de conidiación, aunque se expresó el gene *brlA* (Fig. 10). No obstante que la inducción de *brlA* coincidió con el agotamiento de la glucosa del medio, el pH se alcalinizó fuertemente y no se observó ninguna señal de conidiación (Fig. 10). Cuando en un experimento de este tipo se incluyó 100 mM de buffer de fosfato de sodio (pH inicial de 6.5), se observó que las cinéticas de consumo de glucosa y de inducción de *brlA* se conservaron, pero

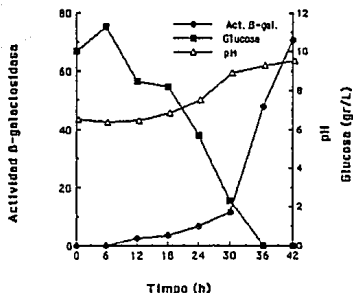


Figura 10. Inducción de *brlA α / β* , consumo de glucosa y cambio de pH durante el crecimiento prolongado de la cepa TJA22 en medio mínimo.

La cepa TJA22 se inoculó en medio mínimo con 1% de glucosa y 70 mM de NaNO_3 y se cultivo durante 42 horas. En los tiempos indicados, se colectó el micelio utilizando un matraz por tiempo, y se determinó la actividad de β -galactosidasa. Se analizaron muestras del medio de cultivos para determinar el consumo de glucosa y los cambios en el pH. Cada punto es el promedio de cuando menos dos experimentos independientes, con un porcentaje de variación menor al 12%.

los niveles de β -galactosidasa alcanzados fueron más altos, el pH se mantuvo alrededor de 6.5 y se observó una conidiación profusa (Fig. 11). El hecho de que en cultivos standares prolongados de *A. nidulans* no se observe la esporulación del hongo, puede ser la causa de que ningun otro grupo considere a la conidiación sumergida como un fenómeno común y reproducible. No

obstante, ya se había reportado esporulación sumergida en un medio que contenía 100 mM de fosfatos en lugar de la concentración de 11 mM de fosfatos del medio de Käfer, sin embargo, no se relacionó la presencia del fosfato con la esporulación (Martinelli, 1976).

El efecto sobre la esporulación observado con la inclusión de 100 mM de fosfatos en el medio de cultivo, también se podría deber a cambios en la fuerza iónica y/o presión osmótica, más que al pH. Para contestar esta pregunta se empleó una concentración de 100 mM de cloruro de sodio (NaCl) para ver que efecto tendría la sal sobre el desarrollo del conidioforo. Sin considerar a los demás componentes del medio de cultivo (elementos traza, sales de nitrógeno, etc.) 100 mM de fosfatos contribuye con una fuerza iónica de 0.171, mientras que 100 mM de NaCl posee una fuerza iónica de 0.1.

La cepa TJA22 se creció durante 18 horas en medio mínimo y el micelio se transfirió a medios con 100 mM de fosfatos o 100 mM de NaCl. Las actividades de β -galactosidasa 24 horas después del cambio de medios fueron muy semejantes: 120.8 U en el medio con fosfatos, contra 166.6 U obtenidas con NaCl, y en ambas condiciones los conidioforos producidos tenían una estructura elaborada. No obstante, mientras que los niveles de actividad y la morfología fueron semejantes, las diferencias en el pH a las 24 horas después del cambio fueron notable: 6.9 en el medio con fosfatos contra 7.99 en el medio con NaCl.

Las diferencias obtenidas indican que la fuerza iónica tiene un efecto real sobre la expresión de *brlA* y sobre la morfología. Sin embargo, cuando el hongo se precreció en medio mínimo y se transfirió a medios cuyo pH se preajustó 4, 6.5 y 8 y que contenían o carecían de 100 mM de fosfatos, la diferencia en la actividad de β -galactosidasa entre los medios con y sin buffer es mayor cuando el medio se ajustó a pH 6.5 (incremento de 4.6 veces) que

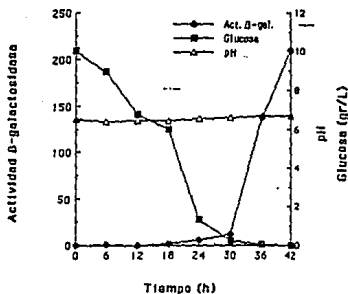


Figura 11. Inducción de *brlA* α/β , consumo de glucosa y cambio del pH durante el crecimiento prolongado de la cepa TJA22 en medio mínimo suplementado con 100 mM de buffer de fosfato de sodio pH 6.5.

La determinación de la actividad de β -galactosidasa, consumo de glucosa y cambios en el pH se realizó de manera idéntica a la que se muestra en la figura 10, salvo que el medio de cultivo se había suplementado con 100 mM de buffer de fosfato de sodio pH 6.5 para amortiguar los cambios en el pH. Nuevamente cada punto es el promedio de cuando menos dos experimentos independientes, con un porcentaje de variación inferior al 12%.

cuando el medio está ajustado a 4 (incremento de 2 veces), e inclusive a pH 8 la actividad disminuyó (decremento de 2.3 veces). Este experimento demuestra que también el pH contribuye a la regulación de *brlA* y al desarrollo del conidióforo.

Por el momento no podemos evaluar la importancia relativa del pH y la fuerza iónica sobre el proceso de esporulación, sin embargo, no hay duda que que ambos factores juegan un papel fundamental al nivel de la transcripción de *brlA*. Aunque estos experimentos no permiten evaluar la contribución de cada una de las condiciones de manera separada, sabemos que estos fenomenos son reales y que tanto el pH como la fuerza iónica contribuyen a la regulación del proceso de conidiación.

Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión de *brlA* y la esporulación.

La limitación de nitrógeno en medio líquido induce la expresión del gene *brlA* de manera gradual y conduce a la formación de conidioforos elaborados (Fig. 6). Cuando se inoculan a confluencia cajas con medio sólido con nitrato de sodio 70 mM, el micelio empieza a conidiar 36-42 horas despues de haber sido inoculado. Sin embargo, cuando se inocula de la misma manera en medio que contiene cloruro de amonio 70 mM, el micelio crece rápidamente pero esporula muy mal y tardiamente. Estas observaciones sugieren que la fuente de nitrógeno empleada tiene un profundo efecto sobre la conidiación.

Durante el crecimiento de *A. nidulans* en medio líquido, el pH cambia dependiendo de la fuente de nitrógeno empleada. El empleo de nitrato de sodio conduce a un pH final de alrededor de 8, debido a que no se pueden neutralizar los iones de sodio, mientras que el empleo de cloruro de amonio conducira a un medio ácido que termina por inhibir el crecimiento, debido a la presencia de iones clorato. El empleo de tartrato de amonio o de nitrato de amonio conduce a una acidificación del medio que después tiende a neutralizarse (Zonneveld, 1977).

Para analizar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la conidiación, se creció la cepa TJA22 en medio con nitrato de sodio, y a las 18 horas el micelio se transfirió a medios con nitrato, nitrato más 200 mM de fosfatos o sin nitrato. De igual manera se creció la misma cepa pero en medio con cloruro de amonio y se transfirió el micelio a medios con amonio, amonio más 50 mM de citrato de sodio o sin amonio. La figura 12 muestra los valores de β -galactosidasa, mientras que en la tabla IV se muestran los valores de pH para algunos de los puntos. Tanto en el medio mínimo nitrato (pH final 8.4) como en el medio mínimo amonio (pH final 2.5), las actividades de β -galactosidasa fueron bajas y no hubo desarrollo de estructuras conidiogénicas (Fig. 12 y Fig. 13, paneles A y D). Es interesante el hecho de que mientras con nitrato el crecimiento vegetativo continua, en el medio con amonio las hifas adquieren una estructura anormal y hay desarrollo de posibles células Hülle (¿inducción del ciclo sexual?). No sabemos si este fenómeno se debe a la acidificación del medio, a la fuente de nitrógeno o a la toxicidad del ion clorato.

