

4  
20j

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMEDICAS

CARACTERIZACIÓN DE UNA MUTANTE DE *Aspergillus nidulans*  
AFECTADA EN LA PIGMENTACIÓN Y LA ESPORULACIÓN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

DENHI SCHNABEL PERAZA

DIRECTOR DE TESIS

DR. JESUS AGUIRRE LINARES

MEXICO D.F.

1997

TESIS CON  
FALLA LE 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.

**A mis padres**

**gracias a ellos pudo ser posible.**

**A Enrique**

**por todo su cariño**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Jesús Aguirre Linares por permitir mi participación en un proyecto muy interesante y ser un excelente tutor.**

**Al jurado constituido por el Dr. Sergio Sánchez , la Dra. Amelia Farres, el Dr. Jorge Calderón y el Dr. Luis Servin, por los comentarios hechos a este trabajo.**

**A todo el grupo Aguirre-Hansberg que además de ser muy buenos compañeros son excelentes amigos, Laura, Rosalinda, Rosa, Monica, Olivia, Fernando, Billy y Maura que me ayudo con mis primeros pasos en el laboratorio.**

**De manera muy especial al Dr. Rafael Vazquez Duhalt y a su grupo en el Instituto de Biotecnología UNAM por toda la ayuda para realizar este trabajo, gracias.**

**Al Dr. Antonio Velázquez, con quien comenzó la historia, con mucho cariño.**

**A mis compañeros, amigos y casi hermanos de la carrera con los que compartí los buenos y malos momentos : Laura Espinosa, Irene Lee, Javier Cabello y Bernardo Reina.**

**A toda la gente que en Biomédicas y Fisiología Celular que en los pasillos siempre tuvieron una sonrisa que brindar.**

**A mi familia Francisco Schnabel (el papa), Ana Ma. Peraza (la mama), Nashyeli Schnabel (la hermana) Paco Schnabel (el hermano) y la yaya (la abuela) que siempre me apoyaron ya ayudaron en todo.**

**A mi Enrique que siempre esta ahí.**

## INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	
• La diferenciación celular y el hongo <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo experimental	2
• Ciclo de vida	3
• Factores Psi	3 y 4
• <i>Aspergillus nidulans</i> como sistema experimental	4 a 7
• Antecedentes	7 a 12
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y METODOS	
• Cepas de <i>A. Nidulans</i> empleadas en este trabajo	14
• Relación entre los marcadores genéticos de las cepas empleadas y su fenotipo	14
• Medios de cultivo	15 y 16
• Incubación y tiempo de cultivo	16
• Preparación del inóculo de esporas	16
• Extracción y determinación de ácidos grasos	16 a 18
• Extracción y determinación de metabolitos secundarios	18
• Purificación y análisis de cósmidos	18 a 20
• Transformación de <i>A. nidulans</i>	20 y 21
• Mutagénesis de <i>A. nidulans</i> con luz ultravioleta	21 y 22
• Cruzas sexuales	22
• Obtención de diploides	22
• Mapeo genético	23
RESULTADOS Y DISCUSION	
• Análisis de ácidos grasos libres en la mutante <i>cfwA2</i> .	24 a 30
• Extractos orgánicos de metabolitos secundarios de bajo peso molecular	31 a 36
• Estrategias para clonar el gen <i>cfwA2</i> por complementación	
a) Caminata por el cromosoma "chromosome walking"	36 a 38

<b>b) Identificación de cósmidos usando el conjunto de genes involucrados en la síntesis de esterigmatocistina</b>	.....38 a 42
<b>c) Mapeo de <i>cfwA2</i> con respecto a <i>pyroB</i></b>	.....42 a 45
• Obtención de posibles supresores de la mutación <i>cfwA2</i> .	.....45 a 51
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	.....52 y 53
<b>REFERENCIAS</b>	.....54 a 58

## RESUMEN

Entre una serie de mutantes afectadas en la esporulación asexual (conidiación): se identificó una (*cfwA2*) termosensible, la cual a 30°C presenta retraso en la conidiación, produce esporas blancas y es autoestéril. Al crecerla junto a una cepa silvestre estas características son complementadas extracelularmente.

Se propuso que esta mutante podría estar afectada en la síntesis de ácidos grasos ya que mutantes en esta ruta aisladas en *M. xanthus* presentan fenotipos semejantes. El análisis de la concentración de ácidos grasos libres de la mutante *cfwA* mediante cromatografía de gases, mostró que no hay diferencias con respecto a la cepa silvestre.

Por el contrario, el análisis de metabolitos secundarios y pigmentos, mediante cromatografía en capa fina, si mostró diferencias entre la mutante y la cepa silvestre.

Al transformar a la mutante *cfwA2* utilizando diferentes grupos de cósmidos seleccionados mediante *chromosome walking* o por hibridar con genes involucrados en la síntesis de aflatoxinas, no fue posible complementar a esta mutación.

Mediante mutagénesis con luz U.V., se seleccionaron 7 posibles supresores, dentro de los cuales 6 resultaron ser revertantes de la mutación *cfwA2* y el restante suprime parcialmente los efectos de la mutación en *cfwA2*. En el mismo experimento se aislaron potenciadores de la mutación *cfwA2* los cuales presentan características peculiares estos se caracterizaron genéticamente.

## INTRODUCCIÓN

LA DIFERENCIACIÓN CELULAR Y EL HONGO *Aspergillus nidulans* COMO MODELO EXPERIMENTAL.

Se piensa que el crecimiento vegetativo es un estado fisiológico estable de la célula. Esta estabilidad deriva principalmente del ajuste del metabolismo ante cambios continuos del interior y exterior. Muchos micro-organismos pueden continuar creciendo en casi cualquier condición ambiental con un mínimo de nutrientes. Sin embargo, en condiciones que limitan el crecimiento vegetativo, muchos micro-organismos forman células o estructuras celulares que se encuentran relativamente aisladas del medio ambiente. Estas células o estructuras celulares se encuentran a su vez en otro estado fisiológico estable. Por lo tanto, el proceso de diferenciación celular puede considerarse como una transición entre estados estables (Hansberg y Aguirre 1990 ).

La formación de esporas en microorganismos es un ejemplo claro de la diferenciación celular. Durante el ciclo de vida de *A. nidulans* (fig. 1) se alternan diferentes estados de diferenciación, la generación de esporas asexuales o conidias durante la reproducción asexual (conidiación) o la producción de las esporas sexuales o ascosporas durante el ciclo sexual (ascosporogénesis), lo que hace a este organismo un excelente modelo experimental para el estudio de la diferenciación celular, ya que combina ventajas experimentales de los procariontes, como su fácil manejo en el laboratorio con la complejidad del desarrollo eucarionte.

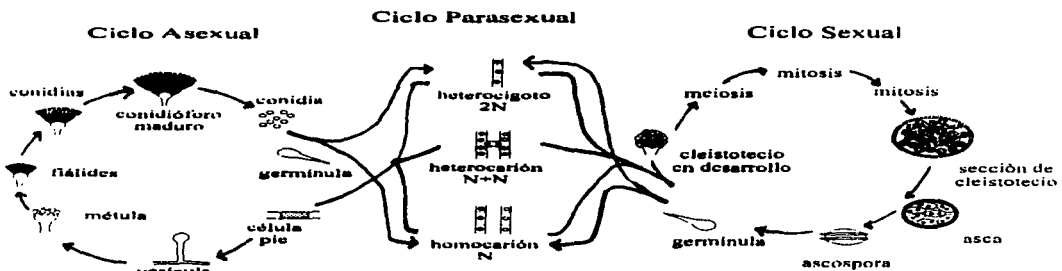


Figura 1 Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*



## CICLO DE VIDA

Durante el ciclo de vida de *A. nidulans* se destacan tres fases: el crecimiento vegetativo, el ciclo asexual y el ciclo sexual. El crecimiento vegetativo se caracteriza por un crecimiento apical y la ramificación de células cilíndricas ó hifas, que en conjunto se denominan micelio. Núcleos genéticamente distintos pueden encontrarse en micelios separados (homocariones) o en un mismo micelio (heterocariones). En este caso, dos núcleos pueden unirse y generar un diploide (Pontecorvo y col., 1988).

El ciclo asexual se inicia cuando los segmentos de ciertas hifas se diferencian para formar a las células pie, las cuales dan soporte a la estructura característica (conidioforo) donde se encuentran las esporas o conidias. Al igual que en el crecimiento vegetativo se generan ramificaciones a partir de esta célula pie, creciendo de manera apical; pero a diferencia de las hifas vegetativas, este crecimiento se detiene y las puntas se hinchan formando vesículas. Posteriormente, en la superficie de la vesícula se forman, mediante gemación, células uninucleadas denominadas métulas. Estas a su vez se dividen generando a las fialides, las cuales generan las conidias uninucleadas, a partir de divisiones nucleares repetidas (Timberlake y Clutterbuck, 1994 ).

Por otro lado, la reproducción sexual involucra la formación de cuerpos fructíferos llamados cleistotecios, los cuales se encuentran rodeados de las células Hülle. Como resultado de la meiosis y división mitótica se forman ocho ascosporas dentro de una estructura denominada asca. Posteriormente ocurre una segunda división mitótica generándose un segundo núcleo en cada ascospora (Champe y col., 1994 ).

Estas tres etapas pueden ocurrir simultáneamente en una colonia, pero en regiones y tiempos diferentes. Por ejemplo, en el borde de la colonia se presenta el crecimiento vegetativo, mientras que anterior a este borde se encuentran conidióforos con cadenas de conidias y al centro de la colonia aparecen las células Hülle que marcan el inicio de la esporulación sexual. Los cleistotecios maduran de manera progresiva hacia el centro de la colonia hasta que, finalmente, después de aproximadamente 90 horas, aquéllos que se encuentran en el centro contienen ascas y ascosporas desarrolladas (Timberlake y Marshall, 1988 ).

## FACTORES PSI

Existe una familia de sustancias producidas por *A. nidulans* denominadas factores psi ("*precocious sexual inducer*"), psiA, psiB y psiC, los cuales son derivados hidroxilados del ácido linoleico. PsiC es el ácido 5,8-dihidroxisilinoico,

psiB es el ácido 8-hydroxilinooleico y psiA es la  $\delta$ -lactona de psiC (Mazur y col., 1990; 1991 ). Se piensa que psiB es probablemente un intermediario de la biosíntesis de psiC. No se conoce el mecanismo de acción de estos factores psi, sin embargo se ha observado que el factor psiA induce la esporulación asexual mientras que el factor C la inhibe, induciendo probablemente la esporulación sexual (fig. 2). Por lo tanto, cuando una colonia comienza a esporular asexualmente, la presencia de una enzima lactonizante que daría como resultado la acumulación del factor psiA, resultando en la esporulación asexual. Se ha propuesto que conforme transcurre el tiempo de crecimiento de la colonia una lactonasa estado-específica podría convertir a psiA en psiC e iniciar la esporulación sexual (Champe y El-Zayat 1989; Champe y col. 1994).

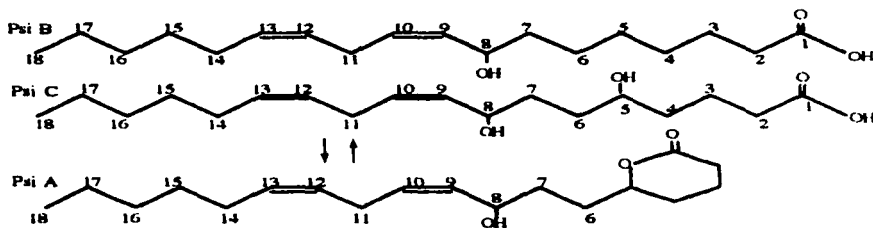


Figura 2 Estructuras de los factores Psi. Psi A y Psi C tienen efectos opuestos durante el desarrollo y son interconvertibles *in vivo*.

#### A. *nidulans* COMO SISTEMA EXPERIMENTAL

En los últimos años, se ha incrementado el uso de este hongo ascomiceto como sistema experimental debido a sus ventajas biológicas y al desarrollo de herramientas moleculares:

- Es un eucarionte sencillo capaz de crecer rápidamente en una gran variedad de medios de cultivo definidos ya sea líquidos o sólidos.
- Forma colonias compactas e individuales en medio sólido, lo que hace posible el uso de técnicas de inoculación y de replicación en placa.
- La separación de los cromosomas en geles de agarosa hace posible asignar genes a los distintos cromosomas.

- Se cuenta con bibliotecas genómicas separadas por cromosoma y un mapa físico.
- Es un organismo homotálico cuyo ciclo de vida se alterna entre el ciclo sexual (coniosporogénesis) y el asexual (conidiogénesis).
- Las conidias son uninucleadas, lo que permite el aislamiento subsecuente de clones idénticas y la mutagénesis directa de éstas.
- La reproducción sexual permite el análisis genético tradicional
  - a) se pueden crear mutantes que pueden ser mapeadas.
  - b) es posible cruzar cualquier par de cepas.
  - c) es fácil formar diploides estables; con lo cual se pueden establecer relaciones de alelismo y dominancia entre distintas mutaciones y asignar mutaciones a cierto cromosoma (Ward, 1991; Aguirre, 1992; Martinelli, 1994).

Gracias a estas características se han generado una gran variedad de mutantes, entre las que se encuentran muchas afectadas en diferentes etapas de la conidiación; entre estas las que definen a los genes *brlA*, *abaA*, *wetA*, *stuA* y *medA*. También genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios, algunos encargados de la pigmentación del conidióforo: *yA*, *wA*; y otros de la producción del precursor de aflatoxinas llamado esterigmatocistina *aglR*, *stcF*, *stcV*, etc (Brown y col., 1996).

El gen *brlA* o "*bristle*" (cerdas) juega un papel esencial en el cambio del crecimiento vegetativo a la reproducción asexual. Mutantes en este gen no llegan a producir las vesículas, métulas, fialides o esporas (fig. 3a); tampoco se activan genes asociados a estados posteriores de la formación del conidióforo como *abaA* y *wetA* (Clutterbuck, 1969). Mutantes afectadas en el gen *abaA* o "*abacus*" producen conidióforos con vesículas y métulas reiteradas que asemejan a un ábaco (Sewall y col., 1990a; fig. 3b). Las mutantes en el gen *wetA* (mojadas), forman conidióforos normales, pero las conidias no alcanzan la madurez, ya que se hidratan y lisan (Sewall y col 1990b; fig.3c).

Los genes *stuA* y *medA* están relacionados con la organización espacial del conidióforo y son esenciales para la diferenciación sexual. Mutantes en los genes *stu*, "*stunted*" (achaparrado), forman esporas a partir de conidióforos enanos, que poseen paredes celulares anormalmente delgadas (Miller y col., 1991, 1992); mientras que las mutantes en el gen *medA* (*medusa*) producen métulas reiteradas y conidióforos secundarios o cabezas secundarias a partir de una cabeza principal (Timberlake y Clutterbuck 1994; fig. 3d).

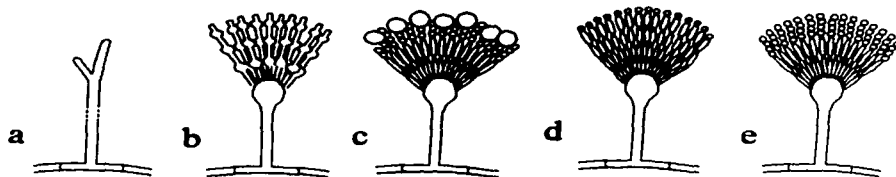


Figura 3 Estructuras de los conidióforos de diferentes mutantes morfológicos y la cepa silvestre. a, *brlA*; b, *abaA*; c, *wetA*; d, *medA* y e, silvestre (Modificado a partir de Timberlake y Clutterbuck, 1994).

