



03062 18 24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

CARACTERIZACION GENETICA Y FISIOLÓGICA DE UNA MUTANTE AFECTADA EN EL INICIO DE LA ESPORULACION ASEJUAL EN Aspergillus nidulans

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA (BIOQUIMICA) PRESENTA: BIOL. ROSALINDA TAPIA LOPEZ

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Con muchísimo cariño a mis Papas por todas sus enseñanzas y por su apoyo.

A Liliana y Violeta, mis hermanas por su todos los momentos felices que hemos tenido juntas y hasta por los no tan divertidos.

A toda mi familia por su apoyo y cuidados.

A Bruno, Sofia, María y Fedro, con todo mi cariño por la alegría que representan en mí.

A todos mis amigos por todos los momentos compartidos en las buenas y en las malas, Uds. saben a quienes me refiero.

Agradezco a mi comité tutorial integrado por:

Dra. Alicia González Manjarrez

Dr. Luis Servín

Dr. Jesús Aguirre Linares

por sus valiosas discusiones y aportaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al jurado formado por :

Dr. Jesús Aguirre Linares

Dra. Carmen Gómez Eichelmann

Dra. Alicia González Manjarrez

Dr. Roberto Coria Ortega

Dr. Julio Morán Andrade

por sus acertados y estimulantes comentarios, así como brindarme su valioso tiempo en la revisión de este trabajo.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al CONACYT por las becas otorgadas para la realización de este trabajo.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares, en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Agradezco profundamente al Dr. Jesús Aguirre Linares enseñarme a conocer la Diferenciación Celular, al depositar en mis manos un proyecto tan interesante, el cual me motivo a formar una conciencia más crítica y a enfrentarme a resolver problemas fundamentales de la Biología. Mil Gracias por dejarme ayudar a formar y ser parte de tu laboratorio.

Agradezco también profundamente y con sumo respeto a la Dra. Aurora Brunner L., por iniciarme en el camino de la Investigación y de la Biología Molecular. En su memoria.

Agradezco ala Universidad Nacional Autónoma de México, nuestra "Máxima Casa de Estudios".

Agradezco al Dr. Wilhelm Hansberg por sus valiosos comentarios en el desarrollo de este trabajo, así como por enseñarnos Ciencia.

Agradezco a la Dra. Elena Alvarez-Buylla por la confianza depositada en mí, así como por su infinita paciencia durante la realización de este manuscrito.

Agradezco a Q.F.B. Rogelio Ortiz C. por su ayuda en el mapeo de la mutación fluH.

Agradezco al M. en C. Octavio Loera por su gran ayuda en la utilización del Procesador de Imágenes para analizar la morfología de las mutantes estudiadas. También agradezco al Dr. Gustavo Viniegra el permitirme usar este equipo en su laboratorio, en el Departamento de Biotecnología de la UAM Iztapalapa.

Agradezco de manera especial a Angeles Cortéz T. por su gran disposición e invaluable ayuda para llevar adelante el Laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Centro de Ecología.

Agradezco especialmente y con mucho cariño Laurita Kawasaki, Paula González, Mónica Magidin, Rosa Estela Navarro, Olivia Sánchez, Denhi Schnabel, Isaac Skormne y a Ernesto Maldonado (que casi es del lab. 106 Ote.) por haber hecho del laboratorio un lugar tan agradable para trabajar, donde siempre hay oportunidad para discutir, aprender, cotorrear, y hasta para hablar sobre "el bien y el mal". Muchas gracias por su amistad.

Agradezco a todos mis amigos del Laboratorio de Genética Molecular y Evolución su amistad y por los buenos ratos, espero no olvidar a ninguno: Angeles, Ale, Alicia, Caroline, Liz, Adrián, Guadalupe, Alvaro, Carlos, Sol, Rodolfo, Paco, León, Paty, Marcos, Toño, Adriana, Rosaura, Sergio, Pablo, Victor, Paloma. También con gran cariño al Dr. Ken Oyama por brindarme su valiosa amistad.

A Glorita Guerrero por su amistad, disposición y ayuda, Mil Gracias.

Agradezco a Fernando Lledías (también por su valiosa amistad) y al Ing. Rodrigo Montúfar Ch. por su ayuda para la impresión de este trabajo.

Agradezco a mis amigos del Seminario de Estructura de Proteínas por su amistad y sobre todo por las excelentes discusiones sobre la vida y las proteínas incluidas las TPI y las ATPasas obviamente. A Elena Hilario, José J. García, Alejandro Fernández, Edgar Vazquez, Héctor Ceceña y Santiago Rebolledo.

Agradezco a los Srs. Rodolfo Paredes D., Jorge Sepulveda y Arturo Franco por su ayuda con las fotografías presentadas en el presente trabajo. Mil Gracias también a la M. en C. Ember Gutiérrez por las fotos tomadas y por tu amistad.

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
Diferenciación Celular.....	1
<i>Aspergillus nidulans</i> como sistema experimental para estudiar la Diferenciación Celular.....	5
Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	6
El gen <i>bria</i> y otros genes reguladores de la conidiación de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	9
Mutantes "fluffy" o algodonosas.....	13
<b>OBJETIVOS</b> .....	16
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	17
Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> empleadas en este trabajo.....	17
Medios de cultivo.....	17
Medición de la actividad de proteasas.....	19
Medición de la actividad de amilasas.....	19
Colecta y cuantificación de esporas.....	19
Curvas de crecimiento.....	20
Cultivos sincrónicos en medio sólido.....	20
Cultivos sumergidos.....	21
Análisis microscópico.....	22
Determinación de la actividad específica de $\beta$ -galactosidasa.....	22
Determinación de glucosa.....	23
Análisis genético.....	24
Mutagénesis por radiación con luz ultravioleta.....	27
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	28
<i>fluHI</i> define un nuevo locus en <i>Aspergillus nidulans</i> , cuya mutación causa un considerable retraso en la esporulación asexual.....	28
La limitación de glucosa suprime parcialmente los efectos de la mutación <i>fluHI</i> .....	31



La tasa de crecimiento y el consumo de glucosa en cultivos líquidos no se ven afectados por la mutación <i>fluH1</i> .....	33
Análisis morfológico de la mutante <i>fluH1</i> .....	35
La expresión del gen <i>brlA</i> se encuentra marcadamente retrasada en cepas con la mutación <i>fluH1</i> .....	37
La privación de carbono suprime parcialmente el requerimiento de <i>fluH1</i> en cultivos sumergidos.....	39
El gen <i>fluH</i> es indispensable para la esporulación inducida por la privación de nitrógeno.....	43
Otros genes, cuya mutación genera fenotipos algodonosos, también se requieren para esporular por privación de nitrógeno.....	45
Obtención y caracterización parcial de mutantes con supresores extragénicos de <i>fluH1</i> .....	47
Niveles de esporulación en las mutantes CRT9, CRT10, CRT11 y CRT12.....	49
Caracterización genética de las mutantes con posibles supresores de <i>fluH1</i> .....	50
Análisis de dominancia.....	56
Caracterización de mutantes afectadas en el gen <i>suAfluH1</i> : .....	57
Caracterización Morfológica de la mutante <i>suAfluH1</i> .....	58
Caracterización fisiológica. sobreproducción de proteasas y amilasas extracelulares por la mutante <i>suAfluH1</i> .....	61
Caracterización genética de la mutante <i>suAfluH1</i> .....	65
El gen <i>suAfluH1</i> es indispensable para esporular por privación de carbono.....	67
<b>DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>79</b>

## RESUMEN

La esporulación asexual o conidiación del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* ha constituido un buen sistema experimental para abordar problemas de diferenciación celular y regulación genética. La esporulación en este ascomiceto es dependiente de la activación del gen *brlA*, el cual codifica para una proteína con un dominio de unión al DNA del tipo dedos de zinc. Esta y otras evidencias indican que la función del producto del gen *brlA* es la de un activador transcripcional fundamental.

Se han descrito algunos factores ambientales que regulan la activación de *brlA* tales como posibles hormonas, la luz y la privación de nutrientes específicos. Sin embargo, los factores genéticos que controlan al gen *brlA* han sido poco estudiados. En este trabajo se reporta el aislamiento y caracterización de una nueva mutante del tipo algodonoso, la cual se caracterizó por presentar una proliferación de hifas aéreas no diferenciadas, una capacidad para invadir colonias cercanas y como característica principal, un considerable retraso en la conidiación.

A partir de diversos estudios genéticos de esta mutante, se definió al locus *fluH*, mismo que se mapeo en el cromosoma IV. La morfología de las hifas de la mutante *fluH1* se estudió con respecto a los patrones de ramificación y diámetro de las hifas. Los resultados indicaron que el fenotipo algodonoso de la mutante *fluH1* está asociado a modificaciones en su patrón de crecimiento, presentando una tasa de ramificación menor que la observada para una cepa silvestre. Se comprobó que el retraso en la esporulación asexual se debió a una inducción menor y tardía del gen *brlA*. Se demostró que en cultivos sólidos se requiere del gen *fluH* para esporular normalmente, pero que en condiciones de limitación de glucosa, éste requerimiento fué parcialmente aminorado. Por el contrario, en cultivos líquidos, se determinó que el gen *fluH* es indispensable para esporular en ausencia de nitrógeno, más no así en privación de glucosa. Se encontró que además de *fluH*, existen al menos otros 3 genes cuya mutación también genera un fenotipo algodonoso y que son requeridos para esporular en condiciones de privación de nitrógeno.

En la segunda parte de este trabajo, se reporta el aislamiento y caracterización de cuatro mutantes conteniendo supresores extragénicos de *fluH1*. Las mutaciones supresoras aisladas resultaron ser monogénicas y recesivas. Tres de ellas no confirieron ningún fenotipo en un fondo genético silvestre, mientras que la cuarta mutación confirió un

fenotipo bien definido y se denominó *suAfluH1* al locus afectado. La mutante *suAfluH1* se analizó de manera más detallada con respecto a su patrón de crecimiento y a la respuesta a la privación de nutrientes. La mutación de *suAfluH1* genera un fenotipo pleiotrópico en el cual se observan modificaciones en el patrón de crecimiento micelial, generando hifas cortas, engrosadas y con una alta frecuencia de ramificación. También se observó la sobreexpresión de algunas proteínas extracelulares tales como proteasas y amilasas. En condiciones de privación de nitrógeno en medio líquido, el gen *suAfluH1* resultó ser dispensable para esporular, mientras que cuando el nutriente eliminado fue la glucosa, éste gen resultó necesario para inducir la expresión de *brlA* y por consiguiente para esporular. Una mutante doble *fluH1/suAfluH1*, presenta un fenotipo con características de ambas mutantes; valores intermedios de ramificación y morfología de las hifas y una esporulación por privación de nutrientes semejante a la observada en la mutante *fluH1*, lo cual sugiere interacciones complejas entre los productos de ambos genes.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican la existencia de múltiples factores ambientales y genéticos que determinan la esporulación asexual en *A. nidulans*. Junto con estudios de otros laboratorios, nuestros resultados muestran que la regulación del gen *brlA* es un proceso genéticamente complejo donde intervienen varios genes y donde algunos de los productos de éstos, parecen interactuar directamente. Se han definido al menos 9 genes, incluidos *fluH* y *suAfluH1*, cuya mutación afecta la conidiación en diversas circunstancias. Los resultados del estudio de las mutantes *fluH1* y *suAfluH1* en condiciones de privación de nutrientes, muestran claramente que aunque ambos tipos de stress nutricional conducen a la expresión del gen *brlA* y a la esporulación, ambas señales son procesadas por vías independientes.

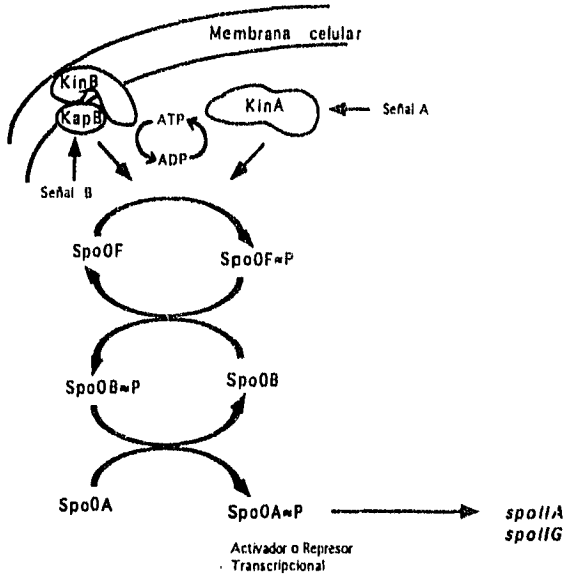
## INTRODUCCION

### Diferenciación Celular:

El desarrollo en los organismos multicelulares es un proceso complejo de cambios graduales y progresivos. El desarrollo comprende principalmente dos fases: la primera en la cual se genera la diversidad o diferenciación celular y una segunda que constituye la reproducción. Durante la diferenciación celular ocurren la morfogénesis, que se refiere primordialmente a la organización de las diferentes células en diferentes tejidos u órganos y el crecimiento.

Los microorganismos han constituido excelentes modelos experimentales para tratar de entender la diferenciación celular y nos han permitido conocer muchos de los procesos de regulación de la expresión génica que ocurren durante el proceso. En muchos microorganismos se ha determinado que la escasez de nutrientes constituye el estímulo principal para iniciar la diferenciación celular. La privación de fosfato o de nitrógeno, la tensión de oxígeno y la presencia de distintas fuentes de carbono y de nitrógeno, son solamente algunas de las señales ambientales que los microorganismos tienen que sentir, integrar y transducir para producir rápidamente una respuesta apropiada. En el caso de la bacteria *Bacillus subtilis* la limitación de nutrientes lleva a la formación de una endospora, proceso que ha sido considerado como un modelo simple de diferenciación celular en procariontes. A partir de mutantes incapaces de esporular aún en condiciones nutricionales limitantes, se ha determinado toda una red compleja de interacciones entre diferentes productos génicos específicos de la célula madre y de la endospora. Una de las maneras en que las señales ambientales son captadas, es a través de los diferentes "sistemas de dos componentes" (Parkinson, 1995). Estos sistemas están formados por dos moléculas; una proteína sensora encargada de captar las señales ambientales y de enviar éstas señales al segundo componente del sistema, el cual está constituido por una proteína reguladora de la respuesta. Este tipo de proteínas son del tipo modular; la proteína sensora tiene generalmente en su extremo amino terminal el módulo encargado de recibir el estímulo ambiental y en su extremo carboxilo terminal el módulo transmisor. La proteína reguladora de la respuesta recibe la señal en un módulo localizado en su extremo amino terminal, el

cual puede estar acoplado a uno o más dominios de salida de la señal localizados en el extremo carboxilo terminal (Parkinson, 1995). Se ha demostrado que los mecanismos de comunicación entre los dos componentes de este tipo de sistemas involucra reacciones de fosforilación y desfosforilación. En el ejemplo que corresponde a la inducción de la esporulación en *B. subtilis* mostrado en la figura 1, la proteína Spo0F (una de las proteínas reguladoras de la respuesta) es fosforilada por cualquiera de las cinasas KinA o KinB (proteínas sensoras), en respuesta a señales no caracterizadas aún, aunque en el caso de KinB, se cree que la señal para su activación es transmitida a través de la proteína citoplásmica KapB. Una vez que Spo0F es fosforilada, transfiere su grupo fosfato a la proteína Spo0A, a través de la fosfotransferasa Spo0B. La forma activa de Spo0A, que es el estado fosforilado, funciona como factor transcripcional para activar o reprimir la expresión de ciertos genes dependiendo del promotor sobre el que actúe (Hoch, 1995). Como activador, promueve la transcripción de genes como *spoIIA* y *spoIIG*, que codifican para los factores sigma F y sigma E, respectivamente. Los factores sigma, son proteínas accesorias de la RNA polimerasa que le dan especificidad para transcribir ciertos genes. En *B. subtilis*, los factores sigma constituyen un nivel fundamental de la regulación de la expresión genética, indispensable para la formación de la endospora. (Losick, 1989; Errigton, 1992; Hoch, 1995).



**Figura 1.** Esquema del sistema de transducción de señales por fosfotransferencia, durante la esporulación de *Bacillus subtilis*.  
(Figura modificada de Hoch, 1995).

En eucariontes sólo se conocen tres casos de transducción de señales mediadas por sistemas de dos componentes (Chang et al., 1993; Maeda, et al., 1994; Brown, et al., 1993; Alex, et al., 1996). En cambio, se conocen varios sistemas que dependiendo también de cascadas de fosforilación, están mediados por proteínas G triméricas. La respuesta a feromonas en levaduras es un paradigma de este tipo de sistemas de transducción de señales. En él, las células haploides responden a feromonas peptídicas producidas por la célula de tipo de apareamiento contrario, desencadenando así cambios que llevan a la generación de un diploide (Herskowitz, 1995). Una vez que las feromonas son producidas, éstas tienen como blanco a receptores específicos, los cuales están asociados a una proteína

G heterotrimérica. La unión al receptor produce, al parecer, cambios conformacionales que activan a la proteína G disociándola en sus dos componentes  $G\alpha$ -P y  $G\beta\gamma$ , siendo éste último el responsable de activar la cascada de fosforilación efectuada por Proteínas Cinasas Activadas por Mitogénos (MAPK; ver figura 2). El receptor final del grupo fosfato es un factor transcripcional (STE12), el cual en su estado activo (fosforilado), actúa induciendo la transcripción de genes que codifican para componentes de la respuesta a feromonas y genes necesarios para la fusión celular (Ammerer, 1993; Roberts y Fink, 1994; Herskowitz, 1995).

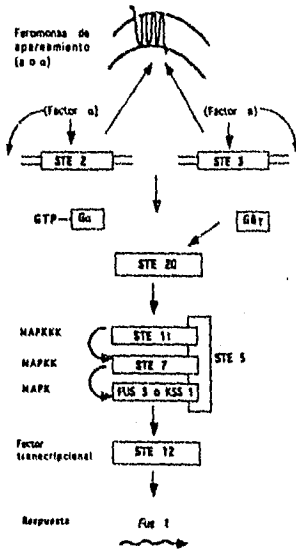


Figura 2. La vía de respuesta a feromonas mediada por proteínas G en *Saccharomyces cerevisiae*.

Una vez que las feromonas actúan sobre su receptor blanco se desencadena una cascada de fosforilaciones por proteínas cinasas que a su vez son activadas por fosforilación. En este modelo se proponen también las interacciones que existen entre los diferentes componentes del sistema, en base a diversos estudios bioquímicos y genéticos. (Figura modificada de Herskowitz, 1995).

## ***Aspergillus nidulans* como sistema experimental para estudiar la diferenciación celular.**

El uso de hongos ascomicetos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*, como organismos experimentales para el estudio de procesos biológicos fundamentales ha sido sumamente decisivo. Estos microorganismos han sido elegidos por ser eucariotes sencillos sujetos a una amplia gama de manipulaciones genéticas.

Aunque para diversos procesos biológicos la levadura ha sido un modelo experimental ampliamente utilizado, representa un modelo de estudio muy limitado para entender procesos de diferenciación celular multicelulares. Por el contrario, *A. nidulans* resulta atractivo debido a que sus actividades reproductivas involucran la formación de conidióforos. Los conidióforos son estructuras complejas que consisten de varios tipos celulares con funciones bien diferenciadas. Entre las principales ventajas de *A. nidulans* como sistema experimental se encuentran las siguientes:

- a) Fácil manipulación por su tamaño pequeño y su crecimiento colonial en medio sólido, lo que permite su replica en placa.
- b) Genoma pequeño ( $2.4 \times 10^7$  pb), aproximadamente 5.8 veces el genoma de *E. coli*.
- c) Se cuenta con una gran variedad de mutantes disponibles en colecciones.
- d) Sus ciclos sexual y asexual son cortos, además de presentar un ciclo parasexual.
- e) Tiene esporas asexuales uninucleadas y haploides, lo que permite su mutagénesis.
- f) Es una especie homotálica, es decir existe un sólo tipo de cruce y por ello existe compatibilidad entre todas las cepas de laboratorio.
- g) A partir del establecimiento de diploides y heterocariontes se pueden realizar análisis de complementación y de dominancia.
- h) A la fecha más de 700 genes han sido mapeados en sus ocho cromosomas.
- i) Se puede analizar la expresión de ciertos genes por medio de fusiones entre regiones regulatorias y genes reporteros (como el de la  $\beta$ -galactosidasa), o con promotores regulables y genes estructurales (como es el caso del promotor *alcA*).
- j) Existen sistemas de transformación con una variedad de vectores.



### Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*.

#### Fase Asexual.

Al ser expuesto el micelio vegetativo a una interfase aérea, se induce la fase asexual del ciclo de vida. Esta fase se caracteriza por la detención del crecimiento polarizado y su reemplazo por un crecimiento por gemación, que lleva a la formación de la estructura portadora de las esporas asexuales o conidias (Smith, et al, 1977; Clutterbuck y Timberlake, 1992; Timberlake y Marshall, 1988). Durante mucho tiempo se planteó que para esporular, la interfase aérea era un requisito indispensable en *Aspergillus nidulans* y que además la conidiación era un evento genéticamente programado que no dependía de factores ambientales (Axelrod, 1973; Adams, et al., 1988; Mooney y Yager, 1990; Champe y Simons, 1992; Han, et al., 1993; Lee y Adams, 1994). Skromne et al. (1995), demostraron que en condiciones de cultivo líquido podía inducirse la esporulación por privación de nutrientes. Con los hallazgos reportados por Skromne, dos de las premisas postuladas para la conidiación de *A. nidulans* fueron revocadas:

La esporulación no depende únicamente de una interfase aérea y no es un fenómeno genéticamente programado independiente de factores ambientales, ya que puede inducirse por privación de nutrientes. Skromne y colaboradores, también demostraron que la expresión del gen *brlA* (regulador primario de la esporulación) ocurre de manera dosis-dependiente. Durante la privación de glucosa, la inducción de *brlA* llegó a niveles altos en poco tiempo, produciendo esporas a partir de las puntas de las hifas. Mientras que durante la privación de nitrógeno, la inducción de *brlA* era gradual, y se producían conidióforos semejantes a los obtenidos en una interfase aérea. Otro de los factores que se conoce que inducen la conidiación son los factores "psi". Los factores psi (precocious sexual inducer) son precursores "hormonales" derivados del ácido linoleico, purificados a partir de una mutante que presentaba un retraso en la conidiación. Al agregar a un cultivo confluyente una muestra concentrada del factor psi, se inhibe la conidiación y se induce prematuramente la reproducción sexual (Champe, 1987; Champe y Simon, 1992; Manzur et al., 1990). La actividad del factor psi está determinada por diferentes formas interconvertibles de éste, psiA, psiB y psiC (Kurtz y Champe, 1981; Champe, et al., 1989). Estas señales no se encuentran bien caracterizadas, ya que aún no se conoce cuáles son los factores que promueven su interconversión y su producción.

Además de los estímulos ambientales necesarios para iniciar el desarrollo en *A. nidulans*, también se han descrito diversos requerimientos genéticos para que se lleve a cabo este proceso. Axelrod (1972; 1979) demostró que para esporular no sólo bastaba que un micelio vegetativo pudiera crecer, sino que también era necesario alcanzar cierta madurez; aproximadamente 18 h después de la germinación. Si un micelio vegetativo es expuesto a una interfase aérea, este no comenzará a esporular hasta que no obtenga cierta capacidad para responder a los diferentes estímulos dados ("Capacitancia"; Axelrod, 1979). Aunque la capacitancia ha sido un fenómeno poco entendido, resulta evidente la necesidad de emenderla a nivel molecular (Champe, et al., 1981).

El desarrollo asexual se inicia por la diferenciación de algunas células de las hifas en células pie, las cuales sostienen a los conidióforos (figura 3). A partir de la células pie se desarrollan hifas aéreas que crecen perpendicularmente al micelio vegetativo, llamadas tallos. Las paredes celulares de los conidióforos son más delgadas y más hidrofóbicas que las de las células vegetativas. Los tallos crecen hasta una altura aproximada de 100  $\mu\text{m}$  y comienzan a hincharse para formar una vesícula multinucleada. A partir de gemaciones múltiples de la vesícula se originan las métulas (sterigmata primarios) y la gemación subsecuente de las métulas genera al siguiente tipo celular ó filídes (sterigmata secundarios), las cuáles son las células conidiogénicas. Las conidias se forman por divisiones mitóticas repetidas del núcleo de cada filíde.