La adición de 200 mM de fosfatos al medio con nitrato, así como la adición de 50 mM de citratos al medio con amonio indujeron la β -galactosidasa a niveles más elevados, se mantuvo el pH alrededor de 6.5 y se indujo la conidiación (Fig. 12 y Fig. 13, paneles B y E). Tanto los niveles de β -galactosidasa alcanzados como las estructuras generadas en el medio con amonio y citratos 50 mM son equivalentes a los del medio mínimo con nitrato, salvo que en el medio con 50 mM de citratos se corrige la morfología producida por el cloruro de amonio, y se observan algunas métulas muy espaciadas (Fig. 12 y Fig. 13, panel E). La limitación total de nitrógeno tanto

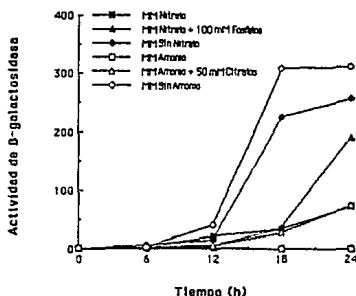
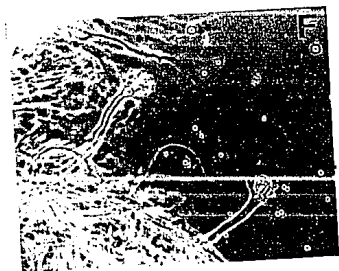
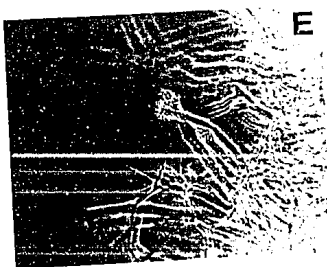
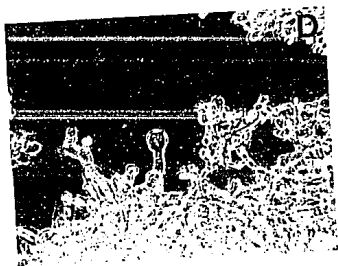
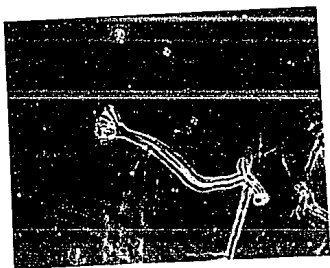
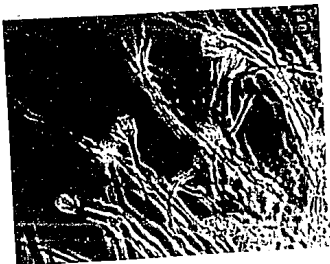


Figura 12. Inducción de *brlA* α/β en cultivos sumergidos que carecen o poseen distintas fuentes de nitrógeno.

La cepa TJA22 se creció 18 horas en medio mínimo con 1% de glucosa y 70 mM de NaNO_3 (figuras cerradas) o 70 mM de NH_4Cl (figuras abiertas), y el micelio se transfirió a los medios indicados. La incubación se continuó bajo las mismas condiciones, y a los tiempos indicados se tomaron muestras que se procesaron para determinar la actividad de β -galactosidasa. Cada punto es el promedio de cuando menos dos experimentos independientes, con un porcentaje de variación menor al 16%.

en un cultivo precrecido en amonio como en nitrato conduce al mayor incremento en la actividad de β -galactosidasa, siendo ligeramente superior la que presenta el micelio precrecido en amonio. Los niveles de esporulación, el pH final y la morfología en ambas condiciones son muy semejantes (Tabla IV y Fig. 13, paneles C y F).



Estos resultados confirman el hecho de que pHs extremos (tanto ácidos como alcalinos) tienen un efecto adverso sobre la conidiación, y sugieren que el mecanismo de regulación de *brlA* por fuente de nitrógeno pudiera ser través de la activador de los genes del metabolismo de nitrógeno *AreA*.

Efecto de las mutaciones *creA* y *areA* sobre la expresión de *brlA*.

Los resultados obtenidos en los experimentos donde se emplearon distintas fuentes de carbono o de nitrógeno son muy sugestivos de que la esporulación y *brlA*, están integrados al esquema metabólico general del hongo. Para comprender mejor la regulación del gene *brlA*, se construyeron las cepas CPG1 y CPG5. Ambas cepas se seleccionaron de una cruce entre las cepas TJA22 y MH440. La cepa CPG1 posee la fusión *pbrlA::lacZ* y la mutación *creA204*, y la cepa CPG5 además de poseer la fusión *pbrlA::lacZ*, contiene la mutación *areA217*.

Figura 13. Morfología de los conidioforos 24 horas después de la transferencia del micelio a medios que carecían o poseían distintas fuentes de nitrógeno.

A; 70 mM de NaNO_3 , B; 70 mM de NaNO_3 y 100 mM de buffer de fosfatos pH 6.5, C; sin NaNO_3 , D; 70 mM de NH_4Cl , E; 70 mM de NH_4Cl y 50 mM de buffer de citratos pH 6.5 y F; sin NH_4Cl . El micelio de los paneles A-C se creció en medio mínimo 1% de glucosa y 70 mM de NaNO_3 durante 18 horas antes de transferirlos a los distintos medios, mientras que el micelio de los paneles D-F se creció en 1% de glucosa y 70 mM de NH_4Cl durante 18 horas antes de transferirlos. Las flechas gordas en los paneles B, C, E y F indican conidioforos elaborados, mientras que las puntas de flecha en los paneles C y F indican esporas libres. Amplificación 1000x.

La mutación en el represor del catabolismo de carbono *creA* se caracteriza por la desrepresión de un cierto número de genes involucrados en el metabolismo del carbono en presencia de sacarosa (por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa *alcA*; Arst y Cove, 1973; Arst y Bailey, 1977; Hynes y Kelly, 1977), por lo que si *brlA* está sujeto a la represión catabólica por carbono mediada por *CreA*, se debe de observar la desrepresión del gene en presencia de glucosa. La figura 14 muestra el perfil de actividad de β -galactosidasa y el consumo de glucosa de la cepa CPG1, así como una cepa control (CPG3, mutante *creA* sin fusión), crecida continuamente sin transferirlas a otro medio. Es notable el hecho de que las cepas *creA* no consumieron la glucosa tan bien como la cepa silvestre, ya que a las 42 horas de cultivo aún queda más de la mitad de la glucosa en el medio, lo cual puede deberse a que la mutante *creA* crece menos que la cepa silvestre. Por otro lado, la actividad de β -galactosidasa presentó un patrón de inducción y niveles similares a los de la cepa silvestre (Fig. 10). El hecho de que en la cepa con la mutación *creA204* se exprese el gene *brlA* en presencia de concentraciones elevadas de glucosa sugiere que *brlA* esta sujeto a la represión catabólica por carbono dependiente de la proteína *CreA*.