Existen una gran variedad de mutantes afectadas en genes que se requieren para la pigmentación de las esporas tales como: *wA* (blancas "white" ); *yA* (amarillas "yellow" ); *bwA* (café "brown"); *pA* (pálidas); *dilA* (diluido); *drkA, B* (oscuro "dark") etc. Sin embargo únicamente los productos de los genes *yA* y *wA* han sido caracterizados; *yA* codifica para una enzima p-difenol oxidasa o lacasa, la cual es depositada por las fialides en la pared de las conidias, donde convierte el pigmento intermediario de color amarillo en el producto final de color verde (Clutterbuck, 1972). La secuencia del gen *wA* indica que codifica para una policétido sintetasa. Por lo tanto el precursor amarillo de la lacasa es un policétido sintetizado por el producto del gen *wA* (Timberlake y Clutterbuck, 1994). En *Aspergillus parasiticus* se demostró que el precursor del pigmento amarillo es el policétido hydroximetil naftopiranona (Brown, 1993). Otros policétidos sintetizados por *Aspergillus*, tales como las aflatoxinas y la esterigmatocistina, son metabolitos secundarios que se encuentran clasificados dentro los productos naturales mas carcinogénicos, mutagénicos y tóxicos (Wogan y col. 1992). A partir de los estudios previos en *A. parasiticus*, Brown y colaboradores describen un conjunto de 25 genes que definen

la mayor parte de las enzimas que se requieren para la síntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans*; *afIR*, *stcA*, *stcU*, entre otros (Brown y col. 1995).

#### ANTECEDENTES

Mediante mutagénesis con luz ultravioleta Aguirre aisló a partir de la cepa TJA22 mutantes condicionales incapaces de crecer a 42°C y/o que presentaran defectos en la conidiación. Habiendo demostrado que ambos fenotipos son resultados de una sola mutación, se seleccionó a la cepa CJA15, cuyas características a 30°C son: el retraso en la conidiación, las conidias que produce son blancas y es incapaz de formar cleistotecios. También se observó que al crecer a esta mutante cerca de una cepa silvestre, en la interfase todos estos defectos eran remediados (fig. 3). Anteriormente se había aislado otra mutante por A. J. Clutterbuck (comunicación personal) cuya característica principal es que no puede crecer por si sola y para crecer requiere estar co-inoculada con una cepa silvestre y una vez que esporula los conidióforos que produce son blancos. A esta mutante se nombro *cfvA1* ("cross feedable white" alelo 1).

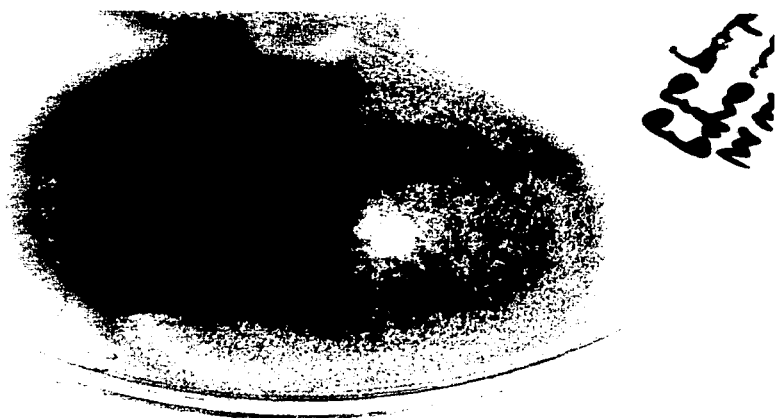


Figura 4 Fotografía en la que se muestra a la cepa mutante *cfvA2* (*cfv*) de *A. nidulans* creciendo cerca de una cepa silvestre (*cs*) a 30°, en la interfase de muestra la complementación por parte de la cepa silvestre: *cfvA2* produce esporas de color verde en la zona de contacto (→).

Posteriormente M. Cárdenas siguió con el estudio de esta mutante, así caracterizó si la mutante CJA15 era un alelo "leaky" de *cfvA1*; mapeo a este gen dentro de los cromosomas de *A. nidulans*; observo si el retraso observado en la conidiación se debe a que este afectada la expresión de genes involucrados en la conidiación como *brlA* y *fluG* y si la falta de pigmentación esta causada por la falta de expresión del gen *wA*; se comprobó que la complementaciones extracelular y finalmente se estudió la posibilidad de que la mutante codificará para la acetil-CoA carboxilasa; además en experimentos preliminares observo diferencias en el patrón de acumulación de ácidos grasos entre una cepa silvestre y la mutante CJA15 (Cárdenas 1996).

- Identificación de CJA15 como alelo de *cfvA1*.

Con el fin de determinar si la mutante CJA15 era un alelo "leaky" de *cfvA1* se realizó una cruce entre *cfvA1* y la mutante CJA15. El diploide obtenido, mostró características de la cepa CJA15, por lo que se concluyó que en efecto la mutación contenida en la cepa CJA15 es alélica a *cfvA1*; por lo que se denominó a esta mutante como *cfvA2* al alelo correspondiente. Con estos resultados se interpretó que

*cfwA1* es una mutación nula del gen *cfwA*, mientras que *cfwA2* se comporta como una mutación parcial, conservando parte de la función del gen a 30°C, permitiendo el crecimiento pero se muestra afectada tanto en la esporulación sexual como asexual.

• Mapeo Genético de *cfwA2*

Mediante cruza con una cepa que contiene marcadores genéticos en cada uno de los ocho cromosomas, MSF (*yA2*; *acrA*; *galA1*; *pyroA4*; *facA303*; *sB3*; *nicB8*; *riboB2*), se determinó que la mutación *cfwA2* se encuentra localizada en el cromosoma I. Posteriormente se procedió a ubicarlo dentro del cromosoma I para esto se hicieron cruza con la cepa A362 (*riboA1*, *ana1*, *adG14*, *proA1*, *pabaA1*, *yA2*) cuyos marcadores se encuentran distribuidos a lo largo del cromosoma en el orden indicado. Se mapeó y se encontró que el gen *cfwA* se encuentra en el brazo izquierdo del cromosoma I a 9.4 cM del gen *pyrG* (fig. 5).

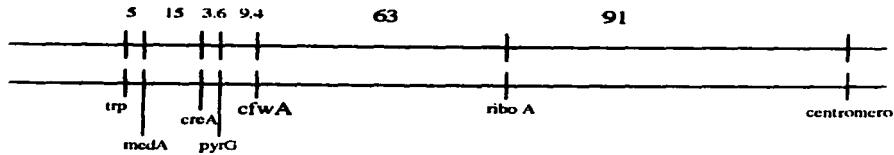


Figura 5 Mapa genético del cromosoma I. Las distancias están dadas en unidades de mapa ó centiMorgans (Modificado de Cárdenas, 1996).

• Retraso de la conidiación en la mutante *cfwA2*

Con hibridaciones de tipo “Northern” utilizando como sonda un fragmento del gen *brlA*, se determinó que hay un retraso de 10 horas en la expresión del gen *brlA*

en la cepa mutante con respecto a la silvestre. Esto indicó que el retraso en la esporulación de la mutante *cfvA* se debe a que se expresa de manera tardía el gen *briA*. Se analizó posteriormente la expresión del gen *fluG*, ya que la mutación en este gen retrasa la expresión de *briA* (Lee y Adams, 1995), retrasándose la conidiación, al igual que en la mutante *cfvA*. Los resultados que se obtuvieron mostraron que la expresión de *fluG* no está alterada en la mutante, por lo tanto *cfvA* actúa de manera independiente a *fluG* en la regulación de la expresión de *briA*.

- Expresión del gen *wA* en la mutante *cfvA2*.

Como la mutante *cfvA* produce conidias blancas al igual que la mutante *wA* (Mayorga y Timberlake, 1992), una posibilidad es que no se expresara el gen *wA* en la mutante *cfvA*. Sin embargo, se observó que el gen *wA* sí se expresa en la mutante *cfvA*, aunque de manera tardía.

- Autoesterilidad

Se estudió la posibilidad de que la autoesterilidad y el retraso en la conidiación estuviera causado por la falta en la actividad de las enzimas responsables de la síntesis de los factores psi. S. P. Champe (comunicación personal) determinó, que la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de estos factores no está afectada en la mutante *cfvA2*.

- Complementación extracelular

Se comprobó que la complementación observada al crecer a cepa *cfvA2* cerca de una cepa silvestre es extracelular; porque al aislar conidias de la interfase y sembrarlas, presentaron un fenotipo igual al de *cfvA*. La complementación no se observó cuando en la interfase se interpusieron diferentes membranas, tales como membranas de diálisis de 4000 y 6000 Da, filtros Whatman de 3 mm, Celofán, filtros hidrófobos ó filtros millipore de 0.22  $\mu\text{M}$  y 0.45  $\mu\text{M}$ . Esto resultados sugieren que la complementación requiere de un contacto cercano célula-célula para llevarse a cabo y que no se trata de un metabolito difusible.

- Posible relación entre la mutante *cfvA* y la enzima ACC

M. Cárdenas propuso que *cfvA* podría codificar para la acetil-CoA carboxilasa (ACC) ya que es una enzima involucrada en la síntesis de ácidos grasos así como en



la síntesis de algunos metabolitos secundarios (Hopwood y Sherman, 1990). Esto correlaciona con que posiblemente la mutante *cfwA2* fuese incapaz de sintetizar ácido linoleico, precursor de los factores Psi, causando así las alteraciones observadas durante la esporulación sexual y asexual; también al estar involucrada la ACC en la síntesis de metabolitos secundarios afectaría probablemente la pigmentación de las esporas, características de la mutante *cfwA2*.

Así, mediante hibridaciones tipo "Southern" con un fragmento que codifica para el gen de la ACC de levadura, se seleccionaron 7 cósmidos del cromosoma I, los cuales se utilizaron para tratar de complementar la mutación *cfwA2*. Sin embargo, los resultados fueron negativos, sugiriendo que *cfwA* no codifica para la ACC.

- Síntesis de Esterigmatocistina

Los policétidos es una clase diversa de metabolitos secundarios sintetizados mediante la condensación secuencial de ácidos carboxílicos catalizado por enzimas denominadas policétido sintetetasas (PKS). Los policétidos son sintetizados en bacterias, hongos y plantas, en algunos *Aspergilli* (*parasitucus*, *flavus* y *nomius*) se produce la aflatoxina; mientras que la esterigmatocistina, el penúltimo intermediario de la biosíntesis de aflatoxina, es sintetizado como producto final en *A. nidulans*.

Experimentos realizados por Guzmán (1996) mostraron que la cepa CRO1 (*cfwA2*, *pabaA1*, *yA2*, *veA1*) es incapaz de sintetizar esterigmatocistina; sin embargo muestra una serie de metabolitos secundarios que no se encuentran en una cepa silvestre, posiblemente precursores de la esterigmatocistina que en la mutante *cfwA2* se acumulan al no cumplirse por completo la biosíntesis de este policétido.

- Patrón de acumulación de ácidos grasos en la mutante *cfwA2*.

Dado el efecto pleiotrópico de la mutante *cfwA2* esta mutación podría explicarse por un defecto en la síntesis de ácidos grasos, alterándose la producción de metabolitos derivados de éstos, como factores psi, dando como consecuencia el retraso en la conidiación y la falta de formación de esporas sexuales, así como la síntesis de metabolitos secundarios, bloqueando la pigmentación y la producción de esterigmatocistina. En experimentos preliminares utilizando a las cepas FGSC26 (*bioA1*, *veA1*) y a la cepa CRO1 (*cfwA2*, *pabaA1*, *yA1*, *veA1*) se determinó que a 30°C ambas cepas presentan la misma proporción de ácidos grasos excepto por el ácido linoléico el cual se encuentra 3 veces mas acumulado en la cepa silvestre. Al elevar la temperatura de cultivo a 42°C, se observó que ambas cepas presentan la misma proporción de ácidos grasos, excepto que la cepa silvestre presentó 70 veces

mas ácido linolénico que la mutante y esta a su vez presentó 5 veces mas ácido linoléico que la silvestre. Esto sugirió que tal vez el fenotipo observado en la mutante estuviere relacionado con estas diferencias.

## OBJETIVOS

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LA MUTANTE *cfwA*

Consideramos importante re valorar los resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio, ya que el estudio se realizó una sola vez, sin duplicados y no se utilizaron cepas isogénicas, lo cual no permite evaluar si la diferencia en el patrón de ácidos grasos se debe a la mutación en el gen *cfwA2* o si los distintos requerimientos de cada cepa son los que alteran el patrón de acumulación de ácidos grasos.

### IDENTIFICAR CÓSMIDOS QUE COMPLEMENTEN LA MUTACIÓN *cfwA*.

Se decidió hacer una caminata por el cromosoma I utilizando como sonda los cósmidos que contienen a *pyrG*, el cual se encuentra localizado 9.4 cM de distancia de *cfwA2*. Así seleccionar cósmidos y utilizarlos para transformar a la mutante *cfwA2*, y seleccionar aquel cósmido que sea capaz de complementar la mutación.

### OBTENCIÓN DE MUTACIONES SUPRESORAS DEL FENOTIPO *cfwA*.

Dados los efectos pleiotrópicos de la mutación *cfwA2*, resulta interesante preguntarse si es posible prescindir del producto de *cfwA* a través de la mutación de otros genes; por lo cual decidió obtener supresores de la mutante *cfwA2* mediante mutagénesis con luz U.V.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### CEPAS DE *A. nidulans* EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
CRO 1	<i>cfwA2, pabaA1, yA2, veA1.</i>	R. Ortiz
CMC 2	<i>cfwA2; biA1; pyroA4; riboB2, veA1.</i>	M. Cárdenas
CDS 4	<i>pabaA1, yA2, veA1.</i>	RMS011 X G1102 (este trabajo)
CDS 6	<i>pyroB12; riboB2, veA1.</i>	G1102 X MH1164 (este trabajo)
G1102	<i>pyroB12, sulA1; dilA, veA1.</i>	Glasgow
MH1164	<i>yA1, suadE20, adE20, riboB2, veA1.</i>	M. Hynes
RMS011	<i>pabaA1, yA2; (argB::trpC::B); trpC801; veA1.</i>	M. Stringer
TJA22	<i>brlA (-2900p/l)::lacZ (argB+::argB::CAT), biA1, metG1, veA1.</i>	J. Aguirre

### RELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES GENÉTICOS DE LAS CEPAS EMPLEADAS Y SU FENOTIPO

Genotipo	Fenotipo
<i>adE20</i>	requerimiento de adenina
<i>argB2</i>	requerimiento de arginina
<i>biA1</i>	requerimiento de biotina
<i>cfwA2</i>	mutante afectada en la esporulación
<i>dilA</i>	color de las conidias diluido
<i>metG1</i>	requerimiento de metionina
<i>pabaA1</i>	requerimiento de ácido p-aminobenzoico
<i>pyroA4</i>	requerimiento de piridoxina
<i>pyro B12</i>	requerimiento de piridoxina
<i>riboB2</i>	requerimiento de riboflavina
<i>suadE20</i>	supresor de <i>adE20</i>
<i>sulA1</i>	resistencia a sulfanilamida
<i>trpC801</i>	requerimiento de triptófano
<i>veA1</i>	da a la colonia apariencia aterciopelada, y elimina el requerimiento de la luz para esporular
<i>yA2</i>	Conidias amarillas

## MEDIOS DE CULTIVO (Käfer, 1977).

### •Medio Mínimo

Solución de sales 20X	50 ml
elementos traza	1 ml
D-glucosa	10 g

Se ajustó el pH a 6.5 con una solución de NaOH 5M y se aforó a un litro con agua destilada. Se agregaron en el caso de medio sólido 12.5 g de agar. Se esterilizó durante 15 min a 121°C.

### •Solución de sales 20X

NaNO <sub>3</sub>	120 g
KCl	10.4g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10.4g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30.4g

Se aforó a un litro con agua destilada y se guardó a temperatura ambiente.

### •Elementos traza

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.2 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.1 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CoCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.11g
Na <sub>2</sub> EDTA	5.0 g

Se agregaron los compuestos conforme a la lista a 80 ml de agua destilada. Se calentó hasta ebullición y se aforó a 100 ml con agua destilada. Se guardó a temperatura ambiente.

