

00346 5  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Una nueva mutante de  
*Aspergillus nidulans*  
afectada diferencialmente en  
el crecimiento y la esporulación**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**Maestría en Ciencias**  
**( Biología Celular )**  
PRESENTA  
**Q.F.B. Maura Cárdenas García**

Director de Tesis :  
Dr. Jesús Aguirre Linares

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

*Dedico este trabajo con todo cariño*

*a mi mamá*

*Maura García de Cárdenas*

*a mi papá, hermanas y hermanos*

*Daniel Cárdenas Chimal*

*Danielito*

*Güerin*

*Ramincitittí...to*

*Peque y*

*Lili*

*a mis cuñadas, sobrino y sobrinas*

*Lina*

*Gaby*

*Linita*

*Sergito*

*Almendrita*

*y*

*Pequita*

Jesus Aguirre Linares gracias por permitirme realizar este trabajo y por lo mucho que aprendi de ti.

Agradesco a los miembros del jurado sus comentarios y el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo, especialmente a las doctoras Carmen Gómez y Marieta Tuena por formar parte de mi comite tutorial y contribuir al buen desarrollo de este trabajo.

Agradesco a mis compañeros de laboratorio por los buenos momento que compartimos, así como las discusiones que contribuyeron en el desarrollo de este trabajo, especialmente a Denhi Schnabel, Monica Magidin, Isaac Skromne, Laura Kawazaki y a Rosalinda Tápia por picar piedra por mi.

Agradesco también a mis compañeros de clase por los buenos momentos que compartimos especialmente a mis amigos Aida Uribe y Francisco Arenas, junto con los que comparti, comparto y espero seguir compartiendo la vida.

Agradesco también a mis amigas de toda la vida el compartir conmigo y apoyarme en todo. Maruca Arriaga, Elizabeth Jimenez, Silvia Suarez, Margarita Cruz, Cuca Pedroza, Gloria Chavez, Malena y Fernando.

**CONTENIDO**

<b>I.</b>	Indice .....	<i>i</i>
<b>II.</b>	Resumen .....	<i>iii</i>
<b>III.</b>	Introducción.....	1
<b>IV.</b>	Objetivos.....	21
<b>V.</b>	Materiales y Métodos.....	22
<b>VI.</b>	Resultados y Discusión.....	40
<b>VII.</b>	Discusión General y Conclusiones .....	68
<b>VIII.</b>	Referencias.....	73

## I. INDICE

<b>II. RESUMEN</b> .....	v
<b>III. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Diferenciación celular. ....	1
2. <i>Aspergillus nidulans</i> como modelo de diferenciación celular .....	2
3. Genética de la conidiación en <i>Aspergillus nidulans</i> . ....	6
4. Genética de la pigmentación de las conidios en <i>Aspergillus nidulans</i> . ....	14
5. Genética molecular de los policétidos y su comparación con la biosíntesis de ácidos grasos. ....	16
6. Factores Psi. ....	19
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
1. Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> . ....	22
2. Plásmidos y Cósmidos empleados en este trabajo. ....	24
3. Condiciones de crecimiento. ....	25
4. Obtención de la cepa mutante. ....	25
5. Obtención de diploides. ....	26
6. Cruzas sexuales. ....	27
7. Obtención y cuantificación de esporas. ....	27
8. Aislamiento y purificación de DNA genómico de <i>Aspergillus nidulans</i> . ....	28
9. Extracción de DNA de plásmidos o de cósmidos. ....	29
10. Aislamiento y Purificación de RNA de <i>Aspergillus nidulans</i> . ....	29
11. Cuantificación de ácidos nucleicos. ....	33
12. Hibridación tipo northern. ....	34
10. Hibridación tipo Southern. ....	34
11. Efecto de PsiA. ....	35
12. Efecto de Soraphen A®. ....	35
13. Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i> . ....	36
14. "Caminata por el cromosoma" ( <i>Chromosome walking</i> ). ....	38
15. Extracción y determinación de ácidos grasos libres. ....	39

<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	40
<b>1.0 Caracterización fenotípica de la cepa mutante.</b> .....	40
1.1 Complementación extracelular.	
<b>2.0 Caracterización genética de la cepa mutante</b> .....	44
2.1 La mutación es en un sólo gen.	
2.2 Localización cromosomal de la mutación.	
2.3 Mapeo Genético de <i>cfwA2</i> .	
2.4 <i>cfwA</i> es un gen esencial.	
<b>3.0 Estudio del retraso de la conidiación en la mutante <i>cfwA2</i></b> .....	49
3.1 Expresión del gen <i>brlA</i> .	
3.2 Expresión del gen <i>fluG</i> .	
<b>4.0 Producción de conidios blancos en mutantes <i>cfwA2</i></b> .....	53
4.1 Expresión del gen <i>waA</i> .	
<b>5.0 Autoesterilidad en mutantes <i>cfwA2</i></b> .....	55
5.1 Efecto del factor PsiA.	
<b>6.0 Posible relación entre el producto del gen <i>cfwA</i> y la acetil-CoA carboxilasa.</b> .....	57
6.1 Efecto de Soraphen A <sup>®</sup> sobre una cepa silvestre de <i>Aspergillus nidulans</i> .	
6.2 Transformación de una cepa mutante con cósmidos que presumiblemente contienen el gen de la acetil-CoA carboxilasa.	
6.3 "Caminata" en el cromosoma I a partir de <i>pyrG</i> .	
6.4 Determinación de ácidos grasos libres, en una cepa mutada en <i>cfwA</i> .	
<b>VII. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES</b> .....	68
<b>VIII. REFERENCIAS</b> .....	73

## III. RESUMEN

La diferenciación celular puede ser estudiada desde distintos puntos de vista. En nuestro laboratorio hemos elegido abordar este problema desde un enfoque genético. La esporulación asexual (conidiación) del hongo *Aspergillus nidulans* es un excelente modelo para abordar problemas de diferenciación celular. El aislamiento y caracterización de mutantes bloqueadas en etapas específicas de la conidiación, ha sido fundamental para entender este proceso.

En este trabajo se reporta la caracterización de una nueva mutante de *A. nidulans* afectada en la conidiación. Esta mutante se obtuvo por mutagénesis con luz UV y se seleccionó por su incapacidad para crecer bien a 42°C y por sus defectos morfológicos.

Nosotros determinamos que las características de esta nueva mutante resultan de la mutación de un solo gen designado *cfwA* (*cross feedable white*) el cual localizamos en el brazo derecho del cromosoma I. Al parecer *cfwA* es un gen esencial para la vida ya que determinamos que una mutante aislada independientemente (*cfwA1*), que para crecer requiere de la cercanía de una cepa silvestre, es alélica a la aquí reportada.

Las mutantes *cfwA2* son incapaces de crecer bien a 42°C, mientras que a 30°C crecen bien pero presentan un retraso en la esporulación asexual. Nosotros encontramos que este retraso está relacionado con la expresión tardía del gen *brlA*, gen esencial para la conidiación. También determinamos que el retraso en la expresión de este *brlA*, no está relacionado con la falta de expresión del gen *fluG*, reportado recientemente como necesario para la activación de *brlA* y cuya mutación también da lugar a un retraso en la esporulación. El retraso en la conidiación se revierte parcialmente en presencia del factor PsiA (precocious sexual inducer), este factor funciona como hormona y promueve la reproducción asexual en *A. nidulans*. Sin embargo, la mutante *cfwA2* produce tanto las enzimas que participan en la síntesis de este factor (Champe, comunicación personal), por lo que el retraso en la esporulación pudiera estar relacionado con la falta de precursores para la síntesis de diversos compuestos, entre los que se encontraría el factor PsiA.

Una vez que el gen *brlA* se expresa, la conidiación ocurre normalmente en la mutante *cfwA2*, excepto por que los conidios producidos son blancos en lugar de pigmentados. La síntesis de los pigmentos de los conidios depende de los genes *wA* e *yA*, cuya expresión también está regulada por *brlA*. El producto del gen *wA* es una policétido sintasa necesaria para la producción de pigmento a partir de un precursor incoloro (posiblemente acetil-CoA) y su mutación da lugar a conidios blancos. Dado que si encontramos expresión del gen *wA* durante la conidiación de esta mutante, el fenotipo de esporas blancas no puede explicarse por la falta de expresión de *wA*, pero podría explicarse por la falta del precursor incoloro sobre el cual actúa la proteína *WA*. Cabe mencionar que la mutante produce un perfil de policétidos diferente al de una cepa silvestre (Schnabel y Aguirre, comunicación personal) y es incapaz de producir esterigmatocistina, policétido precursor de aflatoxinas (Ruiz-Herrera, comunicación personal). Estos datos indican una alteración general en la producción de policétidos.

Observamos que el desarrollo sexual también está alterado en esta mutante ya que es capaz de formar células Hülle (nodriza), pero incapaz de producir cleistotecios (cuerpos fructíferos que contienen ascosporas ó esporas sexuales) viables por si sola.

La sensibilidad a temperatura, el retraso en la conidiación, la producción de conidios blancos y la incapacidad para producir cleistotecios se revierten por complementación extracelular.

Al crecer a una cepa silvestre a un lado de la mutante, en la interfase se producen conidióforos pigmentados y en las condiciones adecuadas, cleistotecios. Esta complementación extracelular no se observó al interponer una membrana de diálisis o un papel filtro entre ambas cepas, ni tampoco al adicionar a la cepa mutante extractos de una cepa silvestre. Aunque aún no hemos podido identificar la naturaleza del factor de complementación, sabemos que las esporas recuperadas de las zonas de complementación poseen un genotipo *cfwA2*, lo cual sugiere que no hay fusión de hifas entre la cepa mutante y la silvestre.

Considerando que nuestra mutante presenta alteración en la producción de pigmentos derivados de policétidos y posiblemente en la producción de hormonas derivadas de ácidos grasos, cuyo precursor común es sintetizado por la enzima acetil-CoA carboxilasa, exploramos si



la mutación en *cfwA2* ocurría en esta enzima, mediante la transformación de una cepa *cfwA2* con cósmidos que supuestamente contenían el gen de la acetil-CoA carboxilasa. Sin embargo, ninguno de estos cósmidos complementó la mutación. También se transformó con cósmidos cercanos al gen *pyrG*, dada la cercanía entre *cfwA* y *pyrG* según nuestro mapa genético. Tampoco estos cósmidos complementaron a la mutante *cfwA2*. Por otra parte, determinamos el perfil de ácidos grasos en la cepa mutante y en una cepa silvestre a 30°C y 42°C. Encontramos que los perfiles eran muy similares a 30°C, sugiriendo que la síntesis de ácidos grasos no está alterada en la mutante *cfwA2*. Sin embargo, si se detectaron algunas diferencias a 42°C, por lo que estos datos requieren ser confirmados.

De acuerdo con los resultados reportados en este trabajo, proponemos que el gen *cfwA* está involucrado en la síntesis de un metabolito esencial, el cual se requiere en mayor demanda durante la esporulación. La mutación *cfwA2* daría lugar a un polipéptido alterado posiblemente sensible a temperatura y con una función parcial a 30°C, pudiendo por ello crecer bien pero no esporular igual que una cepa silvestre. En estas condiciones, la producción de policétidos y posiblemente factores hormonales se vería severamente afectada. A 42°C, ocurriría una pérdida total de la función de la proteína CfwA.

### III. INTRODUCCIÓN

#### 1. Diferenciación celular.

Durante la diferenciación de las células se dan una serie de cambios genéticos y morfológicos que permiten, observar por ejemplo, que a partir de una sola célula se pueden obtener individuos completos formados por diferentes tipos celulares. Al estudiar la diferenciación celular desde un punto de vista genético, se ha dilucidado paulatinamente que existe una expresión diferencial de genes, cuyos productos modulan y determinan los cambios que sufre la célula. La expresión genética y los procesos de diferenciación, tanto en procariotes como en eucariotes, suelen ser controlados además por múltiples señales fisiológicas y ambientales, tales como el estado nutricional, el ciclo celular, diversas señales hormonales y los contactos célula/célula. Generalmente es necesaria la combinación de todos estos factores para que los procesos de diferenciación ocurran. En todos los organismos deben existir mecanismos que registren e integren las diversas señales y den inicio a los procesos de diferenciación, para coordinarlos de manera adecuada. Afortunadamente, es posible emplear modelos de estudio ya que muchos de los mecanismos de regulación y patrones de desarrollo se encuentran conservados y presentan características comunes tanto en eucariotes como en procariotes (Cole, 1986).