Este resultado presenta una contradicción con el resultado obtenido con las distintas fuentes de carbono, donde se concluía que *brlA* estaba sujeto a una represión catabólica por carbono independiente de *CreA* (Fig. 8A). Esta contradicción podría resolverse proponiendo que la mutación *creA* posee otras funciones además de las atribuidas como represor clásico del catabolismo de carbono. De hecho, el producto del gene *creA* presenta una región de homología con la clase de motivos estructurales de union al DNA del tipo "dedos de zinc" (Miller, *et al*, 1985; Klug y Rhodes, 1987) y en particular con la proteína *MIG1* de *S. cerevisiae* involucrada en la represión

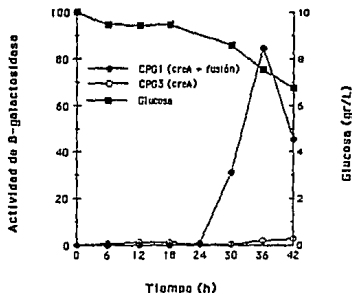


Figura 14. Inducción de *brlAα/β* y consumo de glucosa durante el crecimiento prolongado de la cepa CPG1.

Las cepas CPG1 (*pbrlAα/β::lacZ*, *creA204*) y CPG3 (*creA204*) se inocularon en medio mínimo con 1% de glucosa y 70 mM de NaNO_3 y se cultivaron durante 42 horas. En los tiempos indicados se colectó el micelio utilizando un matraz por tiempo y se determinó la actividad de β-galactosidasa. El consumo de glucosa se determinó a partir de muestras del medio de cultivo colectadas a los mismos tiempos. Sólo se muestra una curva de consumo de glucosa ya que ambas cepas la consumen de manera idéntica. Cada punto es el promedio de cuando menos dos experimentos independientes, con un porcentaje de variación menor al 18% para la CPG1 y del 5% para la CPG3.

por carbono en esta levadura (Nehlin y Ronne, 1990), pero también presenta una segunda región de homología con la proteína *RGR1* de *S. cerevisiae* (Sakai, et al, 1990). Las mutantes parciales de *rgr1* están afectadas en muchas

funciones celulares tales como resistencia a la represión por glucosa, sensibilidad a altas temperaturas, problemas en la esporulación, orientación aberrante de la yema durante la gemación y niveles elevados de cAMP (Sakai, *et al*, 1988 y 1990).

En favor de nuestra propuesta de que el efecto de *CreA* sobre la inducción de *brlA* sea bimodal debido a que *CreA* posee dos motivos estructurales de unión al DNA, se puede argumentar lo siguiente. Primero, la disrupción genética de *creA* es letal (Dowzer y Kelly, 1991), es decir, que *CreA* es indispensable en *A. nidulans*, y debe poseer alguna función aún desconocida. Segundo, diversas mutantes de *S. cerevisiae* aisladas por tener desreprimida la invertasa o la β -galactosidasa en presencia de glucosa han resultado tener alterados procesos tan diversos como el tipo de cruce (mating-type), la esporulación, y la expresión de genes que no están sujetos a la represión catabólica por carbono (por ejemplo; la expresión de los elementos *Ty*, Trumbly, 1992). Tercero, los niveles de expresión de la proteína *CreA* de *Trichoderma reesei* disminuyen cuando el microorganismo se cultiva en sorbitol, glicerol o celulosa y se le añade glucosa, un resultado poco usual para una proteína encargada de controlar la represión por glucosa (Ilmen, *et al*, 1994). Cuarto, distintos alelos mutantes de *creA* poseen distintas morfologías en cuanto a la forma de las colonias y la densidad de conidióforos, aún cuando muestran niveles semejantes de desrepresión del gen de la alcohol deshidrogenasa *alcA* (Arst y Cove, 1973; Arst y Bailey, 1977; Hynes y Kelly, 1977). Por ejemplo, el alelo *creA204* forma colonias muy compactas pero esporula de manera silvestre, mientras que el alelo *creA^{d30}* genera colonias pequeñas pero no tan compactas y además tiene problemas en la conidiación. Recientemente se recibió en el laboratorio el alelo *creA^{d30}*, y las cruces entre esta cepa y la TJA22 se está realizando. El análisis de la progenie con el alelo

mutante y la fusión *pbrlAa/β::lacZ* permitirán comprender mejor las interacciones entre la proteína *CreA* y el gene *brlA*.

El papel de la proteína *AreA* sobre la inducción del gene *brlA* se estudió empleando la cepa CPG5 y una cepa control *areA* que carecía de la fusión *pbrlA::lacA* (CPG8). El gene *areA* codifica para un activador de los genes involucrados en el metabolismo del nitrógeno (Arst y Cove 1973; Arst y Bailey, 1977; Cove, 1979; Caddick, 1992; Scazzocchio, 1992). Posee un solo "dedo de zinc" adyacente a una región de aminoácidos básicos (Kudla, *et al*, 1990, Stankovich, *et al*, 1993) y presenta una alta homología con las proteínas *NIT2* de *N. crassa* y *GLN3* de *S. cerevisiae*, por lo que se ha incluido dentro de la familia de los factores transcripcionales GATA (Fu y Marzluf, 1990; Kudla, *et al*, 1990, Marzluf, 1993). Debido a que las cepas con la mutación *areA* son incapaces de utilizar el nitrato como fuente de nitrógeno, se precrecieron estas cepas en medio mínimo amonio y el micelio se transfirió a un medio sin amonio, donde esperábamos que si *brlA* estaba sujeto a la activación por *AreA*, se abatieran sus niveles de inducción. En efecto, los niveles de β -galactosidasa alcanzados por la cepa CPG5 24 horas después del cambio son menores que los alcanzados por una cepa con la proteína *AreA* intacta (Fig. 15).

Este experimento sugiere que *brlA* esta sujeto a la activación del metabolismo del nitrógeno, mediada por *AreA*. El alelo mutante empleado en este experimento (*areA217*) carece de la proteína funcional, sin embargo, existen otros alelos con una función de *AreA* aumentada que sería interesante estudiar. Recientemente se recibió esta mutante llamada *xprDI* (extracelular protease) en el laboratorio, y se estan realizando las cruza adecuadas para

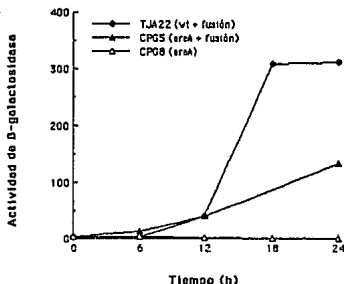


Figura 15. Inducción de *brlA* α/β en una cepa silvestre (TJA22) y en una cepa carente del activador *AreA* (CPG5) en cultivos líquidos carentes de amonio.

Las cepas TJA22, CPG5 (*pbrlA* α/β :*lacZ*, *areA217*) y CPG8 (*areA217*) se crecieron en medio mínimo con 1% de glucosa y 70 mM de NH_4Cl durante 18 horas, y el micelio se transfirió a medio mínimo con 1% de glucosa pero que carecía de NH_4Cl . Se continuó la incubación bajo las mismas condiciones y a los tiempos indicados se colectaron las muestras que se procesaron para determinar la actividad de β -galactosidasa. Los puntos de la curva de la cepa TJA22 son el promedio de cuando menos dos experimentos independientes, con un porcentaje de variación del 16%. Los puntos de las curvas de las cepas CPG5 y CPG8 son el resultado de un solo experimento.

estudiar su efecto sobre la esporulación, donde esperamos que cultivos sumergidos de esta cepa exprese al gene *brlA* de manera aumentada. También será necesario estudiar el efecto de otras fuentes de nitrógeno (por ejemplo

distintos aminoácidos) sobre la esporulación, para comprender mejor la relación entre el metabolismo nitrogenado y la conidiación.