### •Requerimientos

Se agregó la siguiente cantidad por litro de medio mínimo dependiendo de los requerimientos de cada cepa.

Compuesto	Concentración solución madre	Cantidad
Adenina	0.86 %	10 ml
Arginina	16.80 %	5 ml
Biotina	0.05 %	0.5 ml
Metionina	-----	0.11g
PABA	0.17 %	0.5 ml
Piridoxina	0.4 %	2 ml
Riboflavina	0.05 %	5 ml
Triptofano	40 mM	100 ml

•LB ("Luria Broth")

Caseína	10g
Extracto de Levadura	5g
NaCl	5g

Se disolvió en 1000 ml de agua destilada y se esterilizó. Una vez frío, se agregó los antibióticos en la siguiente proporción para cada litro de medio LB:

antibiótico	Solución madre	Concentración Solución madre
Ampicilina	5 ml	10 mg/ml
Kanamicina	2 ml	25 mg/ml

Con una concentración final de 75 µg de ampicilina por ml de LB, y 50µg de kanamicina por ml de LB (Sambrook y col., 1989).

INCUBACIÓN Y TIEMPO DE CULTIVO (Pontecorvo y col., 1953).

*A. nidulans* crece en un rango amplio de temperaturas. En medio mínimo sólido a 37°C las colonias de tipo silvestre crecen de manera radial a una velocidad constante de 5.9 mm cada 24 h.; las cepas con un crecimiento normal pueden ser identificadas después de 48 h después de ser plaqueadas.

PREPARACIÓN DEL INOCULO DE ESPORAS

En medio mínimo sólido con los suplementos apropiados se creció en cultivos confluentes por 3 días a 37°C. Se colectaron las esporas raspándolas con 10 ml de Tween-80 al 0.1% estéril, se agitaron con vortex vigorosamente, para romper los cúmulos de esporas y se centrifugó en una centrifuga clínica por 5 min a la velocidad máxima; se decantó y se resuspendieron en 3 ó 4 ml de agua desionizada estéril. Estos últimos pasos se repitieron dos veces y se cuantificaron las esporas en una cámara de Neubauer utilizando la dilución adecuada.

EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS (Vázquez y Arredondo, 1991).

• Condiciones de cultivo para determinación de ácidos grasos.

En matraces de un litro con 200 ml de medio mínimo mas los requerimientos necesarios se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas recién cosechadas. Se incubaron bajo agitación constante a 300 r.p.m. y 30°C durante 18 horas. Después de 18 horas de incubación se modificó la temperatura a 42°C y se cultivaron durante 6 horas mas con la misma agitación. Se filtró el cultivo, recuperando así el micelio, se lavó con agua destilada estéril y volvió a filtrar con vacío, eliminándose así el máximo de agua acumulada en el micelio.

- **Extracción**

Aproximadamente 1 g de micelio húmedo se resuspendió en 2 ml de metanol en un tubo el cual se incubó en agua hirviendo por 15 min. Se dejó enfriar y se agregó 1 ml de cloroformo (metanol:cloroformo 2:1). Se incubó durante 24 h a 4°C permitiendo que se llevara a cabo la extracción, posteriormente se centrifugó a 2500 G por 5 min. y se lavó 4 veces con un ml de una solución de metanol:cloroformo (1:1) para completar la extracción. Los 4 ml de extractos metanol:cloroformo se combinaron con un volumen de agua destilada, separándose de este modo la fase del cloroformo de la del metanol, se centrifugó y se recuperó la fase cloroformo; ésta se evaporó en un rotavapor a 45°C y se secó con flujo de nitrógeno.

- **Separación de ácidos grasos en neutros y polares (Kates, 1972).**

La alúmina con la cual se prepararon las columnas de separación se activó durante una hora a 100°C y después se empacaron en pipetas pasteur, las cuales se equilibraron posteriormente con éter.

La muestra obtenida se resuspendió en un ml de éter y se aplicó a la columna de alúmina. Los ácidos grasos neutros se eluyeron con 10 ml de éter, se secaron en el rotavapor y posteriormente con nitrógeno. Después se eluyeron los ácidos grasos polares, primero con 10 ml de acetona y después con 10 ml de metanol. Se secaron de igual manera con el rotavapor y nitrógeno.

- **Saponificación (Kates, 1972)**

Los ácidos grasos tanto polares (20 ml) como neutros (10 ml) se transfirieron cada uno a un tubo, se secaron con nitrógeno, se les agregó una perla de ebullición, 3 ml de una solución 0.3N de NaOH metanólico al 90% y se hirvieron en baño maría con glicerol, con reflujo de agua durante una hora. Después se dejaron enfriar y se agregaron de 3 a 4 volúmenes de una mezcla de derivados de petróleo (hexanos), para extraer los ácidos grasos no saponificables; esta porción se desecha. Después para acidificar se agregó 0.3 ml de una solución 6N HCl, se agregaron nuevamente hexanos con el fin de extraer los ácidos grasos libres, se tomó la porción de hexanos y se secó con nitrógeno.

- **Metil-Esterificación**

A los ácidos grasos libres se les agregó un mililitro de tricloruro de boro (BF<sub>3</sub>) en metanol y se calentó por 5 minutos a 60°C. Se dejó enfriar y se agregaron 3 ml de una solución saturada de NaCl, se hicieron 4 lavados con hexanos, se recuperó la fase de hexanos y se secó con nitrógeno.

- **Análisis**

Los ácidos grasos libres metil esterificados se resuspendieron en 50 µl de diclorometano y se inyectaron en el cromatógrafo de gases *Perkin Elmer* de 1 µl a 3

µl según la proporción de ácidos grasos libres en cada muestra; con el fin de inyectar aproximadamente la misma cantidad de muestra. Se resolvieron las muestras en una columna de *Supelco* con fase SBP-20. Los datos obtenidos se analizaron con el programa *HV Chem*.

#### EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

- **Condiciones de cultivo**

Las condiciones de cultivo fueron las mismas que en el método de extracción de ácidos grasos.

- **Extracción (Modificado de Wheeler y Klich, 1995)**

Tanto el micelio como las esporas se extrajeron por 24 h con un volumen que cubriera la muestra de acetona a 4°C. Posteriormente las muestras, se molieron en mortero con 5 g de polvo de cuarzo. La pasta resultante se resuspendió en 10 ml de acetona y se transfirió a tubos corex de 25 ml, se centrifugó a 5000 r.p.m. en el rotor SS-34 y se recuperó la acetona, ésta se secó en vacío y se ajustó la fase acuosa remanente a pH 5 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1N ó KOH 1N. Posteriormente se agregó NaCl hasta saturar la solución y se extrajo dos veces con un volumen de acetato de etilo. Se combinaron las fracciones de acetato de etilo y para eliminar cualquier residuo de agua, se agregó la cantidad necesaria para cada muestra de NaSO<sub>4</sub> anhidro; se concentró en vacío y se secó con nitrógeno. Se pesó la cantidad de metabolitos obtenida, con el fin de aplicar la misma cantidad de cada muestra a las placas de cromatografía.

- **Determinación (Wheeler y Klich, 1995)**

Se aplico 200µg de cada extracto sobre placas de cromatografía fina y se resolvieron con una solución de dietileter-hexanos-ácido fórmico (60:39:1). Las placas se dejaron secar y se rociaron con una solución de etanol:ácido sulfúrico 95:5 y se hornearon en a 150-200°C hasta que se hicieron visibles los compuestos.

#### PURIFICACION Y ANALISIS DE COSMIDOS

- **Purificación de cósmidos**

A partir de una biblioteca genómica de cósmidos con los vectores *PWE15 (Stratagene)* con resistencia a ampicilina o *pLorist* resistencia a kanamicina, mantenida en *Escherichia coli*, se seleccionaron las colonias a utilizar. Se tomó una porción de las células con un palillo y se crecieron 8 h a 300 r.p.m. y 30°C en 3 ml de medio LB con el antibiótico adecuado. Después se transfirió a un matraz de 1 litro con 300 ml de LB mas el antibiótico y se dejó crecer durante la noche en las mismas condiciones (Sambrook y col., 1989) se centrifugó el cultivo a 6000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C en un rotor Sorvall GSA. Se siguió el protocolo de QIAGEN para lisis alcalina y purificación de ADN. Una vez purificado el ADN se cuantificó.



• “*Southern Blot*” (Sambrook y col., 1989).

Las colonias de *E. coli* que conforman la biblioteca genómica de *A. nidulans* separada por cromosomas se replicaron en membranas de nylon *Hybond*, se crecieron y lisaron *in situ*. El ADN resultante se fijó covalentemente a las membranas de nylon. Estas se utilizaron en varios ciclos de hibridación tipo “*Southern*”.

-Pre hibridación

A las membranas que contienen los cósmidos correspondientes al cromosoma I de la biblioteca de *A. nidulans* se les agregaron 15 ml de solución de hibridación y 0.6 ml de ADN de esperma de salmón (10 mg/ ml) y se incubaron por 2 horas en esta solución a 65°C.

-Preparación de la sonda

Todos los cósmidos con resistencia a ampicilina provenientes del vector PWE15 (*Stratagene*) fueron tratados con la enzima NotI en las condiciones descritas en el catálogo, así se liberó el inserto necesario para preparar la sonda. El fragmento se purificó posteriormente con un método rápido de purificación (“*The Geneclean kit*” Bio 101 Inc. La Jolla, CA).

Se utilizó el “*Random primed DNA labeling system*” de GIBCO BRL (“*Life Technologies*” Inc., N.Y.). 25 ng de ADN se ajustaron a un volumen final de 20 µl con agua destilada desionizada estéril (agua dd) y se puso a baño maría por 5 minutos. Pasado este tiempo se transfirió inmediatamente a hielo por 10 minutos. Después se agregaron 2 µl de cada nucleótido (ATP, GTP; TTP), 15 µl del buffer de reacción, 5 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP y se ajustó a 29 µl con agua dd y se agregó 1 µl del fragmento Klenow de la ADN polimerasa. Se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Después se agrega 5 µl de “*stop buffer*” y se lleva a 80 µl con agua dd. Se pasa por una columna de Sephadex G-50 (Penefsky, 1977). Se centrifugó la columna 3 min a 2000 r.p.m. en la centrifuga clínica.

Para los cósmidos de resistencia a kanamicina se sintetizaron los oligos SP6 y T7 (Ongay L.). Se desnaturalizaron 500 ng de ADN se agregaron 2 µl de cada nucleótido frío; 5 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP y la cantidad necesaria para tener al final la concentración de 1 pmol/µl de cada oligo. Se siguió el protocolo como se describió anteriormente para los fragmentos obtenidos del vector PWE15.

-Hibridación (Sambrook y col., 1989).

Tanto las sondas como 0.6 ml ADN de esperma de salmón (10 mg/ ml) se desnaturalizaron hirviéndolas en baño maría por 5 minutos y después se dejaron enfriar en hielo.

Se desechó la solución de prehibridación y se agregaron 15 ml de solución de hibridación, las sondas y el ADN de esperma de salmón. Se dejó en agitación a 65°C durante aproximadamente 12 h.

**-Lavado de membranas.**

Las membranas se pusieron a 65°C por 30 min en 500 ml de buffer A y se agitaron. Se descartó el buffer y se agregaron 500 ml del buffer B y se agitó por 30 minutos a 65°C. Estas condiciones corresponden a un lavado de alta astringencia.

**Buffer A**

SSC 2X	50 ml	SSC 20X
SDS 0.1%	5 ml	SDS 10%

Se aforo a 500 ml con agua dd.

**Buffer B**

SSC 0.1X	2.5 ml	SSC 20X
SDS 0.1%	5 ml	SDS 10%

Se aforo a 500 ml con agua dd.

**Soluciones**

SSC 20X	
NaCl	175.3 g
Citrato de Na	88.2 g

Se disolvió en 800 ml de agua dd, se ajustó el pH a 7 con una solución de NaOH 10N. Se aforó a un litro con agua destilada y esterilizó.

SDS 10%	
SDS	100 g

Se disolvió 100 g de dodecil sulfato de sodio en 900 ml de agua destilada. Se calentó a 68°C hasta que se disolvió. Se ajustó el pH a 7.2 con HCl concentrado. Se aforó a 1000 ml con agua destilada.

• **Identificación de cósmidos**

Aquellos cósmidos que hibridaron se identificaron como nuevos cósmidos, se purificaron como se menciona anteriormente y utilizaron para preparar sondas nuevas y así se va avanzando a lo largo del cromosoma.

**TRANSFORMACIÓN DE *A. nidulans***

Se realizaron modificaciones a la metodología de transformación de *A. nidulans* reportada por Ballance y col. en 1983; Tilburn y col. en 1983 y por Turner en 1994.

El protocolo se siguió de manera similar a la metodología reportada hasta la digestión de las germinulas la cual se realizó al poner el micelio obtenido en presencia de novozyma a una concentración mayor (10 mg/ml).

Cuando los protoplastos no se bandearon como se espera con el protocolo original, se retiró la mezcla de las soluciones y se resuspendió el pellet en aproximadamente 10 ml de STC e inmediatamente se filtraron por miracloth estéril lavando varias veces con STC. Los protoplastos obtenidos ya sea por el baneo o mediante filtración se resuspendieron con STC-poliaminas-DMSO en el volumen adecuado y se dejó una hora en hielo.

- **Transformación**

Se utilizaron aproximadamente 3 µg de ADN y se diluyeron con STC-poliaminas-DMSO 1:1. Se agregaron 100 µl de la solución de protoplastos y se dejaron durante 25 min a temperatura ambiente. Se incubaron a 42°C por 2 min y se pasaron 4 min a hielo. Se continuó el protocolo como estaba descrito anteriormente (Ballance y col., 1983; Tilburn y col., 1983 y Turner 1994).

-Soluciones

STC

Se preparo un litro de una solución se sorbitol al 1.2M mas CaCl<sub>2</sub> 10mM y tris-HCl 10 mM. Se esterilizó y guardó a 4°C.

STC-poliaminas

En 10 ml de STC se disolvió 1 mg de heparina y 10 µl de una solución 100 mM de espermidina. Se esterilizó por filtración y guardo a 4°C.

STC-poliaminas-DMSO

Se agregaron 10 µl de DMSO por cada ml de STC-poliaminas. Se preparó para cada transformación.

Solución de Novozyma

Se utilizo la enzima litica de *Trichoderma harazanium* de Sigma; se disolvieron 5 mg de enzima en 0.5 ml de agua desionizada estéril. Se preparó para cada transformación.

Solución de albúmina (BSA)

Se disolvieron 12 mg de albúmina de suero bovino (BSA) de Sigma en 1 ml de agua desionizada estéril. Se preparó la solución para cada transformación.

**MUTAGENESIS DE *Aspergillus nidulans* CON LUZ ULTRAVIOLETA (Grigorov y col., 1983).**

- **Preparación de las condiciones de mutagénesis.**

Se utilizó una lámpara modelo UVGL-25, colocada sobre dos soportes universales a una distancia de 8 cm sobre las esporas que se irradiaron. Debajo de la lámpara y procurando que quedara lo mas centrado posible se colocó un agitador, que se utilizó para agitar las esporas que se irradiaron. Se prendió la lampara eligiendo la longitud de onda corta y se dejó calentando durante 15 minutos. Se colocó una cortina de papel aluminio alrededor de la lampara para que no se dispersara la luz.

- **Preparación de esporas**

Se utilizaron 25 ml de una suspensión de 1X10<sup>8</sup> esporas por ml, se colocaron en una caja Petri de vidrio estéril y se agitaron con una barra magnética estéril.

- **Condiciones de irradiación**

Se colocaron las esporas en el agitador debajo de la lampara de U.V. momentáneamente tapada. Esto se realizó en la presencia de un mechero con el fin de mantener la esterilidad durante el proceso. Se tomó 1 ml de la suspensión a los 0.