No obstante los múltiples modelos, estrategias y técnicas experimentales desarrolladas, no ha sido posible comprender en su totalidad la naturaleza de los mecanismos de regulación que determinan si un microorganismo continúa creciendo o si entra en un proceso de diferenciación. Se ha observado que los procesos de diferenciación celular en los microorganismos son inducidos frecuentemente en condiciones que tienen efectos negativos sobre el crecimiento. Durante la diferenciación se producen cambios estructurales y fisiológicos que permiten soportar las condiciones adversas. Se ha propuesto que las señales ambientales de cualquier tipo finalmente generan un estado hiperoxidante que dispara los procesos de diferenciación (Hansberg y Aguirre, 1990).

La formación de esporas en los microorganismos es un ejemplo claro de diferenciación celular. El enfoque genético aborda este problema aislando mutantes bloqueadas en la esporulación, tanto para identificar, a los genes que participan en la esporulación, como para entender el mecanismo por el cual se controla su expresión.

## **2. *Aspergillus nidulans* como modelo de diferenciación celular.**

*Aspergillus nidulans* está clasificado taxonómicamente como hongo filamentosos en la subdivisión Ascomycotina. Los ascomicetos se caracterizan por tener esporas sexuales (ascosporas), producidas dentro de una estructura similar a un saco, llamado ascus. *A. nidulans* es un hongo saprófito que puede encontrarse en el suelo o como moho en los alimentos. En el laboratorio puede crecer en un medio simple y definido, en el que se pueden variar un gran número de fuentes de carbono o de nitrógeno, lo cual hace posible el estudio de la regulación de las vías metabólicas que se requieren para la asimilación de estos catabolitos (Raper y Fennel, 1965; Fennel, 1977).

Los estudios sobre *Aspergillus nidulans*, los iniciaron Pontecorvo y sus colaboradores a finales de los 40s y la mayoría de las cepas empleadas en la actualidad son derivadas de las aisladas originalmente por ellos (Pontecorvo et al., 1953). *A. nidulans* constituye un modelo experimental excelente debido a que posee un ciclo sexual bien caracterizado y un mapa genético con más de 400 genes identificados en sus 8 cromosomas. Tiene también un ciclo parasexual mediante el cual se forman diploides estables, proporcionando información inmediata sobre las relaciones alélicas y/o sobre la dominancia entre las diferentes mutaciones, así como la posibilidad de determinar en qué cromosoma se encuentra el gen que se ha mutado a través de la haploidización de los diploides. Los conidios de *A. nidulans* presentan un solo núcleo haploide con un genoma de  $2.4 \times 10^7$  pb, lo que facilita la mutagénesis y consecuentemente el aislamiento de una amplia gama de mutantes morfológicas y nutricionales (Aguirre et al., 1990; Timberlake, 1991b; Timberlake y Marshall, 1988; Ward, 1991; Champe y Simon, 1992; Aguirre, 1993).

**•Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*.**

*A. nidulans* es un organismo homotálico, que forma células especializadas llamadas esporas. Durante el ciclo de vida pueden observarse cuatro etapas: crecimiento vegetativo, ciclo sexual, ciclo parasexual y ciclo asexual (Figura 1).

La hifa crece por extensión apical y ramificación de las hifas. El crecimiento polar es una característica de los hongos filamentosos, que ocurre al depositarse precursores de la pared celular y enzimas polimerizantes en el extremo apical de la hifa (Oliver, 1972; Bartnicki-García, et al., 1978; Cole, 1986; McKerracher y Heath, 1987).

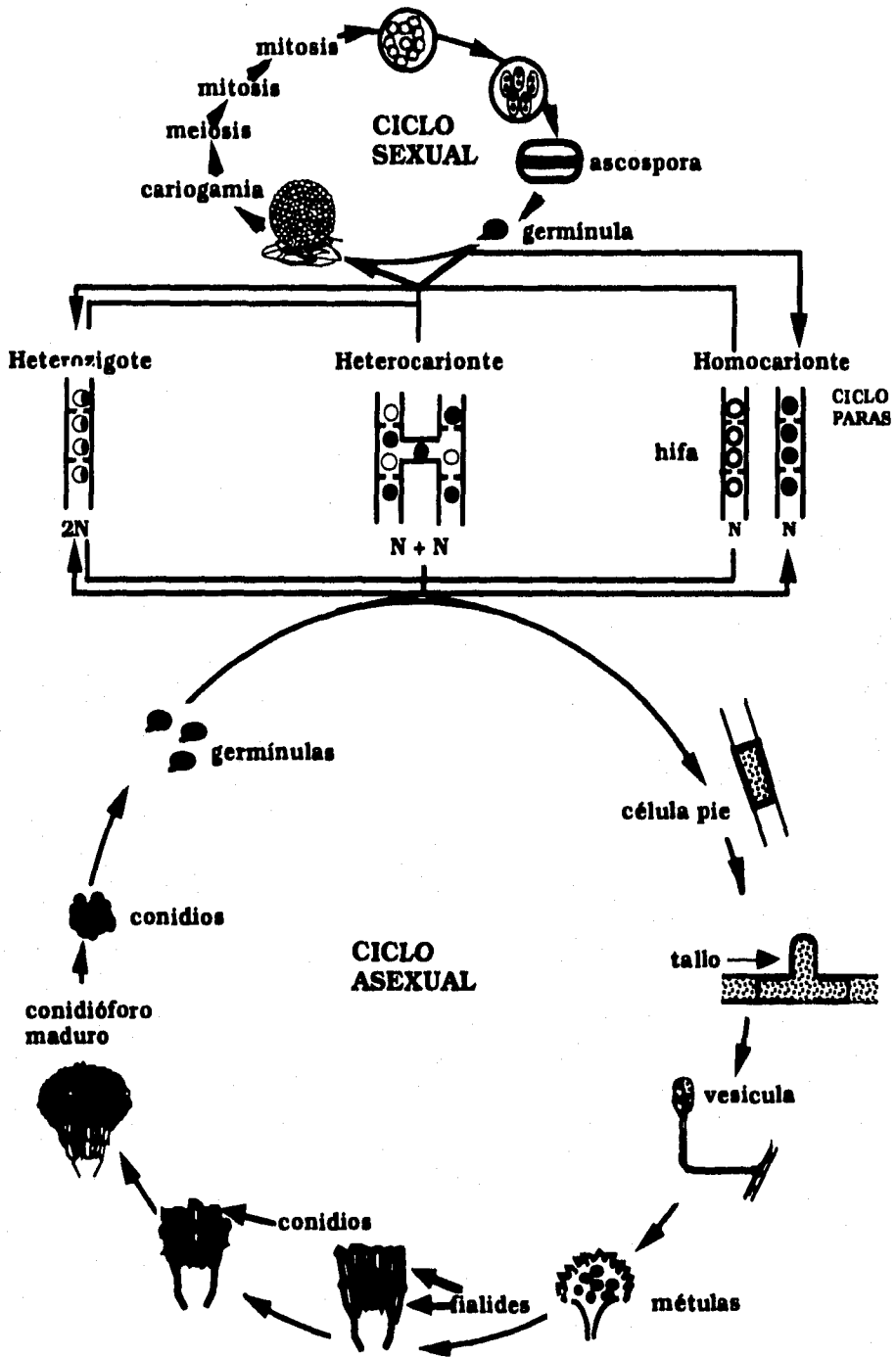
Cuando el micelio vegetativo se expone al aire, o se limita de nutrimentos en medio líquido, se induce el desarrollo asexual, que se caracteriza por la sustitución del crecimiento polarizado por un crecimiento por gemación, que culmina en la formación de una estructura multinucleada llamada conidióforo. Los conidios (esporas asexuales) de este conidióforo, en condiciones adecuadas, germinan y forman un nuevo micelio (Smith, et al., 1977; Clutterbuck, 1977; Boylan, et al., 1987, Skromne, et al., 1995).

La capacidad de formar conidios no se alcanza sino hasta después de un periodo de crecimiento de aproximadamente 18 a 20 h (a partir de la germinación de los conidios). A este punto de "madurez" se le ha denominado capacidad de formar conidios. Antes de alcanzar la capacidad de formar conidios, la exposición del micelio al aire no induce la conidiación. Sin embargo, después de alcanzarla la inducción resulta en la expresión secuencial de numerosos genes específicos de este proceso (Axelrod, 1972; Axelrod, et al., 1973; Champe, et al., 1981; Timberlake, 1980; Zimmerman, et al., 1980; Boylan, et al., 1987).

El ciclo sexual requiere de la fusión de las hifas (ya sea de la misma cepa o de cepas distintas) y de los núcleos para formar un diploide (2N) que puede ser estable o inestable. Las células diploides, en baja tensión de oxígeno o en la obscuridad, forman agregados. Algunas células de los agregados se hinchan y forman las células Hütle que protegen al cleistotesio o cuerpo fructífero. En su interior ocurre una cariogamia, una meiosis y varias divisiones mitóticas consecutivas para formar los ascos que contienen a las ascosporas (esporas binucleadas haploides, N).

Al germinar en condiciones adecuadas, las ascosporas reinician el ciclo de vida del hongo, dando origen a un micelio haploide (Zonneveld, 1977; Timberlake y Marshall, 1988; Yager, 1992).

El ciclo parasexual es un proceso mediante el cual un diploide estable heterocarionte formado por la fusión de dos núcleos, da lugar a dos homocariontes. A diferencia de la meiosis, rara vez se da un entrecruzamiento entre cromátidas homólogas, como consecuencia los homocariontes generados en este ciclo poseen cada uno el material genético de alguna de las cepas originales (Champe y Simon, 1992).



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

*A. nidulans* produce dos tipos de células especializadas llamadas esporas (esporas sexuales ó ascosporas, esporas asexuales ó conidios).

Cuando el micelio vegetativo se expone al aire, se induce el desarrollo asexual, que culmina con la formación de un conidióforo. Las conidios de este conidióforo en condiciones adecuadas germinan y forman un nuevo micelio. El ciclo sexual requiere de la fusión de hifas y de núcleos para formar un diploide. Las células diploides finalmente traz una serie de divisiones dan lugar al cleistotesio o cuerpo fructífero. En el interior del cleistotesio se forman las ascas que contienen a las ascosporas. Al germinar las ascosporas (binucleadas haploides), se reinicia el ciclo de vida del hongo dando origen a un micelio haploide.

**3. Genética de la conidiación en *Aspergillus nidulans*.**

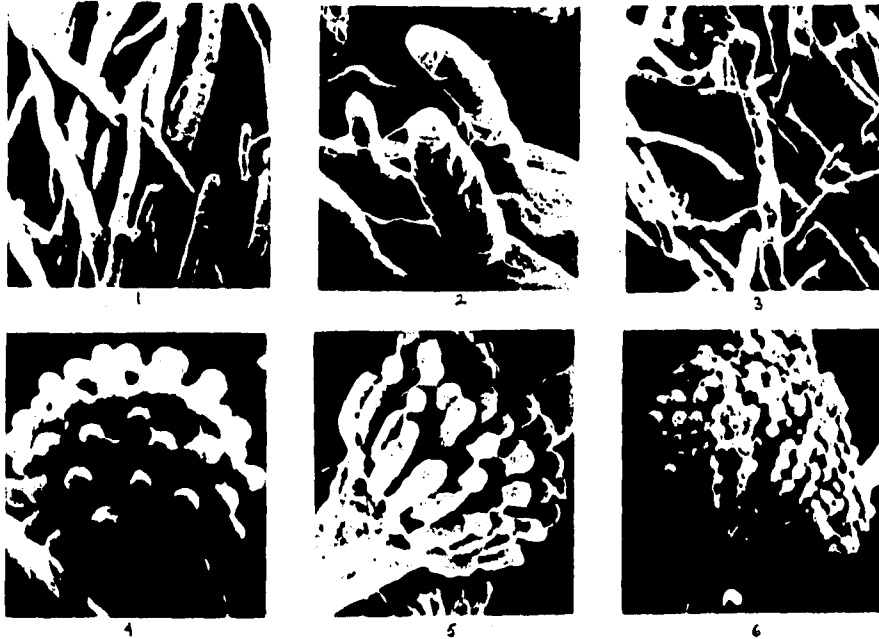
La esporulación asexual (conidiación) comienza cuando un micelio "competente", no diferenciado (crecido en medio líquido) se expone al aire o cuando se priva de nutrimentos en medio líquido (Skromne et al., 1995)..