La integración de todas estas señales ambientales y la esporulación a nivel de la regulación del gene *brlA* pudiera ser muy compleja, ya que en la región promotora del gene *brlA* se sitúan muchos elementos regulatorios que podrían influir su tasa de transcripción. Es importante resaltar que se requiere una región reguladora de hasta -2913 pares de bases (pb) hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción de *brlA*, para lograr una expresión completa del gene. Cortes progresivos del promotor hacia el sitio del inicio de la transcripción, reducen gradualmente el nivel de transcripción de *brlA* sin alterar su regulación espacial (Aguirre y Timberlake, sin publicar). De manera semejante, cuando se crecieron cepas por 18 horas que contenían fusiones *lacZ* con distintos tamaños del promotor de *brlA* (cepas TJA18 y TJA12) y se transferían a medios con 0, 0.1 y 1% de glucosa, conservan el perfil de actividad de β -galactosidasa, aún cuando los niveles absolutos disminuyen (Fig. 16). La presencia de múltiples elementos regulatorios dentro de la región promotora de *brlA*, pero sobre todo el arreglo de *brlA α* y *brlA β* (genes sobrelapados), dificulta el estudio de los efectos que distintos activadores (por ejemplo *AreA*) o represores (como *creA*) tendrían sobre su transcripción, ya que las interacciones que se podrían dar entre estos reguladores podrían ser muy diversas (por ejemplo; sinérgicas, antagónicas, etc.). El gene regulador de la esporulación en *Myxococcus xanthus*, *csgA*, se comporta de manera similar al gene *brlA*, en cuanto a que reducciones sistemáticas del promotor también resultan en la disminución gradual en la actividad del gene y al arresto del proceso morfogénico en distintos puntos (Li, et al, 1992). De cualquier forma, la demostración bioquímica de la unión de las proteínas *CreA* y *AreA* al promotor de *brlA* es un requisito indispensable para probar,

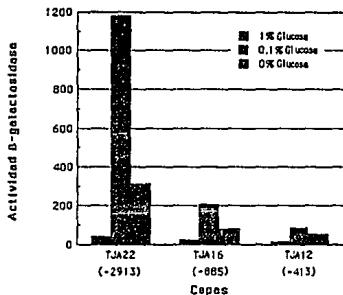


Figura 16. Regulación por glucosa de la fusión *pbrlA α β ::lacZ* con distintos tamaños de la región promotora de *brlA*.

Las cepas que se indican se crecieron 18 horas en medio mínimo con 1% de glucosa y 70 mM de NaNO_3 y el micelio se transfirió a medios con 0, 0.1 y 1% de glucosa. Las muestras se colectaron 24 horas después del cambio de medios y las muestras se procesaron para determinar la actividad de β -galactosidasa. Los números entre paréntesis indican el tamaño de la secuencia regulatoria hacia arriba del gene *brlA α β* , tomando como referencia el sitio de inicio de la transcripción de *brlA α* (para ver los detalles de la organización de la unidad de transcripción de *brlA α β* ver la figura 4 y Prade y Timberlake, 1993).

junto con nuestros resultados, el papel regulador *in vivo* de estos genes sobre la expresión de *brlA*.

Obtención y caracterización parcial de mutantes de *Aspergillus nidulans* que presenten una esporulación anticipada.

El periodo de crecimiento que requiere *A. nidulans* para poder conidiar se le ha denominado competencia (Axelrod, 1972; Axelrod, *et al*, 1973; Champe, *et al*, 1981). Una vez alcanzada la competencia, el hongo es capaz de responder a una fase aerea y conidiar (Timberlake, 1980; Zimmerman, *et al*, 1980; Boylan, *et al*, 1987). No obstante que la relación entre competencia y conidiación es clara, no se sabe específicamente en que consiste este fenómeno y de que manera esta regulado.

La relación entre la competencia y la capacidad para responder a los estímulos ambientales nos hicieron pensar que mutantes que hubieran esquivado la competencia, podrían esporular en un tiempo menor del requerido por la cepa silvestre y tendrían alterado el control de la expresión del gene *brlA*.

Se llevo a cabo una mutagénesis de acuerdo al método desarrollado por Käfer (Käfer, 1965). Brevemente, una solución de 1×10^8 esporas/ml de la cepa TJA22 en 25 ml de agua esteril se irradiaron durante 90 segundos con una dosis de u.v. de aproximadamente 700 mW/cm^2 , para lograr un 90% de mortalidad. Se realizó un enriquecimiento de mutantes que consintió en cultivar en medio líquido las conidias irradiadas. A las 30 horas después de inoculadas se filtro el micelio colectando las conidias que se encontraran en el cultivo, y que podrían provenir tanto de mutantes que presentaran una esporulación temprana, como de mutantes que tardaran mucho en germinar. El filtrado se concentró por centrifugación y las esporas se emplearon para sembrar cajas con medio mínimo con 1% y 0.1% de glucosa. Las colonias se dejaron crecer durante 24 horas y se tiñeron con X-gal. De 200 colonias seleccionadas por su aspecto

sano, se reseleccionaron 5 mutantes que se teñían con X-gal más temprano que la cepa padre. También se seleccionó una mutante que presentaba un fenotipo aberrante y una conidiación variegada. No se les ha asignado nombre a la mutación y el alelo mutante se conoce con el nombre asignado a la cepa mutante original. A continuación se describen parcialmente las 6 cepas mutantes:

- CIS9. Presenta un crecimiento similar a la cepa padre, pero se tiñe con X-gal mucho más temprano.
- CIS10. Crece de manera muy compacta y tanto las conidias como el micelio adquieren un color café. Se tiñe con X-gal mucho más temprano que la cepa padre. Los conidioforos presentan una apariencia similar al fenotipo *medA* (conidioforos reiterados), sin embargo, cruza con la cepa *medA1* revelaron que se trata de otra mutación. En cultivos líquidos forma pellets muy compactos.
- CIS13. Crece tanto en medio sólido como en líquido de manera muy compacta. Sus conidias son verdes y también presenta una tinción positiva con X-gal mucho antes que la cepa padre.
- CIS17. Forma colonias arrugadas que deforman el medio sólido, y presenta una conidiación variegada, es decir, algunas hifas aéreas no se diferencian para formar conidioforos. Ambos fenotipos se deben a una sola mutación. Los fenotipos se pueden suprimir parcialmente si se cultiva la cepa en medio con una mala fuente de carbono (por ejemplo: acetato, etanol, tributirina, etc.). El diploide entre esta cepa y una cepa *brlA* tiene apariencia silvestre, por lo que se trata de otra mutación recesiva. No muestra tinción positiva con X-gal.
- CIS18. Es indistinguible de la cepa padre, salvo que se tiñe con X-gal de manera muy temprana. En cultivo líquido esporula profusamente.

CIS19. Fenotipo similar al de la cepa CIS18, salvo que en cultivo líquido no esporula y forma pellets muy grandes.