15, 30, 45, 60, 90, y 120 segundos de irradiación, y se mantuvieron en hielo en ausencia de luz.

- **Plaqueo de muestras**

Se plaquearon 200  $\mu$ l por duplicado los diferentes tiempos de irradiación en cajas Petri con medio mínimo mas los requerimientos de la cepa mutagenizada, además de desoxicolato de sodio al 0.04 %, ya que éste inhibe el crecimiento permitiendo que las colonias crezcan compactas y de este modo poder cuantificarlas mas fácilmente. Se incubaron las cajas a 30°C y después de 3 días de crecimiento se contaron las colonias y construyó una curva de porcentaje de muerte.

- **Mutagénesis**

Se repitió el protocolo anterior al tiempo que correspondió a 90-95% de muerte y se seleccionaron posibles supresores.

### **CRUZAS SEXUALES**

Se cruzaron las cepas de la siguiente manera: con palillos estériles se pican en medio mínimo mas los suplementos, las colonias de las cuales se desea obtener la cruce a una distancia aproximada de 3 mm y se dejan crecer por 3 ó 4 días hasta que las colonias toquen sus bordes. Posteriormente una pequeña porción de agar con hifas de ambas cepas (se procuró remover el exceso de agar) se transfirió a medio mínimo sólido, donde se dejaron crecer aproximadamente 3 días más hasta que se forman heterocariontes. La caja Petri se sella con cinta adhesiva, lo cual favorece la formación de cleistotecios.

Después de 4 ó 5 días se buscaron los cleistotecios bajo el microscopio y se eligieron aquéllos que fueran grandes, ya que éstos tienen la mayor probabilidad de ser híbridos. Se limpió el cleistotecio quitando las células Hülle que lo rodean. Se pasó este a un tubo eppendorff y se rompió liberando las ascosporas, éstas se resuspendieron en aproximadamente 500  $\mu$ l de agua desionizada estéril de ahí se tomaron 50  $\mu$ l y plaquearon en medios con suplementos de ambas cepas.

### **OBTENCIÓN DE DIPLOIDES**

El procedimiento para hacer diploides es igual que en las cruces sexuales hasta que se forma un heterocarionte; las esporas del heterocarionte se raspan con agua dd y se recuperan en un tubo Eppendorff. De esta suspensión se toman aproximadamente 30  $\mu$ l y se ponen en una caja de Petri y se agrega sobre ellas medio mínimo agar suave (7 g/l), se agita la caja para que las esporas se esparzan por la caja y se dejan solidificar. Aquéllos que crezcan en medio mínimo formando una colonia de apariencia sana y con el color apropiado son considerados como diploides. Esto puede ser confirmado posteriormente en base al mayor tamaño de las esporas y a la posibilidad de haploidización.

## **MAPEO GENÉTICO**

**Para mapear una mutación con respecto a cierto marcador se obtienen cleistotecios formados entre la mutante y otra cepa que contenga el marcador de interés. Para hacer este mapeo se siembra un cleistotecio y se analiza la progenie en medios selectivos para observar la segregación meiótica de cada uno de los marcadores.**

## RESULTADOS Y DISCUSION

### ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN LA MUTANTE *cfvA2*.

En 1995 Toal y col. describen una mutante en *Myxococcus xanthus* (*esg*) afectada en la síntesis de ácidos grasos, que presenta características fenotípicas semejantes a la mutante *cfvA2*; esto es: retraso en el crecimiento, defecto en la pigmentación y defectos en la esporulación. Una de las posibles explicaciones de los efectos pleiotropicos de la mutación en *cfvA2* es que es una mutación parcial que afecta la síntesis de ácidos grasos, lo que explicaría que una mutación nula (*cfvA1*) sea letal que tuviese problemas para esporular tanto sexual como asexualmente ya que los factores psi que regulan la esporulación son derivados del ácido linoleico y finalmente que este alterada en la producción de metabolitos derivados de los ácidos grasos, afectando así la pigmentación y otros procesos fundamentales para la vida del hongo.

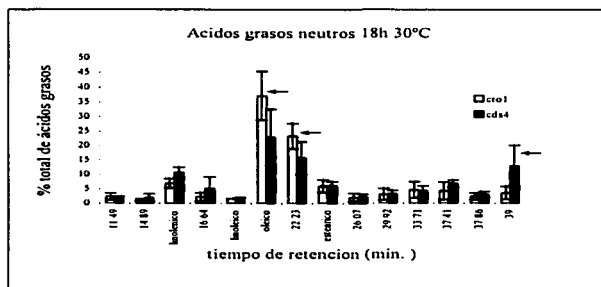
Experimentos preliminares realizados en el laboratorio mostraron que tal vez el fenotipo observado en la mutante estuviese relacionado con estas diferencias en la acumulación de ácidos grasos, sin embargo, consideramos importante revalorar estos resultados. Para el presente estudio se seleccionaron dos cepas que fueran isogénicas CDS4 (*pabaA1*, *yA1*, *veA1*) y CRO1 (*cfvA2*, *pabaA1*, *yA1*, *veA1*), se sembraron a confluencia en medio sólido y se crecieron por 72 h a 30°C, posteriormente se obtuvieron las conidias y se cuantificaron. En 50 ml de medio con la solución madre de esporas se inocularon  $5 \times 10^5$  esporas por ml de medio. Se utilizaron dos distintas condiciones para cada cepa, una primera, en la que se creció el cultivo durante 18 h a 30°C y una segunda condición en que se creció igual que la anterior y posteriormente se elevó la temperatura a 42°C por 6 h mas; se seleccionaron estas temperaturas porque como se menciona anteriormente la mutante *cfvA* presenta las características descritas a 30°C, mientras que a 42°C las características de esta mutación se vuelven mas dramáticas (la mutación *cfvA2* es sensible a la temperatura). De este modo, de haber diferencias a 30°C, estas diferencias se acentuarían a 42°C. Se hicieron además duplicados de cada condición para cada cepa.

Los cultivos tanto de la cepa silvestre como de la mutante en las diferentes condiciones, se filtraron descartando los sobrenadantes, obteniendo así los micelios de los cuales se procuró eliminar la mayor cantidad de agua. Posteriormente, se determinó el peso seco.

Condición	Peso seco
CDS4 18h	150 mg
CRO1 18h	60 mg
CDS4 24h	163 mg
CRO1 24h	152 mg

Tabla 1 Peso seco de los micelios de la cepa silvestre CDS4 (*pabaA1*, *γA1*, *veA1*) y la mutante CRO1 (*cfwA2*, *pabaA1*, *γA1*, *veA1*) a las 18 h de cultivo a 30°C y a las 24 h de cultivo (18h a 30°C + 6 h a 42°C) y los datos representan un promedio de los duplicados en cada condición.

Con los micelios obtenidos se siguió el protocolo de extracción de lípidos reportado por Vázquez y Arredondo (1991), posteriormente cada muestra se separó en: ácidos grasos que se almacenan dentro de la célula ó neutros y aquellos que son componentes de la membrana ó ácidos grasos polares. Después las mezclas de lípidos se hidrolizaron para obtener únicamente los ácidos grasos libres, los cuales se metilesterificaron para hacerlos volátiles y así poderlos detectar con el cromatógrafo de gases. Los resultados se analizaron con el programa *HV quem* y se obtuvieron las gráficas de la figura 6.



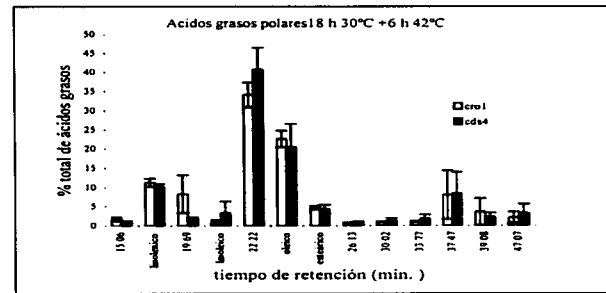
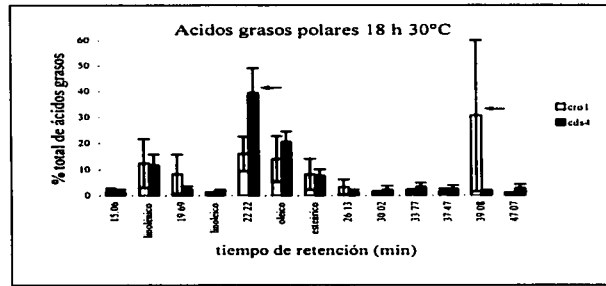
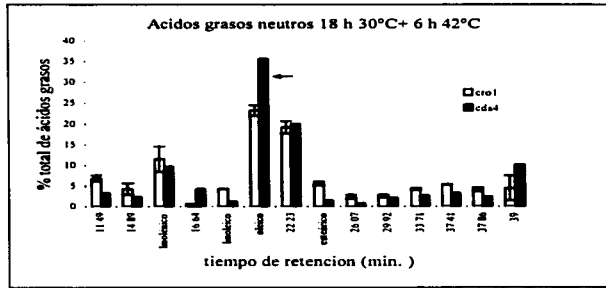




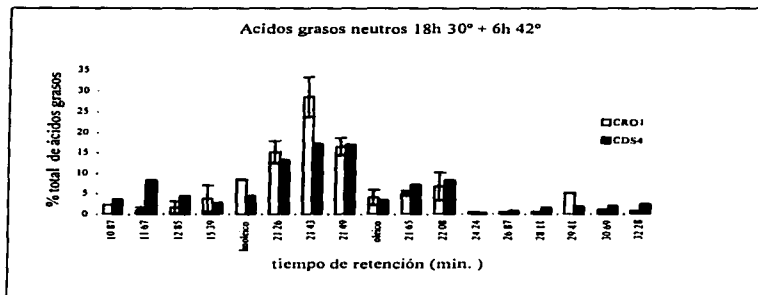
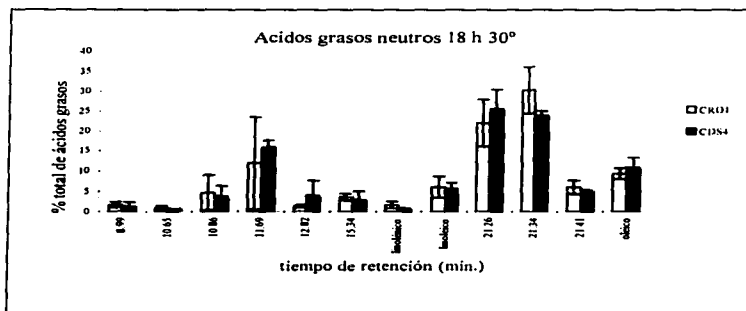
Figura 6 Perfil de ácidos grasos libres de una cepa silvestre CDS4 (■) y de la cepa mutante CRO1 (□). Perfil de ácidos grasos neutros (a) y polares (c) a las 18 h de crecimiento a 30°C. Perfil de ácidos grasos neutros (b) y polares (d) a las 24 h de crecimiento (18 h a 30°C + 6 h a 42°C). Los valores mostrados son el promedio de los duplicados en cada condición (excepto en b, donde CDS4 no tiene duplicado). Se utilizó aceite de oliva como estándar, con el cual se pudo determinar la identidad de algunos picos con respecto al tiempo de retención, tales como el ácido linolénico, linoleico, oleico y esteárico, con tiempos de retención de 15.8, 21.3, 22 y 23.3 respectivamente.

La composición de ácidos grasos neutros en el micelio obtenido después de cultivar por 18 h a 30°C no varía entre la cepa silvestre y la mutante. Al aumentar la temperatura a 42°C, tampoco se observaron diferencias en el perfil general de ácidos grasos neutros, excepto en el caso del ácido linoleico, en el que la mutante tiene 13 % menos que la cepa silvestre. Esto podría sugerir que la mutante es incapaz de almacenar ácido linoleico a altas temperaturas. Por otra parte, el perfil de ácidos grasos polares en los cultivos de 18 h no mostró diferencias entre la mutante y la silvestre y, al aumentar la temperatura y cultivar por 6 h más, el perfil de ácidos grasos entre la cepa silvestre y la mutante se mantuvo similar al anterior y no se presentan diferencias significativas entre las cepas. Esto indica que la composición de la membrana, tanto de la cepa silvestre como la mutante, es similar y, que al aumentar la temperatura esta composición no se altera.

Sin embargo, los datos obtenidos presentan variaciones muy altas dentro de los mismos duplicados, tales como el perfil de ácidos grasos neutros a las 18 h (a), donde los ácidos grasos con tiempos de retención de 22, 22.3 y 39 así como en los ácidos grasos polares (b) se observan variaciones significativas dentro de los duplicados de los ácidos grasos con tiempo de retención de 22.3, y 39. Esto puede deberse a error experimental durante el proceso de extracción, a diferencias dentro de las muestras o a que en la condición de 18 h a 30°C la variación en la cantidad de biomasa obtenida al inicio era de la mitad de la mutante con respecto a la silvestre (tabla 1).

Debido a esto, se decidió repetir la extracción de ácidos grasos libres con algunas modificaciones. Para obtener más biomasa se utilizó una mayor cantidad de cultivos, se ajustó el número de matraces para obtener la misma cantidad de biomasa de la cepa mutante y de la cepa silvestre. Así, después de cultivar de la misma manera que el experimento anterior se obtuvo 1 g de micelio húmedo para cada condición. Se

siguió el mismo protocolo de extracción y se analizaron con el programa *HV quem* y se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 7.



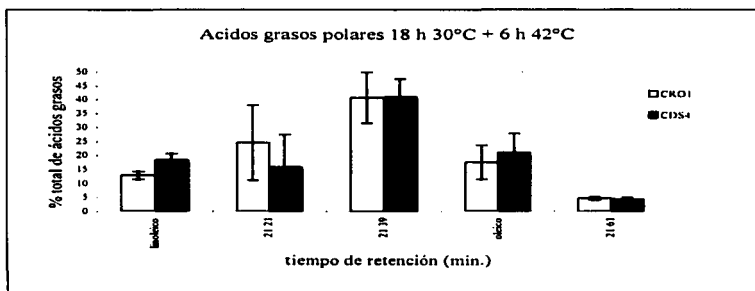
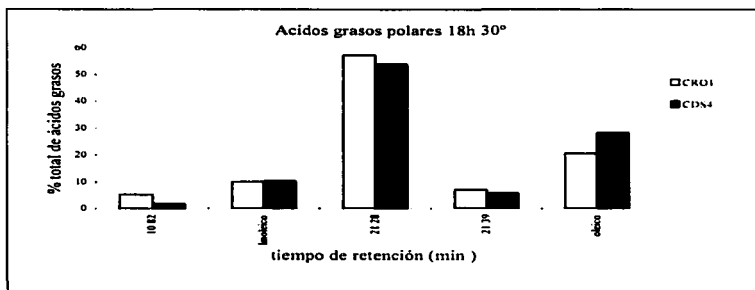


Figura 7 Perfil de ácidos grasos libres de la cepa CDS4 (silvestre) y la cepa mutante CRO1. Perfil de ácidos grasos neutros (a) y polares (c) a las 18 h de cultivo a 30°C. Ácidos grasos neutros (b) y polares (d) después de transferir los cultivos de 30°C a 42°C por 6 h mas de cultivo. Los valores obtenidos en a, b y d son el promedio de los duplicados de cada condición. Los tiempos de retención 18, 18.3, 21.5 representan a los ácidos linoléico, linoleico y oleico respectivamente, de acuerdo con los estándares, usando aceite de oliva.

El perfil de ácidos grasos neutros obtenidos del micelio de un cultivo de 18h de la cepa silvestre y la mutante es similar. Al aumentar la temperatura a 42°C y seguir el cultivo durante 6 h mas se observa un cambio en el perfil de ácidos grasos neutros en ambas cepas; a las 18 h se detectaron los ácidos con tiempos de retención de 8.9, 15.4 y 21.3, mientras que a la 24 h de cultivo, estos ácidos grasos no están presentes.