#### Fase sexual.

*A. nidulans* como ya se ha mencionado anteriormente es una especie homotálica, por lo que una cruce puede darse dentro de una misma colonia. Para que haya reproducción sexual se requiere la fusión de un par de hifas provengan o no de la misma cepa y, por consiguiente, de la fusión de núcleos para formar un diploide ( $2n$ ), fase que puede ser estable (figura 1). Las células diploides, por una disminución en la tensión de oxígeno o por la obscuridad pueden enrollarse y formar agregados. Los agregados celulares pueden hincharse y formar a las células nodrizas o "hulle" del cleistotecio (cuerpo fructífero). En el interior del cleistotecio se lleva a cabo la cariogamia.

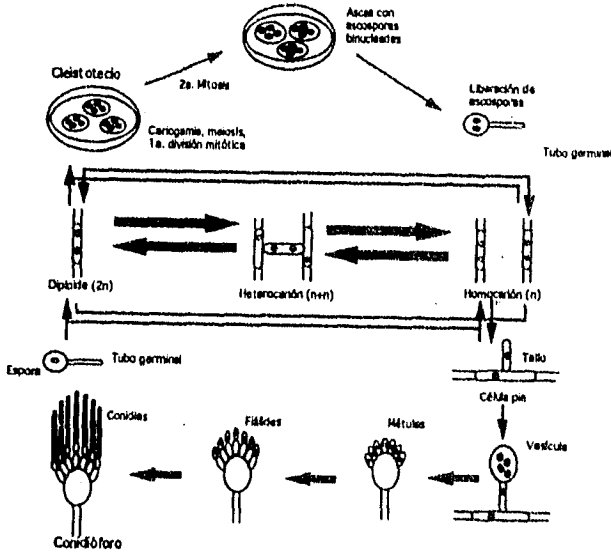


Figura 3. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*.

La porción central muestra a las células vegetativas (hifas) que crecen por extensión apical y por ramificación. Estas hifas pueden poseer núcleos genéticamente idénticos (homocariotes) o distintos (heterocariotes). En un heterocarión los núcleos pueden fusionarse y generar un diploide estable o transitorio. Los homocariotes y heterocariotes, tanto haploides como diploides, pueden reproducirse de manera sexual (parte superior de la figura) o asexual (parte inferior). Los diploides pueden entrar a la fase sexual del ciclo de vida al ocurrir la cariogamia. La fusión de núcleos es seguida de una meiosis y posteriormente ocurren dos divisiones mitóticas, generándose ocho ascosporas haploides binucleadas. Las ascosporas se generan en bolsas llamadas ascas, las cuales están contenidas en los cleistotecios, que son los cuerpos fructíferos. Las ascosporas al germinar dan origen a hifas haploides homocarióticas.

En el ciclo parasexual, un diploide puede ser haploidizado con la ayuda de agentes químicos que promueven la pérdida de cromosomas al azar.

En la fase asexual del ciclo de vida se forman los conidióforos y a partir de éstos se generan las conidias, que son las esporas asexuales haploides y uninucleadas. Las esporas se forman por mitosis repetidas de las células conidiogénicas ó filídies (figura modificada de Aguirre, 1993).

### Ciclo Parasexual.

Al crecer de manera contigua un par de cepas genéticamente distintas, puede haber fusión de sus hifas, llevando a la formación de un heterocarión. El heterocarión puede ser propagado en un medio mínimo sobre el cual ninguno de los padres puede crecer y se producen conidias de los dos progenitores. Si dos núcleos diferentes se fusionan, se forman espontáneamente diploides heterocigotos a baja frecuencia. Estos diploides pueden seleccionarse en medio mínimo debido a la complementación de auxotroffas. Una vez generados los diploides, éstos pueden ser haploidizados utilizando diversas drogas que afectan la formación de uso mitótico. Durante la haploidización, los ocho pares de cromosomas segregan independientemente. Un haploide generado de esta manera puede entonces poseer cromosomas de ambos progenitores. Cuando se aísla una nueva mutación, la haploidización es la manera más rápida de asignar ésta mutación a un cromosoma, por lo que esta fase del ciclo de vida presenta una gran utilidad.

### **El gen *brlA* y otros genes reguladores de la conidiación de *Aspergillus nidulans*.**

La morfogénesis del conidióforo requiere del establecimiento de gradientes espacio-temporales de factores regulatorios que controlan la activación coordinada de decenas de genes. Además de llevar a cabo la transición de un crecimiento polar de hifas multinucleadas al crecimiento gemante de los esterigmata uninucleados (métulas y filídes), la regulación del desarrollo y el control de ciclo celular parecen estar íntimamente relacionadas

La red genética (figura 3) que controla la conidiación está formada principalmente por cinco loci regulatorios: cerda o "bristle" (*brlA*), abacus (*abaA*), wet-white (*wetA*), stunted (*stuA*) y medusa (*medA*). Mutaciones nulas de estos genes, alteran la expresión de otros genes conidiación-específicos, bloqueando el desarrollo o resultando en la formación de conidióforos aberrantes que parecen ser reminiscencia de los defectos causados por mutaciones homéóticas o mutaciones heterocrónicas en plantas (Coen y Meyerowitz, 1991).

- El gen *brlA*.

En mutantes *brlA* ("bristle"), el proceso de conidiación se inicia con la formación de tallos de conidióforos que crecen indefinidamente, sin formar los siguientes tipos celulares (Clutterbuck, 1969; Martinelli, 1979). La actividad de *brlA* es importante en el control del cambio de crecimiento apical a la formación de vesículas globosas, o sea de un crecimiento polarizado a uno no polarizado. A partir del análisis de la estructura primaria de este gen, se ha encontrado que puede codificar una proteína que tiene dos dominios del tipo "dedos de zinc" semejantes al factor transcripcional TFIIIA de *Xenopus laevis* y ciertas otras proteínas eucarióticas de unión a DNA (Adams, et al., 1988; 1990). La interrupción del desarrollo en sus etapas tempranas en mutantes *brlA*, así como el bloqueo a nivel de la acumulación de RNAm de genes activados específicamente durante la conidiogénesis, ha llevado a proponer que la función de *brlA* es la de un activador transcripcional (Clutterbuck, 1977; Boylan, 1987; Adams et al, 1988 y 1990). Posiblemente, la regulación de genes específicos por *brlA* se efectúe debido a gradientes espacio-temporales de ésta proteína en el conidióforo (Aguirre, 1993). La expresión ectópica de *brlA* desde un promotor inducible, resulta en el detenimiento del crecimiento vegetativo y la formación de conidióforos rudimentarios (Adams, et al., 1988), lo que demuestra que la expresión de este gen es necesaria y suficiente para inducir la esporulación asexual. La diferenciación es mantenida por la amplificación de la expresión de *brlA* a través de una autoactivación (Aguirre, 1993) y por retroalimentación por la proteína AbaA (Boylan, et al., 1987; Adams, et al., 1988; Mirabito, et al., 1989).

El locus *brlA* consiste de dos unidades de transcripción superpuestas: El sitio de iniciación del transcrito *brlA $\alpha$*  cae dentro del único intrón de 392 pares de bases del transcrito *brlA $\beta$*  (Prade y Timberlake, 1993). Con excepción de 23 aminoácidos adicionales en el extremo amino terminal del polipéptido BrlA $\beta$ , los productos traduccionales son idénticos en los restantes 432 residuos. El RNA mensajero (RNAm) de *brlA $\beta$*  presenta como característica particular una región líder muy larga de 752 pb. Dentro de ésta región se localiza un pequeño marco de lectura ( $\mu$ ORF) de 123 pb, característico de los RNAm sujetos a regulación traduccional (Han, et al., 1993; Prade y Timberlake, 1993). Se ha propuesto que el  $\mu$ ORF funciona como regulador de la traducción del RNAm de *brlA $\beta$*  durante el crecimiento (Han, et al., 1993; Miller, 1993).

El siguiente gen en la vía regulatoria de la conidiación es el gen *abaA* (abacus). Las mutantes *abaA* son esporogénicas, pero los conidióforos producidos son casi normales. En lugar de conidias, éstas mutantes producen cadenas anormales de células semejantes a las metulas. El gen *abaA* es miembro de una familia de proteínas de unión a DNA y su transcrito es altamente regulado durante el desarrollo. (Clutterbuck, 1969; Boylan et al., 1987; Mirabito, et al., 1988).

El gen *wetA* tiene una función esencial en el establecimiento de la integridad de la conidia, debido a que cepas que contienen alelos nulos forman esporas que se autolisan antes de la maduración. Los RNA's de un gran número de genes que son transcritos específicamente durante la diferenciación de esporas, pero cuyos productos tienen una función desconocida, están ausentes en esporas de cepas mutantes *wetA*- (Clutterbuck, 1969; 1977; Mirabito, 1988; Aguirre et al., 1990).

Además de los tres genes regulatorios del desarrollo existen un par de genes que aunque no son indispensables para la esporulación, son necesarios para modular la organización espacial del conidióforo. Estos genes son *stuA* ("stunted") y *medA* (medusa). Las mutantes afectadas en estos genes forman algunas esporas viables en conidióforos anormales y son sexualmente estériles (Clutterbuck, 1969; Martinelli, 1979; Miller et al., 1992; 1993; Aguirre, 1993; Timberlake, 1993).

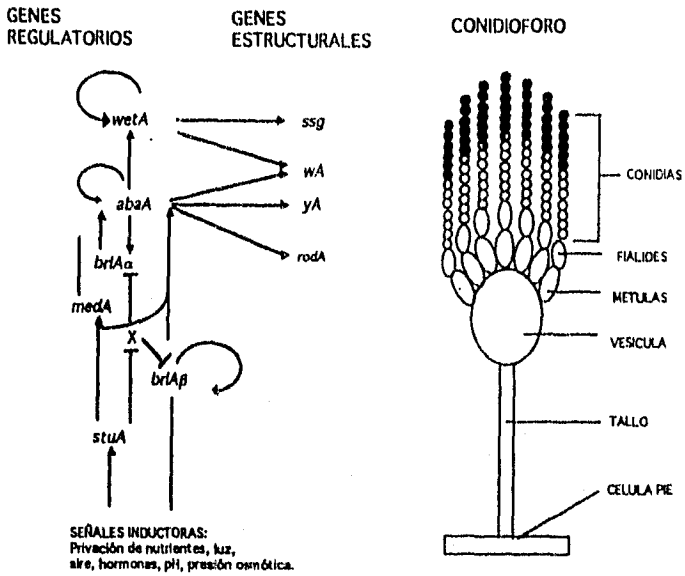


Figura 4. Modelo de las interacciones génicas durante el desarrollo del conidióforo de *Aspergillus nidulans*.

Los genes centrales de la regulación son *briA*, *abaA* y *wetA*. Las actividades de éstos genes son reguladas también por los genes auxiliares *stuA* y *medA*. Los genes estructurales *rodA*, *yA*, *wA* y otros *ssg* (genes específicos de las esporas) son los encargados de conferir el fenotipo de las esporas. Las flechas indican regulación positiva y las barras, regulación negativa. La regulación de *briA* y *abaA* se ha visto estar mediada por interacciones directas entre los factores de transcripción codificados por estos genes y las secuencias promotoras corriente arriba de los genes regulatorios y morfogenéticos. El inicio de la activación de los dos transcritos de *briA*, se dispara por señales inductoras, no caracterizadas aún (tomada de Timberlake, 1993).

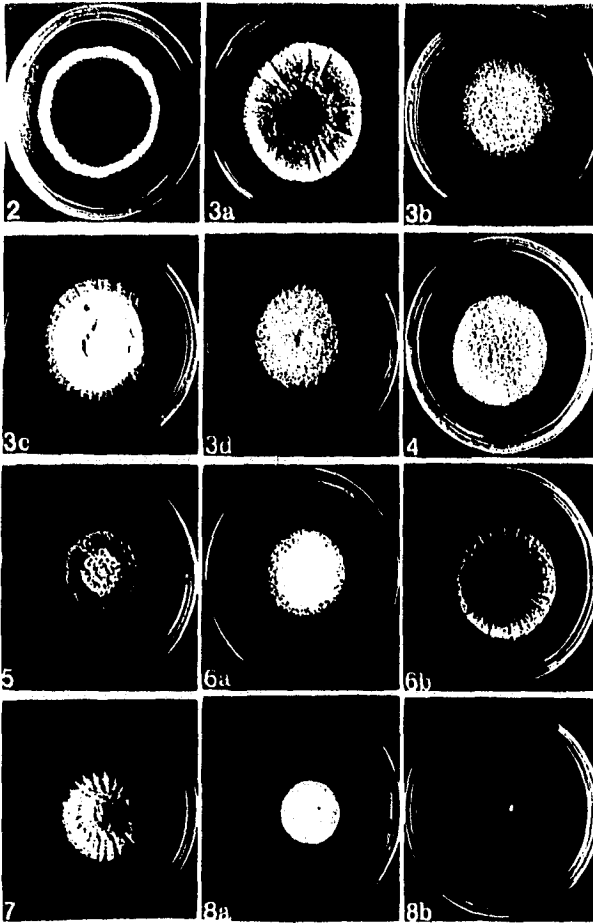
### Mutantes "fluffy" o algodonosas.

Se han reportado diversas mutantes afectadas en el desarrollo del conidióforo (Dorn, 1970; Martinelli y Clutterbuck, 1971; Butnick, et al., 1984; Martinelli y Clutterbuck, 1971). El fenotipo más comunmente obtenido entre las mutantes afectadas en el inicio de la esporulación han sido las denominadas mutantes "fluffy". Este grupo de mutantes incluyen a un grupo de cepas que aunque con discretas diferencias en la morfología, presentan características comunes tales como el crecimiento desmedido de hifas aéreas, formando colonias grandes que asemejan algodón (Dorn, 1970; Martinelli y Clutterbuck, 1971). Otro de los defectos comunes de este tipo de mutantes, es el presentar alteraciones en la conidiación, sin llegar nunca a ser totalmente aconidiales, ya que la esporulación finalmente si se produce. Una posible explicación para el fenotipo de estas mutantes, consiste en proponer que estan alteradas en la activación del gen *brlA*, el regulador temprano de la conidiación. Es importante destacar que después de búsquedas exhaustivas, nunca se han aislado mutantes totalmente aconidiales que estén afectadas en un gen diferente de *brlA*.

El estudio formal de las mutantes "fluffy" o algodonosas se remonta a 1970, cuando Dorn reportó a un grupo de mutantes con las características de un crecimiento vegetativo desmedido, capacidad de invasión a colonias vecinas y defectos en la esporulación. Aunque Dorn aisló varias mutantes de este tipo, éstas no fueron depositadas en ninguna colección, por lo que su estudio no continuó más allá del reporte morfológico y del mapeo genético de algunas de estas mutantes (Dorn, 1970; figura 5). Posteriormente Tamame y su grupo (1983), reportaron una mutante con características semejantes a las reportadas por Dorn, denominada *fluF1*.

En nuestro laboratorio, el Dr. Jesús Aguirre aisló, por mutagenésis con luz UV, una mutante de *A. nidulans* del tipo algodonoso, a la que denominó *fluH1*. Aunque en *A. nidulans*, el proceso de conidiación es uno de los mejor entendidos para los hongos filamentosos, poco se sabe de las señales de inducción que regulan la esporulación. Cuando esta mutante fué aislada aún no se tenían noticias de otras mutantes fluffy, a excepción de los reportes de Dorn (1970) y Tamame (1983), por lo que su estudio resultó altamente atractivo para tratar de dilucidar alguna de las posible vías de inducción del regulador *brlA*.





**Figura 5. Morfología de las mutantes algodonosas crecidas en medio completo obtenidas por Dorn.**

Panel 2, cepa silvestre; 3a. *flu1*; 3b. *flu3* (VIII); 3c. *flu4* (VIII); 3d. *flu13*; 4. *flu2* (VIII); 5. *flu7* (I); 6a. *flu12* crecida a 25°C; 6b. *flu12*; 7. *flu11*; 8a. *flu8* crecida a 25°C; 8b. *flu8*. Todas las cepas a excepción de las mostradas en los paneles 6a y 8a se crecieron a 37°C. Entre paréntesis se indican algunos de los genes asignados a algún cromosoma (Figura tomada de Dom. 1970).

Posteriormente, el estudio de este tipo de mutantes como posibles reguladores del inicio de la esporulación comenzó a cobrar importancia para otros grupos de investigadores. En 1992 se clonó el primer gene de una mutante algodonosa, *acoD* (*fluG*) (Adams et al., 1992). A partir de un análisis exhaustivo para buscar mutantes algodonosas afectadas en la esporulación, se definieron seis grupos de complementación, esto es, 6 diferentes fenotipos algodonosos provocados por la mutación de 6 diferentes genes; *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* (Wieser, et al., 1994). Cabe hacer notar que la mutante *flbB*, aislada por el grupo de Adams, es un alelo de la mutación *fluH1*. Esto se determinó en nuestro laboratorio por análisis de diploidía. Este grupo de mutantes algodonosas además de presentar características morfológicas comunes, responden a distintas condiciones de crecimiento de manera similar. Al crecerlas en un medio de cultivo rico, se incrementa su fenotipo algodonoso y al disminuir la fuente de carbono del medio, el fenotipo algodonoso tiende a desaparecer parcialmente (Adams, et al., 1992; Wieser, et al., 1994; Wieser, et al., 1995). El hecho de encontrar esporulación en condiciones de limitación nutricional aún en mutantes afectadas en el inicio de la esporulación, sugiere que la activación de *brIA* puede efectuarse por más de una vía (Skromne, et al., 1995). Una posible interpretación para las mutantes algodonosas, es que éstas son incapaces de responder a las señales que normalmente regulan el inicio de la conidiación.

La existencia de un grupo de mutantes con fenotipos similares, afectadas en genes diferentes, nos habla de una vía global común que al ser afectada en algún punto, tiene como consecuencia final, el retrasar la esporulación. Aunque en la actualidad el grupo del Dr. Thomas Adams (Texas A&M) tiene caracterizadas varias de las mutantes algodonosas, así como los genes correspondientes, el gen *fluH* no ha sido aislado, por lo que el estudio y caracterización de la mutante *fluH1*, fueron objetivo en el presente trabajo.

## OBJETIVOS

Con base en los antecedentes de que la inducción de la esporulación es un proceso complejo en el que están involucrados factores tanto genéticos como ambientales, se planteó que el estudio de una mutante afectada en la esporulación asexual, podría aportar información acerca de la captación y transducción de señales durante la esporulación asexual en *Aspergillus nidulans*.

- 1.- Caracterizar genéticamente a la mutante *fluHI*.
- 2.- Analizar los aspectos fisiológicos y morfológicos relacionados con el fenotipo de esta mutante.
- 3.- Evaluar la expresión del gen *brLA* en la mutante *fluHI*.
- 4.- Determinar los efectos de la privación de glucosa vs. la privación de nitrógeno en la esporulación de la mutante *fluHI*, y otras mutantes alodonosas.
- 5.- Aislar y caracterizar mutantes con supresores extragénicos de la mutación *fluHI*, con respecto a su segregación y fenotipo en presencia y ausencia de nutrientes.

## Materiales y Métodos.

1. Cepas de *Aspergillus nidulans* empleadas en este trabajo.

Cepas	Genotipo	Origen
FGSC 26	<i>biA1, veA1.</i>	FGSC
PW 1	<i>biA1, argB2, metG 1, veA1.</i>	P. Weglenski
MH440	<i>ya1, suAadE20, adE20; riboB2; areA217, creA204, veA1.</i>	M.J. Hynes
TJA22	<i>brIA(-2900pI)::lacZ (argB<sup>+</sup>::argB::CAT), biA1; metG1; veA1</i>	J. Aguirre
CPG1	<i>brIA(-2900pI)::lacZ(argB<sup>+</sup>::argB::CAT), biA1;metG1;riboB2; creA204; veA1</i>	J. Aguirre
RMSO11	<i>pabaA1, ya2, ΔargB::trpCDB; veA1; trpC801.</i>	Ronald Morris
CJA16	<i>metG1, biA1; brIA::lacZ; fluH1.</i>	J. Aguirre
CJA14	<i>pabaA1, ya2, ΔargB::trpCD; fluH1.</i>	J. Aguirre
CRT8	<i>pabaA1, biA1; fluH1; brIA(-2900 pI)::lacZ.</i>	Segregante de TJA22 y CJA16 (este trabajo)
CRT9	<i>pabaA1, biA1; fluH1; sup1fluH1; brIA(-2900 pI)::lacZ.</i>	Mutagenesis U.V. CRT8 (este trabajo)
CRT10	<i>pabaA1, biA1; fluH1; sup2fluH1; brIA(-2900 pI)::lacZ.</i>	Mutagenesis U.V. CRT8 (este trabajo)
CRT11	<i>pabaA1, biA1; fluH1; sup3fluH1; brIA(-2900 pI)::lacZ.</i>	Mutagenesis U.V. CRT8 (este trabajo)
CRT12	<i>pabaA1, biA1; fluH1; supA1fluH1; brIA(-2900 pI)::lacZ.</i>	Mutagenesis U.V. CRT8 (este trabajo)
CRT14	<i>ya2; metG1; supA1fluH1.</i>	Segregante de CRT9 y CLK11 (este trabajo)
CLK11	<i>ya2; proA1</i>	L. Kawasaki
FGSC283	<i>suAadE20, ya2, adE20; acrA; galA1; pyroA4; fucA303; sB3; nicB8; riboB2.</i>	FGSC
FGSC-A374	<i>suA1adE20, ya2, adE20; acrA1; sA4; pyroA4; pA2; lacA 1; nibB8; riboB2.</i>	FGSC

FGSC-A467	yA2,adE20:lacA1:phenB6,SF211,palF15,malA1,choA1, nicB8.	FGSC
-----------	---	------

Tabla 1 Cepas de *Aspergillus nidulans*.

## 2. Medios de Cultivo.

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *Aspergillus nidulans* en este trabajo fué el Medio mínimo (MM) recomendado por Käfer (1977) adicionado con glucosa al 1.0 %, y suplementado con los requerimiento apropiados. En el caso de ser necesario el crecimiento en Medio completo (MC), al MM se le agregó peptona (caseína hidrolizada) al 0.2 % y extracto de levadura al 0.1 %. En los casos de preparación de medios sólidos se añadió agar al 1.5 %.

Para el crecimiento bacteriano se utilizó Medio Luria Bertani (LB) recomendado por Sambrook *et al.* (1989). Los antibióticos utilizados fueron ampicilina y tetraciclina a una concentración final de 75 µg/ml y de 10 µg/ml respectivamente. Ambos se prepararon en etanol al 70 % y se añadieron después de esterilizar el medio y una vez que éste alcanzó una temperatura de aproximadamente 40°C.

Para la detección de cepas con la mutación *creA204*, una vez esterilizado el medio se añadió alcohol alílico a una concentración final de 2.5 mM (Arst y Cove, 1973). Este compuesto al ser metabolizado produce acroleína, un aldehído tóxico para las células; sólo las mutantes *creA* que tienen desreprimida la alcohol deshidrogenasa en presencia de glucosa, son incapaces de crecer en este medio.

Todos los medios de cultivo y el material empleado se esterilizaron por autoclave a una presión de 1.4 Kg/cm<sup>2</sup> a 121°C por 20 minutos.

### 3. Medición de la actividad de proteasas.

Para la detección de la actividad de proteasas extracelulares se preparó MM, MM sin nitrato, MM con 10mM de tartrato de amonio más los requerimientos de las cepas. Como fuente de caseína se agregó al medio leche descremada a una concentración final de 1.0 % (Cohen, 1973). Se inocularon por picadura a las cepas de interés en estos medios y se incubaron por 72 h a 37°C. La actividad de proteasas extracelulares se detectó por la aparición de halos transparentes alrededor de las colonias como producto de degradación de la caseína.

### 4. Medición de la actividad de amilasas.

Para la detección de la actividad de amilasas extracelulares se preparó MM con almidón 0.5 % sin glucosa más los requerimientos necesarios. Se inocularon por picadura a las cepas de interés por 72 h a 37°C, posteriormente se agregaron 15 ml de Lugol (Yodo 0.33 %, Yoduro de potasio 0.66 %). El lugol tiñe enlaces  $\alpha$ 1-6 de la amilopectina, tiñendo así de color morado oscuro un medio con almidón. La actividad de amilasa se detecta por la formación de halos transparentes alrededor de las colonias que están secretando esta proteína en un medio con almidón.