Para verificar que la tinción positiva con X-gal en medio sólido reflejara la inducción del gene *brlA* por causa de la mutación y no por causa de la fase aerea, se realizaron cultivos de todas las mutantes en medios con 1% y 0.1% de glucosa. La cuantificación de la actividad de β -galactosidasa se realizó a un tiempo fijo de 36 horas y los resultados se muestran en la figura 17. Como se observa, las cepas CIS9, CIS18 y CIS19 poseen una actividad mucho mayor que la cepa padre en medio con 1% de glucosa, e inclusive la cepa CIS18 presentó esporulación. En el cultivo que solo contenía 0.1% de glucosa, las cepas CIS9, CIS18 y CIS19 presentaron niveles similares de actividad y esporulación que la cepa padre. Los niveles de actividad de las cepas CIS10, CIS13 y CIS17 en el medio con 1% de glucosa son bajos, y aunque se incrementan en el cultivo con 0.1% de glucosa, siguen estando por debajo de los de la cepa padre. Por el momento no podemos explicar este fenómeno, especialmente para las cepas CIS10 y CIS13.

Debido a la facilidad de seguir el fenotipo de la cepa CIS17, se decidió continuar con su caracterización. Se realizaron varias cruza con distintas cepas (CIS18, TJA22, *brlA*) para asegurarnos de que era una mutación monogénica. Un inconveniente de la mutación es de que tiene cierta tendencia a revertir, especialmente cuando se ha almacenado por periodos largos a 4°C. Las cepas que revierten adquieren el fenotipo de la cepa padre. Se realizó la asignación de este gene a alguno de los ocho cromosomas de *A. nidulans*, cruzando la cepa CIS17 con la cepa A283 que posee marcadores en cada uno de los cromosomas. La haploidización del diploide se realizó en medio mínimo suplementado que contenía 70 mg/ml de *p*-fluoro-fenilalanina. Este

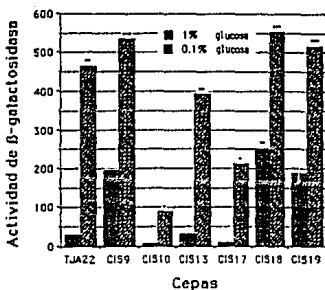


Figura 17. Inducción de *brlA* α/β en distintas cepas aisladas de una mutagénesis de la cepa TJA22, en medios con 0.1 y 1% de glucosa.

Las cepas que se indican se inocularon en medios estandares con 0.1 y 1% de glucosa, y se incubaron durante 36 horas de manera continua como se describe en materiales y métodos. A este tiempo se colectó el micelio y se proceso para determinar la actividad de β -galactosidasa. Los simbolos + indican el grado de esporulación que a simple vista se detecto en el medio de cultivo. Las barras son el resultado de un solo experimento.

análisis mostró que el marcador *galA1* del cromosoma III no segregaba con el fenotipo mutante, lo que sugería que la mutación se encontraba en este cromosoma. Debido a que la fusión *pbrlA α/β ::lacZ* se localiza en el cromosoma III, el análisis de segregación de este marcador mostraba que siempre segregaba con la mutación, lo que confirmaba el resultado obtenido con el marcador *galA1*. Se ha iniciado el análisis de segregación del fenotipo

mutante dentro del cromosoma III empleando las cepas PW1, A456 y A516 (ver los fenotipos en las tablas I y II). Los marcadores que se han empleado hasta ahora para mapear la mutación son *argB*, *adl50* y *galE9*, que se encuentran distribuidos en el brazo izquierdo del cromosoma. De estos tres marcadores solamente el de *argB* muestra cierto ligamiento con el gene mutado, y el porcentaje de recombinación que muestra es de 42.3 %. Este marcador es el más cercano al centrómero de los tres, por lo que sera necesario mapear la mutación empleando marcadores que se encuentren cerca de esta región.

La cepa CIS18 también es una mutante muy interesante, ya que su fenotipo es idéntico al de la cepa padre salvo que esporula abundantemente en medio líquido. Aún empleando la tinción con X-gal, esta mutación es muy difícil de seguir, especialmente cuando se trata de analizar los productos de distintas cruza. Hasta ahora no hemos encontrado un buen método para diferenciarla de las cepas silvestres (por ejemplo; no muestra diferencia en la tinción para fosfatasas ni ácidas ni alcalinas y no presenta desrepresión el la alcohol deshidrogenasa ni en actividad proteolítica extracelular), por lo que su análisis no se ha podido iniciar.

El empleo de este tipo de mutantes permitiría entender mejor la regulación del proceso de esporulación, ya que sólo estan afectadas en este proceso (no tienen un efecto pleiotrópico), sin embargo, ésta misma característica es una seria limitación, ya que el fenotipo es difícil de distinguir. Será necesario buscar un método para seguir este tipo mutaciones, ya que serían muy valiosas para esclarecer la regulación del proceso de conidiación.

Conclusiones y perspectivas.

Los resultados que se presentan en este trabajo ofrecen una nueva alternativa para estudiar el inicio de la esporulación y los factores ambientales que modifican proceso. El protocolo de cultivo líquido y esporulación sumergida permitió estudiar el efecto de la limitación de carbono y de nitrógeno sobre la esporulación, así como el efecto del pH sobre los patrones morfológicos. Debido al tipo de seguimiento que se hizo de los cultivos, el número de muestras era enorme y había problemas de reproducibilidad. Sin embargo, ahora sabemos que los niveles alcanzados a las 24 horas después del cambio de medios se mantienen estables, por lo que sería conveniente que en los próximos experimentos se colectaran las muestras a tiempos definidos en lugar de realizar toda la curva, con lo que se podría reducir el número de muestras de cada experimento y aumentar el número de repeticiones para poder aplicar un tratamiento estadístico adecuado a los resultados.

La limitación de carbono induce al gene *brlA* de manera rápida y a niveles elevados, mientras que la limitación de nitrógeno induce al gene *brlA* de manera más moderada y a niveles menores. Los conidióforos producidos cuando se limita al microorganismo de carbono son muy reducidos, y cuando se limita de nitrógeno son más elaborados. Esto permite concluir que la inducción de *brlA* esta regulada por diversos factores ambientales de manera distinta, además de que los distintos tipos celulares del conidióforo pudieran deberse a incrementos en la dosis de *brlA*.

El resultado obtenido cuando se emplearon distintas fuentes de carbono sugirió que *brlA* está sujeto a un mecanismo de represión catabólica independiente de *creA*. Por el contrario, el empleo de una cepa con el alelo

creA204 mostró que la regulación de *brlA* por *creA* es posible. Atribuimos esta contradicción al hecho de que posiblemente *creA* tenga más de una función (ver discusión anterior). Sería necesario emplear una cepa con un alelo de *creA* cuyo fenotipo sea más fuerte que el del alelo *creA204*, como sería el alelo *creA^{d30}*, en condiciones de cultivo que permitan despejar esta duda. Además, un ensayo de protección del promotor de *brlA* con la proteína *CreA* obtenida de la fusión *GST-CreA* permitiría identificar sitios de unión de esta proteína al promotor de *brlA* (Klumburg, *et al*, 1992).