También hay una disminución en el porcentaje de ácidos grasos con tiempo de retención de 21.2 y 21.5 y un aumento considerable del ácido graso con tiempo de retención de 21.4, cuando se transfirieron los cultivos a 42°C por 6 h. Estos datos coinciden con reportes anteriores en los que muestran que la composición general de ácidos grasos varía al aumentar o disminuir la temperatura (Rhoshanara y Shanmugasudaram., 1980; Hori y col., 1987). Las diferencias anteriores se observaron tanto en la cepa silvestre como en la mutante. Con estos resultados, se demuestra que no hay diferencias en la acumulación de ácidos grasos entre una cepa silvestre y la mutante *cfivA2<sup>-</sup>* y que ambas cepas son capaces de responder al aumento de temperatura de la misma manera, lo cual indica que la maquinaria de síntesis y almacenamiento de ácidos grasos no está alterada en la mutante.

El perfil de ácidos grasos polares de la mutante y la silvestre observado después de 18 h de cultivo es similar, no obstante que en esta condición no se tuvieron duplicados para cada muestra. Este perfil varía al cultivar durante 6h mas aumentando la temperatura a 42°C; disminuyendo considerablemente tanto en la cepa silvestre como en la mutante la concentración de los ácidos grasos con tiempo de retención de 21.2 y aumentando la del ácido graso con tiempo de retención de 21.4, mientras que la proporción de ácido oleico se mantiene constante, indicando que la composición en la membrana de la cepa CDS4 y la de la mutante CRO1 son similares con respecto a la composición de ácidos grasos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo no coinciden con los datos obtenidos por M. Cárdenas anteriormente, lo cual podría deberse a que se utilizaron cepas, metodologías de extracción y análisis diferentes (ver material y métodos; Cárdenas, 1996). Al utilizar cepas isogénicas los resultados obtenidos sugieren que las características de la mutante *cfivA2* no se deben a que tenga deficiencias en la síntesis o acumulación de ácidos grasos, por lo que probablemente no tenga deficiencia en la producción de ácido linoleico precursor de los factores psi, y la letalidad de la mutante a altas temperaturas no se debe a que posee una diferencia en la proporción de ácidos grasos de la membrana con respecto a una cepa silvestre, además se mostró que la cepa mutante es capaz de responder a la elevación de temperatura de manera similar que una cepa silvestre, cambiando los niveles de ácidos grasos en la membrana y en las pozas internas de la célula.

## EXTRACTOS ORGÁNICOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE BAJO PESO MOLECULAR.

Una de las características más conspicuas de la mutante *cfwA2* es la deficiencia en la producción de pigmentos en las conidias o esporas asexuales. lo cual se ha determinado que no se debe a la falta de expresión del gen *wA* (Cárdenas., 1996), también necesario para la síntesis de pigmento. Proponemos que la mutante *cfwA* es incapaz de producir precursores del pigmento, el cual probablemente sea un policétido ya que el producto del gen *wA* es una policétido sintetasa encargada de llevar a cabo la formación del pigmento amarillo a partir de un "precursor incoloro". Por otra parte estudios realizados por Guzmán (1996) muestran que la mutante *cfwA* es incapaz de sintetizar otro policétido denominado esterigmatocistina, precursor en la síntesis de la aflatoxinas, y que la mutante acumula una serie de metabolitos que una cepa silvestre no acumula. Esto último coincide con reportes en los que al bloquear la síntesis de metabolitos secundarios (pigmentos) en *Penicillium* o *Aspergillus* con diferentes fungicidas, se acumulan otros metabolitos (ej. flaviolina) que no se producen durante la vía normal de síntesis de los pigmentos (Wheeler y Klich, 1995). También se ha demostrado que alguna de las funciones de algunos policétidos se relaciona con la señalización "hormonal" (Hopwood y Sherman, 1990). Así pues es posible que el defecto causado por la mutación en *cfwA* es que éste bloquee la síntesis de policétidos. (esterigmatocistina), la síntesis del pigmento característico de las conidias y probablemente en la producción de posibles señales que regulen la diferenciación celular en *A.nidulans*.

Se decidió explorar la posibilidad de que existieran diferencias en los niveles de acumulación de distintos metabolitos secundarios en condiciones de cultivo diferentes a las condiciones en donde se promueve la síntesis de esterigmatocistina. Al igual que en el estudio de los ácidos grasos se utilizaron las cepas CDS4 (*pabaA1*, *yA1*, *veA1*) y CRO1 (*cfwA2*, *pabaA1*, *yA1*, *veA1*), se sembraron a confluencia en medio sólido y se crecieron por 72 h a 30°C, posteriormente se obtuvieron las conidias, se cuantificaron. Con la solución madre de esporas se inculó a una densidad de  $5 \times 10^5$ / ml de medio de cultivo. Se cultivó de la misma manera que en los experimentos de extracción de ácidos grasos; por 18 h a 30°C y 18 h a 30°C mas 6 h a 42°C. Se obtuvo el micelio y se cuantificó. Para extraer los metabolitos a partir de la solución madre de esporas y los micelios se utilizó la metodología reportada por Wheeler y col. (1995), y se pesó la cantidad final de metabolitos de cada condición (tabla 2).

Muestra	peso
CDS4 esporas	6 mg
CRO1 esporas	4 mg
CDS4 18h	14 mg
CRO1 18h	16 mg
CDS4 24h	15 mg
CRO1 24h	19 mg

Tabla 2 Peso seco de metabolitos solubles extraídos con acetona, en diferentes condiciones de crecimiento y desarrollo. Cepa silvestre, CDS4 (*pabaA1*, *yA1*, *veA1*) y mutante, CRO1 (*cfvA2*, *pabaA1*, *yA1*, *veA1*).

Se resuspendió en el volumen adecuado de acetato de etilo a una concentración final de 20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , y se aplicaron 10  $\mu\text{l}$  de cada muestra en placas de cromatografía fina. Estas se corrieron con una mezcla de eter:hexanos:ácido fórmico 60:39:1, se revelaron con una solución de etanol:ácido sulfúrico 95:5 y se hornearon a 150°C hasta que las manchas se hicieran visibles y carbonizaran (fig. 8). En la placa de las muestras obtenidas de micelio cultivado 18 h a 30°C (fig. 8b) parecería que se cargó una cantidad menor de la cepa mutante, por lo que se procedió a repetir la cromatografía de esta muestra cargando el doble de la muestra de la mutante (fig. 8b').

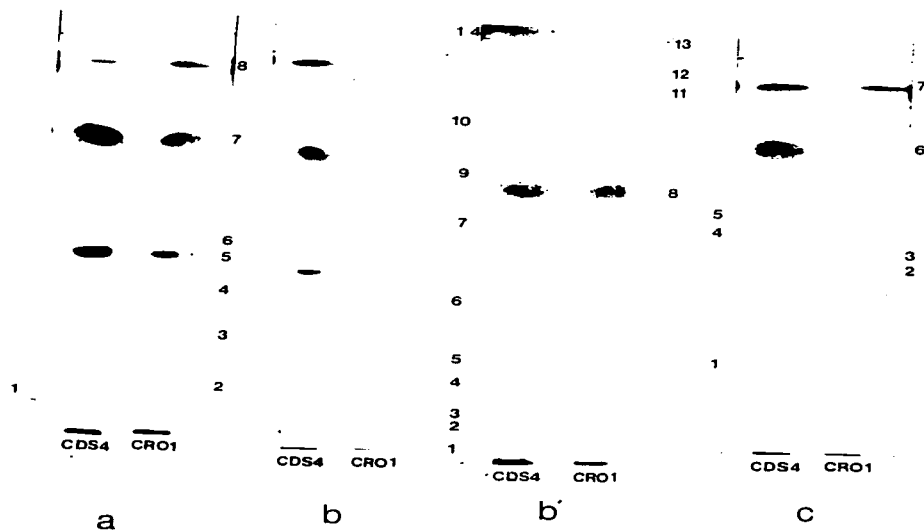


Figura 8 Fotografías de cromatografías en capa fina de metabolitos secundarios solubles en solventes orgánicos. (a)cromatografía de los metabolitos obtenidos a partir de esporas; (b, b') cromatografía de metabolitos a las 18 h de cultivo a 30°C; (c) cromatografía de metabolitos obtenidos después de transferir los cultivos de 30°C a 42°C. CDS4 cepa silvestre y CRO1 mutante *ε<sup>flv</sup>Δ2<sup>-</sup>*.

Usando las fotografías de las cromatografías de capa fina (fig. 8) se determino la movilidad relativa (Rf) de los distintos compuestos detectados y se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 3. Se asignó un número a cada compuesto en las diferentes cromatografías lo que permite determinar las posibles diferencias entre la cepa silvestre (CDS4) y la mutante (CRO1).

Esporas		Micelio 18 h a 30°C		Micelio 18 h a 30°C + 6 h a 42°C	
No. de compuesto	Rfs	No. de compuesto	Rfs	No. de compuesto	Rfs
E-1	0.107	M18-1	0.047	M24-1	0.231
E-2	0.129	M18-2	0.070	M24-2	0.473
E-3	0.269	M18-3	0.107	M24-3	0.526
E-4	0.344	M18-4	0.190	M24-4	0.568
E-5	0.452	M18-5	0.285	M24-5	0.621
E-6	0.494	M18-6	0.381	M24-6	0.785
E-7	0.753	M18-7	0.533	M24-7	0.936
E-8	0.925	M18-8	0.628		
		M18-9	0.666		
		M18-10	0.772		
		M18-11	0.828		
		M18-12	0.895		
		M18-13	0.949		
		M18-14	0.990		

Tabla 3. Numeración de compuestos según su movilidad relativa (Rfs) en cromatografías de capa fina de: las esporas (a), del micelio obtenido a las 18 h de cultivo a 30°C (b) y de micelio del cultivo que se transfirió después de 18 h de cultivo a 30°C mas 6 h a 42°C (c). Cabe notar que los números de cada compuesto de las esporas (E-) no coincide con los números asignados a los compuestos de los micelios de 18h de cultivo a 30 °C (M18-) ni a los micelios después de 24 h de cultivo (M24-); 18 h de cultivo a 30°C mas 6 h a 42°C. Estos últimos números asignados no coinciden tampoco entre los micelios.

En la cromatografía de la muestra obtenida a partir de las esporas (figura 8 a), se muestra que ambas cepas acumulan diferentes metabolitos solubles en acetona. La cepa silvestre carece de los compuestos E-2 y E-4, mientras que la mutante carece del compuesto E-1. El compuesto E-7 se acumulan en menor cantidad en la mutante. Es importante mencionar que los metabolitos que se detectan en la cromatografía de capa fina no corresponden a los pigmentos de las esporas, ya que estos, siendo visibles a simple vista, no migraron con el sistema de solventes utilizado. Tampoco parecen corresponder a las que se han observado por Guzmán y col. (1996) ya las



condiciones de cultivo que se utilizaron (material y métodos), son diferentes a las que se utilizan para inducir la síntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans* (Yu y Leonard, 1995).

En 8 b' se observa que la cepa silvestre y la mutante difieren en la cantidad de metabolitos acumulados en el micelio de cultivos de 18 h a 30 °C; la mutante tiene una menor cantidad de los metabolitos M18-4, M18-5, M18-6, M18-7, M18-9, M18-10 y M18-14; sin embargo acumula una mayor cantidad de metabolitos asignados con los números M18-12 y M18-13, cabe destacar que se observa de manera clara que el metabolito M18-8 se acumula de igual manera en ambas cepas, lo que indica que se aplicó la misma cantidad de muestra y que las diferencias en la acumulación de metabolitos realmente se debe a que se acumulan y/o sintetizan en menor cantidad en la mutante o en el caso de los compuestos M18-12 y M18-13 menor cantidad en la silvestre. Como era de esperarse, al aumentar la temperatura, la cepa mutante tiene características más dramáticas que al cultivarse a 30°C, acumulando la mitad de los metabolitos que acumula la cepa silvestre; así en las muestras obtenidas a partir del micelio que se cultivó por 18 h a 30°C + 6 h a 42°C (fig. 8 c), se observa que la mutante no acumula los metabolitos M24-1, M24-4 y M24-5; el metabolito M24-6 es acumulado en mayor cantidad por la cepa silvestre que por la mutante, los metabolitos M24-2 y M24-7 se acumulan de igual manera por ambas cepas, y la mutante acumula mayor cantidad del metabolito M24-3.

Los resultados obtenidos indican que: las cepas silvestre (CDS4; *pabaA1*, *yA1*, *veA1*) y la mutante (CRO1 *cfvA2*, *pabaA1*, *yA1*, *veA1*), muestran patrones distintos de acumulación de metabolitos de bajo peso molecular solubles en solventes orgánicos, tanto en el micelio como en las esporas. Durante el crecimiento vegetativo la mutante *cfvA2* acumula a las primeras 18 h de cultivo menor cantidad de metabolitos (M18-4, M18-5, M18-6, M18-7, M18-9, M18-10 y M18-14) que la cepa silvestre, después 18 h a 30°C de cultivo y elevar durante 6 h la temperatura a 42°C se observa que la mutante acumula únicamente 4 metabolitos del total de 8 que acumula la cepa silvestre. Esto sugiere que la mutación en el gen *cfvA* impide sintetizar o acumular algunos de estos metabolitos, lo cual pudiera estar relacionado con la falta de pigmentación en las conidias.

Por otra parte, la mutante acumula metabolitos que no se observaron en la cepa silvestre (fig. 8 b', compuestos M18-12 y M18-13; fig. 8 a, los compuestos E-2 y E-4). Se ha demostrado que al bloquear la síntesis de melanina en algunas especies de *Penicillium* y *Aspergillus* con ciertos fungicidas, se acumulan otra serie de metabolitos que no se acumulan normalmente (Wheeler y Kilch, 1995). Esto es

consistente con los resultados obtenidos por Guzmán y col., (1996) donde también se observa que la mutante *cfwA* acumula metabolitos que no se encuentran en la cepa silvestre. Es posible que los compuestos detectados en la mutante sean los precursores de los pigmentos y al no poder proseguir con la vía normal de síntesis se acumulen en la cepa mutante; una posible explicación a la letalidad de la mutante es que al acumularse ciertos metabolitos sean tóxicos y finalmente destruyan a la mutante, de manera alternativa la mutante al carecer de una serie de metabolitos necesarios para su desarrollo muera por la falta de metabolitos; queda por determinar si la falta o la presencia en la mutante de ciertos metabolitos son los causantes de la letalidad de la mutante en *cfwA2*.

#### ESTRATEGIAS PARA CLONAR EL GEN *cfwA* POR COMPLEMENTACIÓN.

a) Caminata por el cromosoma ó "*chromosome walking*".

"*Chromosome walking*" es el nombre que se da a un proceso sistemático que permite aislar regiones de genomas complejos, de manera ordenada, al sobrelapar diferentes clonas recombinantes. Una caminata ("walk") es una serie de pasos que conducen a la identificación de fragmentos de ADN que se encuentran localizados en el extremo izquierdo (FI) o derecho (FD) de una clona (C). FI y FD se utilizan como sondas para identificar nuevas clonas que contengan ADN adicional que se encuentre del lado izquierdo o derecho de C (Cross y Little, 1986).

Ya que se conoce que el gen *pyrG* se encuentra cerca del gen *cfwA* (Cárdenas, 1996), se utilizó como sonda el cósmido L10F09 del cromosoma I de la biblioteca genómica de *A. nidulans*, el cual se había determinado previamente que contiene el gen *pyrG* (Prade y col. comunicación personal). Se utilizaron los oligos SP6 y T7 para marcar este cósmido en los extremos y se hibridó contra las membranas que contienen una colección redundante de cósmidos específicos del cromosoma I de *A. nidulans*. Se identificaron los cósmidos L10F04, L10G09, L19A12, L19B11, L24O07 y W07C06. Los cósmidos L10G09, L19A12 y L19B11 también contienen al gen *pyrG* (Prade y col. comunicación personal). Para continuar, con la caminata, se purificaron los cósmidos L24O07 y W07C06, se marcaron radioactivamente en los extremos y se hibridaron nuevamente (materiales y métodos). Se identificaron, además de los cósmidos identificados previamente, a los cósmidos L30C03, L25C12, W26C10 y W27G11.