### 5. Colecta y cuantificación de esporas

Se inocularon a confluencia sobre cajas Petri esporas de las diferentes cepas con las que se trabajó y se incubaron a 37°C durante 5 días para poder coleccionar esporas perfectamente maduras. Se cosechó raspando las esporas con una asa bacteriológica de metal y una solución estéril de Tween 80 (Sigma) al 0.01 %. Las esporas cosechadas se recuperaron en tubos Falcon estériles de 15 ml y se centrifugaron por 5 min en una centrifuga clínica. Se decantó el Tween y las esporas se resuspendieron en agua estéril, se agitaron vigorosamente en un vortex y se centrifugaron nuevamente durante 5 min. Este procedimiento se repitió cuatro veces más, las esporas se resuspendieron finalmente en un

volúmen conocido de agua estéril. A partir de este punto se almacenaron a 4°C, por no más de un mes para experimentos fisiológicas. La cuantificación de esporas se efectuó diluyendo 100 veces la suspensión y se empleó una cámara de Newbauer, analizando cinco cuadros al azar.

## 6. Curvas de crecimiento

Se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas/ml de las cepas CJA16 y FGSC-26 en matraces de 250 ml con 50 ml de MM + 1.0 % de glucosa. Se incubaron a 37°C con una agitación constante de 300 rpm y se realizaron cultivos continuos hasta las 42 h. Cada 6 h se tomó un matraz y el micelio se colectó por filtración en Miracloth (Calbiochem). Se secó con toallas absorbentes, se congeló en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente el micelio fué liofilizado empleando vaco en un Speed-Vac (Marca Savant). Se determinó el peso seco midiendo cada muestra en una balanza analítica. Cada experimento se realizó por triplicado. Para determinar el consumo de glucosa con respecto al tiempo, se tomó 5 ml de medio de cada una de las muestras y se almacenó a -20°C.

## 7. Cultivos Sincrónicos en Medio Sólido

Se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas/ml a MM líquido + glucosa 1.0 % adicionado con requerimientos y se incubaron por 18 h a 37°C con agitación constante de 300 rpm. Tiempo y condiciones en las que se ha establecido que *A. nidulans* alcanza un cierto grado de madurez o competencia para poder esporular (Axelrold, 1979). Pasado este tiempo para inducir la conidiación, se filtraron 100 ml de micelio en círculos de papel filtro Whatman 1, se eliminó la mayor cantidad de líquido por succión con vaco a través de un embudo Buchner (Law y Timberlake, 1980). Posteriormente se transfirieron los filtros a charolas que contenían MM sólido más requerimientos, en los que la variable fué la concentración de glucosa utilizada, 1.0 o 0.1 %. Las charolas fueron cubiertas con papel aluminio y se incubaron a 37°C. Se utilizó un filtro por cada tiempo a analizar. A cada tiempo establecido se colectó un filtro y se hicieron las observaciones pertinentes. Posteriormente se eliminó el

exceso de líquido presionándolo con toallas absorbentes, el micelio se colectó en un tubo eppendorf y finalmente se congeló cada muestra con N<sub>2</sub> líquido y se almacenó a -70°C hasta su procesamiento. Para las muestras correspondientes al tiempo cero (18 h de crecimiento), se filtraron 100 ml de micelio en un filtro Miracloth (Calbiochem) estéril, y se procesó de la misma forma (Law y Timberlake, 1980).

Las observaciones del crecimiento y esporulación en los filtros a los diferentes tiempos se realizó bajo el microscopio estereoscópico, y en algunos casos a simple vista.

## 8. Cultivos Sumergidos

En este caso se partió de esporas que se procesaron como ya se mencionó anteriormente. Este tipo de experimentos consta de dos partes principalmente, el precultivo y el cultivo como tal, en el que se hicieron las modificaciones reportadas que a continuación se detallarán. En el precultivo se inocularon  $5 \times 10^8$  esporas/ml en 400 ml de MM líquido + glucosa 1.0 % suplementado con los requerimientos necesarios en matraces de 2 litros. Esto fué para tratar de mantener la relación líquido/aire 1: 5. Se incubó durante 18 h a 37°C con una agitación constante de 300 rpm. Una vez terminado el periodo de precultivo el micelio se transfirió a las diferentes condiciones experimentales. Se tomaron alcuotas de 50 ml del cultivo y se filtraron por Miracloth estéril, se lavó con un volumen de agua destilada estéril y posteriormente con dos volúmenes de MM, suplementado, ya sea con glucosa 1.0 %, 0.1 %, 0 %, o bien sin nitrato según fuera el caso. Una vez que se trató de eliminar la mayor cantidad de líquido posible sin maltratar al micelio, éste fué transferido cuidadosamente con una espátula a matraces de 250 ml los cuales contenían 50 ml del medio con las condiciones a analizar, ya sea sin glucosa o sin nitrógeno. Incubándose nuevamente a 37°C con agitación constante.

A diferentes tiempos se colectaron las muestras (50 ml de cultivo), por filtración en Miracloth estéril y se eliminó el exceso de líquido con toallas absorbentes. Las muestras se guardaron en tubos eppendorf y se congelaron con N<sub>2</sub> líquido, y se almacenaron a -70°C. Todas las muestras colectadas congeladas fueron liofilizadas empleando vacío en un Speed-vac (Savant) por aproximadamente 4 h. Una vez secas las muestras se molieron y se guardaron a -70°C hasta su procesamiento.



## 9. Análisis microscópico

Las muestras de los cultivos sólidos fueron observadas a diferentes tiempos utilizando un microscopio estereoscópico. Las diferentes muestras obtenidas a partir de los cultivos líquidos fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , agregándoles glicerol estéril a una concentración final del 20 % (v/v). La morfología y producción de esporas fue analizada por la observación bajo un microscopio óptico Karl Zeiss, utilizando el sistema de contraste de fases. Las microfotografías fueron tomadas en un microscopio óptico Leitz, empleando un filtro verde y película fotográfica Kodak Tri-X-Pan 400. La amplificación fue de 400 veces.

## 10. Determinación de la Actividad Específica de $\beta$ -galactosidasa

Se utilizó básicamente el protocolo sugerido por Miller (1972). Este método consiste en dos fases. La primera se basa en la extracción de proteínas totales y la segunda en la determinación de la actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa por la hidrólisis de la ortonitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranos (ONPG), reacción que libera el o-nitrofenol, un compuesto cromogénico, que puede cuantificarse espectrofotométricamente. Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

- Buffer de Extracción: Buffer de fosfatos 0.2 M, pH 7, Cloruro de Potasio 20 mM y EDTA 1mM.
- Buffer Z: Buffer de Fosfatos 0.1M, pH 7, Cloruro de Potasio 10 mM, Sulfato de magnesio 1 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 25 mM.
- Solución para detener la reacción: Bicarbonato de sodio 1 M.
- Solución con el sustrato ONPG 4 mg/ml. o-nitrofenol- $\beta$ -D-galactopiranos (ONPG), resuspendido en Buffer Z.

Reactivo de Bradford. Es un reactivo concentrado para la determinación de proteína total (BIO-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA).

### 10a) Actividad específica de $\beta$ -galactosidasa.

Las muestras congeladas y liofilizadas que se encontraban en tubos eppendorf tanto de cultivos sólidos como líquidos bajo diferentes condiciones de crecimiento, se molieron hasta obtener un polvo fino el cual se resuspendió en un 1 ml del Buffer de extracción frío. Se mezcló todo cuidadosamente en un vortex tratando de hacer una suspensión homogénea.

Los extractos se mantuvieron por una hora en hielo, agitando ocasionalmente para facilitar una mejor extracción. Las muestras se centrifugaron por 15 min a 4°C y 10 000 rpm. El sobrenadante se depositó en otro tubo eppendorf. Se prepararon tubos para cada uno de los diferentes tiempos de reacción 0, 2.5 y 5 min, respectivamente. Se añadió a cada tubo 50 µl de extracto crudo más 720 µl de Buffer Z. Como blanco se preparó un tubo con la mezcla de reacción sin extracto. La reacción se inició agregando 160 µl de la solución de ONPG y se detuvo agregando 500 µl de la solución de bicarbonato de sodio a diferentes tiempos. La reacción se efectuó a 30°C y actividad se leyó a 420 nm. Posteriormente se realizaron los cálculos respectivos para determinar la actividad específica de β-galactosidasa. La actividad se reporta en unidades definidas como la cantidad de enzima que libera un micromol de o-nitrofenol por minuto (coeficiente de extinción molar = 0.0045). La actividad específica se expresa por miligramo de proteína.

#### **10b) Cuantificación de proteínas**

Para realizar la cuantificación de proteínas se tomaron 50 µl del extracto crudo de cada muestra y se llevó a 1 ml de volumen final con agua desionizada. De esta dilución se tomaron 50 µl y se agregaron 750 µl de agua, para tener 800 µl de volumen final. Se añadieron 200 µl del Reactivo de Bradford (diluyendo la muestra 40 veces). Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro "Shimadzu" a 595 nm. La curva patrón se hizo con albúmina sérica de bovino (Sigma).

### **11. Determinación de Glucosa.**

La cuantificación del consumo de glucosa se realizó utilizando un método enzimático de Sigma (St. Louis, MO, USA) y se empleó de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Este método está basado en el propuesto originalmente por Kenston (1956), modificado por Raabo y Terkildsen (1960). Este método combina la acción de la glucosa oxidasa y la peroxidasa, que actúan acopladamente. La reacción se efectúa de la siguiente manera: en presencia de glucosa, la glucosa oxidasa genera ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, siendo éste último sustrato de la peroxidasa el cual es utilizado para oxidar la o-dianisidina, un compuesto cromogénico que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. El color desarrollado es proporcional a la cantidad de glucosa presente en cada muestra.

Las muestras a analizar se obtuvieron a partir de medios de cultivo en los que se crecieron por diferentes tiempos las cepas FGSC-26 y CJA16. La concentración inicial de glucosa fué de 1.0 %.

El método utilizado consistió en lo siguiente:

Se disolvió en 100 ml de agua destilada una cápsula que contenía 500 U de glucosa oxidasa más 100 U de peroxidasa en solución buffer. Separadamente se disolvieron 50 mg de cloruro de o-diasidina (reactivo cromogénico) en 20 ml de agua destilada (solución colorante). A los 100 ml de solución de enzimas se agregó 1.6 ml de la solución colorante. Las muestras a cuantificar se diluyeron 200 y 400 veces y se utilizó 1 ml de éstas. Al tubo que contenía la muestra a analizar se le agregaron 5 ml de la solución de enzimas más colorante mezclándose todo perfectamente. La reacción se incubó a 37°C por 30 min en la oscuridad. Las muestras se leyeron a 450 nm y los datos obtenidos se cuantificaron utilizando una curva patrón de glucosa.

## 12. Análisis Genético

### 12a). Análisis melótico.

Para este análisis se utilizaron los procedimientos de genética clásica en los que se efectuaron cruza con las diferentes cepas de *A. nidulans* para poder obtener y analizar la progenie (Pontecorvo, *et al*, 1953; Clutterbuck, 1974). Brevemente: Para realizar las cruza se seleccionaron cepas con marcadores genéticos diferentes. Preferencialmente se recomienda utilizar una cepa que produzca esporas amarillas (que lleve una mutación *ya*) y otra que produzca esporas verdes, para poder seleccionar más fácilmente a la progenie recombinante. Posteriormente se inocularon por picadura a las dos cepas de interés de manera contigua sobre MM más los requerimientos necesarios y se incubaron de dos a tres días a 37°C.

Una vez que las cepas crecieron lo suficiente para que sus hifas estuvieran en contacto y llegaran a fusionarse, se cortaron pequeños trozos de la periferia que contenían a ambas cepas y se transfirieron a cajas con MM (medio selectivo). incubándose a 37°C hasta observar la formación de heterocariotes (hifas que comparten núcleos diferentes). Las esporas de la zona del heterocarión fueron raspadas guardándose como una suspensión en agua estéril. Para la formación de diploides en cajas Petri se colocaron aproximadamente 100 µl de la suspensión de esporas de la zona del heterocarión perfectamente

homogenizadas y se dispersaron en la caja utilizando la técnica de vaciado en placa, empleando para esto MM. Una vez solidificado el agar se incubaron a 37°C por dos o tres días hasta detectar la formación de diploides, los cuales se distinguieron por crecer como colonias circulares y vigorosas de color verde, a diferencia de los heterocariotes que crecieron de forma irregular y con esporas tanto verdes como amarillas. Una vez seleccionados los diploides, éstos fueron estriados para colonia aislada en MM. El diploide crecido bajo estas condiciones puede ser utilizado para análisis posteriores.

Las cajas que inicialmente contenían al heterocarión fueron selladas con cinta adhesiva para reducir la tensión de oxígeno, lo cual favorece la formación de cleistotecios (cuerpos fructíferos) y se incubaron nuevamente a 37°C hasta detectar microscópicamente la formación de dichas estructuras. Se seleccionaron los cleistotecios de mayor tamaño que generalmente son híbridos. Estas estructuras fructíferas son redondas de color gris oscuro y se encuentran cubiertas por células "Hülle" o nodrizas. Los cleistotecios fueron transferidos a cajas con agar al 3.0 % en donde se limpiaron de las células Hülle, haciéndolos rodar sobre el agar con ayuda de una aguja de disección estéril. Una vez limpios, se colocaron en tubos eppendorf estériles y se rompieron con una aguja de disección liberando las ascosporas (esporas sexuales). Se agregaron aproximadamente 900 µl de agua estéril por tubo, agitando perfectamente con el vortex para tratar de tener una suspensión lo más homogénea posible.

Para realizar el análisis de la progenie obtenida se plaquearon aproximadamente 50 µl de la suspensión de ascosporas sobre MM más los requerimientos de los dos progenitores y se incubaron a 37°C por tres días. Para determinar si el cleistotecio seleccionado era híbrido se debe observar la progenie ya esporulada, tanto colonias verdes como amarillas (colores de las cepas progenitoras). Esta segregación sirve como marcador interno y debe ser 1:1 (aproximadamente el 50 % de la progenie total de cada color). Una vez que se detecta que el cleistotecio es híbrido se plaquean varias cajas con las ascosporas para poder así obtener un número representativo de colonias y realizar el análisis genético. Una vez esporuladas las colonias, éstas se seleccionaron una a una inoculándolas por picadura en un orden determinado a una caja Petri con MM más los requerimientos de los dos padres, esto es, se hicieron "cajas maestras". Estas placas maestras se utilizaron para replicar en MM selectivos, lo cual nos permitió identificar los marcadores genéticos que portaba cada colonia.

### 12b. Mapeo genético.

Para mapear las mutaciones que se generaron en este trabajo fué necesario obtener de diploides entre una cepa maestra, la cual lleva marcadores genéticos en cada uno de los ocho cromosomas de *A. nidulans* y las cepas cuya mutación queríamos asignar a un cromosoma.

Para realizar el mapeo se aprovechó de una parte del ciclo de vida de *A. nidulans*, que es el ciclo parasexual. En dicho ciclo se forman diploides estables y posteriormente se haploidiza con una droga; los haploides generados portan cromosomas que segregaron al azar sin haberse dado recombinación mitótica. Posteriormente se realiza el análisis de los haploides en medios selectivos para cada uno de los marcadores de la cepa maestra y se trata de encontrar alguna posible relación entre la segregación de la mutación recesiva de interés y alguno de los marcadores de la cepa maestra. Si uno de los haploides porta el marcador de uno de los cromosomas de la cepa maestra y continúa presentando la característica mutante, quiere decir que la mutación que nos interesa no se encuentra en el cromosoma marcado de la cepa maestra que ahora porta el haploide (Ward, 1991).

Una vez generados los diploides entre la cepa maestra y las diferentes cepas mutantes, éstos se inocularon por picadura en el centro de cajas Petri con MM más los requerimientos de las cepas adicionando p-F-fenilalanina (Sigma) a una concentración de 75 µg/ml. Este compuesto es una droga que inhibe la formación del huso mitótico (McCully, y Forbes, 1965). La p-F-fenilalanina se disolvió en agua y se esterilizó por filtración. Una vez esterilizado y tibio el medio de cultivo se agregó la p-F-fenilalanina, ya que ésta es lábil a altas temperaturas. Los diploides se incubaron aproximadamente 15 días a 37°C, hasta observar la formación de diferentes sectores haploides. Se verificó la formación de dichos sectores utilizando un microscopio estereoscópico. Estos sectores se observan como zonas que crecen vigorosamente debido a la pérdida de cromosomas. Cada uno de ellos fue inoculado en cajas con los diferentes marcadores selectivos.

### 13. Mutagénesis por Radiación con Luz Ultravioleta.

La mutagénesis con luz UV se llevó a cabo empleando la técnica de Käfer (Käfer, 1965). Se utilizó una suspensión de esporas de  $1 \times 10^8$  esporas/ml de la cepa CRT8 (mutante *fluH1*, *bioA1*; *pabaA1*) en 25 ml de agua estéril. Se irradió con luz U.V. utilizando lámpara modelo UVGL-25. La distancia entre la lámpara y la suspensión de esporas fué de 7.5 cm, lo cual corresponde a una dosis aproximada de  $700 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . Las esporas se mantuvieron en agitación durante la mutagénesis de manera que siempre estuvieran en una suspensión homogénea y recibieran una cantidad constante de irradiación durante todo el experimento.

La mutagénesis se llevó a cabo durante 180 segundos, y se tomaron alícuotas de 1 ml a diferentes tiempos para hacer una curva de sobrevivencia. Las esporas colectadas a cada tiempo se diluyeron y se inocularon en cajas con MM más los requerimientos y adicionado con desoxicolato de sodio (Sigma) al 0.05 %, como inhibidor del crecimiento. Se determinaron los valores de sobrevivencia.

Una vez que se estableció el tiempo de irradiación que produce 10 % de sobrevivencia, se debe irradiar una nueva suspensión de esporas a ese tiempo, y buscar un método de selección para las mutantes de interés. En este caso el método de selección para las mutantes fué crecerlas en MM con glucosa 1.0 %, y encontrar a aquellas que esporularon mejor que la mutante *fluH1* en estas condiciones a tiempos cortos. Una cepa con la mutación *fluH1* no esporularía en estas condiciones.

## RESULTADOS Y DISCUSION

***fluHI* define un nuevo locus en *Aspergillus nidulans*, cuya mutación causa un considerable retraso en la esporulación asexual.**

A partir de mutagénesis con luz Ultravioleta, el Dr. Jesús Aguirre aisló una cepa cuya mutación producía un fenotipo algodonoso. Esta mutación fué designada como *fluHI*, por tratarse del primer alelo descrito. La mutante en *fluHI* presenta características típicas de mutantes del tipo "fluffy" o algodonosas, como son el crecimiento vegetativo aparentemente desmedido y una esporulación asexual retrasada. En la Figura 6 se muestra a la mutante *fluHI* y a una cepa silvestre crecidas por 48 h. La mutante *fluHI* puede observarse como una cepa con colonias robustas en las cuales existe proliferación de micelio aéreo indiferenciado a semejanza de algodón. A partir de las 48 h aproximadamente, la cepa silvestre esporula abundantemente, lo cual no ocurre en esta mutante sino a partir de las 72 h, siendo esta esporulación muy escasa.

Se utilizaron diversas técnicas genéticas con el fin de determinar el tipo de mutación de que se trataba y dar una localización a la misma dentro del genoma de *A. nidulans* (Pontecorvo, 1953; Clutterbuck, 1977; Ward 1991). Para saber si el fenotipo de la mutante *fluHI* fué generado por una sola mutación o si éste correspondía a la mutación de varios genes, se utilizó básicamente un enfoque genético, se realizaron cruzas entre la mutante *fluHI* y una cepa silvestre. Al analizar la progenie meiótica se encontró que la segregación de esta mutación fué 1:1 con respecto al fenotipo silvestre, lo que demostraba que se trataba de una mutación monogénica. Para determinar si la mutación *fluHI* era dominante o recesiva, así como para asignarla a un cromosoma, se hicieron diploides entre la cepa CIA16 y la cepa maestra MSE (cepa que porta marcadores de cada uno de los cromosomas de *A. nidulans*). Los diploides obtenidos se observaron como colonias silvestres, por lo que se concluyó que la mutación *fluHI* era recesiva. Posteriormente se realizó un análisis de haploidización mitótica con p-fluorofenilalanina a partir de los diploides obtenidos (McCully y Forbes, 1965).

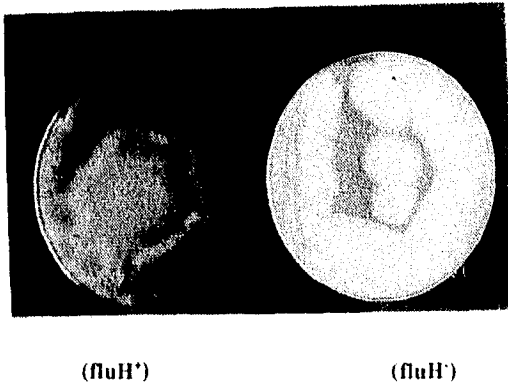


Figura 6. Morfología de la mutante *fluH1* y de una cepa silvestre. Se crecieron a las cepas FGSC26 (*fluH+*) y CJA16 (*fluH-*) durante 72 h en MM + glucosa al 0.1 %. La mutante *fluH1* es una mutante del tipo algodonoso, la cual presenta un crecimiento vegetativo aparentemente desmedido, y un marcado retraso en la esporulación asexual (conidiación), comparada con la cepa silvestre. el color obscuro en la cepa proviene de la pigmentación de las esporas asexuales o conidias. La mutación *fluH1*, es una mutación recesiva que segrega Mendelianamente.

Se obtuvieron diversos sectores haploides, como producto de la segregación azarosa de cada uno de los ocho cromosomas de *A. nidulans*. A partir del análisis de los sectores haploides se encontró que la mutación *fluH1* estaba asociada al Cromosoma IV. A la fecha existen los reportes de otras mutantes tipo algodonosas diferentes a *fluH1*, tales como *fluF*, *fluG*, *flbA*, las cuales corresponden a mutaciones independientes de *fluH1* ya que mapean en los cromosomas VIII, III, y I respectivamente (Tamame y Antequera, 1983; Adams y Lee, 1994 a y b). Posteriormente se realizó un análisis genético a un



poder localizar la mutación en el cromosoma IV (Dorn, 1970; Clutterbuck, 1977). Para esto se hicieron cruza con cepas que portaban diferentes marcadores en el cromosoma IV. En la tabla 2 se muestran las cruza realizadas, el número de progenie parental y recombinante obtenida. A partir de estos resultados se determinó el porcentaje de recombinación con cada uno de los marcadores que mapearon más cerca de *fluHI*. Se encontró que esta mutación se localizaba en el brazo derecho del cromosoma IV, a 10 unidades de mapa (aproximadamente a 60 Kpb) del marcador *palC* (deficiencia de fosfatasa alcalina), el marcador más cercano a esta mutación. También se mapeó con respecto a otros dos marcadores, que fueron *acuK* (utilización de acetato) y *meaA* (resistencia a metil amonio), los cuales se encontraron a 31 y 35 cM respectivamente (Clutterbuck, 1994). En la figura 7 se muestra un segmento del brazo derecho del cromosoma IV, en el cual se esquematiza la localización del gen *fluHI* con respecto a otros marcadores.

Cruza	Genotipo	No. de Progenie	Genotipo	No. de Progenie	Progenie Total	Recombinantes (%)
G420 X CJA16	<i>fluHI</i> <sup>+</sup> , <i>mea</i> <sup>-</sup>	63	<i>fluHI</i> <sup>+</sup> , <i>mea</i> <sup>+</sup>	56	262	36
	<i>fluHI</i> , <i>mea</i> <sup>+</sup>	104	<i>fluHI</i> <sup>-</sup> , <i>meaA</i> <sup>-</sup>	39		
G0306 X CJA16	<i>fluHI</i> <sup>+</sup> , <i>acu</i> <sup>-</sup>	46	<i>fluHI</i> <sup>+</sup> , <i>acuK</i> <sup>+</sup>	54	206	31
	<i>fluHI</i> <sup>-</sup> , <i>acuK</i> <sup>+</sup>	95	<i>fluHI</i> <sup>-</sup> , <i>acuK</i> <sup>-</sup>	11		
A517 X CJA14	<i>fluHI</i> <sup>+</sup> , <i>pal</i> <sup>-</sup>	71	<i>fluHI</i> <sup>+</sup> , <i>palC</i> <sup>+</sup>	10	158	10
	<i>fluHI</i> , <i>palC</i> <sup>+</sup>	71	<i>fluHI</i> <sup>-</sup> , <i>palC</i> <sup>-</sup>	6		

Tabla 2. Recombinación entre *fluHI* y otros marcadores del cromosoma IV.