El efecto de la limitación de nitrógeno sobre la inducción de la esporulación en cultivo líquido resulta muy interesante, ya que la morfología del conidióforo es muy similar a la que se produce cuando se induce la conidiación por exposición al aire. Además de las fuentes de nitrógeno que se estudiaron (nitrato y amonio), sería conveniente estudiar otras fuentes tales como glutámico, glutamina, otros aminoácidos, etc. La relación entre el activador de los genes del metabolismo del nitrógeno *AreA* y la inducción de *brlA* es muy clara y requiere ser estudiada con más profundidad. Se podría emplear una cepa que en lugar de tener un alelo como *areA217* que perdió su función, se empleara un alelo como el *xprD1* que se caracteriza por tener el gene de la proteína *AreA* más activo (Stankovich, *et al*, 1993). De esta manera se podría comprobar que *AreA* efectivamente activa al gene *brlA* (en proceso).

Con respecto al papel que juega el pH sobre la esporulación, se requieren experimentos adicionales que permitan diferenciar los efectos del pH, de los de la fuerza iónica. Cada uno de estos factores de manera separada o conjunta, inducen el desarrollo de conidióforos elaborados. Para diferenciar la contribución de cada factor, sería necesario emplear distintos medios en los que se variara la fuerza iónica y el pH de manera independiente. Esto se lograría si se emplea una sola sal que amortiguara a distintos pH pero que tuviera la

misma fuerza iónica, o a un pH determinado variar la fuerza iónica del medio. Otra estrategia sería evaluar el efecto de la mutación *pacC5* sobre la expresión de *brlA*, ya que este gene codifica para un regulador de los genes de las proteínas que se sintetizan en medios ácidos (Dorn, 1965; Caddick y Arst, 1986; Caddick, *et al*, 1986a y 1986b). Resultaría conveniente evaluar también otros parámetros como la presión osmótica utilizando compuestos no iónicos como el etilenglicol.

La continuación de este trabajo debe de estar encaminada a dilucidar los mecanismos fisiológicos y moleculares mediante los cuales la privación de nutrientes induce al gene *brlA*. De especial interés sería el analizar los efectos de la privación de nutrientes sobre genes que se sabe que regulan a *brlA*, tales como *stuA* y *medA* (Clutterbuck, 1969; Aguirre, 1993; Miller, 1993), para poder definir en un futuro los tipo de señales que regulan el proceso y los mecanismos mediante los cuales regulan la conidiación.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Referencias.

- Adams, T. H.; Boylan, M. T. y Timberlake, W. E. (1988) *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. Cell. Vol 54. p.: 353-362.
- Adams, T. H.; Deising, H. y Timberlake, W. E. (1990a) *brlA* requires both zinc fingers to induce development. Mol. Cell. Biol. Vol 10. p.: 1815-1817.
- Adams, T. H.; Hide, W. A.; Yager, L. N. y Lee, B. N. (1992) Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell. Biol. Vol 12. p.: 3827-2833.
- Aguirre, J.; Adams, T. H. y Timberlake, W. E. (1990) Spatial control of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. Exp. Mycol. Vol 14. p.: 290-293.
- Aguirre, J. (1992) *Aspergillus nidulans* como sistema experimental, y la esporulación como modelo de diferenciación celular y regulación genética. Ciencia. Vol 43. p.: 445-450.
- Aguirre, J. (1993) Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. Mol. Microbiol. Vol 8. p.: 211-218.
- Andrianopoulos, A. y Timberlake, W. E. (1994) The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. Mol. Cell. Biol. Vol 14. p.: 2503-2515.
- Aramayo, R. y Timberlake, W. E. (1993) The *Aspergillus nidulans yA* gene is regulated by *abaA*. EMBO J. Vol 12. p.: 2039-2048.

- Arst, H. N. y Cove, D. J. (1973) Nitrogen metabolite repression in *A. nidulans*. Mol. Gen. Genet. Vol 126. p.: 111-141.
- Arst, H. N. y Bailey, C. R. (1977) The regulation of carbon metabolism in *A. nidulans*, en Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Ed. Smith, J. E. y Pateman, J. A. Academic Press Inc. Nueva York, E. U. p.: 131-146.
- Axelrod, D. E. (1972) Kinetics of differentiation of conidiophores and conidia by colonies of *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. Vol 73. p.: 181-184.
- Axelrod, D. E.; Gealt, M. y Pastushok, M. (1973) Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. Devel. Biol. Vol 34. p.: 9-15.
- Barnicki-Garcia, S.; Braker, C. E.; Reyes, E. y Ruiz-Herrera, J. (1978) Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrils *in vitro*. Exp. Mycol. Vol 2. p.: 173-192.
- Boylan, M. T.; Mirabito, P. M.; Willett, C. E.; Zimmerman, C. R. y Timberlake, W. E. (1987) Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. Mol. Cel. Biol. Vol 7. p.: 3113-3118.
- Brise, C. E. y Clutterbuck, A. J. (1990) N-acetil-6-hydroxytryptophan oxidase, a developmentally controlled phenol oxidase from *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. Vol 136. p.: 1725-1730.
- Brise, C. E. y Clutterbuck, A. J. (1991) Isolation and developmentally regulated expression of an *Aspergillus nidulans* phenol oxidase encoding gene, *ivoB*. Gene. Vol 98. p.: 69-76.

- Butnick, N. Z.; Yager, L. N.; Kurtz, M. B. y Champe, S. P. (1984) Genetic analysis of mutants of *Aspergillus nidulans* blocked at an early stage of sporulation. *J. Bac.* Vol 160. p.: 541-545.
- Caddick, M. X. (1992) Characterization of a major *Aspergillus* regulatory gene, *araA*. en *Molecular biology of filamentous fungi*. Ed. Stahl, U. y Tudzynski, P. VCH Publications. Berlin, Alemania. p.: 141-152.
- Caddick, M. X. y Arst, H. N. (1986) Structural genes for phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res. Camb.* Vol 47. p.: 83-91.
- Caddick, M. X.; Brownlee, A. G. y Arst, H. N. (1986a) Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* Vol 203. p.: 346-353.
- Caddick, M. X.; Brownlee, A. G. y Arst, H. N. (1986b) Phosphatase regulation in *Aspergillus nidulans*: responses to nutritional starvation. *Genet. Res. Camb.* Vol 47. p.: 93-102.
- Champe, S. P.; Kurtz, M. B.; Yager, L. M.; Butnick, N. J. y Axelrod, D. E. (1981) Spore formation in *Aspergillus nidulans*: Competence and other developmental processes, en *The fungal spore: Morphogenetic controls*. Ed. Turian, G. y Hohl, H. R. Academic Press, Nueva York, E. U. p.: 255-276.
- Champe, S. P.; Rao, P. y Chang, A. (1987) An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* Vol 133. p.: 1383-1387.
- Champe, S. P. y Simon, L. D. (1992) Cellular differentiation and tissue formation in the fungus *Aspergillus nidulans*, en *Morphogenesis: An*

- analysis of the development of biological form. Ed. Rossumondo, E. y Alexander, S. Marcel Dekker Inc. Nueva York, E. U. p.: 63-91.
- Chang, Y. C. y Timberlake, W. E. (1993) Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics*. Vol 133. p.: 29-38.
- Chory, J.; Peto, C.; Feinbaum, R; Pratt, L. y Ausubel, F. (1989) *Arabidopsis thaliana* mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell*. Vol 58. p.: 991-999.
- Clutterbuck, A. J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. Vol 63. p.: 317-327.
- Clutterbuck, A. J. (1970) A variegated positional effect in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* Vol 16. p.: 303-316.
- Clutterbuck, A. J. (1974) *Aspergillus nidulans*, en *Handbook of Genetics*. Ed. King, R. C. Plenum Press, Nueva York, E. U. p.: 447-510.
- Clutterbuck, A. J. (1977) The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*, en *Genetics and Physiology of Aspergillus*. Ed. Smith, J. E. y Pateman, J. A. Academic Press, Londres, Inglaterra. p.: 305-317.
- Clutterbuck, A. J. (1990) The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* Vol 136. p.: 1731-1738.
- Clutterbuck, A. J. y Spathas, D. H. (1984) Genetic and environmental modification of gene expression in the *brlA12* variegated position effect mutant of *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res. Camb.* Vol 43. p.: 123-138.