Todos estos cósmidos (L10F09, L10F04, L10G09, L19A12, L19B11, L24O07, L30C03, L25C12, W07C06 W26C10 y W27G11) se utilizaron para cotransformar a la cepa CMC2 ( *cfwA2*, *pyroA*, *riboB2*, *bioA*, *veA1*), ya que al tener la mutación *riboB2*, puede ser complementada por el plásmido pPL1, el cual contiene una copia silvestre del gen *riboB* (Oakley y col., 1987). También se utilizó el plásmido de replicación autónoma pHelp ya que este aumenta la frecuencia de transformación (Gems ycol., 1991). Los resultados se muestran en la tabla 4.

	sin ADN	pPL1	pPL1 + pHelp	pPL + pHelp L24O07, W26C10, L25C12 y W07C06	pPL + pHelp W27G11 y L30C03.
No. total de transformantes	0	31	103	81	190
No. total de transformantes dilución 1:100	nd	nd	nd	137	261
No. total de transformantes dilución 1:1000	nd	nd	nd	nd	191

Tabla 4. Resultados de la cotransformación realizada con los cósmidos identificados mediante "chromosome walking". Se utilizaron las siguientes concentraciones de ADN: pPL1 4 µg, pHelp 2 µg y 1µg de cada cósmido. Se diluyó 1:100 ó 1:1000 de la cantidad total de ADN. (nd, no determinado).

El total de transformantes *riboB*<sup>+</sup> obtenidas con los cósmidos que se identificaron mediante "chromosome walking" a partir del gen *pyrG* (cercano a *cfwA*) fue de 860, dentro de las cuales no se observó ninguna que recuperara el fenotipo de una cepa silvestre con respecto a la pigmentación de las esporas. Como la biblioteca que se utilizó es altamente redundante, la técnica de "chromosome walking" permitió un avance muy lento a lo largo del cromosoma, lo cual se indica por el hecho de que después de 2 rondas de hibridización, se siguieron identificando los cósmidos de los cuales se partió inicialmente. Se procedió entonces a la utilización del mapa físico

del cromosoma I elaborado por R. Prade y sus colaboradores (comunicación personal). Para elaborar este mapa, se partió de una biblioteca genómica en cósmidos con fragmentos promedio de 40 Kb, la cual representa cerca de 6 veces el genoma de *A. nidulans*. Inicialmente, la biblioteca se hibridó contra cromosomas aislados de un gel tipo CHEF, marcados radioactivamente. Todos los cósmidos que hibridaron con un cromosoma fueron separados y clasificados como específicos de cada uno de los ocho cromosomas de *A. nidulans*. Posteriormente se seleccionaron varios cósmidos al azar de cada cromosoma que no hibridaran entre sí, se utilizaron como sondas para hibridar contra el mismo cromosoma. Se diseñó posteriormente un algoritmo que permitió ir ordenando en forma lineal los distintos cósmidos en base a sus patrones de hibridación, hasta construir mapas como el mostrado en la fig 9. Con la ayuda de este mapa es fácil seleccionar cósmidos que no hibriden entre sí, pero que se encuentren alineados dentro del cromosoma en cierta región. Así dentro de la región contigua al gen *pyrG* (identificado dentro del mapa físico) se seleccionaron los cósmidos W07A05, W12F06, W19E01 y W23A02 y se utilizaron para transformar a la cepa CMC2 (*cfwA2*, *pyroA*, *riboB2*, *bioA*, *veA1*). Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que se obtuvieron muy pocas transformantes y ninguna de éstas presentaba un fenotipo silvestre.

b) Identificación de cósmidos usando el conjunto de genes involucrados en la síntesis de esterigmatocistina.

El análisis de los metabolitos solubles en solventes orgánicos o metabolitos secundarios de la mutante *cfwA* y la cepa silvestre mostró diferencias en la acumulación de éstos metabolitos entre estas cepas. Es posible entonces que la mutante se encuentre afectada en una enzima involucrada en la síntesis de metabolitos secundarios o policétidos tales como las policétido sintetasas. Como se ha mencionado anteriormente la mutante *cfwA*, además de no sintetizar pigmentos (policétidos) y una serie de metabolitos secundarios, es incapaz de sintetizar esterigmatocistina (policétido).

Recientemente en el cromosoma IV de *A. nidulans* se identificó un conjunto de genes que codifican para las proteínas responsables de la síntesis de esterigmatocistina (Brow y col., 1996). El gen *cfwA* también se requiere para sintetizar esterigmatocistina, sin embargo, se encuentra localizado en el cromosoma I (Cárdenas, 1996). El conjunto de genes se encuentra contenido en los cósmidos L11C09, L24B03 y W27H05 del cromosoma IV. Dentro de estos genes se encuentran uno que codifica para una policétido sintetasa (PKS) y dos que codifican

para sintetasas de ácidos grasos (Brow, y col., 1996; Mayorga y Timberlake, 1992; Mohamed y col., 1988; Schweizer y col., 1988). En reportes anteriores se ha demostrado que es posible identificar diferentes policétido sintetasas utilizando sondas heterólogas ya que comparten homología entre sí. Así estos cósmidos se utilizaron como sonda para hibridar contra la biblioteca genómica del cromosoma I. Se identificaron dos poblaciones de cósmidos de acuerdo con la intensidad de hibridación. Una población que hibridó fuertemente, constituida por: L16F04, L16G03, L22H12, W01F10, W02B10, W02D10, W02G10, W03B06, W03E07, W03E09, W05H06, W19D02, W21E06, W27B07, W29F07 y W30F12. Y otra que hibridó de manera débil constituida por: L25F02, L26D09, W01B10, W01D05, W01E06, W01F08, W02B12, W02C01, W02F09, W03F08, W04C06, W04C12, W05F01, W02F09, W03F08, W03F12, W05E10, W05F01, W06G05, W07A01, W07B12, W07C06, W07C11, W07F05, W07G09, W08C06, W08C06, W08F01, W08H06, W09A04, W09D09, W09E08, W09F04, W09F07, W09F11, W10A04, W10D09, W10D12, W10F07, W11B11, W11E02, W11E08, W11F02, W11G12, W12E02, W12E05, W14A03, W14B11, W14E04, W14E07, W17E11, W17E12, W18B04, W18C08, W18E01, W18H06, W21A09, W21D10, W23A02, W23B02, W24E02, W26A01, W26A06, W26C07, W27C05, W27D06, W27G11, W29E08, W29E19, W30G05, W31B06, W31F10 y W31F11.

Se procedió a localizar estos cósmidos en el mapa físico del cromosoma I de *A. nidulans*. Los cósmidos que hibridaron de manera fuerte se encuentran todos en una zona en donde se encuentran los genes *pyrG* y *creA*, es decir cerca de donde mapea el gen *cfvA*. Estos cósmidos también se encuentran cerca de los cósmidos identificados previamente porque hibridaron contra un gen de la acetil CoA carboxilasa (Cárdenas, 1996), así como a los cósmidos identificados mediante el chromosome walking desde *pyrG* (fig.9). En cambio, los cósmidos que hibridaron de manera débil, se encontraron algunos dentro de esta zona (marcados con \* fig 9) y otros en sitios dispersos a lo largo del cromosoma I.

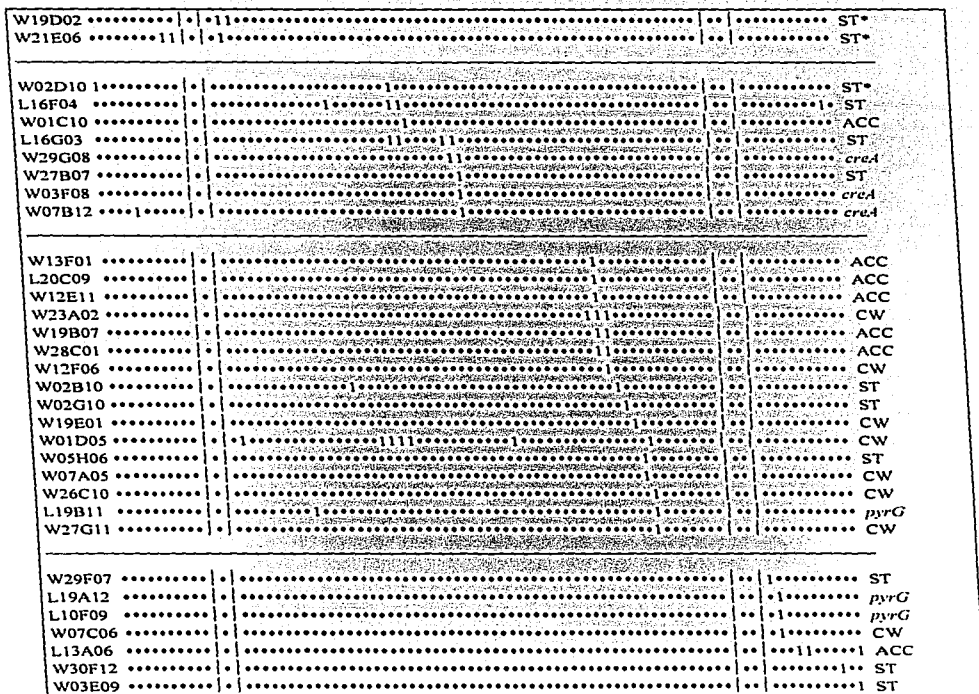


Figura 9 Modificación del mapa físico del cromosoma I de *A. nidulans* (Prade y col. comunicación personal). En la figura se muestran únicamente los cósmidos que se aislaron en este estudio; mediante *chromosome walking* (CW), aquellos que fueron identificados que hibridaron fuertemente (o de manera débil \*) con el "cluster" de genes involucrados en la síntesis de esterigmatocistina (ST) ó en el estudio realizado por M. Cárdenas (1996); donde identifico cósmidos que contienen al gen de la acetil CoA carboxilasa (ACC) y los reportados por Prade y col.(comunicación personal), que identifican a genes ya mapeados en el cromosoma y en el mapa físico (*pyrG* y *creA*). En el mapa físico original se encuentran intercalados cósmidos que no fueron seleccionados por ninguna de las estrategias utilizadas en este trabajo o en el trabajo anterior de Cárdenas (1996).

En la primera columna se muestran los cósmidos identificados con los números y letras característico de cada cósmido. • indica las sondas que fueron utilizadas de manera aleatoria para realizar el mapa físico y que no hibridaron con ese cósmido en particular. 1. indica que esa sonda en particular si hibridó con el cósmido. Las líneas continuas (---) separan regiones o "contigs" no conectadas entre sí experimentalmente. Cabe resaltar que existen cósmidos con uno o mas "1". Esto quiere decir que ese cósmido hibridó con mas de una sonda ya que comparte homología con ese cósmido. Esto hace que en algunas ocasiones el mapa físico no coincida con el mapa genético (Prade y col., comunicación personal).

Es de llamar la atención que por dos criterios totalmente diferentes e independientes, la caminata a partir del gen *pyrG* y la selección de cósmidos que hibridaron con el conjunto de genes que participan en la síntesis de la esterigmatocistina, se hayan identificado cósmidos en una misma región. Esto sugiere que dentro de esta región se encuentre el gen *cfvA*. Es importante notar que esta región comprendiera a un conjunto de genes diferente del conjunto encontrado en el cromosoma IV (Brown y col., 1996), involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios ó policétidos y/o la síntesis de ácidos grasos, ya que ahí se encuentra ubicada la ACC, enzima clave en el inicio de la síntesis de ácidos grasos o policétidos. Posiblemente se encuentren también, sintetetas de ácidos grasos (FAS) y/o sintetetas de policétidos (PKS), ya que dentro de los cósmidos que se utilizaron para hacer la hibridación se encuentran genes que codifican para 2 FAS, y una PKS.

Para determinar si dentro de los cósmidos que hibridaron fuertemente (L16F04, L16G03, L22H12, W01F10, W02B10, W02D10, W02G10, W03B06, W03E07, W03E09, W05H06, W19D02, W21E06, W27B07, W29F07 y W30F12) se encuentra el gen *cfvA*, se purificaron y utilizaron para transformar (material y métodos) a la cepa CMC2 (*cfvA2*, *pyroA*, *riboB2*, *bioA*, *veA1*). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

	sin ADN	pPL1	pPL1 + pHelp	pPL1 + pHelp + W05H06 W30F12	pPL1 + pHelp + W03E09 W02B10	pPL1 + pHelp + W29F07 W21E06	pPL1 + pHelp + W27B07 W02G10	pPL1 + pHelp + W02D10 W19D02	pPL1 + pHelp + L22H12 L16F04 L16G03
No total de transformantes	-	5	119	107	461	188	210	443	379

Tabla 5. Resultados de la transformación realizada con los cósmidos identificados mediante hibridaciones con el conjunto de genes involucrados en la síntesis de esterigmatocistina. Se

utilizaron las siguientes concentraciones de ADN: pPL1 4 µg, pHelp 2 µg y 1 µg de cada conjunto de cósmidos.

De un total de 1788 transformantes *riboB*<sup>+</sup>, ninguna presentó un fenotipo silvestre con respecto a la pigmentación. Esto podría deberse a que la integración de los cósmidos en el genoma fuese muy baja, por lo que se repitió el experimento anterior con la variante de que se digirieron tanto al plásmido pPL1 con la enzima PstI la cual lineariza al plásmido y el conjunto de cósmidos se digirieron con la enzima NotI, la cual libera el inserto dentro del cósmido. Además, no se utilizó el plásmido de replicación autónoma (pHelp), forzando así a que se integren los cósmidos y el plásmido en el genoma de la mutante CMC2, los resultados se muestran en la tabla 6.

	sin ADN	pPL1	pPL1 lineal	pPL1 + cósmidos	pPL1 lineal + cósmidos	pPL1 + cósmidos lineales	pPL1 lineal + cósmidos lineales
No. total de transformantes	-	56	103	41	100	93	160

Tabla 6 Resultados de la transformación realizada con los cósmidos identificados mediante hibidaciones con el conjunto de genes involucrados en la síntesis de esterigmatocistina. Se utilizaron las siguientes concentraciones de ADN: pPL1 4 µg, digerido con PstI durante una hora y 1 µg de todos cósmidos, digeridos durante una hora con la enzima NotI.

En los resultados mostrados en la tabla 6 se observa que al digerir pPL1 con PstI y los cósmidos con NotI, aumenta aproximadamente al doble el número de transformantes en cada condición, comparado con las condiciones en donde no se digirieron ni el pPL1 ni los cósmidos. Por otra parte, del total de 394 transformantes integrativas ninguna presento un fenotipo silvestre.

Los resultados de ambas transformaciones con un total de 2182 transformantes, muestran que posiblemente los cósmidos utilizados no contienen al gen *cfivA* o que este gen se encuentra incompleto y por lo tanto no complementa la mutación *cfivA2*.

### c) Mapeo de *cfivA* con respecto a *pyroB*.

Para determinar si es que dentro de los cósmidos aislados se encuentra el gen de *cfivA* incompleto y que por esto no ha sido posible complementar la mutación en *cfivA*, se procedió a mapear a *cfivA* con respecto a *pyroB*. Se hicieron cruza entre las



cepas CRO1 (*cfwA2*, *pabaA1*, *yA1*, *veA1*) y G1102 (*pyroB12*; *riboB2*, *veA1*). Se analizaron 3 diferentes cleistotecios (ver material y métodos) para determinar el porcentaje de recombinación entre *cfwA* y *pyroB12* (tabla 7).