## MAPEO DEL GEN *fluH1*

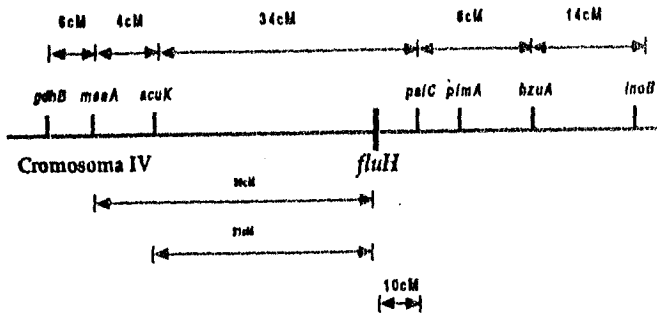


Figura 7. Mapeo de la mutación *fluH1*.

A través del análisis parasexual y meiótico se determinó que la mutación *fluH1* está localizada en el brazo derecho del Cromosoma IV. En esta figura sólo se representa parte del cromosoma IV en donde se localizó a *fluH1* a partir de los datos obtenidos en la tabla 3.

**La limitación de glucosa suprime parcialmente los efectos de la mutación *fluH1*.**

Al crecer a la mutante *fluH1* en medios con una concentración de glucosa diez veces menor (0.1 %) a la normal, se encontró que la esporulación mejoraba notablemente, ya que aproximadamente 3 días después de la inoculación, la formación de micelio aéreo se redujo y se observó esporulación. Esta característica, también ha sido reportada en otras mutantes algodonosas. Al crecer en un medio con baja glucosa, se disminuye la formación de micelio aéreo y se favorece la esporulación (Lee y Adams, 1994). Con estos antecedentes, se decidió explorar la posibilidad de que pudieran existir diferencias en la tasa de crecimiento entre la mutante en cuestión y la cepa silvestre, para lo cual se realizaron dos tipos de experimentos. El primero de ellos consistió en crecer colonias aisladas de las cepas CJA16 y FGSC26 sobre una membrana de celofán sobre MM + glucosa 1.0 % y MM + 0.1 % de glucosa por 72 h. Posteriormente se cortaron segmentos del celofán que contenían una sola

colonia y se cuantificaron el peso seco y la producción de esporas. Como se observa en la Tabla 3, no se detectaron diferencias significativas en el peso de las colonias FGSC26 (cepa silvestre) y CJA16 (mutante *fluH*) al crecer en las dos condiciones probadas, mostrando que ambas cepas presentan tasas de crecimiento similares. En cuanto a la esporulación puede observarse que al crecer en MM + glucosa 1.0 %, la cepa con la mutación en *fluH1* produce aproximadamente 200 veces menos esporas que la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones. Sin embargo, en la condición de baja glucosa, la mutante *fluH* produce sólo 5 veces menos esporas que la cepa silvestre y aproximadamente 10 veces más que ella misma en glucosa 1.0 %. Estos resultados muestran que la limitación de glucosa suprime parcialmente la incapacidad para esporular de la mutante *fluH*.

	Peso/Colonia (mg)		Esporas/Colonia (%)	
	[Glucosa]		[Glucosa]	
	1 %	0.1 %	1 %	0.1 %
FGSC26 ( <i>fluH</i> +) )	13.8	6.9	100	26.34
CJA16 ( <i>fluH1</i> -)	13.9	8.6	0.45	4.9

TABLA 3 Crecimiento y producción de esporas en una cepa silvestre y en la mutante *fluH1* en diferentes concentraciones de glucosa.

Las cepas FGSC-26 y CJA16 se sembraron para colonia aislada sobre colofán en MM + glucosa 1.0 y 0.1 % por 72 h. Al cabo de este tiempo se cortaron segmentos que contenían sólo una colonia. Las muestras se secaron a 65°C por 24 h, se pesaron y posteriormente se resuspendieron en 1 ml de agua estéril para cuantificar las esporas producidas por colonia. Los datos reportados son el promedio de mediciones de tres colonias independientes. El porcentaje máximo de error estándar no rebasó el 10 %. El 100% de esporulación correspondió a  $2.725 \times 10^8$  esporas/ml

### La tasa de crecimiento y el consumo de glucosa en cultivos líquidos no se ven afectados por la mutación *fluH1*.

Durante mucho tiempo se había propuesto que el desarrollo del conidióforo de *A. nidulans* era un fenómeno que respondía a un programa genético, más que una respuesta a factores ambientales (Adams, *et al.*, 1992). Sin embargo, la escasez de nutrientes ha sido reportada como uno de los principales factores que inducen diferenciación celular y esporulación en diversos microorganismos tales como, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dyctiostelium discoideum* y Mixobacterias, entre otras (Shimkets, 1990; Li, *et al.*, 1992; Kaiser y Losick, 1993). Una interpretación que inicialmente se le dió a la mutante *fluH1*, dado su fenotipo, era que posiblemente no esporulaba por que no detectaba la disminución de glucosa en el medio sino hasta mucho tiempo después. Por lo tanto, la utilización de glucosa en esta mutante podría ser más eficiente, puesto que presentaba un crecimiento aparentemente mayor. El experimento reportado anteriormente ya sugería que no había diferencias netas en el crecimiento entre la cepa con la mutación en *fluH* y la cepa silvestre. Sin embargo, tomando en cuenta el antecedente reportado por Skromne *et al.*, 1995, de que la esporulación se reprime en cultivos líquidos en presencia de alta glucosa, decidimos analizar de manera cuantitativa el consumo de glucosa y la tasa de crecimiento de la mutante *fluH1* (cepa CJA16) comparados con una cepa silvestre (cepa FGSC26). Para este propósito se realizaron curvas de crecimiento para las cepas CJA16 y FGSC26 en cultivos líquidos continuos. A distintos tiempos, se tomaron muestras de micelio y del medio de cultivo y se determinó el peso seco y la glucosa, respectivamente. En cultivo líquido *A. nidulans* crece como pequeñas pelotas o "pellets" de micelio vegetativo. A partir de las 30 h, fué evidente que la cepa mutante presentaba pellets de mayor tamaño y menos compactos que la cepa silvestre, es decir, que en medio líquido seguía mostrándose algodonosa. Al observar los pellets al microscopio se encontró que estaban formados por hifas muy largas y delgadas, mientras que la cepa silvestre presentaba hifas de mayor grosor y no tan alargadas. La Figura 8-A muestra las curvas de crecimiento para las dos cepas. Se observa que la tasa de crecimiento para la cepa CJA16 no presenta diferencias significativas con respecto a la cepa FGSC26. Este resultado nos confirma que aunque el fenotipo de la cepa mutante es el de una colonia grande y robusta, su crecimiento es similar al de una cepa silvestre, y que por lo tanto, las diferencias observadas están dadas por un cambio en el patrón de crecimiento, más que por diferencias en la tasa de crecimiento absoluto.

La cuantificación de glucosa en el medio, se realizó usando un método enzimático. Los resultados de la figura 8-B, muestran que el consumo de glucosa en las dos cepas estudiadas presentó cinéticas muy similares. Desde tiempos tempranos de cultivo, la glucosa comienza a consumirse y a partir de las 30 h la concentración fué prácticamente cero. Por lo tanto, no existen alteraciones ni en la tasa de crecimiento ni de consumo de glucosa en la mutante algodonosa, descartándose la hipótesis de que las mutantes *fluH1* debieran su fenotipo a un consumo y/o utilización diferencial de glucosa con respecto a la cepa silvestre.

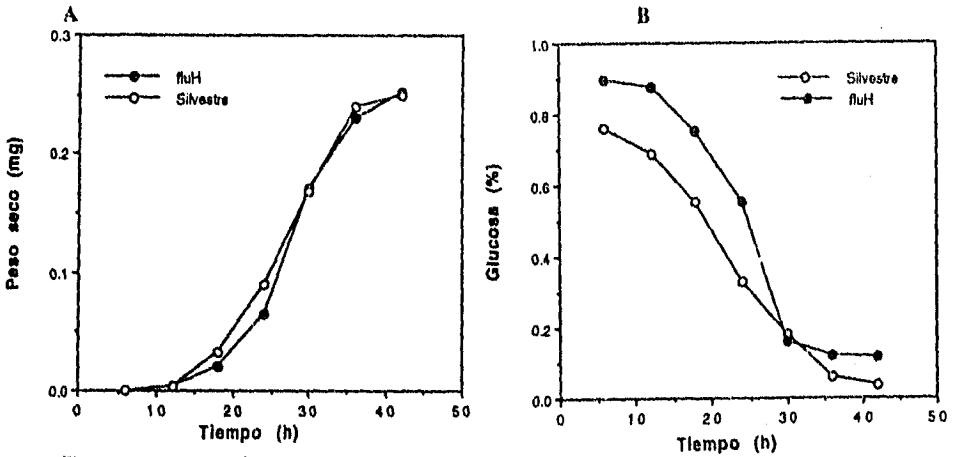


Figura 8. Curvas de crecimiento y consumo de glucosa de las cepas FGSC-26 (silvestre) y CJA16 (*fluH1*).

A. Curva de crecimiento. Se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas/ml en MM + glucosa 1.0 % y se crecieron por 42 h a 37°C con agitación constante. A diferentes tiempos se tomaron muestras, se congelaron con N<sub>2</sub> líquido, se liofilizaron y se pesaron. Cada punto de las gráficas representa el promedio de tres experimentos independientes, con un porcentaje de variación no mayor al 15 %, con respecto al promedio.

B. Consumo de glucosa. El experimento se realizó igual que en la figura 8a, con la variación de que en este ensayo se tomaron muestras del medio de cultivo a diferentes tiempos. El consumo de glucosa se determinó utilizando un método enzimático (SIGMA). Cada punto de las curvas representa el promedio de tres experimentos independientes, con un porcentaje de variación no mayor al 16 %, con respecto al promedio.

### Análisis morfológico de la mutante *fluH1*.

A partir de los resultados descritos anteriormente, se planteó que la morfología de la mutante *fluH1* podría provenir de cambios en el patrón de crecimiento vegetativo, por lo cual se decidió analizar la morfología de las hifas. Se inoculó por picadura a partir de una suspensión de esporas en el centro de una caja Petri a las cepas CJA16 y FGSC 26, se crecieron a 37°C por 100 h y posteriormente las colonias se fijaron con una solución de ácido acético al 0.5 % y CrO3 al 0.25 %. Los análisis morfológicos se realizaron a partir de las hifas terminales de cada colonia con ayuda de un procesador de imágenes. Se realizaron mediciones de la longitud de las hifas terminales a partir de la última ramificación observada. Los datos obtenidos a partir de la medición de la longitud de la ramificación terminal se muestran en la Figura 9-A, cada barra en la gráfica representa el promedio de 120 mediciones, en las cuales el porcentaje de variación con respecto al promedio, no fue superior al 8 %. En la figura 9-A puede observarse que la longitud de ramificación promedio de las hifas para la cepa FGSC-26 fue de aproximadamente 90  $\mu\text{m}$  mientras que para la cepa CJA16 fue de 230  $\mu\text{m}$ . Esto significa que las hifas de la mutante *fluH1* producen un micelio con menor ramificación y consecuentemente una mayor elongación de las hifas terminales en comparación con la cepa silvestre.

Otro parámetro de crecimiento que pudo obtenerse a partir del análisis con el procesador de imágenes, fue la medición del diámetro de las hifas. Los resultados de estas mediciones se muestran en la Figura 9-B. Cada barra representa el promedio de 10 mediciones en las cuales el porcentaje de variación no fue mayor al 10 % con respecto al promedio. En el caso de la cepa FGSC-26 el grosor promedio de las hifas fue de 2.8  $\mu\text{m}$ , mientras que para la cepa CJA16 fue de 1.8  $\mu\text{m}$ , por lo tanto la mutante *fluH1* produce hifas más delgadas que la cepa silvestre.

Los resultados obtenidos a partir de este análisis muestran que la mutante *fluH1* produce un menor grado de ramificación y produce hifas más delgadas que una cepa silvestre, y por lo tanto su fenotipo de una colonia grande y robusta surge principalmente de la producción de hifas poco ramificadas sumamente largas y delgadas, más no por presentar una mayor tasa de crecimiento. A partir de esto, puede concluirse que una mutación en el gen *fluH* produce cambios en el hábito de crecimiento micelial y que estos cambios, que afectan la morfología vegetativa, tienen efectos notables sobre la esporulación de *A. nidulans*.

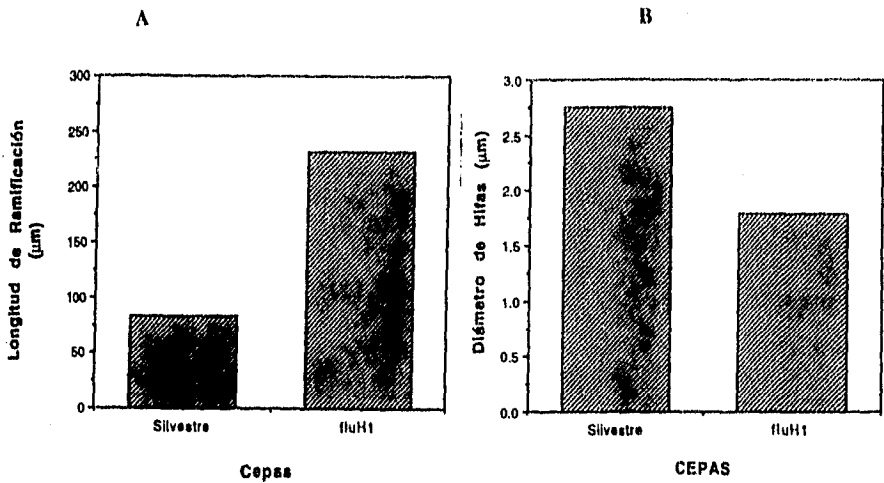


Figura 9. Análisis de la ramificación y grosor de las hifas de la mutante *fluH1* y una cepa silvestre.

A). Análisis de longitud de ramificación de las hifas. Se inocularon por picadura en el centro de una caja Petri a las cepas CJA16 y FGSC-26, y se incubaron por 100 h. Las colonias se fijaron en una solución de ácido acético al 0.5 % y  $CrO_3$  al 0.25 % por 24 h. La longitud de las ramificaciones se midieron en un procesador de imágenes. Cada barra en la gráfica es el promedio de 120 mediciones para cada cepa, con un porcentaje de variación no mayor al 8.0 %.

B). Análisis del grosor de las hifas. Se utilizaron las cepas CJA16 y FGSC-26 y se procesaron como se describió en la figura 9-A. En este caso se realizaron mediciones del grosor de las hifas de las cepas estudiadas. Cada barra de la gráfica representa el promedio de 10 mediciones, con un porcentaje de variación del 10 %, con respecto al promedio.

La extensión apical de las puntas de las hifas es inherente al crecimiento normal de los hongos filamentosos (Wessel, J.G.H, 1992). En las hifas pueden formarse gradientes osmóticos, metabólicos y posiblemente sea a través de la punta de éstas por donde se

efectua la toma de nutrientes y a partir de donde algunas proteínas son secretadas al medio. Después del crecimiento apical, la ramificación de las hifas es otro de los factores importantes que regula la morfología de la colonia (Yarden et al., 1992). En la mutante *fluH* esta afectado uno de estos procesos de la morfología colonial, ya que se mantiene la capacidad de elongar las puntas pero la capacidad de ramificación está notablemente disminuida.

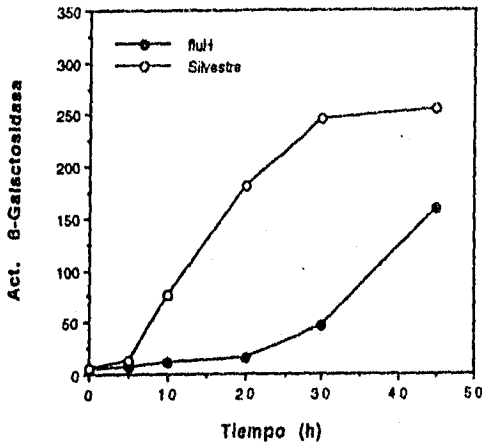
**La expresión del gen *brlA* se encuentra marcadamente retrasada en cepas con la mutación *fluH1*.**

La conidiación en *A. nidulans* se induce exponiendo un micelio competente a una interfase aérea (Axelrod, 1977) o por privación de nutrientes en medio líquido (Skromne, et al., 1995). El hecho de que las mutantes *fluH1* presenten una conidiación retardada, sugiere que el gen *brlA* no se estuviera expresando adecuadamente, o que habiéndose expresado, el patrón de respuesta estuviese alterado. Para discriminar entre estas alternativas, se decidió analizar la expresión de *brlA* de manera indirecta en las mutantes *fluH1* utilizando como gen reportero, una fusión génica que contiene al promotor del gen *brlA* fusionado al gen estructural de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, el gen *lacZ* (Aguirre, 1993). La efectividad de esta fusión para medir la expresión de *brlA*, correlaciona perfectamente con la expresión detectada en experimentos tipo Northern blot (Aguirre, 1993; Skromne et al., 1995). Esta fusión se introdujo a una cepa con la mutación *fluH* a través de una cruce sexual. Las cepas TJA22 (*fluH<sup>+</sup>*) y la mutante CRT8 (*fluH1*, derivada de la CJA16), las cuales contienen la fusión *brlA/lacZ* integrada en el locus de *argB*, se crecieron en medio líquido por 18 h. Posteriormente, el micelio se filtró y expuso al aire para inducir la esporulación y se tomaron muestras a diferentes tiempos. A partir de las 12 h, la cepa silvestre ya presentaba la formación de conidióforos, mientras que la mutante no comenzó a producir conidióforos sino hasta las 30 h. Los cultivos se continuaron hasta las 45 h y posteriormente, las muestras se procesaron para determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

La figura 10 muestra los resultados. Se puede observar que la inducción de *brlA* esta muy retrasada en la mutante *fluH1* comparada a la inducción en la cepa silvestre. La inducción en la cepa silvestre comenzó a partir de las 12 h, tiempo en el que se registró la aparición de



conidióforos, mientras que la inducción de *brlA* en la mutante *fluH1* no comienza sino hasta las 30 h aproximadamente, alcanzando la máxima activación a las 45 h (aproximadamente 150 unidades de  $\beta$ -galactosidasa). Estos resultados corresponden con las observaciones microscópicas realizadas en los cultivos correspondientes, en los que la conidiación se observó casi en su totalidad a las 24 h para la cepa silvestre, mientras que para la cepa mutante comenzó hasta las 30 h de inducción de la esporulación y además el cultivo no llegó a conidiar completamente. A partir de este resultado podemos decir que el retraso en la esporulación en la mutante *fluH1* se encuentra estrechamente relacionado con un retraso en la expresión del gen *brlA*. Por lo tanto, el gen *fluH* parece ser necesario, ya sea de manera directa o indirecta, para la activación de *brlA*. Cabe hacer notar que además de *fluH*, otros genes cuya mutación produce también un fenotipo "fluffy" (*fluG*, *flbA*, *flbC*, *flbD* y *flbE*) se requieren para activar a *brlA*. (Adams et al., 1992; Lee y Adams, 1994 a y b; Wieser et al 1994) indicando que el inicio de la esporulación es un proceso complejo en el que se requiere de la participación de múltiples genes.



**Figura 10.** La mutante *fluH1* presenta un retraso en la inducción de *brlA*. Se crecieron a las cepas TJA22 y CRT8 en MM líquido + glucosa 1.0 %. A las 18 h de crecimiento, el micelio se transfirió a MM sólido + glucosa al 1.0 % para inducir la esporulación. Se tomaron muestras a los tiempos indicados y se procesaron para determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Cada punto de la gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes, con un porcentaje de variación no mayor al 10 %, con respecto al promedio.

### La limitación de glucosa induce una expresión más temprana del *brlA* en la mutante *fluHI*.

Bajo diferentes condiciones de crecimiento en el laboratorio, se encontró que la disminución de glucosa en el medio de cultivo favorecía la esporulación en cepas con la mutación *fluHI* a tiempos más tempranos, aún cuando esta producción fue siempre menor que la observada en una cepa silvestre (ver Tabla 3). Para tratar de comprender el efecto de la glucosa como represor de la esporulación en la mutante *fluHI* y su posible relación con la expresión de *brlA*, se decidió determinar la expresión de *brlA* en mutantes *fluHI* reduciendo la concentración de glucosa del medio de cultivo. Se realizaron cultivos sincrónicos en medio sólido como los descritos anteriormente, excepto que en un caso se usó glucosa al 0.1 %. A partir de las 20 h se observó la formación de conidióforos y a las 30 h se inició la esporulación en la mutante *fluHI*. En la figura 11 se muestra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa CRT8 crecida en diferentes concentraciones de glucosa, junto con la cepa silvestre. La gráfica muestra que la inducción de *brlA* en la cepa CRT8 en condiciones de baja glucosa comenzó 10 h antes que cuando el crecimiento se llevo a cabo en glucosa 1.0 %. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa a las 45 h alcanzó casi 160 unidades, valor semejante al alcanzado al mismo tiempo en glucosa 1.0 %. Los niveles de inducción de *brlA* alcanzados en glucosa 0.1 % en la mutante *fluHI*, aunque mayores que en la condición de glucosa 1.0 %, no alcanzan los niveles de la cepa silvestre.

Estos resultados sugieren que la represión catabólica por carbono pudiera tener alguna relación con el papel que juega el gen *fluHI* en la activación de *brlA*, ya que se sabe que 1.0 % de glucosa es capaz de reprimir la expresión de ciertos genes a través del regulador *creA*, el gen encargado de la mayor parte de la represión catabólica por carbono en *A. nidulans* (Dowzer y Kelly, 1991). Por el contrario, 0.1 % de glucosa es incapaz de reprimir a través del sistema *creA*. También existen casos en los que la represión catabólica por carbono independiente de *creA* juega papeles regulatorios, como en el caso de la biosíntesis de penicilina la cual está sujeta a regulación por las diferentes fuentes de carbono utilizadas, más que a la represión por el gen *creA* (Espeso, *et al.*, 1992 y 1993).

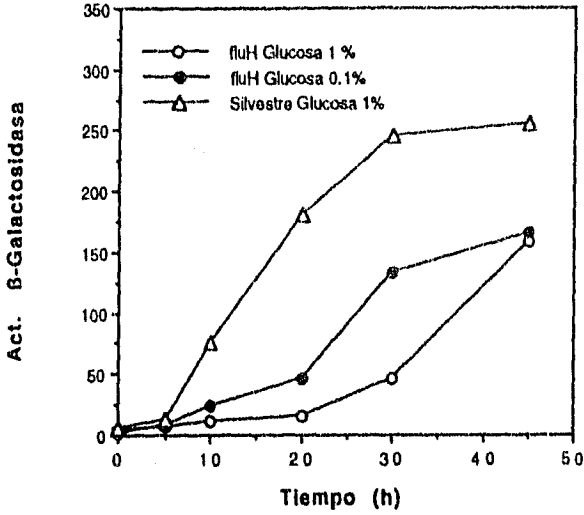


Figura 11. Expresión temprana de *brlA* en la mutante *fluH1* en condiciones limitantes de glucosa. Se realizaron cultivos sincrónicos en sólido como los descritos en la figura 10 con las cepa CRT8, en MM sólido con glucosa al 0.1 %. A los tiempos indicados se tomaron muestras para su observación bajo el microscopio y para procesarlas y poder determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. En esta figura se incluyeron los resultados obtenidos para las cepas CRT8 y TJA22 cuando el crecimiento se efectuó en glucosa al 1.0 % para poder comparar los resultados.

La privación de carbono suprime parcialmente el requerimiento de *fluH1* en cultivos sumergidos.

Uno de los factores ambientales que regulan la expresión de *brlA* es la disposición de nutrientes. La limitación de carbono o nitrógeno para *A. nidulans* en cultivos sumergidos tiene como consecuencia la inducción de *brlA* a distintos niveles. La privación de glucosa induce una rápida expresión del gen *brlA*, la cual alcanza niveles suficientemente altos, para inducir la formación de esporas a partir de conidióforos reducidos (Skromne et al., 1995). Para la mutante *fluH1* en cultivo sólido, bajas concentraciones de glucosa inducen más tempranamente la expresión del gen *brlA*, es

decir suprime parcialmente el efecto de la mutación *fluH1*. Tomando en cuenta estos antecedentes, se decidió abordar las siguientes preguntas:

- a) Si bajo las condiciones de cultivos sumergidos, con una limitación total de la fuente de carbono podía la expresión de *brlA* ser remediada en mayor grado en nuestra mutante?;
- b) Si bajo estas condiciones se podían producir también conidióforos reducidos?.