- Clutterbuck, A. J. y Timberlake, W. E. (1992) Genetic regulation of sporulation in the fungus *Aspergillus nidulans*, en Development, The molecular genetic approach. Ed. Russo, V. E. A.; Brody, S.; Cove, D. J. y Ottolenghi, S. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Cole, G. T. (1986) Models of cell differentiation in conidial fungi. Microbiol. Rev. Vol 50. p.: 95-132.
- Cove, D. J. (1979) Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. Biol. Rev. Vol 54. p.: 291-327.
- Cove, D. J.; Brody, S.; Ottolenghi, S. y Russo V. E. A. (1992) Introduction to development, en Development, The molecular genetic approach. Ed. Russo, V. E. A.; Brody, S.; Cove, D. J. y Ottolenghi, S. Springer-Verlag, Berlin, Alemania. p.: 1-19.
- Crebelli, R. y Bandiera, M. (1983) Short-cycle conidiation in *Aspergillus nidulans*; influence of glucose concentration and acetate or citrate supply. Microbiologica. Vol 1. p.: 27-34.
- Doe, C. Q. y Goodman, C. S. (1985) Early events in insect neurogenesis II. The role of cell interactions and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells. Dev. Biol. Vol 111. p.: 206-219.
- Dorn, G. (1965) Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus nidulans*. Genet. Res. Camb. Vol 6. p.: 13-26.
- Dowzer, C. E. A. y Kelly, J. M. (1991) Analysis of *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell. Biol. Vol 11. p.: 5701-5709.

- Driver, W. y Nüsslein-Volhard, C. (1988) The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration dependent manner. Cell. Vol 54. p.: 95-104.
- Drysdale, M. R.; Kolze, S. E. y Kelly, J. M. (1993) The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. Gene. Vol 130. p.: 241-245.
- Espeso, E. A. y Peñalva, M. A. (1992) Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans*. Mol. Microbiol. Vol 6. p.: 1457-1465.
- Espeso, E. A.; Tilburn, J.; Arst, H. N. y Peñalva, M. A. (1993) pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. EMBO J. Vol 12. p.: 3947-3956.
- Fantes, P. (1989) Yeast cell cycle. Curr. Opin. Cell. Biol. Vol 1. p.: 250-255.
- Ferguson, E. L., Sternberg, P. W. y Horvitz, H. R. (1987) Genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. Nature. Vol 326. p.: 259-267.
- Fernell, D. I. (1977) *Aspergillus* taxonomy, en Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Ed. Smith, J. E. y Pateman, J. A. Academic Press, Londres, Inglaterra. p.: 1-21.
- Fu, Y. H. y Marzluf, G. A. (1990) *nit-2*, the mayor positive acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. P.N.A.S. Vol 87. p.: 5331-5335.
- Fulton, Ch. (1983) Macromolecular syntheses during the quick-change act of *Naegleria*. J. Protozool. Vol 30. p.: 192-198.

- Galbraith, J. C. y Smith, J. E. (1969) Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture. *J. Gen. Microbiol.* Vol 59. p.: 31-45.
- Gems, D. H.; Johnstone, I. y Clutterbuck, A. J. (1991) An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene.* Vol 98. p.: 61-67.
- Gerish, G. (1987) Cyclic AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium*. *Annu. Rev. Biochem.* Vol 56. p.: 853-879.
- Han, S.; Navarro, J.; Greve, R. A. y Adams, T. H. (1993) Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J.* Vol 12. p.: 2449-2457.
- Hansberg, W. y Aguirre, J. (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* Vol 142. p.: 201-221.
- Hengge-Aronis, R. (1993) Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell.* Vol 72. p.: 162-168.
- Hynes, M. J. y Kelly, J. M. (1977) Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* affected in carbon metabolism. *Mol. Gen. Genet.* Vol 150. p.: 193-204.
- Ilmén, M.; Thrane, C. y Penttilä, M. Structure and expression of the *creA1* of *Trichoderma*. 2nd. European Conference on Fungal Genetics. Luntern, Holanda, Abril 28 - Mayo 1, 1994.
- Jacob, F. y Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* Vol 3. p.: 318-356.

- Johnstone, I. I. J.; Hughes, S. G. y Clutterbuck, A. J. (1985) Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. EMBO J. Vol 4. p.: 1307-1311.
- Käfer, E. (1965) The origin of translocations in *Aspergillus nidulans*. Genetics. Vol 52. p.: 217-232.
- Käfer, E. (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. Adv. Genet. Vol 19. p.: 33-131.
- Keston, A. S. (1956) Specific colorimetric enzymatic analytical reagents for glucose. Abstract of papers, 129th Meeting ACS. Dallas, E. U. p.: 31C.
- Kim, S. K.; Kaiser, D. y Kuspa, A. (1992) Control of cell density and pattern by intercellular signals in *Myxococcus* development. Annu. Rev. Microbiol. Vol 46. p.: 117-139.
- Klug, A. y Rhodes, D. (1987) "Zinc fingers": a novel protein motif for nucleic acid recognition. TIBS. Vol 12. p.: 464-469.
- Klumburg, P.; Sequeval, D.; Lenouvel, F.; Mathieu, M. y Felenbok, B. (1992) Identification of the promoter region involved in the autoregulation of the transcription activator AlcR in *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell. Biol. Vol 12. p.: 1932-1939.
- Kudla, B.; Caddick, M. X.; Langdon, T.; Martinez-Rossi, N. M.; Bennett, C. F.; Sibley, S.; Davies, R. W. y Arst, H. N. (1990) The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. EMBO J. Vol 9. p.: 1355-1364.
- Lee, B. N. y Adams, T. H. (1994) The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is

- related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes and Devel.* Vol 8. p.: 641-651.
- Li, S.; Lee, B. y Shimkets, L. J. (1992) *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes and Devel.* Vol 6. p.: 401-410.
- Martinelli, S. D. (1976) Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. *Trans. B. Mycol. Soc.* Vol 67. p.: 121-128.
- Martinelli, S. D. (1979) Phenotypes of double conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* Vol 114. p.: 277-287.
- Martinelli, S. D. y Clutterbuck, A. J. (1971) A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* Vol 69. p.: 261-268.
- Marzluf, G. A. (1993) Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol 47. p.: 31-55.
- Mazur, P.; Meyers, H. V.; Nakanishi, K.; El-Zayat, A. A. E. y Champe, S. P. (1990) Structural elucidation of sporogenic fatty acid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Tetrahedron Lett.* Vol 27. p.: 3837-3840.
- McCullough, W.; Payton, M. A. y Roberts, C. F. (1977) Carbon metabolism in *Aspergillus nidulans*, en *Genetics and physiology of Aspergillus*. Ed. Smith, J. E. y Pateman, J. A. Academic Press Inc. Nueva York, E. U. p.: 97-129.
- McCully, K. S. y Forbes, E. (1965) The use of *p*-fluorophenylalanine with "master strains" of *Aspergillus nidulans* for assigning genes to linkage groups. *Genet. Res. Camb.* Vol 6. p.: 352-359.