En una interfase aerea, algunas hifas se aíslan de las demás a través de septos completos de pared engrosada, para formar las células pie, las cuales se extienden apicalmente hasta una distancia fija de 100  $\mu\text{m}$  del tallo del conidióforo. Al terminar la elongación, las puntas se hinchan para formar vesículas apicales globosas y multinucleadas. Posteriormente la vesícula comienza a gemar originando células uninucleadas llamadas métulas. Divisiones subsecuentes de la métula dan lugar a las células conidiogénicas o fiálides. Las cadenas de conidios o esporas vegetativas surgen a través de divisiones celulares, asimétricas y repetidas de las fiálides. Después de cada división el núcleo aploide de la espora se detiene en la fase  $G_0$  del ciclo celular. Las esporas previamente formadas son desplazadas por otras recién formadas, dando lugar a largas cadenas, donde las últimas conidios de cada cadena son los conidios "maduras". Esta serie de divisiones da lugar a la formación de una estructura multinucleada llamada conidióforo. Los conidios se encuentran en un estado de latencia, por lo que en condiciones adecuadas germinan y forman un nuevo micelio. (Aguirre et al., 1990; Champe y Simon, 1992; Timberlake, 1991; Timberlake y Marshall, 1988; Ward, 1991), Figura 2.

Mediante análisis genético y molecular de mutantes afectadas en algún paso de la esporulación, se ha logrado determinar que a lo largo de este proceso se activan una serie de genes. Aunque no se ha definido aún el papel de todos ellos, se conoce la actividad de genes reguladores como

*brlA*, *abaA* y *wetA*. Estos genes conforman la vía de regulación genética central que controla la conidiación en *A. nidulans* ya que cepas que tienen mutado alguno de ellos dan lugar a fenotipos anormales. Por ejemplo, en cepas *brlA*<sup>-</sup> el proceso de conidiación comienza con la formación del tallo del conidióforo, pero el tallo crece indefinidamente sin formación de vesículas ni ningún otro tipo celular. En cepas *abaA*<sup>-</sup> se inicia la esporulación normalmente, pero las fiálides que producen son incapaces de producir conidios viables, formando estructuras anormales. Las cepas *wetA*<sup>-</sup> inician el proceso de esporulación normalmente pero las conidios que producen se lisan durante la maduración y son incapaces de germinar, Figura 3 (Mirabito, et al., 1989). La actividad de estos genes es modificada por otros genes reguladores auxiliares, tales como *stuA* y *medA*; las cepas *stuA*<sup>-</sup> esporulan normalmente, pero los conidióforos que producen son más pequeños que los normalmente observados; las cepas *medA*<sup>-</sup> forma largas cadenas ramificadas y puede dar lugar a varios conidióforos dentro de uno solo, produciendo estructuras similares a Medusa, el personaje mitológico (Figura 3). Gracias al estudio molecular de mutantes de este tipo, pero en diferentes genes, se ha logrado determinar que señales de inducción como luz, aire, hormonas, tensión nutricional y osmótica (Mooney y Yager, 1990; Hans et al., 1993) y otras señales aún no identificadas, disparan la vía de la diferenciación. Ello ocurre activando a *brlA* y a *abaA* con la ayuda de *medA* que a su vez es activado por *stuA*. La proteína AbaA activa a *brlA* y activa su propia transcripción, además de activar a *wetA* y a genes estructurales (como por ejemplo: *γA* y *ωA*). La proteína WetA activa a numerosos genes específicos de las esporas que se requieren para la maduración de las células. Tanto *stuA* como *medA* también están involucrados en la reproducción sexual; Figura 5 (Miller, 1993; Timberlake, 1993; Andrianopoulos y Timberlake, 1994).

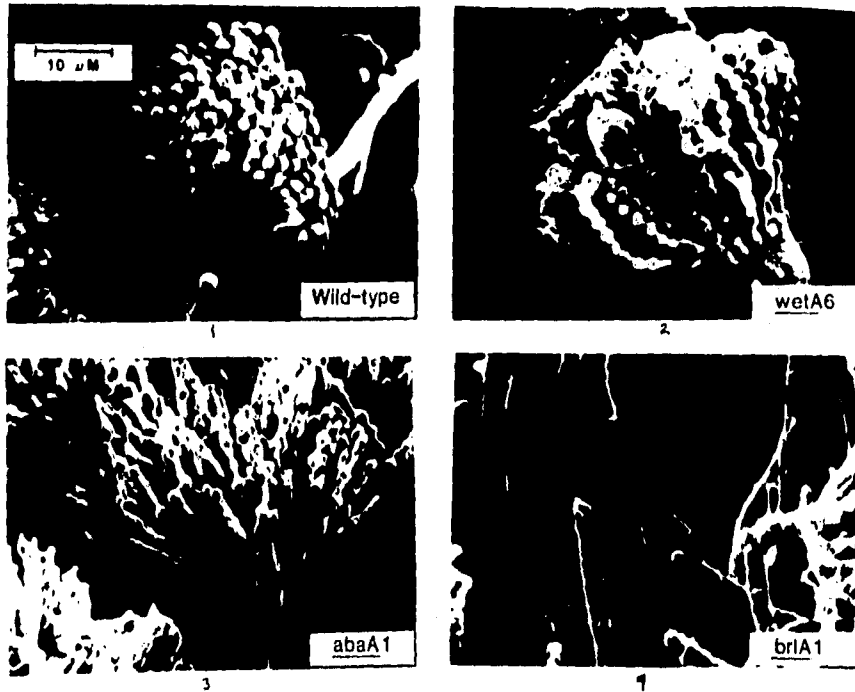




**Figura 2. Desarrollo del conidióforo de *Aspergillus nidulans*.**

En la serie de fotografías de microscopio electrónico se pueden observar las diferentes fases de desarrollo del conidióforo.

1. Micelio vegetativo (no diferenciado).
2. La pared de las células pie se engrosa y se inicia un crecimiento apical que da lugar a una hifa aérea multinucleada.
3. Al alcanzar un altura aproximada de 100  $\mu\text{m}$  el extremo apical se hincha para formar una vesícula globosa multinucleada (vesícula).
4. La gemación múltiple de dicha vesícula da lugar a células uninucleadas llamadas metulas.
5. La gemación de las metulas da lugar a células uninucleadas llamadas filídes.
6. Las cadenas de conidios o esporas vegetativas surgen a través de divisiones celulares, asimétricas y repetidas de las filídes, donde los conidios en la punta de cada cadena son los más maduros. La serie de divisiones de todas las filídes culmina en la formación de una estructura multinucleada llamada conidióforo. Los conidios generados se encuentran en un estado de latencia, en condiciones adecuadas germinan y forman un nuevo micelio (Boylan et al., 1987).



**Figura 3. Fenotipo observado en cepas con mutaciones en los genes centrales de la esporulación de *Aspergillus nidulans*.**

En las fotografías de microscopio electrónico puede observarse los fenotipos de las diferentes cepas mutadas en genes que conforman la vía de regulación genética central de la conidiación.

1. FGSC 4, fenotipo silvestre.
2. GO241 (*wetA*, *briA1*), se observa la autólisis en las esporas.
3. GO1 (*abaA*, *briA1*), se observa la formación de filídes anormales.
4. TRPA31N ( $\Delta$ *briA*) se observa únicamente micelio indiferenciado. (Boylan et al., 1987, Prade y Timberlake, 1993).

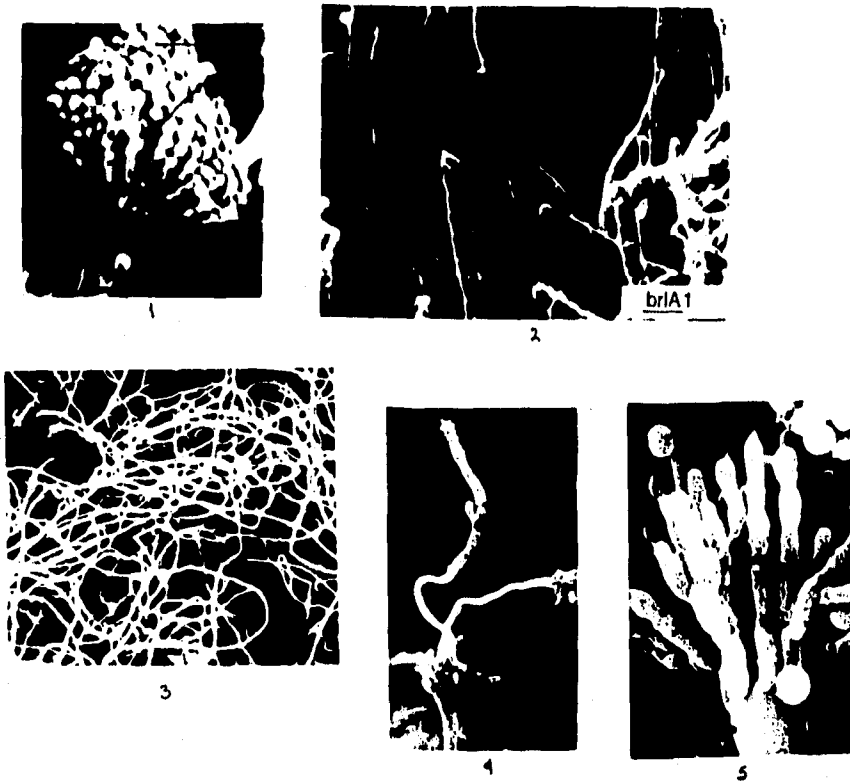
### •Papel del gene *brlA* en la conidiación.

En mutantes *brlA* ("bristle", cerda), el proceso de conidiación comienza con la formación del tallo del conidióforo como en la cepa silvestre, pero el tallo crece indeterminadamente; y no hay formación de la vesícula ni de ningún otro tipo celular (Clutterbuck, 1969; Figura 3). Este gen da lugar a una proteína del tipo "dedos de zinc" que se une a los ácidos nucleicos, común en factores transcripcionales (Miller et al., 1985; Adams et al., 1988 y Adams et al., 1990). El mRNA de *brlA* se encuentra en muy bajos niveles en las hifas y se comienza a acumular un poco antes del inicio de la esporulación (Boylan et al., 1987; Prade y Timberlake, 1993). Cuando el gene *brlA* se expresa en las hifas no diferenciadas por la activación de un promotor heterólogo inducible, se producen esporas viables en las puntas de las hifas. Esta expresión forzada de *brlA* también conduce a la expresión de genes específicos de la conidiación, como *abaA* (Adams et al., 1988; Mirabito et al., 1989).

El control de la acumulación del mRNA de *brlA* esta regulado por factores desconocidos, que aparecen en respuesta a las condiciones de tensión (nutricional y osmótica) u otro tipo de señales inductoras, como son luz, aire u hormonas, que actúan como reguladores. Los factores genéticos más estudiados son: *acoB*, *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*. Se ha propuesto que *fluG* (*acoD*) regula a los demás mediante una señal extracelular, necesaria para la inducción programada del desarrollo del conidióforo, mediada por la activación de *brlA*. Sin embargo, aún no se ha definido si estos genes actúan de manera dependiente a las condiciones de tensión o requieren de otras señales inductoras (Lee y Adams, 1994a, Lee y Adams, 1994b; Wieser y Adams, 1995, Lewis y Champe, 1995).