Además deseábamos saber si el efecto de supresión de *fluH1* en condiciones limitantes de glucosa era independiente del tipo de cultivo realizado, es decir, si también podía observarse este fenómeno en cultivos líquidos o estaba relacionado con el crecimiento en medio sólido, en el que los factores ambientales pueden ser diferentes. Para responder estas preguntas se crecieron las cepas TJA22 y CRT8 en MM líquido por 18 h a 37°C y 300 rpm, el micelio se transfirió a matraces de 250 ml con 50 ml de MM carente de glucosa. Se colectaron muestras a distintos tiempos y se procesaron para determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. También se tomaron muestras de cultivo para ser analizadas bajo el microscopio y para cuantificar las esporas producidas en estas condiciones. En la figura 12-A se muestra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Como ya se había reportado para la cepa silvestre, se encontró que la privación de glucosa induce la expresión del gen *brlA*. Esta inducción para la cepa TJA22 fue rápida y alcanzó niveles altos. La cepa CRT8 también expresó *brlA* bajo estas condiciones. Al privar totalmente de glucosa, la expresión de *brlA* se inicia a partir de las 12 h de inducción para las dos cepas. Es decir que a una mayor limitación de glucosa, se puede dar una expresión más temprana de *brlA* en la mutante *fluH1*. Aunque los niveles de inducción alcanzados por la cepa CRT8 no llegan a ser tan altos como los obtenidos para la cepa silvestre, éstos fueron suficientes para inducir la formación de conidióforos reducidos, como se muestra en la figura 12-B.

En la Tabla 4 se muestra el número de esporas producidas por las dos cepas a diferentes tiempos. La producción de esporas en las dos cepas se detectó a partir de las 18 h cuando había ya más de 100 unidades de  $\beta$ -galactosidasa. Se puede observar que existe una correlación directa entre el nivel de expresión del gen *brlA* (actividad de  $\beta$ -galactosidasa) y el número de esporas producidas. La mayor esporulación fue detectada para la cepa silvestre en la cual el nivel de inducción de *brlA* fue también más alto. La utilización del sistema de cultivos sumergidos permite el estudio de los factores ambientales y nutricionales que regulan la esporulación de manera más homogénea.

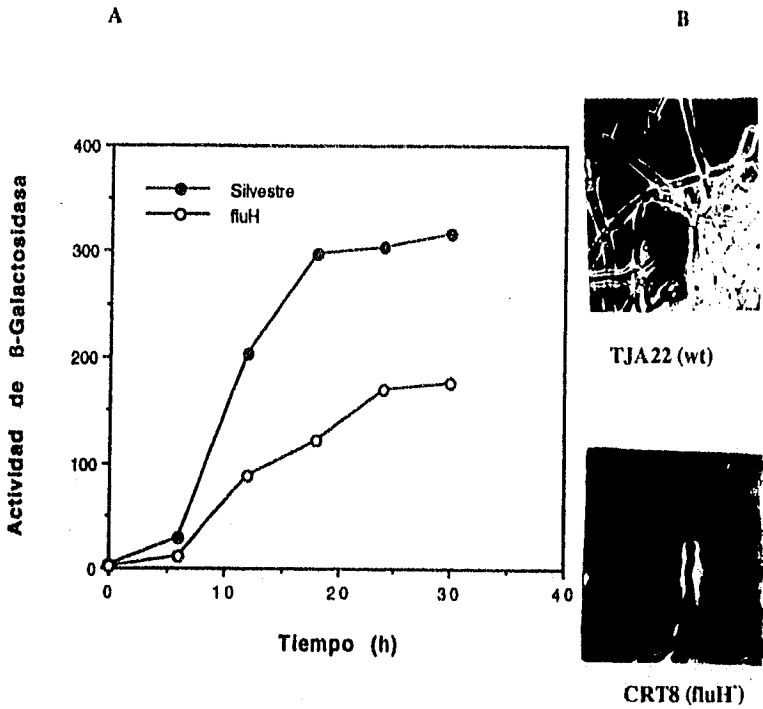


Figura 12. La privación de glucosa remedia parcialmente la expresión temporal de *brIA* en la mutante *fluH*.

A) Las cepas TJA22 y CRT8 se inocularon en MM líquido con glucosa al 1.0 % y se crecieron por 18 h. Posteriormente, el micelio se lavó y transfirió a matraces con 50 ml de MM sin glucosa. A los diferentes tiempos, el micelio de todo un cultivo se colectó para procesarlo y medir la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Cada punto de la curva representa el promedio de cuando menos dos experimentos independientes, con un porcentaje de variación no mayor al 15 % con respecto al promedio.

B) Morfología de los conidióforos 24 h después de la transferencia a un medio sin glucosa. Las flechas indican las esporas producidas a partir de conidióforos reducidos en las cepas TJA22 y CRT8.

	Glucosa 0% Esporas/ml (x 10 <sup>3</sup> )	Glucosa 0% Esporas/ml (x 10 <sup>3</sup> )
Tiempo (h)	TJA22	CRT8
18	775	475
24	4100	800
30	6100	1360

**Tabla 4.** Producción de esporas en la mutante *fluH1* y una cepa silvestre en MM líquido sin glucosa. El experimento se realizó tal como el de la figura 14. A los diferentes tiempos, se tomaron muestras del medio de cultivo para su observación y para la cuantificación de las esporas producidas a partir de conidióforos reducidos. Cada valor representa el promedio de tres mediciones independientes con un porcentaje de variación del 10 %, con respecto al promedio.

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores podemos decir que en cultivos sólidos la mutante *fluH1* presenta un retraso considerable de 20 h en la inducción del gen *brlA* con respecto a la cepa silvestre. Al crecer en medios sólidos con glucosa 0.1 % el retraso se redujó aproximadamente 10 h. Finalmente, la privación total de glucosa en medio líquido en condiciones muy controladas, prácticamente anuló el retraso. Estos resultados, en conjunto, muestran que a mayor limitación de glucosa, menor es el grado del requerimiento del gen *fluH*. Sin embargo, aún la privación total de glucosa no logra restablecer el nivel de expresión de *brlA* que se observa en una cepa *fluH+*. Esto nos sugiere fuertemente que el gen *fluH* juega un papel importante en la activación de *brlA*. Probablemente los efectos observados por la limitación de glucosa supriman parcialmente el requerimiento por *fluH* de una manera indirecta. Al respecto, se ha reportado que otras mutantes con fenotipos semejantes a *fluH1*, pueden ser curadas parcialmente por limitaciones nutricionales tal como el caso de mutaciones en el gen *fluG* (Adams et al., 1992), *flbA*, *flbC*, *flbD* y *flbE* (Lee B. N. y Adams T., 1994A; Lee B. N. y Adams T., 1994B, Wiesser J. y Adams T., 1995).

### El gen *fluH* es indispensable para la esporulación inducida por la privación de nitrógeno.

Cuando a una cepa silvestre de *A. nidulans* se le limita en medio líquido de la fuente de nitrógeno, se induce el gen *brlA* y se producen esporas a partir de conidióforos elaborados, semejantes a los producidos en una interfase aérea. Tanto en una cepa silvestre como en la mutante *fluH1*, la glucosa tiene un efecto represivo sobre la expresión de *brlA*. Para comprender mejor los efectos de la limitación de los dos principales nutrientes en cepas con la mutación *fluH1* se decidió probar en esta mutante, el efecto de la limitación de nitrógeno sobre la esporulación. Para este experimento se crecieron a las cepas TJA22 y CRT8 en MM con glucosa al 1.0 % por 18 h. El micelio se transfirió a medio sin glucosa o sin nitrato y se tomaron muestras a las 12 y 24 h para medir la actividad de  $\beta$ -galactosidasa y para observar la morfología. Como puede verse en la Figura 13, en el caso de la cepa TJA22 la limitación de glucosa llevó a una clara inducción de *brlA*, alcanzando a las 24 h aproximadamente 500 U de actividad de  $\beta$ -galactosidasa y se produjeron esporas a partir de conidióforos reducidos. Cuando la fuente limitante fué el nitrato, la cepa silvestre presentó una inducción más moderada de *brlA*. A las 24 h se registraron 170 U de  $\beta$ -galactosidasa y se observó esporulación a partir de conidióforos elaborados.

Para la mutante *fluH1* la limitación de glucosa llevó a la formación de esporas a partir de conidióforos reducidos y a las 24 h se registraron aproximadamente 240 U de  $\beta$ -galactosidasa. La esporulación observada en este caso fué menor que para la cepa silvestre, lo cual concuerda con los niveles de inducción de *brlA* obtenidos para cada una de las cepas. Al observar el micelio de la mutante *fluH1* en condiciones limitantes de nitrógeno, no se detectó ninguna esporulación. El análisis de la inducción de *brlA* en esta mutante, mostró actividades de  $\beta$ -galactosidasa considerablemente menores que para la cepa silvestre (38 U a las 24 h). Este resultado fué interesante, ya que indica una relación clara entre el metabolismo nitrogenado, *fluH1* y la esporulación. Un resultado interesante, relacionado con el anterior, se refiere a la incapacidad de mutantes nulas *areA* para esporular por privación de nitrógeno (Sánchez y Aguirre, sin publicar). Estos resultados parecen indicar que entre los factores ambientales que regulan la esporulación asexual en *A. nidulans*, existe una muy compleja relación entre el metabolismo del nitrógeno y la esporulación. Uno de los componentes de esta relación pudiera ser el gen activador *areA*, el cual codifica para un regulador central de los genes involucrados en el metabolismo del nitrógeno. Análisis de la secuencia del gen *areA* han mostrado una alta similitud con el gen

*nit-2*, responsable de la regulación de la represión catabólica nitrogenada en *Neurospora crassa*. (Arist y Cove, 1973; Arist y Bayley, 1977; Cove, 1979; Kudla, et al., 1990; Caddick, 1992; Scazzocchio, 1992; Marzluf, 1993). Nuestros resultados sugieren que *areA* al igual que *fluH* puede funcionar en la misma vía de activación de *brlA*. Sin embargo, el proceso debe ser más complejo ya que las mutantes *areA* no presentan un fenotipo algodonoso.


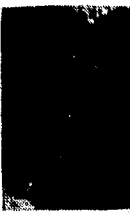


Tiempo	Silvestre	Silvestre	<i>fluH1</i>	<i>fluH1</i>
	-C	-N	-C	-N
0	7.5	2.2	7.5	2.2
12	124	80	139	20
24	495	170	236	38
Morfología				

Figura 13. El gen *fluH* es indispensable para la esporulación inducida por la privación de nitrógeno. Las cepas TJA22 y CRT8 se inocularon a MM + glucosa y se incubaron durante 18 h. El micelio se lavó y transfirió a MM sin glucosa o sin nitrato según fuera el caso. Se tomaron muestras a las 12 y 24 h para ser procesadas para cuantificar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. La morfología corresponden a cultivos de 24 h.



**Otros genes, cuya mutación genera fenotipos “algonosos”, también se requieren para esporular por privación de nitrógeno**

Experimentos realizados con la mutante *fluH1* mostraron que la limitación de carbono llevaba a una inducción más temprana de *brlA*, teniendo como consecuencia la esporulación a partir de las puntas de las hifas, mientras que la esporulación no ocurría durante la privación de nitrógeno, debido a una muy baja inducción de *brlA*. Con estos antecedentes, decidimos probar si éstas respuestas a la limitación de nutrientes eran exclusivas de cepas con la mutación *fluH1*, o si se trataba de una respuesta común presentada por diferentes mutantes algonosos, que aunque afectadas en diferentes genes, presentan una morfología muy similar. Se realizaron cultivos sumergidos en los cuales se crecieron en medio mínimo con glucosa y nitrato a las cepas algonosos con mutaciones en *fluF*, *fluG* y *flbD* por 18 h. Posteriormente los cultivos se lavaron y transfirieron a medios en los que se privaron de glucosa o de nitrato durante 24 h y se hicieron observaciones bajo el microscópio de cada una de las muestras. Se encontró que para las mutantes algonosos utilizadas, la limitación de glucosa tenía efectos muy similares que los observados con la mutante *fluH1*, es decir, cuando se privó de carbono a las mutantes *fluF*, *fluG*, y *flbD*, éstas produjeron esporas a partir de las puntas de las hifas (ver figura 14). En el caso de la limitación de la fuente de nitrógeno, ninguna de las mutantes analizadas esporuló. Con estos resultados podemos decir que los genes *fluF*, *fluG* y *flbD* se requieren para esporular en ausencia de nitrógeno y que de alguna manera participan en una vía común, que finalmente conduce a la esporulación.


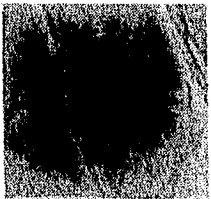

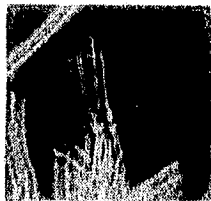
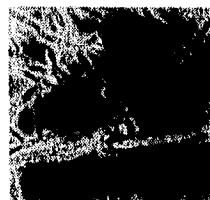

Cepas	- C	- N
fluF		
fbbD		
fluG		

Figura 14. Los genes *fbbD*, *fluF* y *fluG* se requieren para esporular por privación de nutrientes.

Cepas con mutaciones en los genes *fbbD*, *fluF* y *fluG* se inocularon en MM + glucosa 1.0 % por 18 h. Posteriormente, el micelio se lavó y transfirió a MM sin glucosa o sin nitrógeno y el cultivo se continuó hasta las 24 h. Las fotomicrografías se tomaron con un microscopio Leica y la amplificación fué de 400 veces.

### Obtención y caracterización parcial de mutantes con supresores extragénicos de *fluHI*.

A partir de los estudios realizados anteriormente, se determinaron algunos parámetros relacionados con la mutación *fluHI*, en cuanto a patrones de esporulación, curvas de crecimiento y expresión del gen *brlA*. Proponemos que el gen *fluHI* puede funcionar de manera directa o indirecta como un activador del gen regulador *brlA* y que la mutación en *fluHI* tiene alguna relación con la represión catabólica por carbono, pero sobre todo, con la regulación del metabolismo nitrogenado. Decidimos explorar la función de *fluHI* y sus posibles relaciones funcionales con otros genes, a partir de la obtención de mutantes con supresores extragénicos. Para ello se llevó a cabo una mutagénesis de la cepa CRT8 con luz U.V. empleando la técnica de Käfer (1965). La dosis de irradiación correspondió aproximadamente a  $700 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  y fué suministrada a una suspensión de esporas por 180 seg. En la Figura 15 se muestra la curva de sobrevivencia, donde puede observarse que el 10 % de sobrevivencia se obtuvo al irradiar por 120 seg. Posteriormente se realizaron mutagénesis en las que una suspensión de esporas se irradió por 120 segundos y las esporas irradiadas se plaquearon en MM + 1.0 % de glucosa más requerimientos de la cepa.

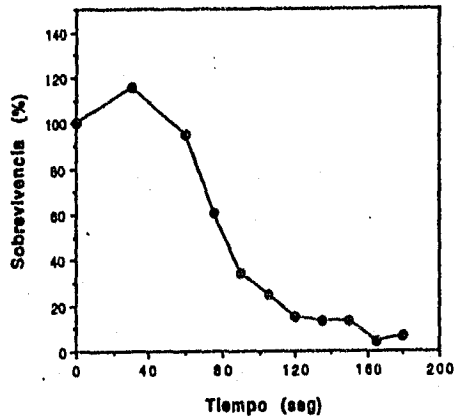


Figura 15. Curva de sobrevivencia de la cepa CRT8 a la irradiación con luz Ultravioleta.

Esporas de la cepa CRT8 se mutagenizaron irradiándolas con luz ultravioleta hasta por 180 seg. El 10 % de sobrevivencia se detectó a los 120 seg. Cada punto en la gráfica representa el promedio de dos experimentos independientes.

Se seleccionaron a aquellas colonias que en este medio fueran capaces de esporular mejor que la cepa original *fluH1* a las 48 h. De 6884 colonias que crecieron después de ser mutagenizadas se detectaron tres colonias con apariencia semejante a una cepa silvestre en cuanto a morfología de la colonia y/o que presentaban una mayor esporulación que la mutante *fluH1*. Estas tres mutantes fueron denominadas inicialmente CRT9, CRT10, CRT11 y CRT12. Estas cuatro cepas mutantes se purificaron por sembrado para colonia aislada, para dejar que las mutantes generadas crecieran en condiciones estándar y poder así verificar su fenotipo (figura. 16). Las auxótrofias para biotina y paba (marcadores de la cepa mutagenizada) se verificaron en las cuatro mutantes, para eliminar la posibilidad de que se tratara de posibles contaminaciones.

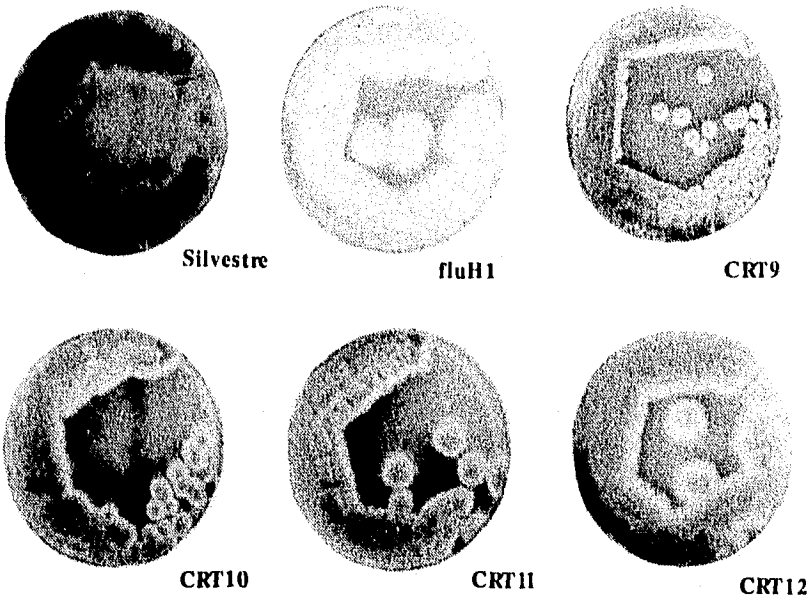


Figura 16. Mutantes con posibles supresores extragénicos de la mutación *fluH1*.

Las mutantes obtenidas después de la radiación con luz ultravioleta de la cepa CRT8 se seleccionaron plaqueando en MM + 1.0 % y 0.05 % de desoxicolato se sodio. Se detectaron cuatro colonias mutantes, tres de las cuales restablecieron un fenotipo semejante al silvestre, y una cuarta que resultó ser una colonia compacta de bordes rugosos. En esta figura se representa a las mutantes supresoras obtenidas denominadas CRT9, CRT10, CRT11 y CRT12, así como también a la cepa silvestre FGSC26 y la mutante *fluH1* (CJA16), crecidas en MM + glucosa 1.0 %.

## Niveles de esporulación en las mutantes CRT9, CRT10, CRT11 y CRT12.

Para determinar el grado de supresión del fenotipo algodonoso de la mutante *fluH1* en las mutantes generadas, se decidió cuantificar sus niveles de esporulación. Se sembraron para colonia aislada sobre membranas de celofán en junto con la cepa silvestre FGSC26 y la CJA16 (*fluH*). Cada colonia se pesó y se cuantificó la esporulación. En la Tabla 5 se muestra el promedio del peso seco por colonia y el porcentaje de esporas producidas por colonia, para cada una de las cepas, tomando como 100 % de esporulación a la cepa silvestre. Puede observarse que el porcentaje de esporulación de las mutantes CRT9-CRT12 es de alrededor del 10 % comparado con la cepa silvestre. Aún cuando los niveles de esporulación alcanzados por las mutantes no restablecen los niveles silvestres, si hubo un incremento de aproximadamente 20 veces con respecto a la mutante *fluH*, la cual sólo genera aproximadamente el 0.5 % de la esporulación silvestre. Estos resultados muestran que las mutaciones contenidas en las cepas CRT9, CRT10, CRT11 y CRT12, suprimen parcialmente el fenotipo *fluH1*

Cepa	Peso Seco (mg)	Esporas/colonia (%)
FGSC26	69.60	100
CJA16	69.0	0.53
CRT9	32.66	8.95
CRT10	43.33	11.12
CRT11	44.66	12.69
CRT12	48.33	11.82

Tabla 5. Niveles de esporulación de las mutantes con posibles supresores de *fluH1*.

Se inoculó sobre MM + glucosa al 1.0 % y celofán a las cepas FGSC26, CJA16, CRT9, CRT10, CRT11 y CRT12. Las cepas se incubaron a 37°C por 68 h, tiempo en el cual se tomaron colonias aisladas para ser secadas y cuantificar su peso seco. Posteriormente cada colonia se agitó en 1 ml de agua estéril para la cuantificación de esporas. Los datos reportados aquí representan el promedio de cuando menos tres colonias diferentes. El porcentaje de error con respecto al promedio no fué mayor del 10% para las esporas y del 7.0 % para el peso seco. El 100 % de esporas corresponde a  $2.10833 \times 10^4$ /colonia.

### Caracterización genética de las mutantes con posibles supresores de *fluH1*.

Con el análisis anterior se estableció que las mutaciones con posibles supresores de *fluH* tenían un efecto sobre el grado de esporulación, por lo que se decidió demostrar formalmente que las mutantes generadas, contenían mutaciones independientes de *fluH1*, y no reversiones parciales de esta mutación. Para probar este punto se realizaron cruzas entre cada una de las mutantes CRT9, CRT10, CRT11, CRT12 y la cepa silvestre CLK11. Los resultados se muestran en las Tablas 6, 7, 8 y 9, respectivamente. Se utilizó la proporción de colonias verdes y amarillas como marcador interno de segregación. En este sentido las cruzas se comportaron Mendelianamente (aproximadamente 50 % de colonias verdes y 50 % de colonias amarillas). Las mutantes aisladas se designaron provisionalmente como *suAfluH1*, *suBfluH1*, *suCfluH1* y *suDfluH1* (Clutterbuck, A.J. y Arst H., 1995).

#### - Análisis meiótico de CRT9 (*suAfluH1*).

El análisis de la progenie generada por la cruce entre la cepas CRT9 y la cepa silvestre CLK11 (*γA2*, *argB2*, *proA1*) se muestra en la Tabla 6. Se obtuvieron resultados interesantes al observar los diferentes fenotipos generados (figura 19). Primeramente, se obtuvieron cepas con un fenotipo algodonoso, lo cual comprobó el hecho de que se había generado una mutación independiente de *fluH1*. Se obtuvieron cepas con el fenotipo original de la doble mutante, es decir, colonias compactas con bordes arrugados y en la periferia de la colonia gran cantidad de células "hulle" o nodrizas. También se obtuvieron colonias con fenotipo silvestre. Otro fenotipo encontrado fue el provocado por la mutación supresora, es decir que, fuera del contexto algodonoso la mutante presentaba un fenotipo propio. Las cepas que sólo llevaban la mutación *suAfluH1*, eran colonias compactas de bordes más o menos rugosos y con una esporulación muy abundante y de coloración intensa. Las proporciones con las que segregaron cada uno de los fenotipos fue de aproximadamente 25 %, lo que indicó que la mutación supresora era monogénica y no se encontraba ligada a *fluH1*.

A partir de estos resultados podemos concluir:

La cepa CRT9 contiene una mutación independiente de *fluH*, la cual genera un fenotipo fuera del contexto *fluH*. Con éstos resultados, puede formalmente considerarse que la mutación contenida en la cepa CRT9 es una mutación supresora de *fluH*, la cuál define al gen *suAfluH1*.

Fenotipos obtenidos	(%)
Silvestre	21
Algodonoso ( <i>fluH1</i> )	22
Doble mutante( <i>fluH1; suAfluH1</i> )	21
Compactas ( <i>suAfluH1</i> )	36
Colonias verdes	49
Colonias amarillas ( <i>vA2</i> )	51

Tabla 6. Análisis melótico de la cruce de las cepas CRT9 (*suAfluH1*) y CLK11.

Se plaquearon alícuotas de ascosporas provenientes de cleistotecios híbridos en medios no selectivos, para analizar los diferentes fenotipos generados. La progenta total analizada fué de 266 colonias.