Cruzas	Genotipo	Parentales	Genotipo	Recombinantes	progenie total	% recombinantes
G1102 X CRO1	<i>pyroB<sup>12</sup></i> <i>dilA<sup>+</sup></i>	41 17 16	<i>cfwA<sup>+</sup>pyroB<sup>+</sup></i>	0 0 0	134 63 65	0 3.2 0
			<i>cfwA<sup>+</sup>pyroB<sup>-</sup></i>	0 2 0		
CRO1	<i>cfwA2<sup>-</sup></i> <i>pabaA1</i> <i>yA1<sup>-</sup></i>	93* 44* 49*	<i>yA<sup>+</sup> dilA<sup>+</sup></i>	17 12 15	170 90 90	22 32 27
			<i>yA<sup>-</sup> dilA<sup>+</sup></i>	19 17 10		
			<i>cfwA<sup>-</sup>paba<sup>+</sup></i>	19 22 13		
			<i>cfwA<sup>+</sup>paba<sup>+</sup></i>	39 29 23		

Tabla 7 Resultados de la cruce entre la mutante CRO1 (*cfwA2*, *pabaA1*, *yA1*, *veA1*) y la cepa G1102 (*pyroB12*; *riboB2*, *veA1*). En la primera columna se muestran las cepas empleadas y en la segunda el genotipo de estas. La tercera columna muestra el total de la progenie analizado de tres cleistotecios. En el caso de la mutante no se puede distinguir si la cepa es *yA<sup>+</sup>* o *yA<sup>-</sup>* (\*), ya que al ser blanca no permite determinar de manera clara este marcador.

Al hacer un promedio de la recombinación total entre *pyroB12* y *cfwA2* obtenida para cada cleistotecio (0, 3.2 y 0) se obtuvo que *cfwA* se encuentra a aproximadamente 1.1 unidades de mapa o centimorgans (cM) (fig. 10).

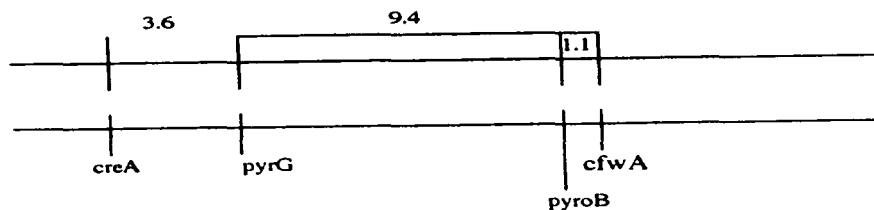


Figura 10 Distancia del gen *cfwA* respecto a *pyroB* y otros marcadores del cromosoma I de *A. nidulans*. Las distancias están dadas en unidades de mapa ó centiMorgans.

El resultado anterior de tres diferentes cleistotecios con un total de 1000 colonias analizadas mostró que el gen *cfwA* se encuentra a 1.1 cM del gen *pyroB*; aunque la relación entre la distancia entre dos genes medida por porcentaje de recombinación y la distancia física real, no siempre correlaciona de manera lineal, se ha observado que en *A. nidulans*, una unidad de mapa corresponde a aproximadamente a 6 Kb (Clutterbuck, 1994). De esta manera, una distancia entre *pyroB* y *cfwA* de 1.1 cM equivale a 6.6 Kb y en los cósmidos utilizados para transformar a las mutantes de *cfwA2* poseen insertos de 50 Kb lo que hace posible que al clonar el gen que codifique para *pyroB* en el mismo cósmido se encuentre el gen que codifique para *cfwA*. Para llevar a cabo esto se transformo a la cepa CDS6 (*pyroB12, riboB2, veA1*) los cósmidos seleccionados mediante la hibridación con el conjunto de genes que están involucrados con la síntesis de esterigmatocistina. Se siguió el protocolo de transformación como se describe en material y métodos con la variante de digerir los cósmidos y los plásmidos con NotI y PstI respectivamente ya que como se mostró anteriormente, esto aumenta la cantidad de transformantes. Los resultados se muestran en la tabla 8.

	Selección para riboflavina							Selección para piridoxina			
	sin ADN	pPL1	pPL1 lineal	pPL1 + cósmidos	pPL1 lineal + cósmidos	pPL1 + cósmidos lineal	pPL1 lineal cósmidos lineal	sin ADN	cósmidos	cósmidos lineal	cósmidos + pHelp
No total transformantes	-	87	305	50	69	87	87	-	-	-	-

Tabla 8 Resultados de la transformación de la cepa CDS6 con el conjunto de cósmidos identificados mediante la hibridación con los cósmidos que contienen a los genes involucrados en la síntesis de esterigmatocistina. Se utilizaron las siguientes concentraciones de ADN: pPL1 4 µg, digerido con PstI durante una hora y 1 µg de todos los cósmidos digeridos durante una hora con la enzima NotI y pHelp 2 µg.

Las 329 transformantes *riboB*<sup>+</sup> se repilaron a medio mínimo con el fin de seleccionar aquellas que pudiesen crecer sin piridoxina. Estas cepas serían transformantes para *pyroB*, y por lo tanto el cósmido en cuestión tendría una alta probabilidad de contener al gen *cfwA*. De las 329 colonias, solo 2 mostraron algún crecimiento, sin embargo cuando estas colonias se estrilaron para colonia aislada en medio mínimo mostrando un crecimiento bastante malo. Esto podría deberse a que la integración del cósmido que pudiera eliminar al auxotrofia a piridoxina se hubiese

integrado de manera que el gen *pyrG* se exprese de manera ineficiente. Estos resultados podrían sugerir que dentro de este conjunto de 13 cósmidos se encuentra el gen *pyroB* y probablemente *cfwA*, pero por razones que no entendemos, no complementan a la mutación *cfwA2*. Alternativamente, los cósmidos utilizados no contienen ni al gen *pyroB* ni al gen *cfwA*.

Recientemente Jahng K.Y. (comunicación personal) aisló una mutante con características similares a la *cfwA2*, es decir carece de pigmentación. Se encuentra alterada tanto en la esporulación sexual como asexual, también es capaz de ser complementada al crecer cerca de una cepa silvestre y finalmente se encuentra mapeada en el cromosoma y en la región en donde se encuentra mapeado *cfwA*. Mediante complementación lograron obtener al gen responsable de esta mutación: la secuencia parcial de este gen codifica para una poliketido sintetasa. Estos resultados en conjunto con los obtenidos en este trabajo permiten proponer que *cfwA* esta involucrada en la síntesis de metabolitos secundarios, aunque quedaría por demostrar que ambas mutantes son alélicas. Alternativamente ambas mutaciones no pertenecen a un alelo; sin embargo el que presenten un fenotipo tan parecido permite la posibilidad de que estén relacionadas en una vía común de síntesis de metabolitos secundarios. Esto abre la posibilidad que de igual manera que en el cromosoma IV se encuentra un conjunto de genes responsables de la síntesis de esterigmatocistina; en el cromosoma I se encuentre otro conjunto de genes responsables de la síntesis de diversos metabolitos secundarios, como por ejemplo la pigmentación, esterigmatocistina, etc.

#### OBTENCION DE POSIBLES SUPRESORES DE LA MUTACIÓN *cfwA2*.

La mutación *cfwA2* tiene efectos pleiotrópicos en la diferenciación de *A. nidulans*; es letal a 42°C y a 30°C la conidiación esta retrasada. Una vez que se producen las conidias, estas carecen de pigmentación. La mutante es además incapaz de producir esporas sexuales (Cárdenas, 1996) Y finalmente no produce esterigmatocistina (Guzmán, 1996). El analizar supresores extragenéticos, es un método poderoso para disectar las posibles interacciones de *cfwA* con los productos de otros genes y posiblemente identificar nuevas mutantes de interés.

Para obtener los supresores se hizo una curva de supervivencia tal como se describe en material y metodos; mutagenizado con luz UV de onda corta a la cepa CMC2 (*cfwA*, *pyroA*, *riboB*, *bia*, *veA*). Se tomaron muestras a los 0, 15, 30, 45, 60 90 y 120 segundos de exposición a la luz UV. Se graficaron los datos obtenidos (fig 11) y se seleccionó el tiempo en donde se obtuvo aproximadamente 90% de muerte.

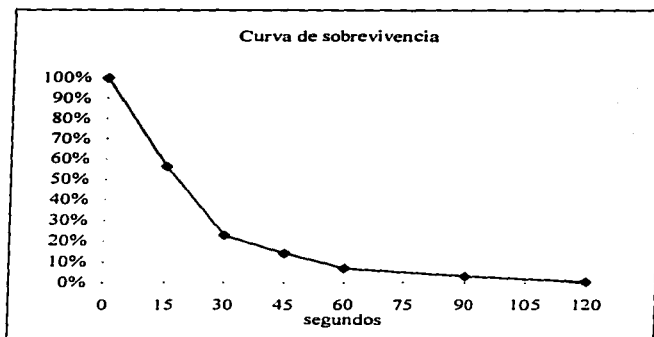


Figura 11 Curva de supervivencia de la cepa CMC2 (*cfwA*, *pyroA*, *riboB*, *biA*, *veA*) después de irradiar con luz UV durante 0, 15, 30, 45, 60 90 y 120 segundos.

A los 45 segundos se obtuvo aproximadamente el 90% de muerte. Para poder, posteriormente hacer análisis genéticos con los posibles supresores obtenidos, se decidió utilizar también a la cepa CRO1 (*cfwA2*, *pabaA1*, *yA1*, *veA1*). Así ambas cepas (CMC2 y CRO1) se irradiaron con luz UV por 45 segundos, se plaquearon y se analizaron en total  $1 \times 10^4$  colonias, incluyendo esporas mutagenizadas tanto de la cepa CMC2 como de la cepa CRO1.

Se seleccionaron 6 posibles supresores y 14 cepas donde el fenotipo *cfwA* se vio incrementado (esporas más blancas, conidiación retrasada) ó potenciadores de la mutación *cfwA* obtenidas a partir de la mutagenesis de las conidias de CRO1, así como 13 potenciadores de la mutación *cfwA* provenientes de la mutagenesis realizada a las esporas de la cepa CMC2 (fig. 12).

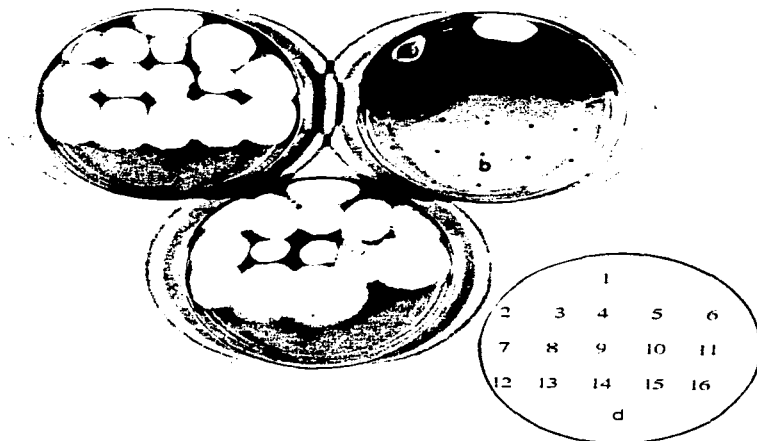


Figura 12 Supresores y potenciadores obtenidos después de mutagenizar con luz UV a las cepas CMC2 (*cfvA2, pyroA1, riboB.12 biA1, veA1*) y CRO1 (*cfvA2, pabaA1, yA1, veA1*). a), muestra los distintos potenciadores (2 a 5 y de 7 a 16) obtenidos de la cepa CRO1 (1); b), supresores (2 a 7) de CRO1 (1); c), potenciadores (2 a 14) provenientes de la mutante CMC2 (1). La numeración en cada caja es de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha como se muestra en el dibujo (d).

En las tablas 8, 9 y 10 se muestran las características fenotípicas de los supresores y potenciadores de la cepa CRO1 (tabla 8 y 9), de las mutaciones potenciadoras de CMC2 (tabla 10) y las características de las cepas CRO1 y CMC2.

		color	crecimiento	esporas	micelio aéreo	pigmento en el agar
1	CRO1	blanco amarillo	++	++++	+	-
2	sup1	amarillo claro	+++	+++++	en el centro de la colonia	++

		color	crecimiento	esporas	micelio aéreo	pigmento en el agar
3	sup2	amarillo oscuro	+++	+++++	-	+
		color	crecimiento	esporas	micelio aéreo	pigmento en el agar
4	sup3	amarillo oscuro	+++	+++++	-	+
5	sup4	amarillo oscuro	+++	+++++	-	+
6	sup5	amarillo oscuro	+++	+++++	-	+
7	sup6	amarillo oscuro	+++	+++++	-	+

Tabla 8 Características morfológicas de los supresores (sup) de la cepa CRO1 (*cfh1.2*, *paba1*, *ya1*, *ve1*) obtenidos después de la mutagenesis con UV. La primera columna se refiere al número asignado en la fotografía (fig. 12 b).

		color	crecimiento	esporas	micelio aéreo	pigmento en el agar	otro
1	CRO1	blanco amarillo	++	++++	+	-	
2	enh1	beige	+	++	++	+	
3	enh2	beige	++	+++	+	+	
4	enh3	beige	++	+++	+	+	
6	enh4	muy blanca	++	++++	+	-	
7	enh5	muy blanca	++	++++	+	-	esporas húmedas
8	enh6	muy blanca	+	+	++	+	células hülle abundantes
9	enh7	muy blanca	++	++++	+	-	
10	enh8	muy blanca	++	++++	+	-	
11	enh9	beige	++	-	+++	-	agua en la colonia
12	enh10	amarillo claro	+	-	++	+	células hülle abundantes
13	enh11	beige	++	+++	+	+	
14	enh12	blanca	++	++++	+	-	
15	enh13	blanca	++	++++	+	-	
16	enh14	beige	++	+++	++	+	

Tabla 9 Características morfológicas de los potenciadores de la mutación *cfwA* ó enhancers (enh) de la cepa CRO1 (*cfwA2*, *pabaA1*, *ya1*, *veA1*) obtenidos después de la mutagénesis con UV. La primera columna se refiere al número asignado en la fotografía (fig 12 a).

		color	crecimiento	esporas	micelio aéreo	pigmento en el agar
1	CMC2	blanco verde	++	++++	+	-
2	enh1	beige	++	++++	+	-
3	enh2	blanco	+	++	+++	-
4	enh3	blanco	++	++++	+	-
5	enh4	muy blanco	+	++	++++	+
6	enh5	blanco	+	+++	+++	-
7	enh6	beige	++	++++	+	-
8	enh7	blanco	+	++	+++	-
9	enh8	blanco	+	++	+++	-
10	enh9	blanco	-	++	++++	-
11	enh10	blanco	+	++	+++++	-
12	enh11	blanco	+	++	++++	+
13	enh12	beige	+++	++++	+++	-
14	enh13	beige	+++	++++	+++	-

Tabla 10 Características morfológicas de los potenciadores (enh) de la mutante CMC2 (*cfwA2*, *pyroA1*, *riboB*, *12 biA1*, *veA1*) obtenidos después de la mutagénesis con UV. La primera columna se refiere al número asignado en la fotografía (fig 9 c).

Para determinar si los supresores aislados de la cepa CRO1 eran reales o revertantes, se cruzaron cada uno con una cepa silvestre, TJA22 (*metG1*, *biA1*, *brlA(-2900p/l)::lacZ (argB<sup>+</sup>::argB::CAT)*) y se buscó dentro de la progenie de cada una de las cruzas si habia una población que presentara el fenotipo de la mutante *cfwA2*. Las cruzas en las que se encontrara esta población mostrarían que la cepa empleada es un supresor y no una reversión de la mutación *cfwA2*. También se hicieron cruzas con la cepa CMC2 (*cfwA2*, *pyroA1*, *riboB*, *12 biA1*, *veA1*) para ver si los supresores eran capaces de complementar de manera extra celular a la mutación en *cfwA*, ya que de no complementar a la mutación podrían clasificarse como

supresores y no como revertantes. Los resultados de estas cruzas demostraron que los supresores 2, 3, 4, 5, 6 y 7 son en realidad revertantes de la mutación en *cfvA2*, mientras que el supresor 1 si es un supresor extragénico de *cfvA2*.