El locus de *brlA* es un complejo que consiste en dos unidades de transcripción traslapadas designadas como *brlA $\alpha$*  y *brlA $\beta$* . *brlA $\beta$*  inicia su transcripción aproximadamente a un 1 kb antes del inicio de la de *brlA $\alpha$* . El transcrito de *brlA $\beta$*  presenta dos marcos de lectura abierta (ORF's, Open Reading Frames), uno antes del de *brlA $\alpha$*  ( $\mu$ ORF) y otro después (ORF), que codifican para el mismo polipéptido BrlA $\alpha$ , excepto por 23 aminoácidos en el extremo amino terminal. En una mutante *brlA $\beta$*  se observan conidióforos secundarios sin esporas, pues a partir del

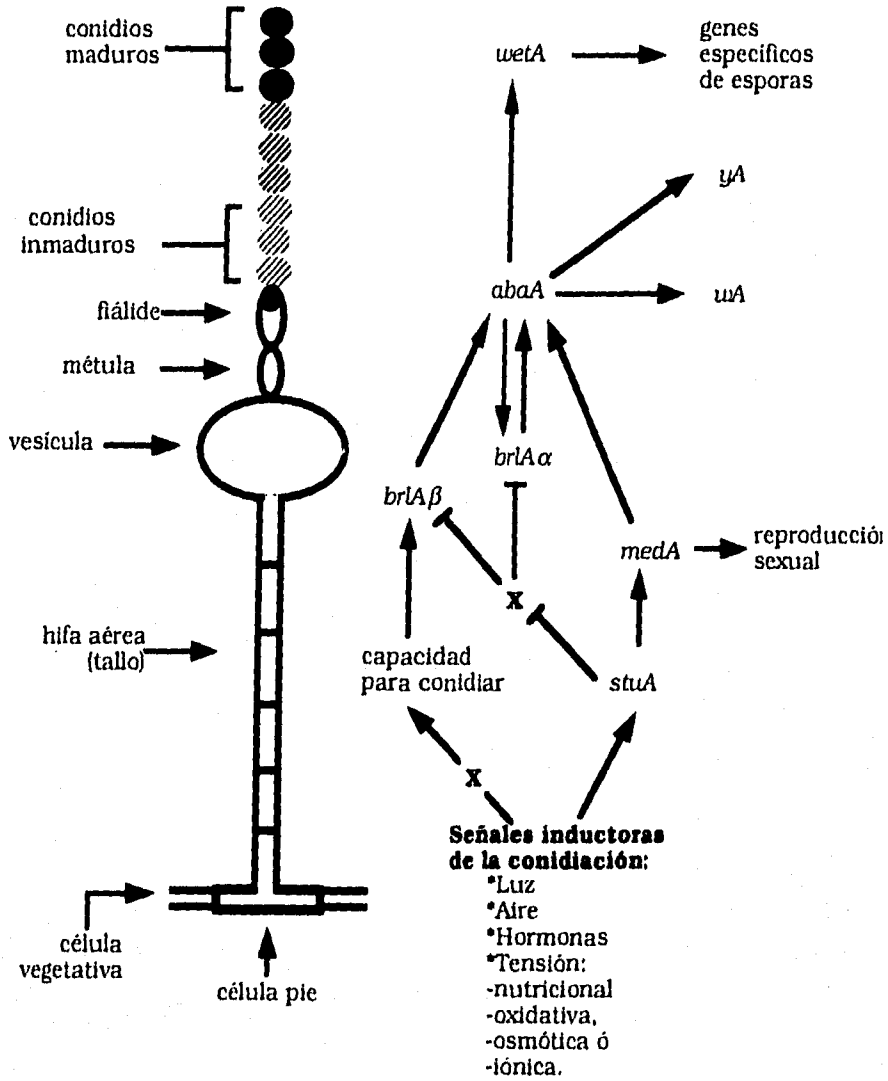
conidióforo algunas mótulas dan lugar a un segundo conidióforo y aún a partir de él se puede dar lugar a la formación de un tercer conidióforo. La mutación de *brlA $\alpha$*  provoca la producción de conidióforos anormales, que presentan mótulas ramificadas y filídes con una sola espora (Figura 4), pero a pesar de existir ambos transcritos la sobre-expresión de *brlA $\alpha$*  o *brlA $\beta$* , elimina la necesidad del otro (Prade y Timberlake, 1993, Miller, 1993). La traducción de *brlA $\beta$*  se inicia a través del  $\mu$ ORF que da lugar a BrlA $\beta$ . Esta proteína activa la transcripción de otros genes específicos de la conidiación, dentro de los que se encuentra *abaA*. La proteína AbaA activa a *brlA $\alpha$*  (Hans et al., 1993).



**Figura 4. Fenotipo observado en mutantes *brlA*.**

En las fotografías de microscopio electrónico pueden observarse los diferentes fenotipos de las cepas mutadas en *brlA $\alpha$* , *brlA $\beta$*  o en ambos.

1. FGSC4, fenotipo silvestre.
2. TRP $\Delta$ 31N ( $\Delta$ *brlA*), se observa únicamente micelio no diferenciado.
3. TRP62N (*brlA $\alpha$  $\beta$* <sup>-</sup>), se observa micelio indiferenciado y tallos con tamaño indeterminado.
4. TRP44L (*brlA $\alpha$  $\beta$* <sup>+</sup>), se observan tallos, vesículas y filídes secundarias.
5. TRP $\Delta$ 31396 (*brlA $\alpha$  $\beta$* <sup>+</sup>), se observa la formación de filídes anormales y algunos conidios (Prade y Timberlake, 1993).



**Figura 5. Interacción genética durante el desarrollo del conidióforo.**

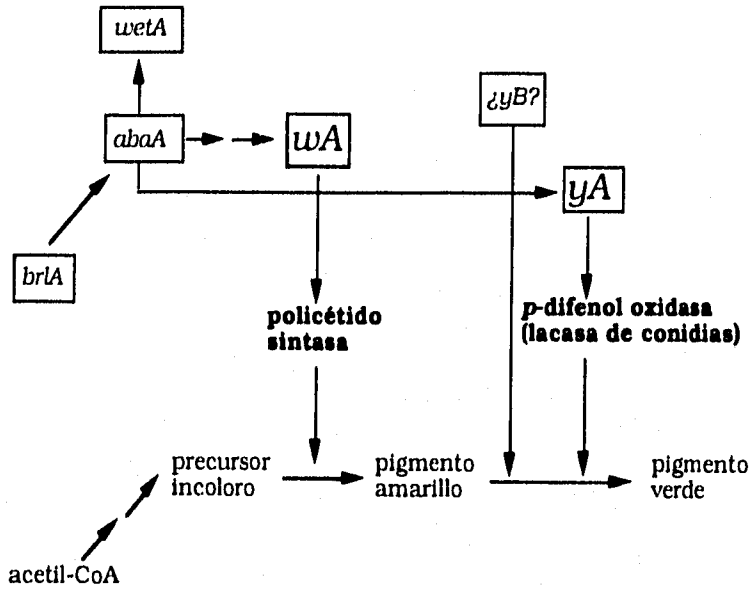
En la figura se muestra la vía de regulación genética que controla la conidiación en *Aspergillus nidulans*. Paralelamente, se presenta un diagrama que representa los tipos celulares observados durante el desarrollo y se intenta relacionarlos con la expresión de los genes en cada etapa. Los genes reguladores centrales de la esporulación son *brlA*, *abaA* y *wetA*. La actividad de estos genes modifican otros genes reguladores auxiliares, tales como *stuA* y *medA*. (↑) regulación positiva y (⊥) regulación negativa. Señales de inducción como luz, aire, hormonas, tensión nutricional, oxidativa, osmótica, iónica y

otras aún no estudiadas dan inicio a la diferenciación, activando a *blaB*, produciendo bajos niveles de *BrlA*, el cual activa al gen *abaA* y éste a *brlA*. *abaA* también es activado con la ayuda de *medA*, activado a su vez por *stuA*. *AbaA* activa a *brlA*, además de activar a *wetA* y a numerosos genes estructurales, por ejemplo los genes de la pigmentación *yA* y *wA*. *WetA* activa a numerosos genes específicos de las esporas que se requieren para la maduración de las células. *stuA* y *medA* también intervienen en la reproducción sexual (Andrianopoulos, A. y Timberlake, 1994; Miller, 1993; Hans et al., 1993; Mooney y Yager, 1990).

#### 4. Genética de la pigmentación de los conidios en *A. nidulans*.

Clutterbuck, Timberlake y otros autores han reportado que la pigmentación verde-café, de composición desconocida, en la pared de los conidios de *Aspergillus nidulans*, protege a las esporas de los daños por luz UV y contribuye en la supervivencia del conidio en la naturaleza (Armitt et al., 1976, Clutterbuck, 1990). La síntesis de los pigmentos depende de varios genes, entre los que destacan *wA* e *yA*. Estos genes codifican para las enzimas que catalizan secuencialmente la síntesis de un pigmento a partir de un precursor sin color, no identificado. *wA* codifica para una policétido sintasa necesaria para dar el color amarillo (Mayorga y Timberlake, 1990; Mayorga y Timberlake, 1992), mientras que *yA* codifica para una *p*-difenoil oxidasa, que convierte el intermediario color amarillo, en un producto final de color verde (Kurtz y Champe, 1982; Aramayo y Timberlake 1990; Aramayo y Timberlake 1993) (Figura 6). Las mutaciones en los genes reguladores del desarrollo de *A. nidulans* (*brlA*, *abaA* y *wetA*), impiden la acumulación del mRNA de *wA* e *yA*, lo que indica que la regulación de la transcripción de *wA* e *yA*, se da durante el desarrollo del conidióforo y dependen de la activación de genes reguladores de la vía central de la conidiación (O'Hara y Timberlake, 1989). Ello se confirma con el hecho de que los mRNA de *wA* e *yA* están ausentes en las hifas y los conidios maduros pero se acumulan cuando se forman las primeras esporas pigmentadas (Marshall y Timberlake, 1991; Law y Timberlake; 1980).

Los genes de la pigmentación estudiados hasta la fecha no son esenciales, ni para el crecimiento ni para la conidiación, pero sí son genes específicos de la conidiación y su estudio ha permitido entender en parte los mecanismos de acción de los genes que son reguladores centrales de la conidiación, como lo es el gen *brlA*. Los genes de la pigmentación *wA* e *yA* son de los pocos genes específicos de la conidiación cuya función bioquímica se conoce.



**Figura 6. Secuencia de genes relacionados con la producción de los pigmentos de los conidios.**

En el esquema se presentan los genes (*wA* y *yA*) y la participación de sus productos en la síntesis del pigmento verde final de la pared de las esporas. Se ha propuesto que el sustrato inicial es la acetil-CoA debido a que a partir de ella se sintetiza malonil-CoA precursor de los policétidos como del pigmento amarillo intermedio (Armitt et al., 1976; Mayorga y Timberlake, 1992).



### **5. Biosíntesis de policétidos y su relación con la biosíntesis de ácidos grasos.**

La acetil-CoA carboxilasa (ACC) cataliza el paso inicial que limita la velocidad de síntesis de los ácidos grasos.

La ACC es un complejo enzimático con tres diferentes actividades: acarreadora de grupos biotín-carboxílicos, actividad de biotín-carboxilasa y actividad de carboxil-transferasa. En animales vertebrados está formada por multímeros de subunidades idénticas y es regulada alostéricamente por citrato y por acetil-CoA. En levaduras es un tetrámero regulado por fosforilación y defosforilación mediada por proteína/cinasas dependientes de AMP, las cuales coordinan su actividad de acuerdo a la necesidad de ácidos grasos, colesterol y triglicéridos. La regulación de la expresión genética de la ACC se relaciona directamente con la velocidad de crecimiento celular (Hopwood y Sherman, 1990; Haßlacher et al., 1993 y Li y Cronan, 1993).