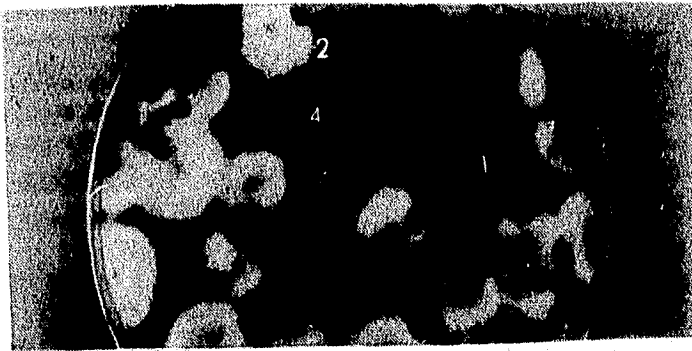


Figura 17. La mutante *suAfluH1* presenta un fenotipo propio en un fondo silvestre.

Se plaquearon en un medio no selectivo a ascosporas de la cruce entre las cepas CLK11 X CRT9. Dentro de la progenta obtenida se observaron cuatro fenotipos diferentes: 1) colonias silvestres, 2) colonias algodonosas, 3) colonias compactas con bordes rugosos y gran cantidad de células Hulle en la periferia y 4) colonias compactas con una esporulación mayor y de coloración muy intensa.

Mutantes afectadas en el gen *creA* responsable de la represión catabólica por carbono, crecen como colonias compactas de bordes más o menos definidos (Dowzer y Kelly, 1991). Estas mutantes no pueden crecer en alcohol alílico más glucosa, ya que la alcohol deshidrogenasa se encuentra desreprimida y utiliza a este compuesto como sustrato para formar acroleína, la cual es tóxica para las células. Para eliminar la posibilidad de que las mutantes obtenidas fueran mutantes *creA*, se realizaron dos pruebas. Se inocularon en placas con alcohol alílico y los requerimientos necesarios a las cepas CRT14, FGSC26 y CPG1 (mutante *creA*). Después de 48 h de incubación sólo crecieron las cepas CRT14 y FGSC-26. La cepa CPG1 no creció, como era de esperarse. Con esto se comprobó que la mutante generada no era alélica a *creA*, aunque aún cabía la posibilidad de que si se tratará de una mutante *creA* reprimida para la alcohol deshidrogenasa y desreprimida para otros sujetos a represión catabólica por carbono, como se ha reportado para algunos alelos de *creA*. Como prueba final se realizaron diploides entre la cepa CRT15 y la CPG1. Los diploides obtenidos crecieron como colonias silvestres en cuanto a morfología y esporulación. Con estos experimentos quedó totalmente descartado de que la mutación *suAfluH1* fuese un alelo de *creA*, aunque se trate de una mutación que también genere colonias compactas.

- Análisis meiótico de CRT10 (*suBfluH1*).

Se realizaron cruza entre las cepas CRT10 y CLK11 y su análisis se reporta en la Tabla 7. En este caso sólo se obtuvieron tres fenotipos discernibles, es decir, no se distinguió un fenotipo generado por la mutación de *suBfluH1*, lo que sugiere que esta mutación no confiere un fenotipo en un contexto *fluH*<sup>+</sup>. Se obtuvieron colonias con fenotipo algodonoso, lo cual significa que la mutación generada era independiente de la mutación en *fluH*. Los otros dos fenotipos observados fueron: colonias con fenotipo silvestre y colonias con un fenotipo semejante al de la doble mutante *fluH1-suBfluH1* (figura 18). El fenotipo algodonoso de la mutante *fluH1*, sabemos es de carácter monógeno ya que la proporción en que segregó este gen es de aproximadamente 25 %. A partir de este resultado, se esperaba que, la proporción en que se presentaran los fenotipos silvestres, *suBfluH1* en un contexto silvestre y *suBfluH1* en un contexto *fluH1*, fueran también de aproximadamente un 25 % cada uno. Dado que no fue posible distinguir el fenotipo *suBfluH1* en un contexto silvestre, del fenotipo únicamente silvestre, se decidió cuantificar las colonias que presentaban fenotipo silvestre y tomarlas como representantes de ambos fenotipos. La proporción de colonias con morfología silvestre fue cercana al 50 %. Si se analiza a la progenie cuando es muy joven, es aún más difícil distinguir estos dos fenotipos de la doble mutante (*fluH1; suBfluH1*), por lo que la proporción para este fenotipo parece



estar sobreestimada. No obstante el marcador interno, la segregación de colores, 50% colonias amarillas y 50 % colonias verdes, indicó que la cruce se comportó normalmente.

Las conclusiones obtenidas a partir del análisis de la progenie de las cruces entre las cepas CRT10 y CLK11 son las siguientes:

La cepa CRT10 contiene una mutación independiente de *fluH*, la cual no genera un fenotipo propio fuera del contexto *fluH*. De los resultados obtenidos a partir de la segregación puede observarse que esta mutación no se encuentra ligada a *fluH*, y todo parece indicar que es monogénica. De aquí en adelante se designará como *suBfluH1*.

Fenotipos obtenidos	(%)
Algodonoso ( <i>fluH1</i> )	24
Silvestre	40
Doble mutante( <i>fluH1</i> ; <i>suBfluH1</i> )	36
Colonias verdes	51
Colonias amarillas ( <i>ya2</i> )	49

Tabla 7. Análisis melódico de la cruce entre las cepas CRT10 (*suBfluH1*) y CLK11.

Se plaquaron alícuotas de ascosporas provenientes de cleistotecios híbridos en medios no selectivos para analizar los diferentes fenotipos generados. La progenie total analizada fué de 487 colonias.

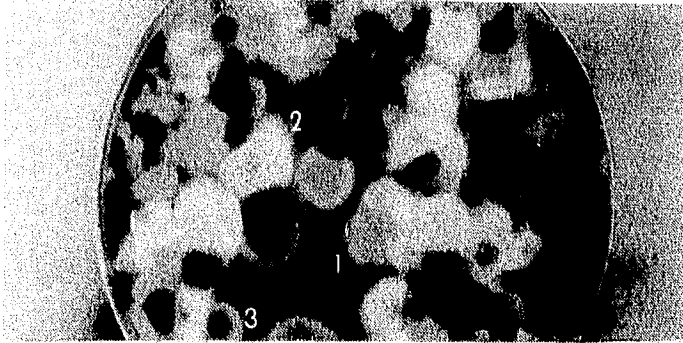


Figura 18. La mutante *subfluH1* no presenta un fenotipo propio.

Se plasmó en un medio no selectivo una alícuota de ascosporas de la cruce entre las cepas CLK11 y la CRT10. En la progenie obtenida se observaron tres fenotipos diferentes: 1) colonias silvestres, 2) colonias algodonosas, y 3) colonias que representan a la doble mutante *fluH1-subfluH1*. Resultó imposible discernir a la mutación *subfluH1* cuando se encuentra en un contexto silvestre, es decir que no presenta un fenotipo propio.

El mismo tipo de análisis meiótico se aplicó a las cepas CRT11 y CRT12. Los resultados se muestran en las tablas 8 y 9, respectivamente. En estos casos, al igual que con la cepa CRT10, puede concluirse que ambas mutantes contienen mutaciones supresoras independientes de *fluH1*, las cuales no confieren ningún fenotipo en un fondo silvestre y que hemos designado *suCfluH1* y *suDfluH1*, respectivamente.

Fenotipos obtenidos	(%)
Algodonoso ( <i>fluH1</i> )	22
Silvestre	55
Doble mutante( <i>fluH1</i> ; <i>suCfluH1</i> )	23
Colonias verdes	50
Colonias amarillas ( <i>ya2</i> )	50

**Tabla 8. Análisis melótico de la cruce de las cepas CRT11 (*suCfluH1*) y CLK11.**

Se plaqueron alicuotas de ascosporas provenientes de cleistotecios híbridos en medios no selectivos para analizar los diferentes fenotipos generados. La progenie total analizada fué de 616 colonias.

Fenotipos obtenidos	(%)
Algodonoso ( <i>fluH1</i> )	22
Silvestre	55
Doble mutante( <i>fluH1</i> ; <i>suDfluH1</i> )	23
Colonias verdes	41
Colonias amarillas ( <i>ya2</i> )	59

**Tabla 9. Análisis melótico de la cruce de las cepas CRT12 (*suDfluH1*) y CLK11.**

Se plaqueron alicuotas de ascosporas provenientes de cleistotecios híbridos en medios no selectivos para analizar los diferentes fenotipos generados. La progenie total analizada fué de 383 colonias.

Las designaciones a las diferentes mutaciones supresoras obtenidas en este estudio presuponen que cada una de ellas es distinta entre sí, esto es *suAfluH1*, *suBfluH1*, *suCfluH1* y *suDfluH1*. Esto sólo ha sido comprobado para la mutación *suAfluH1*, ya que con cepas que sólo portan esta mutación se han podido establecer diploides con las cepas CRT10, CRT11 y CRT12. Los diploides mostraron un fenotipo silvestre, indicando que la mutación *suAfluH1* es independiente a las otras tres mutaciones. Para el caso de las mutaciones supresoras B, C y D, el hecho de no presentar un fenotipo en sí mismas y portar cada una los mismos marcadores (*pabaA1;biA1*; ya que todas provienen de la cepa CRT8) ha dificultado el establecimiento de diploides entre ellas.

La obtención de supresores extragénicos de la mutación en *fluH*, es una herramienta sumamente interesante. El análisis de supresores extragénicos constituye uno de los métodos para establecer posibles interacciones génicas. El hecho de poder determinar qué productos génicos pueden estar relacionados con otros funcionalmente, facilitaría el esclarecimiento de redes regulatorias del gen *brlA*.

#### Análisis de dominancia.

##### CRT10, CRT11 y CRT12.

Para establecer si las mutaciones supresoras se comportaban como dominantes o recesivas, se construyeron diploides entre las cepas CRT10, CRT11 y CRT12 y la cepa CRT18 (*ya2; metG1;fluH1*). Estos diploides fueron heterocígos para las posibles mutaciones supresoras *suAfluH*, *suBfluH*, *suCfluH*, *suDfluH* y homocígos para la mutación *fluH1*. Los diploides obtenidos entre las cepas CRT18/CRT10, CRT8/CRT11 y CRT18/CRT12 se observaron como colonias algodonosas que producían esporas verdes. Este resultado nos indicó que cada una de las mutaciones supresoras *suBfluH*, *suCfluH* y *suDfluH* era recesiva. Para comprobar que las colonias que analizamos eran efectivamente diploides, se utilizaron los siguientes criterios:

Los diferentes diploides obtenidos mostraron estabilidad en MM sin requerimientos, lo que indicó que se complementaron sus auxotrofías. Al crecer los diploides en MM + p-F-fenilalanina se obtuvieron diversos sectores haploides, los cuales al ser analizados mostraron una segregación al azar de los marcadores que portaban cada una de las cepas con las que se formaron los diploides. La prueba final de la obtención de diploides, fué la obtención de colonias algodonosas verdes, es decir se complementó la coloración en las esporas (*ya<sup>+</sup>/ya<sup>+</sup>*).

**CRT9**

Debido a que la mutación *suAfluH* presentó un fenotipo propio, esto facilitó muchísimo la generación de diploides. Los diploides se generaron entre las cepas CLK11 (*yA2; argB1; proA1*) y CRT9. Las colonias diploides obtenidas se observaron como colonias silvestres robustas y de color verde, indicando que *suAfluH1* es una mutación recesiva.

En conclusión, se han obtenido diferentes mutaciones supresoras del gen *fluH1*, que son monogénicas y recesivas. Faltaría determinar si todas estas mutaciones son diferentes entre sí, así como realizar una búsqueda más exhaustiva de este tipo de mutantes, las cuales restablecieran parcialmente o totalmente la condición silvestre en un contexto *fluH*. El hecho de obtener mutantes supresoras de *fluH1* nos abre la posibilidad de entender las posibles interacciones que existen entre el gen *fluH* y otros genes, que pudieran estar relacionados con la inducción del gen *brlA* y por consiguiente en la reproducción asexual de *A. nidulans*.

**Caracterización de mutantes afectadas en el gen *suAfluH1*.**

Como se describió en la caracterización genética de las cuatro mutantes supresoras, se encontró que la mutación supresora *suAfluH1* presenta un fenotipo "per se". El fenotipo observado fue el de colonias compactas que esporulaban perfectamente y que en las periferia de la colonia producen células Hülle. La morfología de esta mutante puede observarse en la figura 19. La mutación *suAfluH1* es recesiva y monogénica. Debido a estas características se decidió continuar con el análisis de la mutante *suAfluH1*, ya que su morfología nos facilitó el poder realizar un estudio fisiológico, morfológico y genético más detallado.

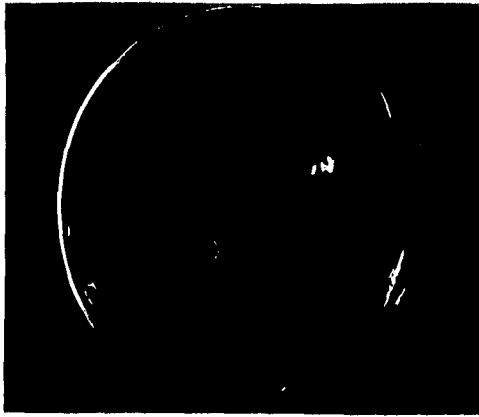


Figura 19. Morfología de la mutante *suAfluH1*.

Se inoculó sobre MM + glucosa 1.0 % a la cepa CRT14, la cual lleva la mutación *suAfluH1*. La mutación en *suAfluH1* resulta en colonias compactas con bordes más o menos rugosos.

#### Caracterización Morfológica de la mutante *suAfluH1*.

Para determinar la morfología de la mutante de una manera más precisa se midieron la longitud de ramificación y el grosor de las hifas, utilizando un procesador de imágenes integrado a un microscopio óptico. Se inocularon por picadura esporas de las cepas CRT9 (*fluH1, suAfluH1*), y CRT14 (*suAfluH1*) en el centro de cajas Petri, y se incubaron las cajas a 37°C por 100 h. Posteriormente las colonias se fijaron y se midieron de las ramificaciones terminales de las hifas así como también del grosor de las mismas. Los resultados de la figura 20-A muestran que las mutantes *suAfluH1* (CRT14) y *fluH1, suAfluH1* (CRT9), muestran claramente un mayor grado de ramificación que la mutante *fluH1* (CIA16) sola.

Los resultados de la medición del grosor de las hifas en estas cepas, se muestran en la figura 20-B. Para el caso de la cepa CRT14 el grosor promedio de las hifas fué de 2.8  $\mu\text{m}$ ; mientras que para la cepa CRT9 (doble mutante) este valor fué de 3.8  $\mu\text{m}$ . Es decir, esta cepa presentó hifas con un incremento notable en el grosor, comparado con los grosores presentados por las cepas silvestre de 2.8  $\mu\text{m}$  y la mutante *fluH1* de 1.8  $\mu\text{m}$ .

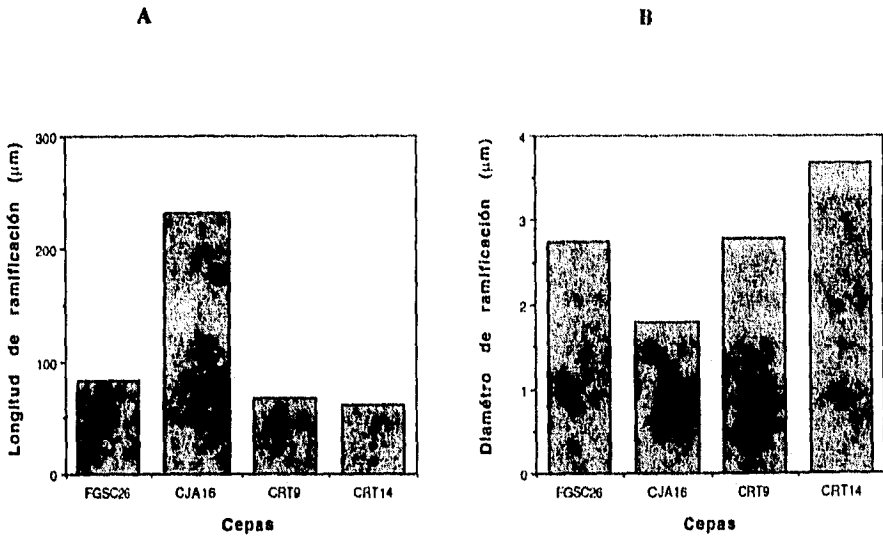


Figura 20. Análisis de la ramificación y grosor de las hifas de la mutante *suAfluH1*.

A. Análisis de la ramificación. Se inocularon a las cepas CRT9 y CRT14 por picadura en el centro de una caja Petri, y se incubaron por 100 h. Las colonias se fijaron en una solución de ácido acético al 0.5 % y CrO3 al 0.25 % por 24 h. La longitud de las ramificaciones se midieron en un procesador de imágenes. Cada barra en la gráfica es el promedio de 120 mediciones para cada cepa con un porcentaje de variación no mayor al 10 %. En esta gráfica se muestra también los datos correspondientes a las cepas FGSC26 y CJA16 (tomadas de la figura 9-A).

B. Análisis del grosor de las hifas. Las cepas CRT9 y CRT14 se procesaron como se indica en la figura 20-B. Cada barra en la gráfica representa el promedio de 10 mediciones para cada cepa, con un porcentaje de variación no mayor al 10 % con respecto al promedio. En esta gráfica se muestran los datos para las cepas FGSC26 y CJA16 (tomados de la figura 9-II).

En conclusión, las cepas que portan la mutación *suAfluH1* presentan una ramificación mucho mayor con hifas más cortas y gruesas que una cepa silvestre, dando lugar estos cambios morfológicos a un fenotipo compacto. Las cepas que son dobles mutantes *fluH1-suAfluH1* presentan fenotipos intermedios de ramificación y grosor de las hifas con respecto a las dos mutaciones independientes.

Con base en estos resultados encontramos que tanto la mutación *fluH* como la mutación *suAfluH1*, las cuales afectan de manera inversa la morfología de las hifas vegetativas también afectan la conidiación. El comportamiento de la doble mutante, en la que existe una expresión parcial de ambos fenotipos sugiere una posible interacción entre los productos de ambos genes, interacción que sería realmente importante estudiar con respecto a la morfología del micelio, su crecimiento y diferenciación.

Resulta interesante que otro tipo de mutantes con morfología compacta (*creA*), no alélicas a *suAfluH1*, también afectan la morfología de las hifas y la esporulación de manera semejante. Cuando se realizaron cruzas entre las cepas CPG1 y CJA14, y se analizó la progenie, se encontraron cuatro fenotipos:

- 1) colonias silvestres;
- 2) colonias "fluffy";
- 3) colonias *creA* (con un fenotipo compacto) y
- 4) dobles mutantes *creA-fluH1*, con un fenotipo intermedio entre las dos mutaciones, las cuales se observan como colonias más grandes que una mutante *creA* pero más compactas que *fluH1* y en las cuales se remedia parcialmente la esporulación (Figura 21).

Como ya se ha descrito anteriormente existe toda una serie de mutantes algodonosas no alélicas a *fluH1*, las cuales parecen resultar también en modificaciones en los patrones de crecimiento, además de estar afectadas en la esporulación. A este respecto, se realizaron cruzas entre la mutante *suAfluH1* y la mutante *fluF*. A partir del análisis de la progenie, también se observó que *suAfluH1* suprime parcialmente a *fluF* en cuanto a la morfología y esporulación (datos no mostrados). Al parecer, el producto del gen *suAfluH* también tiene alguna interacción con *fluF* y posiblemente con algunos otros de los productos de los genes "fluffy". Sería realmente interesante realizar una serie de cruzas entre las diferentes mutantes algodonosas y la mutante *suAfluH1*, para determinar si este efecto de supresión parcial se observa con las otras mutantes. Estos resultados sugieren fuertemente que mutaciones que afectan la morfología del micelio vegetativo, tienen también efecto en gran medida en la esporulación asexual del hongo.



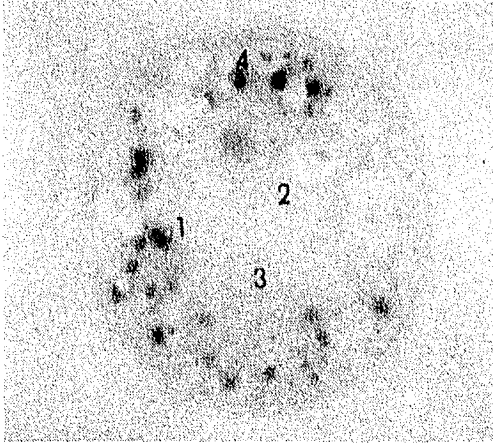


Figura 21. La mutación *creA* también afecta la morfología y confluencia en la mutante *fluHI*.

Se plasmaron ascosporas de una cruce entre las cepas M11440 (*creA 204*) y CJA16 (*fluHI*). De la progenie obtenida se observan cuatro fenotipos, 1) colonias silvestres, 2) colonias fluffy, 3) colonias *creA* (compactas), y 4) dobles mutantes *creA-fluHI*, con un fenotipo intermedio entre estas dos mutaciones

#### Caracterización Fisiológica. Sobreproducción de Proteasas y Amilasas extracelulares por la mutante *suAfluHI*.

En cepas con la mutación *suAfluHI* cuya morfología ya ha sido descrita anteriormente, se observó también que al crecerlas en placa producían una pigmentación café-rojiza en el medio, característica no observada en cepas silvestres. En experimentos preliminares en medio líquido donde se creció a esta mutante se detectó que también liberaba al medio una sustancia rojiza, además de formar agregados extracelulares. Estos agregados se tiñeron con el reactivo de Bradford, lo cual sugirió que la mutante podría estar liberando algunas proteínas al medio.

Se ha propuesto que la morfología del micelio es determinante en la producción de proteínas de secreción (Smart, N.J. 1991). Además de que la secreción de algunas proteínas extracelulares en los hongos filamentosos se efectúa principalmente a través de las

puntas de las hifas. En *A. niger* se ha demostrado que la secreción de glucoamilasa se realiza sólo en las puntas de las hifas en crecimiento (Wönsten, et al., 1991; Wessels, 1992). Desde el punto de vista Biotecnológico, las compañías de fermentación emplean inhibidores del crecimiento, los cuales incrementan la ramificación de los cultivos teniendo en muchos casos efectos significativos sobre la productividad. La excesiva ramificación presentada por la mutante *suAfluH1* y liberación de protefnas al medio observada, nos llevó a analizar si ésta mutante sobre producía algunas protefnas.

En *A. nidulans* se ha reportado que en condiciones donde la fuente de nitrógeno es obtenida de la hidrólisis de protefnas, se detectó la secreción de dos proteasas extracelulares; una neutra y otra alcalina (Cohen, 1973). Estas proteasas estan sujetas a represión catabólica por nitrógeno, a través del activador transcripcional *areA*. En ausencia de fuente de nitrógeno y con caseína en el medio, estas proteasas se producen abundantemente en el medio extracelular. Cuando la fuente de nitrógeno es amonio, la expresión de estas proteasas se encuentra reprimida aún en presencia de caseína. Para determinar si la mutante *supAfluH1* sobreproducía alguna protefna de secreción, se decidió probar el sistema de las proteasas extracelulares (Cohen, 1977). Se creció a la cepa FGSC26, CIA16 (*fluH1*), CRT9 (*fluH1;supAfluH1*) y CRT14 (*supAfluH1*) en MM con nitrato, sin nitrato o con amonio en presencia de leche descremada al 1.0 % como fuente de caseína. Los resultados de la Figura 22 muestran que en las condiciones en las que el crecimiento se efectuó en medio sin fuente de nitrógeno (sin nitrato) se detectó que la mutante compacta CRT14 y la doble mutante CRT9 producían un halo de degradación de caseína de mayor tamaño, comparado con las otras cepas analizadas.

Cuando el crecimiento se efectuó en un medio con amonio, los halos de degradación de la caseína no se observaron en ninguna de las cepas, lo cual indica que la producción de proteasas esta regulada por la fuente de nitrógeno, como se ha reportado con anterioridad. Este resultado sugiere que la sobreproducción de proteasa extracelular observada en cepas con la mutación *suAfluH1*, proviene de un incremento en la secreción y no de la desregulación de los genes correspondientes. En el caso del crecimiento en nitrato como fuente de nitrógeno, se observaron halos pequeños alrededor de todas las cepas. El nitrato mismo no constituye una fuente represora de las proteasas, pero al ser reducido a amonio, éste produce ciertos niveles de represión.