Posteriormente se creció a los supresores a 37°C durante 72 h para observar si conservaban las características morfológicas observadas a 30°C (tabla 8). Al incubarlos a 37°C, los resultados mostraron que todos los supresores excepto el No. 1, conservaron las características descritas en la tabla 8 y se observaron igual que en la figura 9 b, es decir completamente silvestres. Solo el supresor 1 formó conidias blancas, pero su crecimiento no se vio afectado. Esto sugiere que el supresor 1 suprime parcialmente los efectos de la mutación *cfvA*.

- Grupos de complementación

Para determinar si los potenciadores obtenidos son diferentes entre si o pertenecen a un mismo tipo de mutación que causa que el fenotipo de la mutación *cfvA2* se incremente, se decidió llevar a cabo pruebas de complementación en diploides, entre los potenciadores obtenidos a partir de CRO1 y los potenciadores provenientes de CMC2. Los resultados se muestran en las tablas 11 y 12.

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
enh6CRO1	enh4CRO1	enh13CRO1	enh12CRO1	enh11CMC2
enh4CMC2	enh7CRO1	enh14CRO1	enh5CMC2	
enh7CMC2	enh8CRO1	enh12CMC2		
enh8CMC2	enh3CMC2			
enh9CMC2				
enh10CMC2				

Tabla 11 Grupos de complementación obtenidos de los potenciadores de la mutación *cfvA2*. Agrupadas como alélicas entre sí de acuerdo con el criterio de no complementación en diploides. El grupo A resultó ser no alélico al D, mientras que el grupo E resulto no ser alelico del grupos A, B y D.

Estos resultados (tabla 11) definen al menos 4 grupos de complementación (A, B, D y E) y quedaría por determinar si el grupo C es alélico de alguno de los demas grupos (no se probó). De los potenciadores 1, 2, 3, 5, 9, 10 y 11 provenientes de la mutante CRO1 y 1, 2, 6 y 13 de CMC2 faltaría determinar si forman un grupo adicional o si pertenecen a alguno de los grupos ya definidos por lo que faltaría realizar las cruzas entre estos potenciadores y con algún representante de los grupos



ya definidos. Algunas de estas cruzas fueron realizadas y los resultados se muestran en la (tabla 12).

Potenciadores	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
enh1CRO1	≠	?	?	≠	≠
enh2CRO1					
enh3CRO1	?	?	?	?	≠
enh5CRO1					
enh9CRO1	≠	?	?	?	≠
enh1CMC2	?	≠	?	?	?
enh6CMC2					
enh2CMC2	≠	?	?	?	?
enh13CMC2	?	?	≠	?	?

Tabla 12 Potenciadores de la mutación *cfvA2* no asignados a un grupo específico. ≠ no pertenece a ese grupo de complementación en particular. ?, no determinado.

De los potenciadores obtenidos, existe la posibilidad de que sean mutaciones previamente descritas, como por ejemplo la mutación en *wA*, que como se describió anteriormente, genera conidias blancas, y al estar presentes ambas mutaciones en una cepa harían que esta fuera mas blanca que una únicamente con la mutación *cfvA2* (por ejemplo los potenciadores 6 y 7 de CRO1; figura 9). Por otra parte, se han descrito una serie de mutantes que se caracterizan por tener gran cantidad de micelio aéreo dando como resultado un fenotipo algodonoso (*fluffy*) (cita), las cuales al estar presentes en un contexto que contiene a la mutación en *cfvA2* harían que la mutante presentara una mayor cantidad de micelio aéreo, fenotipo de algunos potenciadores obtenidos después de la irradiación con UV de la mutante *cfvA2*, como los potenciadores 12 y 13 provenientes de la cepa CMC2 (fig 9). Después de cruzar una representante de los distintos grupos de complementación obtenidos, son una cepa silvestre, permitiría saber si las mutaciones potenciadoras de *cfvA* son capaces de conferir o no un fenotipo (esporas blancas como *wA* ó fenotipo *fluffy*) en un fondo *cfvA*<sup>+</sup>.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Del presente trabajo se puede concluir que:

- La acumulación de ácidos grasos en las pozas de la célula y en las membranas no se afecta a causa de la mutación en el gen *cfwA*. Mas aún la mutante responde de la misma manera que una cepa silvestre cuando se eleva la temperatura de 30°C a 42°C sintetizando y/o degradando la misma proporción de ácidos grasos.
- Existen diferencias en la acumulación de metabolitos secundarios entre una cepa silvestre y la mutante *cfwA2*. Lo que probablemente cause el fenotipo característico de la mutante *cfwA2*. Sería intresante determinar si alguno de los compuestos que se observan en la cepa silvestre y no en la mutante es capaz de rescatar el fenotipo de la mutante al ser aplicado cerca de esta, o de manera alternativa si alguno de los compuestos acumulados en la mutante es causar el fenotipo característico de la mutación en *cfwA2* al aplicarlo a una cepa silvestre. De no ser éste el caso es importante tratar de determinar la identidad de la molécula que complementa a la mutante al ser crecida cerca de una cepa silvestre, así podrían aislarse metabolitos como en este trabajo y hacer purificaciones con otros solventes con el fin de identificar metabolitos diferentes a los identificados en este trabajo que posiblemente complementen la mutación en el gen *cfwA*.
- Ninguno de los cósmidos probados en este trabajo parece contener al gen *cfwA* aunque no es posible descartar totalmente a los cósmidos L16F04, L16G03, L22H12, W02B10, W02D10, W02G10, W03E09, W05H06, W19D02, W21E06, W27B07, W29F07 y W30F12, seleccionados por hibridar con el conjunto de genes que codifican para las proteínas necesarias para la síntesis de esterigmatocistina en *A. nidulans*, debido a que complementan parcialmente a la mutación *pyroB*, que se encuentra a 1.1cM de *cfwA*. Con el fin de complementar a la mutación en *cfwA* es posible utilizar la técnica de "chromosome walking" utilizando a los cósmidos que complementan a *pyroB* como sonda e identificar nuevos cósmidos que posiblemente contengan a *cfwA*. De manera alternativa sería interesante utilizar los cósmidos que hibridaron débilmente con conjunto de genes involucrados en la síntesis de esterigmatocistina que se encuentran ubicados en el mapa físico cerca de los cósmidos obtenidos a partir de "chromosome walking" o que contienen a la acetil

CoA carboxilasa o al gen *pyrG*, que se utilizaron para complementar a la mutante *cfvA2*.

Sin embargo recientemente se describió una mutante de *A. nidulans* la cual tiene las mismas características que la mutante *cfvA2*, además se encuentra mapeada en el cromosoma I en la región donde mapea *cfvA2*. Mediante complementaciones se logró colonar el gen y secuenciarlo parcialmente, logrando determinar la identidad de este, los resultados indican que codifica para una polícétido sintetasa; queda por determinar mediante análisis genéticos si las mutaciones son alélicas entre sí .

●De los supresores aislados, el asignado con el número 1 es el único supresor real; ya que los demás supresores resultaron ser revertantes de la mutación en el gen *cfvA*. Esta mutación suprime parcialmente la falta de pigmentación de las conidias; pero no suprime ningún otro defecto de la mutante *cfvA2*. Posiblemente no se pueden obtener supresores en otra vía afectada por la mutación en *cfvA* ya que se analizaron un total de  $1 \times 10^4$  colonias dentro de las cuales podrían haberse seleccionado diversas supresores y en cambio se obtuvieron 5 revertantes de la mutación en *cfvA*. Es interesante estudiar a este supresor y observar el fenotipo del supresor sin el fondo genético de la mutación *cfvA2*. Por otra parte los potenciadores de la mutación *cfvA2* obtenidos, permiten estudiar genes que posiblemente interaccionen con el producto del gen *cfvA*, por lo cual es interesante estudiar a estos potenciadores, eliminando aquéllos que sean genes ya conocidos , así como analizar el fenotipo de los diferentes potenciadores en un contexto donde no se encuentre la mutación *cfvA*, siendo interesantes aquellos que dependan de la mutación en *cfvA* para presentar un fenotipo particular. También resultan interesantes aquellos potenciadores que por si solos tengan un fenotipo diferente a una cepa silvestre y se encuentren afectados en diferentes procesos, como la diferenciación, el crecimiento, la síntesis de pigmentos o la síntesis de otros metabolitos secundarios como la esterigmatocistina.

## REFERENCIAS

- Aguirre-Linares J. (1992) *Aspergillus nidulans* como sistema experimental, y la esporulación como modelo de diferenciación celular y regulación genética. *Ciencia* **43** 445-450.
- Ballance, D. J., Buxton, F. P. y Turner, G. (1983) Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'- phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **112**:284-289.
- Brown, D. W. (1993). Structural elucidation of a putative conidial pigment intermediate in *Aspergillus parasiticus*. *Tetrahedron Letters*, **34**: 419- 422.
- Brown, D. W., Yu J. H., Kelkar, H. S., Fernandes M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H. y Leonard, T. J. (1995) Twenty- five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1418-142
- Cárdenas M. (1996) Una nueva mutante de *Aspergillus nidulans* afectada diferencialmente en el crecimiento y la esporulación. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias UNAM
- Champe, S.P. y El-Zayat, A.A. (1989). Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J.Bac.* **171**: 3982-3988.
- Champe S.P., Nagle D.L. y Yager L.N. (1994) Sexual Sporulation En : *Aspergillus 50 years on*. (S.D. Martinelli y J.R. Kinghorn Eds.) Elsevier 429-453.
- Clutterbuck, A.J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **63**: 317-327.
- Clutterbuck, A. J. (1972) Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans* . *J General Microbiol* .**70**: 423-435.
- Clutterbuck, A. J. (1994) Linkage map and locus list En : *Aspergillus 50 years on*. (S.D.Martinelli y J.R. Kinghorn Eds.) Elsevier 791-824.

- Cross S.H. y Little P. F. R., (1986) A cosmid vector for systematic chromosome walking. *Gene* **49**: 9-22.
- Grigorov, I., Aleksieva, P., Djerova, A., Sheremska, P. y Tchorbanov. G., (1983) Selection of gamma-ray mutants from a strain of *Humicola lutea* 72 producing acid proteases *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**:355-357.
- Gems D., Johnstone L. L. y Clutterbuck, A. J., (1991) An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency *Gene* **98**: 61-67.
- Guzmán D., (1996) Regulación de la síntesis de micotoxinas durante el desarrollo de *Aspergilli*. Tesis doctoral. CINVESTAV. Departamento de Genética y Biología Molecular.
- Hansberg W. y Aguirre J. (1990) La diferenciación celular en microorganismos. *Ciencia* **41**: 21-28.
- Hopwood D.A. y Sherman D. H., (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Ann. Rev. Genet.* **24**: 37-66.
- Hori., T., Nakamura, N. y Okoyama, H. (1987) Possible involvement of acetyl-CoA carboxilase as well as fatty acid synthetase in the temperature controlled synthesis of fatty acids. *J. Biol. Chem.* **101**:949-956
- Käfer E., (1997) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus nidulans* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet* **19**:33-131
- Kates M. (1972) General analytical procedures En: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Techniques of lipidology. (Work T. S. y Work E. eds.) Elsevier 354-390.
- Lee B. N. y Adams T. H., (1995) *fluG* and *flbA* function interdependently to initiate conidophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* activation. *EMBO J.* **14**: 299-309.

- Martinelli S.D (1994) *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. En : *Aspergillus 50 years on*. (S.D. Martinelli y J.R. Kinghorn Eds.) Elsevier 33-53.
- Mayorga, M. E. y Timberlake, W. E. (1990) Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* wA gene. *Genetics*. **126**: 73-79.
- Mazur, P., Meyers, H.V., Nakanishi, K., El-Zayat, A.A. y Champe .S.P. (1990) Structural elucidation of sporogenic fatty acid metabolites in *Aspergillus nidulans*. *Tetrahedron Letters*, **31**: 3837-3840.
- Mazur, P., Nakanishi, K., El-Zayat, A.A. y Champe .S.P. (1991) Structure and synthesis of sporogenic psi factors from *Aspergillus nidulans*. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1486-1487.
- Miller, K. Y., Toennis, T. M., Adams, T. H, y Miller, B. L. (1991) Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Mol. Gen. Genet.* **227** : 285-292.
- Miller, K. Y., Wu J. y Miller, B. L. (1992) StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*. *Genes and Development*, **6**: 1770-1782.
- Mohamed, A. H., Chirala, S. S., Mody, N. H., Huang, W. y Wakil. S. J. (1988) Primary structure of the multi functional alpha subunit protein of yeast fatty acid synthetase derived from FAS2 gene. *J. Biol. Chem.* **263**:12315-12325.
- Oakley, C. E., Weil, C. F., Kretz, P. L. y Oakley, B. R., (1987) Cloning of the *riboB* locus of *Aspergillus nidulans*. *Gene* **53**:293-298.
- Penefsky, H.S., (1977) Reversible binding of Pi by beef heart mitochondria adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **252**:2891-2899.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M. MacDonald, K.D. y Bufton, A W. J., (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv in Gen.* **5**: 141-239

- Rhoshanara, B. y Shanmugasudaram, E.R.B., (1980) Lipid components variation among the temperature sensitive mutants and wild strain in *Aspergillus nidulans*. *Ital. J. Biochem.* **30**:127-140.
- Sambrook , J., Fritsch, E. f. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schweizer, E., Kottig, H., Regler, R. y Rottner, G. (1989) Genetic control of *Yarrowia lipolytica* fatty acid synthetase, biosynthesis and function. *J. Basic. Microbiol.***28**:283-292.
- Sewall T., Mims, C.W. y Timberlake, W.E. (1990 a) *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *The Plant Cell.* **2**:731-739
- Sewall T., Mims, C.W. y Timberlake, W.E. (1990 b) Conidial differentiation in wild type and *wetA*<sup>-</sup> strains of *Aspergillus nidulans*. *Developmental Biology* **138**:499-508
- Skory, C. D., Chary, P. K., Cary, J. y Linz, J. E. (1992) Isolation and characterization of a gene from *Aspergillus parasiticus* associated with the conversion of versicolorin A to sterigmatocystin in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3527-3537.
- Tilburn, J., Saczochio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A. y Davies, R. W. , (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*.*Gene* **26**:205-221.
- Timberlake W.E. y Clutterbuck A.J. (1994) Genetic regulation of conidiation En : *Aspergillus 50 years on*. (S.D.Martinelli y J.R. Kinghorn Eds.) Elsevier 383-427
- Timberlake W.E. y Marshall M.A. (1988) Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *TIG* **4**: 162-169.
- Toal D. R., Clifton S. W., Roe B. A. Y Donwnard J. (1995) The *esg* locus of *Mycococcus xanthus* encodes the E1 $\alpha$  and E1 $\beta$  subunits of a branched-chain keto acid dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* **16**(2): 177-189.

- Turner, G., (1994) Vectors for genetic manipulation En : *Aspergillus 50 years on.* (S.D.Martinelli y J.R. Kinghorn Eds.) Elsevier 641-665.
- Vazquez-Duhalt R. y Arredondo-Vega B. O., (1991) Haloadaptation of the green alga *Botryococcus brauni* (race A). *Phytochem.* **30**:2919-2925.
- Ward M. (1991) *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems. *Modern Microbial Genetics* 455-496.
- Wheeler M. H., y Klich M.A. (1995) The effects of tricyclazole, pyroquinol, phtalide and related fungicides on the production of conidial wall pigments by *Penicillium* and *Aspergillus* species. *Pestic. Biochem. Physiol.* **52**:125-136
- Wogan, G. N., Househam, K. C. y Hundt, H. K. (1992). Aflatoxins risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res.* **52**:2114s-2118s.
- Yu, J. H., Cory, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Keller, N. P. y Chu, F. S. (1993) Cloning and characterization of a cDNA of *Aspergillus parasiticus* encoding a o-methyltransferase involved in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3564-3571
- Yu J. H. y Leonard T. J. (1995) Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. *J. Bacteriol* **177**:4792- 4800.