- McKerracher, L. J. y Heath, I. B. (1987) Cytoplasmic migration and intracellular organelle movement during tip growth of fungal hyphae. *Exp. Mycology*. Vol 11. p.: 79-100.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, E. U. p.: 352-355.
- Miller, B. L. (1993) Brushing up on bristles: complex genes and morphogenesis in molds. *TIGS*. Vol 9. p.: 293-295.
- Miller, J.; McLachlan, A. D. y Klug, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*. Vol 4. p.: 1609-1614.
- Miller, K. Y.; Toennis, T. M.; Adams, T. H. y Miller, B. L. (1991) Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Mol. Gen. Genet*. Vol 227. p.: 285-292.
- Miller, K. Y.; Wu, J. y Miller, B. L. (1992) *StuA* is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Gene. Devel*. Vol 6. p.: 1770-1782.
- Mirabito, P. M.; Adams, T. H. y Timberlake, W. E. (1989) Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell*. Vol 57. p.: 859-868.
- Mooney, J. L. y Yager, L. N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes. Devel*. Vol 4. p.: 1473-1483.
- Mooney, J. L.; Hassett, D. E. y Yager, L. N. (1990) Genetic analysis of suppressors of the *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. Vol 126. p.: 869-874.

- Morton, A. G. (1961) The induction of sporulation in mould fungi. Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci. Vol 153. p.: 548-569.
- Nehlin, J. y Ronne, H. (1990) Yeast MIG1 repressor is related to the mamalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. EMBO J. Vol 9. p.: 2891-2898.
- Olivier, P. T. P. (1972) Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. Vol 73. p.: 45-54.
- Pastushok, M. y Axelrod, D. E. (1976) Effect of glucose, ammonium and media maintenance on the time of conidiophore induction by surface colonies of *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. Vol 94. p.: 221-224.
- Pontecorvo, G.; Roper, J. A.; Hemmons, L. M.; MacDonald, K. D. y Bufon, A. W. J. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. Vol 5. p.: 141-238.
- Prade, R. A. y Timberlake, W. E. (1993) The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus consist of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. EMBO J. Vol 12. p.: 2439-2447.
- Pratt, L. H. (1982) Phytochrome: the protein moiety. Annu. Rev. Plant. Physiol. Vol 33. p.: 557-582.
- Priming, M.; Sockanathan, S.; Auer, H. y Nasmyth, K. (1992) Anatomy of a transcription factor important for the start of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature. Vol 358. p.: 593-597.
- Raabo, E. y Terkildsen, T. C. (1960) On the enzymatic determination of blood glucose. Scand. J. Clin. Lab. Inv. Vol 12.

- Reznikoff, W. S. (1992) The lactose operon controlling elements: a complex paradigm. *Mol. Microbiol.* Vol 6. p.: 2419-2422.
- Robbins, J.; Dilworth, S. M.; Laskey, R. A. y Dingwall, C. (1991) Two independent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: Identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell.* Vol 64. p.: 615-623.
- Romano, A. H. y Kornberg, H. L. (1968) Regulation of sugar utilization by *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta.* Vol 158. p.: 491-493.
- Rossi, A. y Arst, H. N. (1990) Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than the wild type when grown at more moderate pH. *FEMS Microbiol. Lett.* Vol 66. p.: 51-54.
- Sakai, A.; Shimizu, Y. e Hishinuma, F. (1988) Isolation and characterization of mutants wich show an oversecretion phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* Vol 119. p.: 499-506.
- Sakai, A.; Shimizu, Y.; Kondu, S.; Chibazakura, T. e Hishinuma, F. (1990) Structure and molecular analysis of RGR1, a gene required for glucose repression of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* Vol 10. p.: 4130-4138.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual.* Segunda Edicion. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, E. U.
- Saxena, R. K. y Sinha, U. (1973) Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged liquid culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.* Vol 19. p.: 141-146.

- Scazzocchio, C. (1992) Control of gene expression in the catabolic pathways of *Aspergillus nidulans*: A personal and biased account, en *Aspergillus*, biology and industrial applications. Ed. Bennett, J. W. y Klich, M. A. Butterworth-Heinemann Publications. Londres, Inglaterra. p.: 43-68.
- Shah, A. J.; Tilburn, J.; Adlard, M. W. y Arst, H. N. (1991) pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol. Lett. Vol 77. p.: 209-212.
- Smith, J. C. (1987) A mesoderm-inducing factor is produced by a *Xenopus* cell line. Devel. Vol 99. p.: 3-14.
- Smith, J. E.; Anderson, J. G.; Deans, S. G. y Davis, B. (1977) Asexual development in *Aspergillus*, en Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Ed. Smith, J. E. y Pateman, J. A. Academic Press, Londres, Inglaterra. p.: 23-57.
- Stankovich, M.; Platt, A.; Caddick, M. X.; Langdon, T.; Shaffer, P. M. y Arst, H. N. (1993) C-terminal truncation of the transcriptional activator encoded by *areA* in *Aspergillus nidulans* results in both loss-of-function and gain-of-function phenotypes. Mol. Microbiol. Vol 7. p.: 81-87.
- Strauch, M. A. y Hoch, J. A. (1992) Sporulation in prokaryotes and lower eukaryotes. Curr. Opin. Genet. Devel. Vol 2. p.: 799-804.
- Tamame, M.; Antequera, F.; Villanueva, J. R. y Santos, T. (1983) High-frequency conversion to a "fluffy" developmental phenotype in *Aspergillus spp.* by 5-azacytidine treatment: evidence for involvement of a single nuclear gene. Mol. Cell. Biol. Vol 3. p.: 2287-2297.
- Timberlake, W. E. (1980) Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. Dev. Biol. Vol 78. p.: 497-510.

- Timberlake, W. E. (1991a) Temporal and spatial controls of *Aspergillus* development. *Curr. Opin. Genet. Devel.* Vol 1. p.: 351-357.
- Timberlake, W. E. (1991b) Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu. Rev. Genet.* Vol 24. p.: 5-36.
- Timberlake, W. E. (1993) Translational triggering and feedback fixation in the control of fungal development. *Plant Cell.* Vol 5. p.: 1453-1460.
- Timberlake, W. E. y Marshall, M. A. (1988) Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *TIG.* Vol 4. p.: 162-169.
- Trumbly, R., J. (1992) Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* Vol 6. p.: 15-21.
- Vézina, C.; Singh, K. y Sehgal, S. N. (1965) Sporulation of filamentous fungi in submerged culture. *Mycologia.* Vol 57. p.: 722-736.
- Yager, L. N.; Kurtz, M. B. y Champe S. P. (1982) Temperature shift analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* Vol 93. p.: 92-103.
- Yager, L. N. (1992) Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*, en *Aspergillus*, biology and industrial applications. Ed. Bennett, J. W. y Klich, M. A. Butterworth-Heinemann Publications. Londres, Inglaterra. p.: 19-42.
- Zimmerman, C. R.; Orr, W. C.; Leclere, R. F.; Barnard, E. C. y Timberlake, W. E. (1980) Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development. *Cell.* Vol 21. p.: 709-715.
- Zonneveld, B. J. M. (1977) Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*, en *Genetics and Physiology of Aspergillus*.

Ed. Smith, J. E. y Pateman, J. A. Academic Press, Londres, Inglaterra.
p.: 59-95.