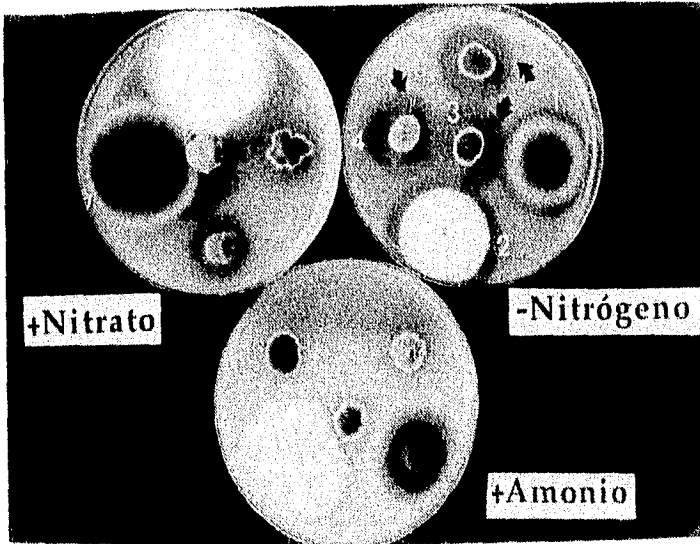


Figura 22. Sobreproducción de proteasas extracelulares de la mutante *suAfluH1*.

Se inoculó por picadura a las cepas 1) FGSC26, 2) CJA16, 3) CRT9 y 4) CRT14 en MM con leche descremada al 1.0 %, con nitrato, con amonio o sin nitrógeno según fuera el caso. A las 72 h se observaron halos de degradación de la caseína, estos halos no se observaron al crecer en amonio, fuente repressora de estas proteasas.

Para investigar si el fenotipo causado por la mutación *suAfluH1* correspondía a una secreción generalizada de proteínas extracelulares, se procedió a llevar a cabo un ensayo en placa para detectar la producción de amilasas. Se ha reportado que el gen de la glucoamilasa es un gen reprimido por glucosa e inducido en presencia de almidón en *A. terreus*, condiciones en las cuales la glucoamilasa es secretada al medio (Ghosh, *et al.*, 1990). Se crecieron a las cepas CJA16, FGSC26, CRT9 y CRT14 en MM sin glucosa más almidón al 0.5 % como fuente de carbono, se incubaron a 37°C. Después de 72 h el medio fue teñido con Lugol, el cual tinte amiloplectina. Las cajas de medio con almidón al ser tratadas con lugol se tiñen de un color morado oscuro, alrededor de las cepas que presentan actividad de amilasa se observan halos transparentes, debido a la degradación del almidón. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23. En el medio que contenía almidón como fuente de carbono la mayor degradación del almidón la realizaron las cepas CRT9 y CRT14, por lo tanto existe una sobreproducción de amilasa por estas dos cepas, comparadas con la cepa silvestre y la mutante *fluH1*, en las cuales apenas si se

distinguen halos de degradación. Para comprobar que la amilasa se estuviera regulando normalmente, se crecieron a las cepas FGSC26, CJA16, CRT9 y CRT14 en MM + glucosa y se incubaron por 72 h. La caja fué teñida también con lugol y los resultados son mostrados en la Figura 23. En este ensayo, se observó que para la cepa silvestre y la mutante *fluH1* no hubo presencia de amilasa, mientras que en el caso de las cepas CRT9 y CRT14 se observó un halo de producción de esta proteína. Este resultado nos indicó que la mutación *suAfluH1* confiere una desrepresión para la producción de amilasa, aún en presencia de glucosa.

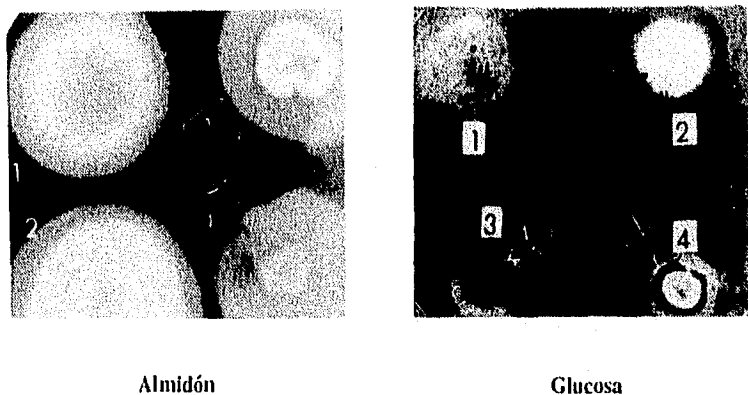


Figura 23. Sobreproducción de amilasas extracelulares y desrepresión de éstas en la mutante *suAfluH1*.

En este caso se inocularon en MM + glucosa 1.0 % y MM sin glucosa con almidón 0.5 % a las cepas 1) FGSC2, 2) CJA16, 3) CRT9 y 4) CRT14. Se crecieron por 72 h y posteriormente se tiñeron por 5 minutos con lugol (Yodo 0.33 %, Yoduro de potasio 0.66 %). Los halos transparentes alrededor de las colonias marcados por las flechas muestran la actividad de amilasa.

Con estos dos ensayos parece ser evidente que uno de los efectos de la mutante *suAfluH1* es una mayor secreción de algunas proteínas. En el caso de las proteasas se observó que la sobreproducción que estaba regulada por la fuente de nitrógeno tal como sucede con la cepa silvestre. En el caso de la amilasa además de ser sobresecretada, se encontró una

desregulación por glucosa. La mutación *suAfluHI* parece presentar defectos en la represión metabólica por carbono.

### Caracterización Genética de la mutante *suAfluHI*.

En vista de que los análisis genéticos de la mutación *supAfluHI* nos habían permitido establecer algunas características de este gen, se decidió localizar esta mutación en algunos de los ocho cromosomas de *A. nidulans*. Para este fin se formaron diploides de la cepa CRT14 (*suAfluHI, argB*) con una cepa maestra (con un marcador en cada uno de los cromosomas; cepa FGSC-A374). Una vez obtenidos los diploides y probado la estabilidad de éstos, se haploidizaron usando p-fluorofenilalanina, la cual promueve la pérdida de cromosomas completos al azar, prácticamente sin recombinación mitótica. Se obtuvieron sectores con fenotipos diferentes, en cuanto a morfología y color. Cada uno de estos diferentes sectores corresponden a diferentes eventos de haploidización. Se seleccionaron diferentes sectores y con estos se elaboraron cajas maestras en MM con todos los requerimientos ya sin la droga. Se obtuvieron en total 58 haploides de los cuales únicamente se obtuvieron 3 haploides de morfología compacta. Sin embargo, con el análisis de estos tres y los haploides de fenotipo silvestre fué posible asignar la mutación *suAfluHI* al cromosoma VII. En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de los haploides. La manera en como se realiza este análisis fué la siguiente:

Si se obtienen colonias compactas (*suAfluHI*) y portan cualquier otro de los marcadores genéticos de la cepa maestra, automáticamente se excluye la posibilidad de que la mutación supresora se encuentre en el cromosoma del marcador. Por ejemplo, si después de la haploidización se recuperan haploides compactos con esporas de color amarillo ( $\gamma A2'$ ), se descarta la posibilidad de que *suAfluHI* se encuentre en el cromosoma I. En este caso la única manera de que se manifieste el color amarillo es que el diploide haya perdido el cromosoma I proveniente de la cepa CRT15 (*suAfluHI*) y conserve el correspondiente a la cepa maestra, la manifestación de colonia compacta en el mismo haploide prueba formalmente que la mutación *suAfluHI* no está en el cromosoma I. La conclusión de que la mutación *suAfluHI* se encontraba asociada al cromosoma VII se basó en que no pudieron encontrarse haploides compactos que requirieran nicotínica, pero si se encontraron colonias silvestres *nic.* Para localizar más finamente dentro de este

cromosoma a la mutación *suAfluIII*, posteriormente se pueden realizar cruza con cepas que tengan múltiples marcadores únicamente en el cromosoma VII.

Cromosoma	Marcador fenotípico	No. de segregantes haploides	
		-	+
I	yA <sup>+</sup>	0	42
	yA <sup>-</sup>	3	13
II	Acr <sup>+</sup>	1	26
	Acr <sup>-</sup>	2	29
III	SB3 <sup>+</sup>	0	11
	SB3 <sup>-</sup>	3	44
IV	Pyro <sup>+</sup>	2	33
	Pyro <sup>-</sup>	1	22
V	Pale <sup>+</sup>	1	24
	Pale <sup>-</sup>	2	31
VI	Lac <sup>+</sup>	2	35
	Lac <sup>-</sup>	1	20
VII	Nic <sup>+</sup>	3	14
	Nic <sup>-</sup>	0	41
VIII	Ribo <sup>+</sup>	0	14
	Ribo <sup>-</sup>	3	41

Tabla 10. Asignación de la mutación *suAfluIII* al Cromosoma VII.

La cepa CRT15 (*suAfluIII*) se utilizó para formar diploides heterocigotos con la cepa FGSC-A-374 (cepa maestra que porta marcadores de cada uno de los cromosomas de *A. nidulans*), los cuales después fueron haploidizados con p-F-fenilalanina. El número total de haploides obtenidos fué de 58. El primer fenotipo enlistado para cada cromosoma (-) corresponde a las cepas supresoras. El segundo fenotipo (+) representa a las cepas silvestres. La manera de interpretar estos resultados es buscar alguna posible relación entre la segregación de la mutación *suAfluIII* y cada uno de los marcadores de la cepa maestra. Si uno de los haploides porta el marcador de la cepa maestra y al mismo tiempo presenta el fenotipo compacto, quiere decir que esta mutación no se encuentra en el cromosoma marcado de la cepa maestra.

### El gen *suAfluH1* es indispensable para esporular por privación de carbono.

Dado que *fluH* se requiere para esporular por privación de nitrógeno y que *suAfluH1* suprime parte del fenotipo de la mutante *fluH1*, decidimos analizar si la mutación *suAfluH1* tenía algún efecto en la esporulación inducida por limitación de nutrientes. Se realizaron cultivos sumergidos en los que se creció a la cepa CRT15 por 18 h en medio mínimo más requerimientos con glucosa al 1.0 %. Posteriormente el micelio se lavó y transfirió a medio sin glucosa y se tomaron muestras a diferentes tiempos para medir la actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

A partir de la observación al microscopio de las muestras obtenidas se detectó que al limitar de carbono no había esporulación en la mutante *suAfluH1*. Es decir, que en este caso ocurre un fenómeno exactamente contrario al presentado por la mutante *fluH1*. Para determinar si el defecto observado era debido a que *brlA* no se estuviera expresando, se midió la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en las muestras procesadas de la cepa CRT14. En la figura 24 se representan la inducción de *brlA* en la mutante *suAfluH1*, así como también los resultados obtenidos anteriormente al medir la actividad de la fusión *brlA/lacZ*, para las cepas TJA22 y CRT8 crecidas en estas mismas condiciones. La inducción de *brlA* en la mutante *suAfluH1* se encuentra totalmente retrasada ya que esta comienza a darse hasta aproximadamente 18 h después de la transferencia y los niveles alcanzados no superan las 65 U de actividad de  $\beta$ -galactosidasa. La expresión de *brlA* en esta cepa fue aún mucho menor que la registrada para la mutante *fluH1*. Por lo tanto, la incapacidad de esporular de la mutante *suAfluH1* al eliminar la fuente de carbono fue debida a la baja inducción de *brlA*. Con este resultado se demuestra que el gen *suAfluH1* es indispensable para esporular en condiciones de privación de glucosa y nuevamente pone de manifiesto la relación entre la morfología vegetativa, esporulación y metabolismo del carbono.

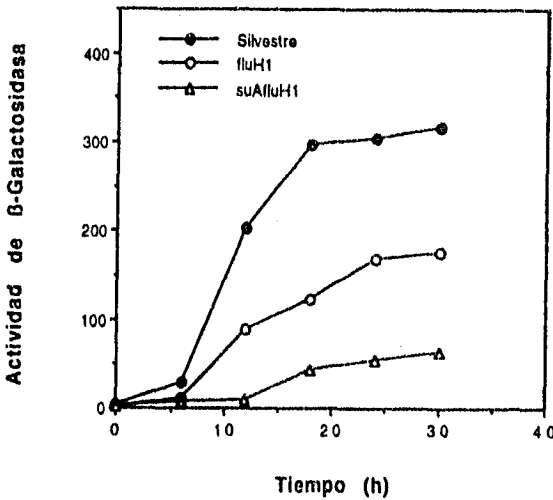


Figura 24. La mutante *suAfluH1* presenta bajos niveles de inducción de *brlA* en condiciones de privación de glucosa.

Se inoculó a la cepa CRT14 en MM + glucosa 1.0 % y se creció por 18 h, tiempo al que se lavó y transfirió a MM sin glucosa. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se procesaron para determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. En esta gráfica se representaron también a los datos obtenidos para las cepas TJA22 y CRT8 (ver figura 12).

Dado el resultado anterior, se decidió probar los efectos de la limitación de nitrógeno tanto en la mutante CRT14 (*suAfluH1*) como en la doble mutante CRT9 (*fluH1*, *suAfluH1*). Para este experimento se crecieron las dos cepas por 18 h en medio mínimo con glucosa y nitrato de sodio. Pasado este tiempo el micelio se lavó y transfirió a medios sin glucosa, sin nitrato o sin glucosa y nitrato y se incubaron por 24 h. En este caso, únicamente se realizaron observaciones al microscopio para verificar las diferentes morfologías y si existía esporulación. Los resultados son presentados en la figura 24. La cepa CRT14 al crecer sin glucosa no esporuló, las hifas eran muy gruesas y la morfología anormal. Cuando se eliminó el nitrógeno, esta cepa presentó una esporulación muy abundante y las esporas se produjeron a partir de conidióforos complejos. Se observó



también que en el medio había gran cantidad de partículas de origen citoplásmico probablemente y además, las hifas estaban muy vacuolizadas. Este resultado indica que en condiciones de privación de nitrógeno ocurrió una inducción de *brlA*, suficiente para la formación de una gran cantidad de conidióforos complejos. Al limitar tanto de glucosa como de nitrógeno, la mutante *suAfluH1* no esporuló y en este caso las hifas presentaban grandes vacuolas opacas. Aunque en estas condiciones también exista la limitación de nitrógeno, el efecto por la limitación de glucosa fue el dominante.

Cuando a la cepa CRT9 (*fluH1/suAfluH1*) se le privo de glucosa presentó una esporulación más o menos abundante, las hifas eran gruesas. Las esporas se produjeron a partir de conidióforos reducidos. Cuando se eliminó el nitrógeno del medio no se detectó esporulación, las hifas estaban algo más delgadas que en la condición anterior y con gran cantidad de pequeñas vacuolas muy brillantes. Cuando se limitó de glucosa y nitrógeno se detectó esporulación escasa a partir de conidióforos reducidos. Las hifas no se observaron tan engrosadas. En este caso los efectos observados son semejantes a los presentados por la mutante *fluH1*. Es decir, que la doble mutante se asemeja a la mutante sencilla *fluH1* en cuanto a sus respuestas a la privación de nutrientes.

En conjunto, estos resultados demuestran que posiblemente existen interacciones complejas entre los genes *fluH* y *suAfluH1*, las cuales se manifiestan por la expresión parcial de los efectos de una mutación sobre la otra:

- a) Se ha demostrado que *suAfluH1* se requiere para esporular cuando existe una privación de glucosa. Sin embargo, una doble mutante *suAfluH1/fluH1* recupera la capacidad para esporular en ausencia de glucosa, en este caso la mutación *fluH* se comporta como dominante.
- b) Hemos determinado también que el gen *fluH* es necesario para inducir la esporulación en ausencia de nitrógeno, mientras que una doble mutante *fluH1-suAfluH1* recupera esta capacidad bajo esas mismas condiciones.

Además de esta expresión diferencial de *brlA* y la consiguiente esporulación observada con la limitación nutricional, la morfología de las hifas de las mutantes *fluH1*, *suAfluH1* y *fluH1-suAfluH1*, también sugieren posibles relaciones entre estos dos genes.

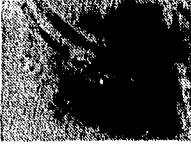
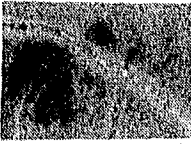







Cepas	-C h	-N h	-N 24h
CRT9 ( <i>fluHI-suAfluHI</i> )			
CRT14 ( <i>suAfluHI</i> )			
TJA22 (silvestre)			

Figura 24. Interacciones entre los genes *fluHI* y *suAfluHI* durante la privación de nutrientes.

Se crecieron a las cepas CRT9 (*fluHI-suAfluHI*) y CRT14 (*suAfluHI*) en MM + glucosa 1.0 % por 18 h, posteriormente el micelio se lavó y transfirió a MM sin glucosa, sin nitrato o sin glucosa y sin nitrato. El cultivo se continuo por 24 h después de la transferencia a los diferentes medios. Se incluyen los resultados obtenidos para la cepa silvestre en estas mismas condiciones (ver figura 15). Las microfotografías fueron tomadas en un microscopio Leica y la amplificación fué de 400 veces.

## DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo reportamos el aislamiento y caracterización de una mutante con defectos en la esporulación asexual y el crecimiento. Estos defectos que resultan en una morfología "algodonosa", la cual se debe principalmente a cambios en el hábito de crecimiento dados por una disminución en la tasa de ramificación de las hifas. La mutante aislada define al gen *fluH*, el cual asignamos al cromosoma IV.

Se determinó que el retraso en la esporulación se debe a un retraso en la inducción del gen *brlA* y que este retraso puede ser parcialmente remediado por limitación nutricional; al crecer a la mutante *fluH1* en bajas concentraciones de glucosa se obtiene una activación más temprana de *brlA*. Al privar totalmente de glucosa, la inducción de *brlA* se inicia al mismo tiempo que una cepa silvestre, aunque no alcanza los niveles silvestres de inducción. Uno de los resultados más interesantes de este trabajo, fué el encontrar una respuesta diferencial a la privación de nutrientes que conduce a la esporulación; *fluH* es indispensable para esporular por privación de nitrógeno, pero no por privación de glucosa. Determinamos que mutantes en los genes *fluF*, *fluG* y *flbD* se comportan de igual manera en esta respuesta, lo cual sugiere que dichos genes se encuentren en una misma vía de activación de *brlA*.

En una segunda parte de este trabajo, se obtuvieron cuatro mutantes con supresores extragénicos. Las cuatro mutaciones fueron recesivas, monogénicas y al parecer distintas entre sí. De estas, tres restablecieron parcialmente la morfología silvestre. Una cuarta mutante que presentó un fenotipo compacto en un contexto silvestre, definió al gen *suAfluH1*. La morfología de la mutante *suAfluH1* se debe a una mayor tasa de ramificación y menor elongación de las hifas, caso exactamente contrario a la mutante *fluH1*. En la mutante *suAfluH1*, la esporulación inducida por privación de nutrientes, tuvo efectos contrarios a los observados en la mutante *fluH1*; la esporulación es dependiente del gen *suAfluH1* cuando se priva de glucosa, e independiente cuando se priva de nitrógeno.

Hasta la fecha se han aislado y caracterizado parcialmente 9 genes requeridos individualmente para la conidación normal de *A. nidulans* y cuya mutación produce fenotipos fluffy; *fluF*, *fluG*, *flbA*, *fluH* (*flbB* alelo de *fluH1*), *flbC*, *flbD*, *flbE*, *fada* y *suAfluH1* (Tamame et al., 1983; Tapia-López y Aguirre, este trabajo; Adams, et al., 1992; Wieser, et al., 1994; Yu, Weiser y Adams, en prensa; tabla 11). El retraso en la esporulación en estas mutantes es debido a una expresión tardía del gen *brlA*, por lo que al parecer éstos

genes actúan de manera positiva durante el desarrollo. En condiciones de baja glucosa, el fenotipo fluffy puede ser parcialmente suprimido, indicando que bajo ciertas circunstancias, algunos de estos genes son dispensables para la esporulación.

En las figuras 25 y 26 se propone un modelo para tratar de conjuntar las diferentes señales ambientales y genéticas que están involucradas en la diferenciación celular de *A. nidulans*, así como las posibles interacciones entre los genes implicados. Este modelo está basado principalmente en los fenotipos de las mutantes afectadas en los distintos genes, en relaciones epistáticas, en análisis de sobreexpresión de algunos de los genes que han sido clonados, en la similitud de la secuencia de estos genes con funciones conocidas y en la respuesta de las mutantes a la privación de nutrientes (Tamame et al., 1983; Tapia-López y Aguirre, este trabajo; Adams, et al., 1992; Wieser, et al., 1994; Yu, Weiser y Adams, en prensa).

Gen	Cromosoma	Similitud (Posible función)	Referencia
<i>fluF</i>	VIII	Desconocida	Tamame et al., 1983
<i>fluH=flbB</i>	IV	Desconocida	Tapia-López y Aguirre, 1993
<i>fluG</i>	III	Glutamina simetasa procarionótica	Lee y Adams, 1994
<i>flbA</i>	I	SST2 (Adaptación a la respuesta de feromonas) <i>S. cerevisiae</i> . GAIP (G alpha interacting protein) Humano EGL-10 (ovoposición) <i>C.elegans</i> .	Lee y Adams, 1994 De Vries et al., 1995 Chang y Otte, 1992. Kurjan, 1993
<i>flbC</i>		Proteína de unión al DNA tipo "dedo de Zn"	Lee, et al., 1995
<i>flbD</i>	VIII	Proteína de unión al DNA semejante a c-myb	Weisser J. y Adams T., 1995
<i>flbE</i>	I	Desconocida	Weisser et al., 1995
<i>fadA</i>		Subunidad $\alpha$ de proteína G heterotrimérica	Yu, Weiser y Adams, en prensa

Tabla 11. Genes aislados y parcialmente caracterizados, cuya mutación produce colonias algodonosas y retraso en la conidiación.

En el modelo propuesto en la figura 25, la esporulación y el crecimiento de *A. nidulans* estarían regulados por un sistema de transducción de señales mediado por una proteína G heterotrimérica acoplada a receptores hipotéticos, capaces de captar señales extracelulares, tales como la presencia de nutrientes, O<sub>2</sub>, etc. La evidencia de la existencia de tal proteína heterotrimérica proviene de la caracterización del gen *fadA*, el cual fué identificado como una mutación dominante capaz de producir colonias con un fenotipo "algodonoso", deficientes en la conidiación y que sufren autolisis al cabo de un tiempo. El producto de *fadA* presenta una fuerte homología con subunidades  $\alpha$  de proteínas G trimericas y la mutación que confiere el fenotipo autolítico dominante es consistente con una pérdida de actividad de GTPasa, lo cual resultaría en un estado permanentemente activo (Yu; Weiser y Adams, en prensa). Por otra parte, mutaciones en el gen *flbA* producen un fenotipo muy parecido al de la mutación *fadA* dominante, mientras que la sobreexpresión de *flbA* induce la esporulación en condiciones donde esta no ocurre normalmente. La secuencia de nucleótidos de *flbA* definió por primera vez un dominio altamente conservado, denominado RGS (Regulator of G Protein Signaling), el cual esta presente en el gen *sst2* de *Saccharomyces cerevisiae* (Chang y Otte, 1992 a y b; Kurjan, 1993), en el gen *egl-10* de *Caenorhabditis elegans* (Koelle y Horvitz, 1996) y en el gen *gaip* (G alpha interacting protein) de humano (De Vries, et al., 1995). Estos tienen funciones relacionadas con la transducción de señales en estos organismos. La proteína Sst2p esta involucrada en la vía de transducción de señales para la desensibilización a feromonas de apareamiento en levaduras, funcionando probablemente como un regulador negativo de esta vía. La proteína EGL-10 regula la ovoposición periódica de *C. elegans* y la proteína GAIP presenta sitios potenciales de fosforilación. Se ha demostrado que las proteínas Sst2p, GAIP y al parecer EGL-10 además de mostrar similitud en su extremo carboxilo terminal, interactúan con la subunidad alfa de proteínas G heterotriméricas (De Vries, et al., 1995; Dohlman, et al., 1995).