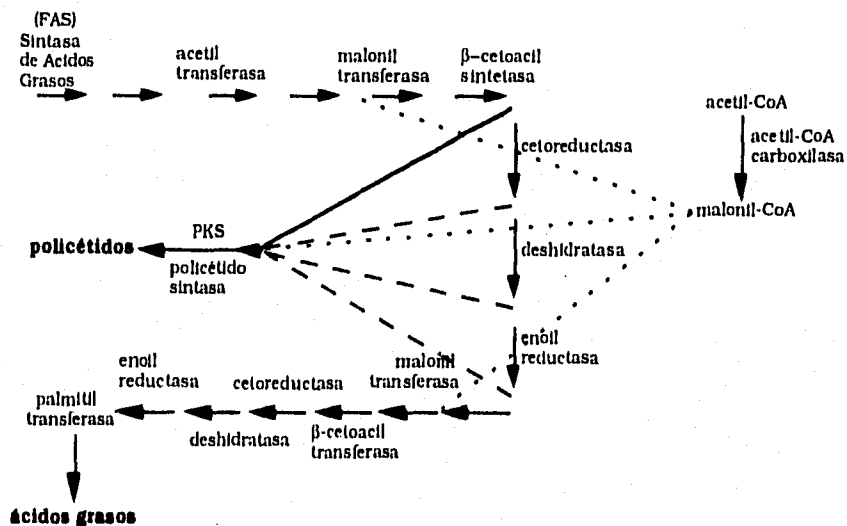
La ACC sintetiza malonil-CoA mediante la carboxilación de su biotina y la transferencia del carboxilo del complejo biotina-bicarbonato a la acetil-CoA. La malonil-CoA sirve como sustrato del complejo FAS (Fatty Acid Synthase, sintasa de ácidos grasos), que se emplea para la síntesis de policétidos y de esteroides.

En el caso de *Escherichia coli*, durante la síntesis de ácidos grasos, la  $\beta$ -cetoacetil sintasa determina la longitud de la cadena y la saturación o insaturación del ácido graso, dependiendo de los policétidos que requiera. Esto depende de la presencia de las enzimas que relacionan a la FAS con la PKS (PolyKetide Synthase, policétido sintasa). Mecanismos similares de regulación ocurren en *Rhizobium sp.* y en la espinaca. Los genes de ambos sistemas (FAS y PKS) son estructuralmente similares ya que son multifuncionales y se interrumpen por secuencias repetidas. Algunos genes codifican enzimas involucradas en ambas vías biosintéticas (Hopwood y Sherman, 1990; Haßlacher et al., 1993) (Figura 7) y las proteínas en ambos casos son estructuralmente similares. Por ejemplo, existe homología entre la proteína PksA de *Aspergillus parasiticus* que se requiere para la biosíntesis de aflatoxina B<sub>1</sub>, la proteína WA de *Aspergillus nidulans* que da lugar a una policétido sintasa involucrada en la síntesis del pigmento de las esporas de este hongo, la FAS de *Rhizopus novogibicus*, la FAS de *Gallus gallus* (ambos

determinantes en la biosíntesis de ácidos grasos) y la PKS de *Streptomyces antibioticus*, determinante en la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Chang, et al., 1995).

La similitud entre la vía de síntesis de policétidos y ácidos grasos, permite que productos de una vía actúen como inhibidores o activadores de la otra vía o viceversa, por ejemplo, el ácido jasmónico (derivado del ácido linoleico) y el metil-jasmonato ambos, además de tener la función de reguladores del crecimiento de plantas, inhiben (a nivel de la síntesis) la producción de aflatoxinas (toxinas derivadas de policétidos) por *Aspergillus flavus*, y proteger a las plantas de estas (Goodrich-Tanrikulu, et al., 1995).

Los policétidos son metabolitos secundarios abundantes tanto en procariotes como en eucariotes, que se obtienen por condensación de los ácidos grasos; todos ellos tienen diferentes propiedades biológicas como las que se enlistan en la Tabla I.



**Figura 7. Representación esquemática de la biosíntesis de ácidos grasos y policétidos.**

Este esquema muestra que la biosíntesis de ácidos grasos se relaciona con la biosíntesis de policétidos, algunos de sus productos son empleados como sustratos por la policétido sintetasa, FAS (Fatty acid synthase, sintasa de ácidos grasos) y PKS (poliketide synthase, policétido sintetasa) (Hopwood y Sherman, 1990).

Organismo	Policétido producido	Actividad
Angiospermas	Flavonoides (antocianinas)	Responsables del sabor de la mayoría de los alimentos derivados de plantas y del color de muchas flores.
	Urishioles	Sustancia irritante de las hiedras.
	Estilbenos e isoflavonoides (fitoalexinas)	Agentes antifúngicos.
Hongos	Micotoxinas	Aflatoxinas y ocratoxinas de <i>Aspergillus</i> .
		Ergocromos de <i>Claviceps</i> .
		Patulina de <i>Penicillium</i> .
	Antibióticos	Griseofulvina de <i>Penicillium</i> .
	Derivados de melaninas	En hongos fitopatogénicos.
	Pigmentos	
Organismos marinos		Breveloxinas de <i>Gymnodium sp.</i>
		Hidrocarburos polinsaturados de algas caféas
		Macrólidos de esponjas.
		Polipropionato de moluscos.
Actinomicetos	Antibióticos	Tetraciclina.
		Antraciclina. (e.g. daunorubicina)
		Macrólidos. (e.g. eritromicina)
		Políéteres. (e.g. monensina)
		Ansamicinas. (e.g. rifamicina)
		Avermectina.
		Inmunosupresores.
		Pamamicina
Microorganismos		Diferentes antibióticos de Mixobacterias
		Productos de los genes <i>nod E, Fy G</i> de Rhizobacterias
		ac. 6-metil salicílico
		Transportador de hierro de <i>Mycobacterium phlei</i>
		Mupirocina de <i>Pseudomonas</i>
		Aurantina de <i>Bacillus</i>

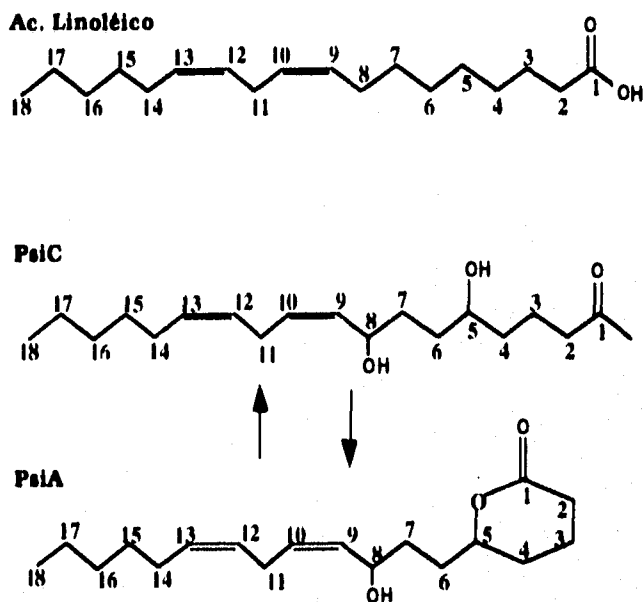
**Tabla 1. Algunos ejemplos de policétidos y su actividad biológica.**

Los policétidos se encuentran tanto en eucariotes como en procariotes y su actividad biológica es diversa (Hopwood y Sherman, 1990).

## 6. Factores hormonales Psi.

Los hongos se reproducen mediante la formación de esporas, las cuales pueden ser de origen sexual o asexual. En algunos hongos heterotálicos se sabe que ciertas feromonas específicas se excretan al medio en pequeñas concentraciones y promueven el desarrollo y la producción de las esporas. Algunas han sido identificadas, como por ejemplo los terpenos (ácido trispórico) de *Mucor sp.*, los esteroides (anterioriol y ogoniol) de *Achlya sp.*, varios oligopéptidos (factores  $\alpha$  y  $\beta$ ) de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Tremellales sp.* y las feromonas de *Ustilago maydis* (Kurjan, J., 1992; Silver, et al., 1993; Spellig, et al., 1994). Estas feromonas actúan de diversas formas, ya sea induciendo estructuras reproductivas, o bien, preparando a las células para que se fusionen. La naturaleza química de las feromonas conocidas es diversa, aunque en su mayoría son derivados de los ácidos grasos (Gooday, 1983; Champe y El-Zayat, 1989).

*A. nidulans* excreta una sustancia estructuralmente similar a los leucotrienos (metabolitos que median las reacciones de hipersensibilidad e inflamación en vertebrados; Samuelsson y Funk, 1989) y al ácido jasmónico (fitohormona reguladora del crecimiento de las plantas; Hamberg y Gardener, 1992; Sembdner y Parthier, 1993), todos ellos derivados del ácido linoleico. Esta sustancia es llamada factor Psi (precocious sexual inducer) con una actividad similar a la de una hormona: cuando este factor se concentra y se aplica en un cultivo crecido a confluencia, inhibe la conidiación e induce prematuramente la reproducción sexual. La actividad del factor Psi está determinada por diferentes formas del mismo: PsiA, PsiB y PsiC. PsiA promueve la esporulación asexual, PsiB y PsiC son promotores de la reproducción sexual. Se piensa que el balance entre la reproducción asexual y sexual parece estar determinado por la abundancia de PsiA con respecto a la de PsiB y PsiC. Dos de estas formas, PsiA y PsiB, son estructuralmente muy similares, siendo PsiA el más abundante y por ello se supone que es el precursor metabólico de los otros factores Psi, cuya presencia inicia la reproducción sexual durante el desarrollo de *A. nidulans* (Kurtz y Champe, 1981; Champe et al., 1987; Figura 8)



**Figura 8. Estructura de los factores hormonales Psia y Psic.**

Hasta ahora se han reportado tres factores hormonales Psi, producidos por *Aspergillus nidulans*. Psia es el más abundante durante el desarrollo de *A. nidulans*, promueve la esporulación asexual y se interconvierte en Psic *in vitro*. PsiB y PsiC son promotores de la reproducción sexual, PsiB es estructuralmente similar a Psia. (Champe et al., 1987; Champe y El-Zayat, 1989).

#### IV. OBJETIVOS

Nuestro interés particular es estudiar la regulación del inicio de la esporulación, y como el organismo dependiendo de sus necesidades sigue creciendo vegetativamente o esporular.

En este trabajo se presenta la caracterización de una nueva mutante de *A. nidulans* sensible a temperatura, con retraso en la esporulación y otros defectos relacionados directamente con la esporulación, como son la producción de conidios blancos y la incapacidad de producir ascosporas (esporas sexuales). Todos estos defectos se complementan por un factor extracelular.

##### OBJETIVOS:

- a) Determinar si todas las características que presenta la cepa mutante son consecuencia de la mutación de un solo gen.
- b) Localizar cromosomalmente al gen y mapearlo.
- c) Determinar la relación entre la expresión del gen *brlA* y el gen *fluG* con el retraso en la esporulación que presenta esta mutante.
- d) Determinar la relación entre la expresión del gen *wA* y la producción de conidios blancos.
- e) Determinar la naturaleza del factor que complementa esta mutación.
- f) Proponer la posible función del gen *cfwA* en el crecimiento, la esporulación y el metabolismo secundario.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de *Aspergillus nidulans*.Tabla II. Genotipo de las cepas de *A. nidulans* empleadas en este trabajo.

Cepa No.	Genotipo	Origen
A256	( <i>pabaA1</i> ; <i>wA3</i> ; <i>argC3</i> , <i>facB101</i> )	FGSC
A362	( <i>riboA1</i> , <i>anA1</i> , <i>adG14</i> , <i>proA1</i> , <i>pabaA1 yA2</i> )	FGSC
AJC7.1	( <i>biA1</i> , <i>brlA1</i> )	J. Clutterbuck
CJA15	( <i>cfwA2</i> , <i>biA1</i> , <i>metG1</i> , <i>brlA::lacZ</i> )	Este trabajo
CJA16	( <i>vegA1</i> , <i>metG1</i> , <i>biA1</i> ; <i>brlA::lacZ</i> )	J. Aguirre
CMC2	( <i>cfwA2</i> , <i>riboB2</i> , <i>pyroA4</i> , <i>biA1</i> )	Este trabajo
CRO1	( <i>cfwA2</i> ; <i>pabaA1 yA2</i> )	Este trabajo
FGSC26	( <i>biA1</i> )	FGSC
G196	( <i>trpB403</i> , <i>pabaA1 yA2</i> )	J. Clutterbuck
MH440	( <i>yA2</i> , <i>suadE20</i> , <i>adE20</i> , <i>riboB2</i> , <i>areA217</i> , <i>creA204</i> )	M. Hynes
MSF	( <i>suAadE20 yA2</i> , <i>adE20</i> , <i>acrA</i> , <i>galA1</i> , <i>pyroA4</i> , <i>facA303</i> , <i>sB3</i> , <i>nicB8</i> , <i>riboB2</i> )	W. Timberlake
NK002	( <i>wA1 yA2</i> , <i>biA1</i> , <i>trpC801</i> , <i>pabaA1</i> )	M. Mayorga
rBN124	( <i>biA1</i> ; $\Delta$ <i>fluG::trpC</i> )	T. Adams
RMS011	( <i>pabaA1 yA2</i> ; $\Delta$ <i>argB::trpCAB</i> ; <i>veA1</i> ; <i>trpC801</i> )	M. Stringer
SAA19	( <i>biA1</i> , <i>metG1</i> )	A. Andrianopoulos
SJA14	( <i>medA26 yA2</i> , <i>metG1</i> , <i>brlA::lacZ</i> )	J. Aguirre
TJA22	( <i>brlA2913p/l/l</i> ) <i>lacZ</i> , <i>argB+ / argB::CAT</i> , <i>metG1</i> ; <i>biA1</i> )	J. Aguirre

Tabla III. Fenotipo de los distintos marcadores genéticos utilizados.

Genotipo	Fenotipo
<i>acrA</i>	Resistencia a acrilavina.
<i>adE20</i>	Requerimiento de adenina.
<i>adG14</i>	Requerimiento de adenina.
<i>anA1</i>	Requerimiento de aneurina.
<i>areA217</i>	Incapacidad de crecer en nitrato. Mutación en el activador de los genes del metabolismo del nitrógeno.
<i>biA1</i>	Requerimiento de biotina.
<i>cfuA</i>	Gen mutado en la mutante caracterizada en este trabajo. <i>Cross feedable white conidio</i> .
<i>creA204</i>	Tiene desreprimido el gen de la alcohol deshidrogenasa. Mutación en el represor de los genes del metabolismo de carbono.
<i>jacA303</i>	No puede utilizar acetato como fuente de carbono. Mutación en acetil-CoA sintasa.
<i>AfluG::trpC</i>	Retraso en la conidiación dada por supresión de <i>fluG</i> por inserción de <i>trpC</i> .
<i>galA1</i>	No utiliza galactosa por tener algún defecto en la regulación de galactocinasa y galactosa-1- <i>p</i> -uridil transferasa.
<i>medA26</i>	Morfología medusa.
<i>methG1</i>	Requerimiento de metionina.
<i>nicB8</i>	Requerimiento de ácido nicotínico, ácido antranílico o de triptofano.
<i>pabaA1</i>	Requerimiento de ácido <i>p</i> -aminobenzóico.
<i>proA1</i>	Requerimiento de prolina.
<i>pyroA4</i>	Requerimiento de piridoxina.
<i>ribaA1</i>	Requerimiento de riboflavina.
<i>riboB2</i>	Requerimiento de riboflavina.
<i>sB3</i>	No utiliza sulfato inorgánico por tener alguna alteración en el transporte del mismo.
<i>suAadE20</i>	Supresión de la mutación en <i>adE20</i> .
<i>trpB403</i>	Requerimiento de triptófano. Mutación en la triptófano sintasa.
<i>trpC801</i>	Requerimiento de triptófano. Mutación en la Indol-3-glicerol phosphate sintasa, Fosfo ribosil antranilato isomerasa y antranilato sintasa.
<i>vegA1</i>	<i>Vegetative appearance</i> . Apariencia vegetativa o indiferenciada. Similar a <i>brlA</i> <sup>-</sup> o "fluffy" (algodonosa).
<i>wa</i>	Produce conidios blancos. Mutación en la policétido sintasa que produce el color amarillo intermedio del pigmento verde final de los conidios.
<i>yA2</i>	Produce conidios amarillos. Mutación en la <i>p</i> -difenoil oxidasa que produce el pigmento verde final a partir del precursor amarillo.



## 2. Plásmidos y Cósmidos empleados en este trabajo.

### Plásmidos

Plásmido	Fuente
pPL1	Oakley et al., 1987.
pNK15	Mayorga et al., 1990.
pHelp	Gems et al., 1991.
pFM1	Lee y Adams, 1994.
pDHG25	Gems et al., 1991.

### Cósmidos

•De la Biblioteca Genómica de *Aspergillus nidulans*, separada por cromosomas (Brody et al., 1990), se emplearon los siguientes Cósmidos :

- a) Mezclas de los cósmidos que contienen todo el cromosoma I.
- b) Los cósmidos L10F09, L10G09, L19A12 y L19B11 del cromosoma I de *A. nidulans*, que hibridaron con un fragmento del gen *pyrG*.
- c) Los cósmidos L13A06, L20C09, W13F01, W01C10, W28C01, W12E11 y W19B07 del cromosoma I de *A. nidulans* seleccionados por haber hibridado con un fragmento del gen de acetil-CoA carboxilasa (ACC) de levadura, obtenido de la digestión con *SacI* del YAC YEp 352-ACC1, proporcionado por el Dr. Kohlwein (Haßlacher, et al., 1993).
- d) Los Cósmidos L24O07, W26C10, W26C10, L25C12, W27G11 y L30C03 obtenidos durante el "cromosome walking" a partir de *pyrG*. En la sección "Caminata por el cromosoma" a partir de *pyrG*, se indica como fuéron seleccionados estos cósmidos.

### 3. Condiciones de crecimiento.

Las cepas se hicieron crecer en un medio de cultivo originalmente descrito por Käfer (1977), que consiste en:

Sales 20X	50 ml
Elementos traza 1000X	1 ml
D-glucosa	10 g

Se ajusta el pH a 6.5 y se afora a un litro. Si se requiere medio sólido se le adicionan 15 gramos de agar bacteriológico por litro. Se debe además suplementar con los requerimientos de aminoácidos y/o vitaminas necesarios de acuerdo a la cepa.

#### Sales 20X

NaNO <sub>3</sub>	120.0 g
KCl	10.4 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30.4 g

Disolver en un litro de H<sub>2</sub>O dd.

#### Elementos traza 1000X

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.20 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.10 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.50 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.50 g
CoCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.11 g
Na <sub>4</sub> EDTA	5.00 g

Disolver y aforar en 100ml de H<sub>2</sub>O dd.

Todos los medios de cultivo y el material se esterilizó a una presión de 1.4 Kg/cm<sup>2</sup> (121°C) durante 15 minutos, con excepción de las sustancias termolábiles, que fueron esterilizadas por filtración.

En general los experimentos se realizaron a 30 y a 42°C.

### 4. Obtención de la cepa mutante.

La cepa mutante original CJA15 (*cfwA2*, *biA1*, *metG1*, *brlA::lacZ*) fue aislada por el Dr. Jesús Aguirre, quien mutagenizó con luz ultravioleta a la cepa TJA22 (*brlA2913p/l/lacZ*, *argB+/argB::CAT*; *metG1*, *biA1*), empleando una dosis suficiente para generar 90% de muerte. Los conidios sobrevivientes se sembraron en placa a 30°C y se replicaron a 42°C. Se seleccionaron las cepas cuyos conidios al ser incubados a 42°C daban lugar a colonias con defectos morfológicos o eran incapaces de crecer a esta temperatura, suponiendo que dicha incapacidad se debe a

una expresión prematura del gen *brlA* y/o a una sobre-expresión del mismo (Adams et al., 1988). En este último grupo se detectó a la cepa CJA15. Aunque la incapacidad de esta cepa para crecer a 42°C no se debió a la expresión prematura o sobre-expresión del gen *brlA*, esta cepa presentó una serie de características asociadas con la esporulación, que ameritaban estudiarla y caracterizarla, motivo del presente trabajo.

### **5. Obtención de diploides.**

Para obtener diploides, es necesario crecer juntas las dos cepas a partir de las que se quieren obtener diploides. Para ello se inoculó cada una de las cepas a una distancia aproximada de 3 mm, en un medio con los requerimientos de ambos padres. Las cajas se incubaron 48 h a 30°C. Pasado el tiempo de incubación se transfirieron pequeños fragmentos de agar con micelio de ambas cepas a un medio mínimo (medio sin ninguno de los requerimientos de los padres) y se incubó a la temperatura adecuada. Después de 3 a 4 días aparecen sectores esporulados; estas esporas, se sembraron nuevamente en un medio mínimo. Las colonias con crecimiento vigoroso son generalmente esporas diploides ya que para poder crecer en un medio mínimo requerrn que las mutaciones se complementen.

#### Haploidización de diploides:

Para inducir la haploidización, se preparó medio mínimo provisto de los requerimientos de ambos padres. Una vez que el medio se esterilizó y se enfrió a 45°C, se le adicionó *p*-fluoro-fenilalanina (PFPA), hasta una concentración final de 50 mg/ml. A las cajas con este medio se les inoculó el mismo diploide con un palillo 4 veces y se incubó, durante una semana o hasta que comenzaron a aparecer "sectores" (zonas con diferente morfología en una misma colonia). Se inocularon los medios provistos de los requerimientos de ambos padres, con esporas de los diferentes "sectores", se incubaron y cuando formaron colonias, se replicaron en los medios con cada uno de los requerimientos.

## **6. Cruzas Sexuales.**

Las cruas sexuales se hicieron inoculando con palillos estériles las cepas en un medio mínimo con los requerimientos de las dos cepas a cruzar, a una distancia aproximada de 3 mm. Las cajas se incubaron 48 h a 30°C. Pasado el tiempo de incubación se transfirieron pequeños fragmentos de agar con el micelio de ambas cepas a un medio mínimo. Las cajas se incubaron a 30°C durante 6 a 7 días y se sellaron con cinta adhesiva para generar un ambiente parcialmente anaerobio. Esta condición favorece la formación de los cleistotecios, que son los cuerpos fructíferos. La caja se incubó durante 5 días o hasta obtener cleistotecios. Estos cuerpos fructíferos son redondos, rojo vino, contienen las ascosporas (esporas sexuales) y están cubiertos por las células Hülle (nodrizas).

Con ayuda de una aguja flameada, en condiciones estériles y bajo el microscopio, se extrajo un cleistotecio grande para aumentar las posibilidades de que se tratara de un híbrido. El cleistotecio se limpió rodándolo suavemente en el agar hasta que quedó limpio y brillante y se colocó en un tubo para microcentrifuga.

Con la aguja de disección se rompió el cleistotecio para liberar las ascosporas y se le añadieron 600 µl de agua bidestilada para resuspenderlas, agitando con vortex. De la suspensión obtenida se plaquearon 30 µl en medio mínimo provisto de con los requerimientos de ambos padres y se incubaron 48 h a 30°C. Luego cada colonia se replicó en un medio selectivo en diferentes cajas con los diferentes requerimientos de los padres y se determinó el porcentaje de dobles mutantes (con la mutación a mapear y la mutación selectiva) o bien, se obtuvo una nueva mutante con características específicas.

La caracterización y mapeo genético inicial de la mutante lo realizó el Q.F.B. Rogelio Ortiz bajo la dirección del Dr. Jesús Aguirre Linares.

## **7. Obtención y cuantificación de esporas.**

La suspensión de esporas empleadas para inocular se obtuvo sembrando a confluencia aproximadamente 5 cajas Petri con medio provisto de con los requerimientos de la cepa e incubando 5 días a 30°C. Las esporas se colectaron raspándolas con un asa de metal y

resuspendiéndolas en una solución de Tween 80 al 0.01%. La suspensión de esporas se centrifugó en una centrifuga clinica a la máxima velocidad durante 10 minutos, después de centrifugar se eliminó el sobrenadante y las esporas se resuspendieron en agua destilada desionizada estéril y se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y finalmente se resuspendieron en agua estéril.