Mutaciones nulas en *fadA*, suprimen el fenotipo mutante *flbA*, lo cual sugiere que la función de *flbA* es la de inhibir la activación de *fadA*. El otro efecto de la mutación de *fadA* es el de reducir el crecimiento, sin afectar la esporulación e inclusive aumentar la esporulación (Yu, Wisser y Adams, en prensa). En base a estos datos, en la figura 25 proponemos que el dímero  $\beta\gamma$  actúa sobre efectores que tienen efectos positivos sobre la esporulación, mientras que la subunidad  $\alpha$  (*fadA*) tiene efectos positivos sobre el crecimiento. El fenotipo crecimiento/falta de esporulación y autolisis que se presenta en mutantes dominantes *fadA* y en mutantes nulas *flbA* es interpretado aquí como el resultado

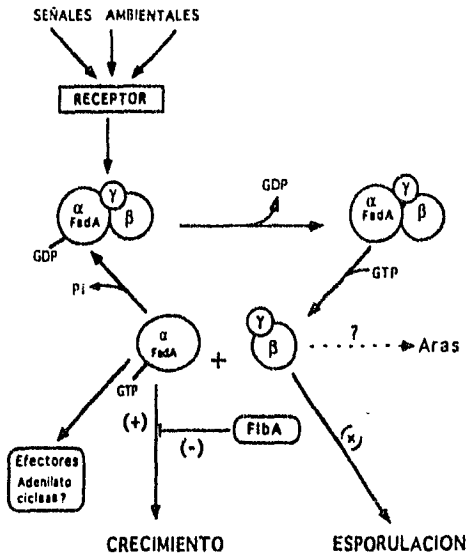


Figura 25. Posible regulación del desarrollo en *Aspergillus nidulans* mediada por proteínas G heterotriméricas (ver texto).

La estimulación de un receptor membranar hipotético por diversas señales ambientales (nutrientes, O<sub>2</sub>), produciría un cambio conformacional, seguido de un intercambio de GDP por GTP en la subunidad α, lo cual conduciría a la disociación de la proteína G asociada. Esta disociación provocaría la activación de esta subunidad. Las interacciones entre las proteínas FdaA y FibA se describen en el texto. La existencia de las subunidades γ, β y α en los diversos sistemas de transducción estudiados hasta la fecha, su papel en la respuesta a feromonas en levaduras y la presencia de la subunidad α en *A. nidulans*, nos lleva a postular la existencia de las subunidades γ y β en este mismo organismo. Una vez disociada la proteína heterotrimérica, tanto la subunidad α como el dímero βγ tendrían la capacidad de activar a otras proteínas posiblemente a través de cascadas de fosforilación (Herskowitz, 1995). La proteína Aras se incluyó debido a que la forma activa (GTP unido) de esta proteína G monomérica, afecta el crecimiento y la diferenciación celular en *Aspergillus nidulans* (Son y Kolaparthi, 1994) y existen reportes en otros sistemas, de que la interacción del dímero βγ con la proteína Ras puede activar la vía de cinasas MAP, afectando la diferenciación celular (Neer, 1995).

de dos señales antagónicas sostenidas (crecimiento vs esporulación). Esto implica que el crecimiento y la esporulación que se observan cuando *A. nidulans* crece en medio sólido en una interfase aérea, provendría de ciclos alternados de señalamiento, mientras que la vía de esporulación debe estar reprimida continuamente en medio líquido con nutrientes. No sabemos cual pueda ser el papel de Ras en este proceso, pero se ha encontrado que la sobreexpresión de la proteína Ras en un estado activo tiene efectos nocivos sobre el crecimiento polarizado y se ha propuesto que para que la esporulación ocurra, es necesario un descenso paulatino en la concentración de ras activa (Som. y Kolaparthi, 1994)

Habiendo propuesto a los genes *fadA* y *fibA* como moduladores del crecimiento, en la figura 26 se proponen las posibles interacciones entre otros genes implicados en la activación del gen *brlA*. En esta figura, se presenta un modelo basado en resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto a la respuesta a la privación nutricional por parte de diferentes mutantes con morfologías algodonosas, así como en análisis de sobreexpresión de algunos de estos genes (Wieser, et al., 1994; Lee y Adams, 1995; Weiser y Adams, 1995). Se propone que el dímero  $\beta\gamma$  funcione como estimulador de la esporulación, basado en que la respuesta a las feromonas de apareamiento en levaduras esta mediada por el dímero  $\beta\gamma$  y la activación de una serie de proteínas cinasas MAPK's (Roberts y Fink, 1994). En esta vía de regulación los genes *fluG*, *fluH*, *flbC*, *flbD* y *flbE*, son requeridos para la esporulación dependiente de la privación de nitrógeno.

El gen *fluG* se postula como uno de los activadores tempranos de la esporulación debido a que mutantes en este gen resultan en colonias algodonosas, pero que pueden recuperar su capacidad para esporular si se crecen junto a una cepa silvestre. Esta capacidad de complementación extracelular también se observa al crecer a una mutante *fluG* cerca de cualquier otra mutante algodonosa. La sobreexpresión de *fluG*, induce la esporulación de manera dependiente de los genes *fluH*, *flbC*, *flbD* y *flbE*, por lo que se le ubica inmediatamente después del dímero  $\beta\gamma$ . La posición del gen *flbC* se basa en que la sobreexpresión del gen *fluG* en una mutante *flbC* no conduce a esporulación, lo cual indica que *flbC* es necesario para transmitir la señal de activación de *fluG* (Wieser, et al., 1994; Lee y Adams, 1995). La posición del gen *flbE* con respecto a *fluG* y *flbD*, se basa en que este

gen es requerido para la esporulación dependiente de la sobreexpresión de *fluG*, pero no para la dependiente de *flbD* (Lee y Adams, 1995; Weiser y Adams, 1995).

La posición del gen *fluF* es totalmente arbitraria, ya que existen muy pocos reportes sobre este gen. Lo que sí es cierto, es que este gen es requerido para la esporulación dependiente de la privación de nitrógeno (este trabajo).

Como se mencionó anteriormente, el gen *flbD* también se requiere para la esporulación por sobreexpresión de *fluG*, y su posición después de *flbE*, se propone por el hecho de que *flbE* no es requerido para la esporulación por la sobreexpresión de *flbD* (Weiser y Adams, 1995).

Se propone al gen *fluH* como uno de los activadores últimos de esta vía, debido a que este gen es requerido para la esporulación dependiente de la sobreexpresión de *fluG* y *flbD* (Weiser y Adams, 1995; Lee y Adams, 1995).

Dentro de este esquema en que hemos demostrado la existencia de conexiones entre el metabolismo del nitrógeno y la esporulación, el gen *areA*, el regulador de la represión catabólica nitrogenada, debe jugar un papel importante, ya que mutantes nulas *areA* son incapaces de esporular en condiciones de privación de nitrógeno (Sánchez y Aguirre, datos no publicados). Sin embargo, la mutación *areA* no confiere un fenotipo algodonoso.

Una aportación del presente trabajo, es que se demostró que la esporulación inducida por privación de nutrientes procede a través de vías genéticas distintas; los genes *fluH*, *flbC*, *flbD*, *flbE* y *fluF* se requieren para esporular por privación de nitrógeno, pero no por carbono. En contraste, el gen *suAfluH1*, el cual aunque no pertenece al grupo de las mutantes tipo fluffy, es necesario para la esporulación dependiente de la privación de glucosa (este trabajo). En este trabajo también se presenta evidencia genética que existe una interacción entre *fluH* y *suAfluH1*, posiblemente en puntos de contacto cruciales entre el metabolismo primario y el desarrollo.

En este modelo se proponen además que los genes *fluG*, *fluH*, *fluF* y *flbE* pudieran ser parte de módulos MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). En este caso la activación del gen *braA*, sería dependiente de una serie de cinasas que para su activación requieren a su vez de ser fosforiladas. Esta propuesta se basa en el hecho de que la transición del crecimiento colonial a un crecimiento pseudofilamentoso en levaduras, es dependiente de la



privación de nitrógeno y de varias MAPK's (Roberts y Fink, 1994; Herskowitz, 1995). En esta respuesta a privación por nitrógeno, en la que el gen *areA* es también indispensable para la activación de *blrA*, *areA* o un gen homólogo a NMR (Marzluf, 1993), tendrían que ser regulados por fosforilación para activar a *blrA*.

También es posible que los genes *fluG*, *fluH*, *fluF* y *flbE* codificaran para fosfatasa, proteínas importantes en las vías de transducción de señales, implicadas en procesos de diferenciación celular (Cid, et al., 1995). En *A. nidulans* se ha reportado que la privación nutricional, en la que se incluye la privación por nitrógeno y por carbono provocan una inducción en los niveles de diversas fosfatasa (Caddick, et al., 1986).

La esporulación en *A. nidulans* muestra una complejidad de interacciones genéticas cada vez mayor, las cuales difícilmente pueden ser planteadas en términos de interacciones lineales jerárquicas, en las que una activación transcripcional fuese seguida de la otra. La fosfotransferencia parece ser uno de los mecanismos importantes en la transmisión de señales que conducen a la diferenciación celular en *A. nidulans*.

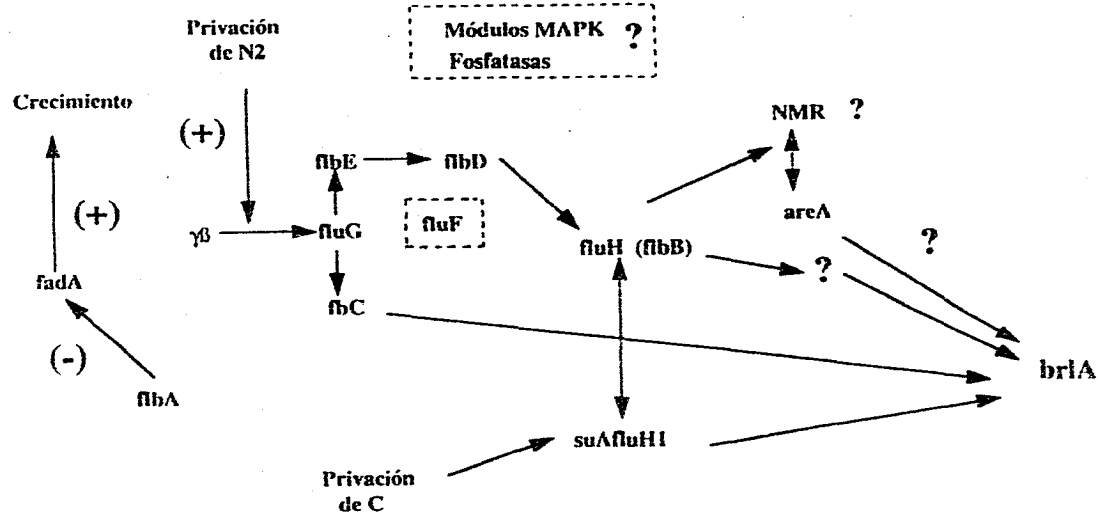


Figura 26. Modelo genético de las interacciones entre los distintos genes que afectan la esporulación en *Aspergillus nidulans*. Las evidencias para proponer las interacciones entre los distintos genes se describen en el texto. La posición del gen *areA*, esta basada en su requerimiento para esporular por privación de nutrientes (Sánchez y Aguirre, datos no publicados), su interacción con un gen homólogo a *NMR* es hipotética.

**Literatura citada.**

Adams, T.H.; Boylan, M.T. y Timberlake, W.E. (1988). *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell*. 54: 353-362.

Adams, T.H.; Deising, H. y Timberlake, W.E. (1990a). *brlA* requires both zinc fingers to induce development. *Mol. Cell. Biol.* 10: 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.* 12: 3827-3833.

Aguirre, J.; Adams, T.H. y Timberlake, W.E. (1990). Spatial control of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. *Exp. Mycol.* 14: 290-293.

Aguirre, J. (1992). *Aspergillus nidulans* como sistema experimental, y la esporulación como modelo de diferenciación celular y regulación genética. *Ciencia*. 43: 445-450.

Aguirre, J. (1993). Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol. Microbiol.* 8: 211-218.

Ammerer G. (1994). Sex, stress and integrity: the importance of MAP kinases in yeast. *Curr. Biol.* 4: 90-95.

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.* 14: 2503-2515.

Aramayo, R. y Timberlake, W.E. (1993). The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. gene. *EMBO J.* 12: 2039-2048.

Arst, H.N. y Baley, 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.

ESTA TESIS NO DEBE  
QUEDAR EN LA BIBLIOTECA

- Axelrod, D.E.; Gealt, M. y Pastushok, M. (1973). Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Devel. Biol.* **34**: 9-15.
- 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. Cell. Biol.* **7**: 3113-3118.
- Brody, H., Griffith, J., Cuticchia, A.J., Arnold, J., y Timberlake, W.E. (1991). Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3105-3109.
- Brown, J.L., North, S., y Bussey, H. (1993). SNL7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall  $\beta$ -glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-components regulators and to heat shock transcription factors. *J. Bact.* **175**: 6908-6915.
- 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.* **160**: 541-545.
- Caddick, M.X., Brownlee, A.G. y Arst, H.N. (1986). Phosphatase regulation in *Aspergillus nidulans*: responses to nutritional starvation. *Genet. Res. Camb.* **47**: 93-102.
- Caddick, M.X., Peters, D. y Platt, A. (1994). Nitrogen regulation in fungi. *Antonie van Leeuwenhoek.* **65**: 169-177.
- 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. y El-Zayat, A.E (1989). Isolation of sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bact.* **171**: 3982-3988.

- Champe, S.P. y Simon, L.D. (1992). Cellular differentiation and tissue formation in the fungus *Aspergillus nidulans*, en *Morphogenesis: An analysis of development of biological form*. Ed. Rossumondo, E. y Alexander, S. MarcelDekker Inc. Nueva York, E.U. p: 63-91.
- Chang, C., Krook, S.F., Bleecker, A.B., y Meyerowitz, E.M. (1993). Arabidopsis ethylene response gene ETR1: Similarity of product to two-components regulators. *Science* **262**: 539-544.
- Chang, C. (1996). The ethylene signal transduction pathway in Arabidopsis: an emerging paradigm ?. *TIBS*. **21**: 129-133.
- Chang, Y.C. y Timberlake, W.E. (1993). Identification of *Aspergillus brIA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics*. **133**: 29-38.
- Cid, V.J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela C. y Sanchez, M. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**: 345-386.
- Claphman, D.E. y Neer E.J. (1993). New roles for G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**: 403-406.
- Clutterbuck, A.J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. **63**: 317-327.
- 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.
- Clutterbuk, A.J. (1990). The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus*

*nidulans*. J. Gen. Microbiol. 136: 1731-1738.

Clutebuck, 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.

Coen, E., y Meyerowitz, E.M. (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature. 353: 31-37.

Cohen, B.L. (1973). The neutral and alkaline proteases of *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. 77: 521-528.

Cole, G.T. (1986). Models of cell differentiation in conidial fungi. Microbiol. Rev. 50: 95-132.

Cove, D.J. (1979) Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. Biol. Rev. 54: 291-327.

Cove, D.J.; Brody, S.; Ottolenghi, S. y Russo, V.E.A. (1992). Induction 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.

De Vries, I., Mousli, M., Wurmser, A. y farquahar, M.G. (1995). GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein Gai3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. Proc. Natl.Acad.Sci. USA 92: 11916-11920.

Dietzel, C y Kurjan, J. (1987). Pheromonal regulation and sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* SST2 gene: a model for desensitization to pheromone. Mol. Cell. Biol. 7: 4169-77.

Dohlman, H. G., Apaniesk, D., Chen, Y., Song, J. y Nusskern, D. Inhibition of G-protein signaling by dominant gain-of-function mutations in Ss2p, a pheromone desensitization factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. and Cell. Biol. 15: 3635-3643.

- Dom, G.L. (1970). Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. **66**: 267-279.
- 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.* **11**: 5701-5709.
- Drysdale, M.R.; Kolze, S.E. y Kelly, J. M. (1993). The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. *Gene*. **130**: 241-245.
- Errington, J. (1992). "Bacillus subtilis sporulation: a Paradigm for the spatial and temporal control of gene expression. En: Development, The molecular genetic approach. Ed. Russo, V.E.A.; Brody, S.; Cove, D.J. y Ottolenghi, S. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- 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.* **6**: 1457-1465.
- Espeso, E.A.; Tilburn, J.; Arst, H.N. y Peñalva, M.A. (1993). pH regulation is a mayor determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**: 3947-3956.
- Femell, 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.
- Galbraith, J.C. y Smith, J.E. (1969). Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture. *J. Gen. Microbiol.* **59**: 31-45.
- Gems, D.H.; Johnstone, I. y Clutterbuck, A.J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene*. **98**: 61-67.
- Gerish, G. (1987). Cyclic AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dicryostelium*. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 853-879.
- Ghosh, A., Banhiskha, C. y Das, A. (1990). Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1307-1311.

- Grossman, A.D., y Losick, R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4369-4373.
- Hall, A. (1994). A biochemical function for Ras- at least. Science 264: 1413-1414.
- Hall, N.E.L. y Axelrod, D.E. (1978) Sporulation competence in *Aspergillus nidulans*: A role for iron in development. Cell Different. 2: 73-82.
- Han, S.; Navarro, J.; Greve, R.A. y Adams, T.H. (1993). Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. EMBO J. 12: 2449-2457.
- Hansberg, W. y Aguirre, J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. J. Theor. Biol. 142: 201-221.
- Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. Cell. 80: 187-197.
- Hoch, J. A. (1995). Control of cellular development in sporulating bacterial by the phosphorelay two-component signal transduction system. En: Two component signal transduction. Ed. Hoch, J. A. y Silhavy, T. J. ASM Press, Washington, D.C.
- Hynes, M.J. y Kelly, J.M. (1977). Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* affected in carbon metabolism. Mol. Gen. Genet. 150: 193-204.
- Johnstone, I.I.J.; Hughes, S.G. y Clutterbuck, A.J. (1985). Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene transformation. EMBO J. 4: 1307-1311.
- Käfer, E. (1965). The origin of translocations in *Aspergillus nidulans*. Genetics. 52: 217-232.
- Käfer, E. (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. Adv. Genet. 19: 33-131.



- Keston, A.S. (1956). Specific colorimetric enzymatic analytical reagents for glucose. Abstract of papers, 129th Meeting ACS, Dallas, E.U. p: 31C.
- Klumburg, P.; Sequeval, D.; Lenouvel, F.; Mathieu, M. y Felebok, B. (1992). Identification of the promoter region involved in the autoregulation of the transcription activator AlcR in *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell. Biol. 12: 1932-1939.
- Koelle M.R. y Horvitz, R. (1996). EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. Cell 84: 115-125.
- Kurjan, J. (1992). Pheromone response in yeast. Annu. Rev. Bioch. 61: 1097-1129.
- Law D. J., y Timberlake W. E. (1980). Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. J. Bact. 144: 509-517.
- Lee, B. N. y Adams, T.H. (1994a). 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. 6: 401-410.
- Lee, B. N. y Adams T., (1994b). Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus nidulans* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. Mol. Microbiol. 14: 323-334.
- Lee, B. N., y Adams, T. (1995). *fluG* and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* activation. EMBO J. 15: 299-309.
- Lhoan, P. (1961). Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluoro-phenilalanine. Nature. 190: 744.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., y Saito, H. (1994). A two component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. Nature. 369: 242-245.

- Marshall, M. A. y Timberlake, W. E. (1991). *Aspergillus nidulans* wetA regulates spore-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 55-62.
- Martinelli, S.D. (1976). Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged culture. *Trans. B. Mycol. Soc.* **67**: 121-128.
- Martinelli, S.D. (1979). Phenotypes of double conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **114**: 277-287.
- Martinelli, S.D. y Clutterbuck, A.J. (1971). A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **69**: 261-268.
- Marzluf, G.A. (1993). Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Annu. rev. Microbiol.* **47**: 31-55.
- Mayorga, M.E. y Timberlake, W.E. (1992). The *Aspergillus nidulans* wA (white conidia) gene encodes a poliketide synthase. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 205-212.
- 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.* **6**: 352-359.
- Miller, B.L. (1993). Brushing up on bristles: complex genes and morphogenesis in molds. *TIG.* **9**: 293-295.
- Mirabito, P. M., Adams, T. H., y Timberlake, W. E. (1989). Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and specificity in *Aspergillus* development. *Cell.* **57**: 859-68.
- Mooney, J.L., y Yager, L.N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus*

*nidulans*. Genes Dev. 4: 1473-1482.

Mooney, J.L., Hassett, D.E., Yager, L.N. (1990). Genetic analysis of suppressors of the *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. Genetics. 126: 869-874.

Neer, E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. Cell 80: 249-257.

Ota, I. M. y Varshavsky, A. (1993). A yeast protein similar to bacterial two components regulators. Science 262: 566-569.;

Parkinson, J.S. (1995). Genetic approach for signaling pathways and proteins. En: Two component signal transduction. Ed. Hoch, J. A. y Silhavy, T. J. ASM Press, Washington, D.C.

Pontecorvo, G. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. 5: 141-238.

Prade, R.A. y Timberlake, W.E. (1993). The *Aspergillus nidulans brlA* regulatory locus encodes two functionally redundant polypeptides that are individually essential for development. EMBO J. 12: 2439-2447.

Punt, P.J., Veldhuisen, G. y van den Hondel, C.A.M.J.J. (1994). Protein targeting and secretion in filamentous fungi. Antonie van Leeuwenhoek. 65: 211-216.

Roberts, R.L., y Fink, G.R. (1994). Elements of a single Map kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. Genes & Dev. 8: 2974-2985.

Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. TIG. 11: 12-17

Ruis, H. y Schüller, C. (1995). Stress signaling in yeast. Bioessays. 17: 959-965.

Sánchez, A.O. y Aguirre, J. (1995). Resultados sin publicar.

- Saxena, R.K., y Shinha, U. (1973). Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged liquid culture. *J. gen. Appl. Microbiol.* **19**: 141-146.
- Skromne, I., Sanchez, O. y Aguirre J. (1995). Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. *Microbiology*, **14**: 21-28.
- Som, T. y Kolaparthi, V.S.R. (1994). Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by ras activity. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5333-5348.
- Tamame, M., Antequera, F. y Santos, E. (1983). High-frequency conversion of a "fluffy" developmental phenotype in *Aspergillus* spp. by 5-azacytidine treatment: Evidence for involvement of a single nuclear gene. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 2287-97
- Tamame, M., Antequera, F. y Santos, E. (1988). Developmental characterization and chromosomal mapping of the 5-azacytidine-sensitive *stuf* locus of *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cell Biology* **8**: 3043-3050.
- Timberlake, W.E. y Marshall, M.A. (1988). Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet.* **4**: 162-169.
- Timberlake, W.E. (1993). Translational triggering and feedback fixation in the control of fungal development. *Plant Cell.* **5**: 1453-1460.
- Timberlake, W.E. y Clutterbuck, A.J. (1994). "Genetic regulation of conidiation". en: *Aspergillus: 50 years on*. Edit. Martinelli, S.D. y Kinghorn, J.R. Holanda.
- Trinci, A.P.J. (1974). A study of the kinetics of hyphal extension and branch incision of fungal mycelia. *Gen. Microbiology* **81**: 225-36.
- van den Hondel, C.A.M.J.J., Punt, P.J. y van Gorcom, R.F.M. (1992). production of extracellular proteins by filamentous fungus *Aspergillus*. *Antonie van Leeuwhoek* **61**: 153-160.
- Ward, M. 1991. *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems. en

Modern Microbial Genetics (Wiley-Liss, Inc): 455-496.

Weiser, J., Lee, B. N., Fondon, J. W., y Adams, T. (1994). Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 27: 62-69.

Weiser, J. y Adams T. (1995). *flbD* encodes a Myb-like protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes and Develop.* 9: 491-502.

Wessels, J.G.H. (1990). Role of cell wall architecture in fungal tip growth generation. Chapter 1 In: *Tip Growth in Plant*.

Wessels, J.G.H. (1990). Fungal growth and development: a Molecular perspective. Chapter 2 En : *Frontiers in Mycology. Honorary and General Lectures from the Fourth International Mycological Congress, Regensburg.*

Yager, L. N., Kurtz, M. B. y Champe, S.P. (1982). Temperature-shift analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Develop. Biol.* 93: 92-103.

Yarden, O., Plamann, M., Ebbole, D. J., y Yanofsky, C. (1992). *cot-1*, a gene required for hyphal elongation in *Neurospora crassa*, encodes a protein kinase. *The EMBO Journal.* 11: 2159-2166.

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

Yu, J., Wieser, J. y Adams, T. (1996). The *Aspergillus* FlbA domain protein antagonizes G-protein signaling to block proliferation and allow development. *En prensa.*

## NOTAS