Para cuantificar la concentración de esporas, se hizo una dilución 1:100 (10 µl de suspensión de esporas + 990 µl de agua estéril) agitando hasta resuspenderlas completamente. A continuación se tomaron 10 µl de esta dilución y se colocaron en un hemocitómetro. Las esporas se observaron por el microscopio en contraste de fases con un objetivo de 40X y se contaron en 5 de los cuadros observados al microscopio. Finalmente para obtener el número de esporas por mililitro se hizo el siguiente cálculo:

$$\left( \sum \text{esporas de los 5 cuadros} + 5 \right) \times 25 \text{ (número total de cuadros)} \times 100 \\ \left( \text{factor de dilución } 100 + 1 \right) \times 10^4 \text{ (factor de corrección del} \\ \text{hemocitómetro)} = \text{No. de esporas /ml}$$

### **8. Aislamiento y Purificación del DNA genómico de *Aspergillus nidulans*.**

En 20 ml de medio liquido estéril en una caja petri, se sembraron  $1 \times 10^9$  esporas de la cepa a 30°C por 16 h.

Pasado el tiempo de incubación se removieron las hifas que se desarrollaron en la superficie del medio de cultivo, se secaron lo mejor posible, se colocaron en un tubo para microcentrifuga, se congelaron con nitrógeno liquido y se secaron en un evaporador rotatorio Savant® durante 6 h.

Cuando las hifas estaban completamente secas, se molieron hasta tener un polvo fino y se les adicionaron 500 µl de una solución de EDTA 50 mM pH 8.5, SDS al 0.2 % y di-etil pirocarbonato (DEPC) al 0.01 %, agitando en vortex para mezclar perfectamente.

La mezcla se incubó a 68°C durante 20 min, agitando cada 5 min. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó 5 min a 11,000 rpm en microcentrifuga.

A la pastilla que se obtuvo se le adicionaron 40 µl de acetato de potasio

5 M pH 4.2, se mezcló perfectamente y se mantuvo en hielo durante 5 min.

Se centrifugó 5 min a 11, 000 rpm en microcentrífuga y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo para microcentrífuga y se adicionaron 600 µl de isopropanol frío, se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 11, 000 rpm en microcentrífuga.

La pastilla se resuspendió en 200 µl de TE (Tris-HCl 1M, Na<sub>4</sub>EDTA 100 mM pH 8.0) + 3 µl de RNAasa (10 µg/ml) y se incubó durante 30 min a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 10 µl de LiCl 10 M y 500 µl de Etanol al 95%, se mezcló y centrifugó por 5 min a 11, 000 rpm en microcentrífuga.

La pastilla obtenida se lavó dos veces con etanol al 70 %.

Después del último lavado, la pastilla se secó en evaporador rotatorio durante 5 min y se resuspendió en 100 µl de TE.

#### **9. Extracción de DNA de los plásmidos o de los cósmidos.**

El DNA de los plásmidos o de los cósmidos se extrajo empleando el sistema "QUIAGEN-tip 100®", para obtener aproximadamente 100 µg de DNA:

Las bacterias que contenían el plásmido o cósmido a purificar se crecieron en 150 ml de medio líquido LB (Luria-Bertani) provisto de con el antibiótico correspondiente (esto depende del vector a partir del cual se construyó el plásmido o cósmido), hasta una DO<sub>600</sub> de 1.0 a 1.5. A continuación la suspensión bacteriana se centrifugó a 4°C durante 15 min a 6, 000 x g.

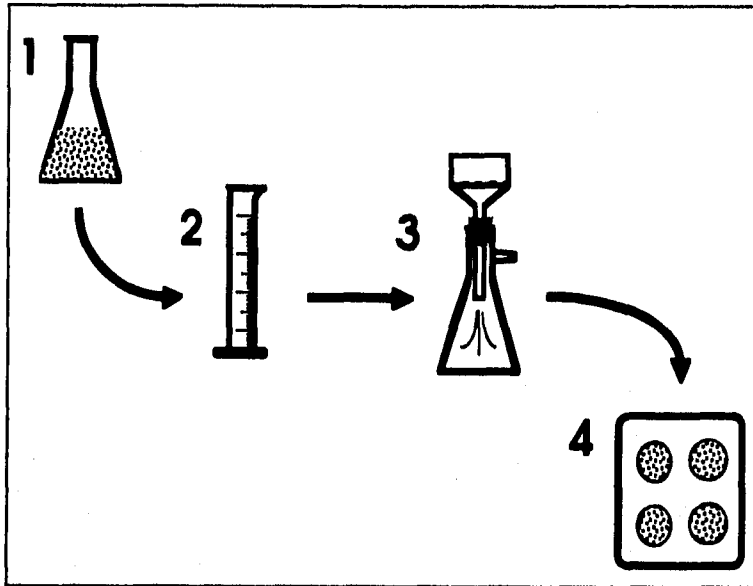
La pastilla obtenida se resuspendió en 4 ml de amortiguador P1® (tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM pH 8.0, RNAsa 100 mg/ml) y se procedió de acuerdo con el protocolo del sistema comercial.

#### **10. Aislamiento y Purificación de RNA de *Aspergillus nidulans*.**

Para extraer el RNA tanto de la cepa mutante como de la cepa silvestre en los diferentes tiempos de inducción de la esporulación se partió de cultivos conidiantes sincrónicos.

##### Cultivos conidiantes sincrónicos.

Se sembraron  $5 \times 10^5$  esporas/ml en 1,000 ml de medio líquido provisto de con los requerimiento de la cepa y se incubó a 30°C durante 24 h agitando a 300 rpm. Después de transcurrido el tiempo de incubación y agitando manualmente se tomaron alicuotas de 200 ml y se filtraron a través de filtro Wathman® No. 1 con ayuda de un embudo Büchner y vacío; el filtro se enjuagó con agua dd procurando que las células del cultivo formaran una monocapa sobre el papel filtro. Con ayuda de vacío se eliminó el exceso de agua; los 4 primeros filtros se colocaron sobre la superficie de medio (Figura 9). Del quinto filtro, sin colocarlo sobre el medio de cultivo, se tomaron con un sacabocados de 1 cm de diámetro 2 muestras, cada una de las cuales se colocó (sin el papel filtro) en un tubo para microcentrifuga etiquetado como *tiempo cero* y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, al resto de la muestra sobre el papel filtro se le eliminó el exceso de agua y se transfirió a papel aluminio previamente esterilizado, se envolvió y etiquetó como *tiempo cero* e inmediatamente se congeló en N<sub>2</sub> líquido, luego se transfirió a -70°C. Los cuatro filtros que se colocaron en el medio de cultivo se incubaron a 30°C durante 10, 20, 30 y 45 h respectivamente. Pasado el tiempo de incubación cada filtro se trato de igual manera que el quinto filtro. Todas las muestras se mantuvieron a -70°C hasta su uso.



**Figura 9. Esquema de inducción de cultivos conidantes sincrónicos.**

1. Se sembraron  $5 \times 10^5$  esporas/ml en 1000 ml de medio líquido y se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 24 h agitando a 300 rpm.
2. Después del tiempo de incubación y agitando manualmente se tomaron alícuotas de 200 ml.
3. Se filtraron a través de filtro Wathman® No.1 con ayuda de un embudo Büchner y vacío, procurando que las células del cultivo formaran una mono capa sobre el papel filtro.
4. Los 4 primeros filtros se colocaron sobre la superficie del medio sólido y se incubaron a  $30^\circ\text{C}$ .

**Aislamiento y Purificación de RNA de *Aspergillus nidulans*:**

A partir de cada una de las muestras obtenidas de los cultivos conidantes sincrónicos se extrajo RNA de acuerdo al siguiente protocolo:

Todo el material que se empleó durante la extracción se esterilizó, el mismo día de la extracción y todas las soluciones empleadas se prepararon en agua dd tratada con di-etil pirocarbonato (DEPC) al 0.1 % (DEPC/H<sub>2</sub>O) (el agua se agita por aproximadamente 12 h con DEPC, se deja reposar 12 h más, pasado este tiempo se esteriliza para eliminar el exceso de DEPC).

Se hicieron las siguientes mezclas:

- a. 1 ml de DEPC/H<sub>2</sub>O + 0.24 g de *p*-aminosalicilato de sodio (PAS).



b. 1 ml de DEPC/H<sub>2</sub>O + 0.40 g de tri-isopropilnafteno sulfato de sodio (TNS).

En baño de hielo se adicionó agitando lentamente la solución de PAS a la de TNS; cuando la mezcla era homogénea se le adicionó 1 ml de amortiguador para RNA (RNB) 5X (Tris-HCl 1M, NaCl 1.25M, EGTA 0.25M, pH 8.5). El pH de la mezcla final debió ser 8.9.

La muestra envuelta en papel aluminio se sacó del ultracongelador y se sumergió inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido, en ese momento a un mortero con pistilo, estéril y lavado con DEPC/H<sub>2</sub>O se le adicionó hasta la mitad de su capacidad N<sub>2</sub> líquido y en seguida una porción de la muestra. Se molió con el pistilo hasta obtener un polvo fino, adicionando N<sub>2</sub> líquido continuamente para evitar que la muestra se descongelara durante el procedimiento.

Un tubo 2 ml se llenó hasta la marca de 500 µl con el polvo y se le adicionaron 700 µl de la mezcla de (RNB/PAS/TNS), 0.5 volúmenes de fenol saturado con agua dd y un tercio de volumen de cloroformo (200 µl) y se mezcló en vortex durante 5 min.

A continuación se calentó en baño de agua a 65°C durante 5 min, se enfrió en hielo y se centrifugó a 4°C, durante 5 min a 10,000 rpm en una microcentrifuga.

Se recuperó la mayor parte del volumen de la fase acuosa y se le adicionaron 500 µl de (RNB/PAS/TNS) y 200 µl de cloroformo, se mezcló en vortex durante 5 min y se calentó en baño de agua a 65°C durante 5 min. Se enfrió en hielo y se centrifugó a 4°C, durante 5 min a 10,000 rpm en una microcentrifuga.

Se recuperó la mayor parte del volumen de la fase acuosa y se reextrajo con fenol/cloroformo 5 veces y con cloroformo dos veces.

Al sobrenadante final obtenido se le adicionó un cuarto de volumen de LiCl 10 M, se mezcló por inversión y se colocó en hielo. El recipiente con hielo se colocó a 5°C durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó a 4°C durante 15 min a 10,000 rpm. La pastilla se resuspendió en 200 µl de DEPC/H<sub>2</sub>O; cuando se resuspendió se adicionó un décimo de volumen de LiCl 10 M y 2.5 volúmenes de Etanol al 95 % y se mantuvo en hielo 20 min.

Se centrifugó a 7,500 rpm durante 10 min a 4°C. La pastilla se lavó

con etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C.

La pastilla se resuspendió en 100 µl de TELS (Tris-HCl 10mM, EDTA 0.1M, SDS 0.2 %, pH 7.6) y se calentó a 68°C hasta que se resuspendió completamente, se dejó enfriar. Cuando se enfrió se le adicionó un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M pH 4.8 y 2.5 volúmenes de etanol al 95 % y se mantuvo a -20°C durante 2 h, pasado este tiempo se centrifugó a 4°C durante 15 min a 10,000 rpm. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 95 % y se secó en evaporador rotatorio durante 10 min.

Se le adicionó TELS y se calentó hasta su resuspensión. Se tomó una alícuota de 10 µl para cuantificarlo y el resto se mantuvo a -70°C.

#### **11. Cuantificación de ácidos nucleicos.**

Para cuantificar DNA o RNA se determinó la absorbencia de la muestra a 230, 260, 280 y 320 nm. Los ácidos nucleicos absorben a 260 nm. La relación  $A_{260}/A_{280}$  se usa como un indicador de pureza de los ácidos nucleicos, una relación de 1.8 a 2.0 indica ácidos nucleicos de alta pureza. Las proteínas tienen su pico de absorción a 280 nm, por lo que una relación menor indicaría contaminación con proteínas. Absorbencia a 320 nm indica partículas en suspensión o cubetas sucias y la absorbencia a 230 nm indica contaminantes con uniones peptídicas o residuos de fenol.

Se empleó la absorbencia de 260 nm para calcular la concentración de ácidos nucleicos. Una  $A_{260}$  de 1.0 indica 50 µg/ml de DNA de doble hebra (DNAds), 37 µg/ml de una sola hebra de DNA (DNAss) o 40 µg/ml de RNA.

Para determinar la concentración del ácido nucleico en µg/ml se realizó la siguiente operación:

$$A_{260} \times (50 \text{ para DNAds, } 37 \text{ para DNAss o } 40 \text{ para RNA}) \times \text{el factor de dilución} = \mu\text{g/ml}$$

## 12. Hibridación tipo northern.

Para determinar la expresión de diferentes genes se realizaron hibridaciones tipo northern, para lo cual se hicieron electroforésis de RNA en geles de agarosa con formaldehído corriendo a 60 volts durante 5 a 6 h. Una vez concluida la electroforésis, el RNA se transfirió a membranas de nitrocelulosa con soporte de nylon (Hybond-N<sup>®</sup>) durante toda la noche (Timberlake, 1980; Sambrook, et al., 1989).

Para marcar la sonda con radioactividad se empleó el sistema Random Priming de GIBCO BRL<sup>®</sup> (Life Technologies Inc., N.Y., U.S.A.) y se procedió de acuerdo con las instrucciones del fabricante y manteniendo las normas de seguridad adecuadas para el trabajo con radioactividad. Este método consiste en incubar el DNA desnaturalizado con dodecámeros (oligómeros de 12 nucleótidos) de DNA de secuencia al azar y nucleótidos (uno de ellos radioactivo) en presencia del fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*. La DNA polimerasa sintetiza las hebras complementarias del DNA con los nucleótidos adicionados y el nucleótido radioactivo (Sambrook, et al., 1989).

## 13. Hibridación tipo Southern.

Este tipo de hibridación se realizó para determinar si el gen de acetil-CoA carboxilasa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tenía homología con el de *Aspergillus nidulans*, para ello DNA genómico total de *Aspergillus nidulans* fué digerido totalmente de manera separada con *Bam*HI y con *Sau*III. La electroforésis de DNA se realizó en geles de agarosa al 1 % corriendo las muestras a 60 volts durante 2 a 3 h (Timberlake, 1980; Sambrook, et al., 1989). Una vez concluida la electroforésis el DNA se transfirió a membranas de nitrocelulosa con soporte de nylon (Hybond-N<sup>®</sup>) durante toda la noche y se hibridizó con el fragmento del gen de acetil-CoA carboxilasa de levadura, encontrándose hibridación en fragmentos definidos. También este tipo de hibridación se empleó para determinar qué cósmidos del cromosoma I de la biblioteca genómica de *A. nidulans* contenían el gen de la acetil-CoA carboxilasa, hibridando al mismo fragmento del gen de acetil-CoA carboxilasa de levadura con los cósmidos que contienen todo el cromosoma I. Al igual que para la hibridación tipo northern para marcar la sonda con radioactividad se empleó el sistema Random Priming de GIBCO BRL<sup>®</sup>.

Tabla IV. Fragmentos de los genes empleados para la realización de las sondas para las hibridaciones tipo northern y tipo Southern.

## northern

Gen a Identificar	Tamaño del fragmento	Plásmido del que se obtuvo	Digestión para su obtención.	Origen del plásmido
<i>argB</i>	1.8 kbs	pDHG25	<i>HindIII</i>	Gems et al., 1991
<i>brlA<math>\alpha</math> y <math>\beta</math></i>	2.0 kbs	pBS2.5	<i>BamHI/EcoRI</i>	Boylan et al., 1987
<i>fluG</i>	2.5 kbs	pMF1	<i>XbaI/EcoRI</i>	Lee y Adams, 1994
<i>wA</i>	1.0 kb	pNK15	<i>SaII/XhoI</i>	Mayorga y Timberlake, 1990

## Southern

Gen a Identificar	Tamaño del fragmento	Plásmido del que se obtuvo	Digestión para su obtención.	Origen del plásmido
<i>acc1</i>	8.0 kbs	YEp352-ACC1	<i>SacI</i>	Haßlacher, 1993

#### 14. Efecto de PsiA.

Para determinar el efecto de PsiA sobre la cepa mutante se inocularon  $1 \times 10^6$  conidios de la cepa CRO1 en 3 ml de agar al 0.7 %, se mezclaron perfectamente y se adicionaron sobre una caja con 25 ml de medio con los requerimientos necesarios (con agar al 1.2 %). Cuando el medio solidificó, se colocaron en la superficie 2 filtros Whatman 3M de 4 mm de diametro, a uno se le adicionaron 23 ng del metil éster de PsiA (forma activa) que se preparó mezclando 1:1 una solución de PsiA en acetato de etilo con metanol ácido (Metanol:HCl 1:0.5), e incubando la mezcla a 40°C durante 1 h y manteniéndola luego a 4°C. En el otro filtro se colocó igual volumen de los disolventes empleados para la solución pero sin PsiA. Como control se realizó exactamente lo mismo para la cepa silvestre FGSC26.

#### 15. Efecto de Soraphen A®.

Soraphen A® es un policétido con acción fungicida reportado recientemente como inhibidor la acetil-CoA carboxilasa, enzima clave en la vía de síntesis de ácidos grasos y policétidos. En *Ustilago maydis* la inhibe in vitro y en *Saccharomyces cerevisiae* la inhibe in vivo (Vahlensieck, et al., 1994). El Dr. Vahlensieck gentilmente nos envió este policétido. Para ver el efecto de este policétido sobre *Aspergillus nidulans*

se sembraron  $5 \times 10^5$  esporas de la cepa RMSO11 (cepa silvestre) en 4 ml de medio con agar al 0.7 %, se mezclaron perfectamente y se adicionaron sobre una caja con 25 ml de medio con los requerimientos necesarios (con agar al 1.2 %). Cuando el medio con las esporas solidificó, se colocaron en la superficie 6 filtros Whatman 3 M con 4 mm de diámetro a los que se les adicionaron diferentes volúmenes de Soraphen A<sup>®</sup> a partir de una solución madre en metanol hasta tener 0, 0.005, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.25  $\mu\text{g}$  de Soraphen A<sup>®</sup>,

#### **16. Transformación de *Aspergillus nidulans*.**

El protocolo original para co-transformar emplea un plásmido de replicación autónoma, pDHG25 (Gems y Clutterbuck, 1993). Este plásmido contiene un marcador selectivo que nos permite determinar si la transformación se realizó o no; el marcador selectivo es el gen *argB*, por lo que para realizar la transformación se requería una cepa *cfwA2-* y *argB-*. Sin embargo, no se pudieron obtener cepas (*cfwA2-*, *argB-*) para ser transformadas, por lo que empleamos al plásmido pPL1 con *riboB2*, como marcador selectivo y a la cepa CMC2 (*cfwA2*, *riboB2*) para transformar.

Se creció la cepa a transformar CMC2 (*cfwA2*, *riboB2*, *pyroA4*, *biA1*) a confluencia en 5 cajas de medio provisto de con los requerimientos adecuados, durante 5 días a 30°C; se colectaron las esporas y se inocularon  $10^9$  esporas/ml en 400 ml de medio con los requerimientos adecuados y 1.2 M de sorbitol. Se creció durante 20 h a 30°C y una agitación de 300 rpm; pasado el tiempo de incubación se observaron germinulas jóvenes de la cepa a transformar, con las que se procedió a hacer protoplastos de la siguiente manera:

El cultivo se filtró a través de Miracloth<sup>®</sup> estéril y se lavó con KCl 0.6 M eliminando el exceso de humedad presionándolo con ayuda de una espátula contra el Miracloth<sup>®</sup>. Se colocó en un tubo con tapa estéril ya pesado y se determinó el peso del micelio para tener entre 0.5 y 1 g, que se colocó en hielo.

Se prepararon las siguientes soluciones, con agua estéril:

\*5 mg/ml de Novozyme<sup>®</sup> 234 (nombre comercial de un preparado de enzimas líticas obtenidas del hongo *Trichoderma harzianum*).

\*12 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma A-6003).

El micelio se resuspendió en 5 ml de medio osmótico (KCl 0.1 M, ácido cítrico 0.1 M, pH 5), se transfirió a un matríz de 250 ml estéril y se le adicionaron 500  $\mu$ l de la solución de Novozyme<sup>®</sup>, se mezcló suavemente y se mantuvo en hielo durante 5 min y se le adicionaron 500  $\mu$ l de la solución BSA.

Se agitó a 80 rpm durante 45 min a 30°C. Cada 15 min se observó una muestra al microscopio para verificar la formación de protoplástos.

Cuando se observaron protoplástos de "buena calidad", se transfirieron a un tubo de vidrio para centrifuga y se les adicionaron 10 ml de "trapping buffer" (Sorbitol 0.6 M, Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0), centrifugando a 5,000 xg en un rotor de angulo libre Sorvall HB-8 a 4°C, los protoplástos que se encontraban en la interfase se recuperaron con ayuda de una pipeta Pasteur, se transfirieron a otro tubo para centrifuga, se matuvieron en hielo y se repitió la operación, eliminando el "trapping buffer" y adicionando nuevo.

A los protoplástos obtenidos se les adicionó igual volumen de STC (Sorbitol 1.2 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 10 mM) y se centrifugó a 5,000 xg, en el mismo rotor.

El sobrenadante se eliminó y la pastilla se lavó tres veces con 10 ml cada vez de STC frio.

Finalmente los protoplástos se resuspendieron con mucho cuidado con ayuda de una pipeta Pasteur en 1 ml de STC y se mantuvieron en hielo.

Con los protoplástos obtenidos se realizó la transformación de la siguiente manera:

El DNA de los plásmidos o cósmidos con los que se iba a transformar, así como el plásmido pPL1 (plásmido integrativo que contiene el marcador selectivo *riboB2*) se diluyeron 1:1 con STC. Se le adicionaron 100  $\mu$ l de protoplástos se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 25 min.

Pasado el tiempo de incubación se adicionó a la mezcla 350  $\mu$ l de PEG (Polietilglicol 4000 al 60%, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris-HCl pH 7.5 10 mM, en STC), se mezclaron suavemente por rotación hasta que la solución era homogénea, se incubaron a temperatura ambiente 5 min, se repitió la operación 2 veces hasta haber adicionado 1,050  $\mu$ l de PEG y se incubó nuevamente a temperatura ambiente 5 min. Finalmente se centrifugó a 7000 xg durante 12 min a 4°C. Se eliminó el PEG por inversión del tubo.

La pastilla con los protoplastos se resuspendió en 200 µl de STC, se plaquearon en medio adicionado con Sorbitol 1.2 M, con los requerimientos adecuados menos el marcador selectivo (riboflavina) y se incubaron a 30°C.

Al mismo tiempo, se realizaron los siguientes controles:

Controles de Viabilidad.

En medio provisto de con los requerimientos, inclusive riboflavina, se sembraron 10 µl de protoplastos no transformados, pero tratados como si hubieran sido transformados, así como 100 µl de diluciones 1:100, 1:1,000 y 1:10,000 de los mismos (a estos controles se les etiquetó como Post-PEG).

También se sembraron 10 µl de protoplastos no transformados (Post-PEG) y no tratados (Pre-PEG) y 100 µl de diluciones 1:100, 1:1,000 y 1:10,000 de los mismos.

Controles de Transformación.

En medio provisto de con los requerimientos excepto riboflavina, se sembraron 100 µl de protoplastos no transformados, pero tratados como si hubieran sido transformados y 100 µl de protoplastos transformados únicamente con pPL1.

**17. "Caminata por el cromosoma" (Chromosome walking) :**

Para localizar a los cósmidos que contienen el gen *cfwA*, se "caminó" sobre el cromosoma I a partir de *pyrG* empleando a los cósmidos de la biblioteca genómica de *A. nidulans*, que hibridan con *pyrG* (Rolf Prade, comunicación personal). La sonda para hibridar se obtuvo a partir de uno de los cósmidos (seleccionado al azar) L10G09, usando el sistema comercial Random Priming de GIBCO BRL®. Se utilizaron los oligonucleótidos de T7 y de SP6 en lugar de los oligonucleótidos del sistema comercial ya que el vector empleado para construir la biblioteca es pLorist B que contiene en uno de los extremos del sitio de clonación la región promotora del bacteriófago T7 y en el otro extremo la del SP6 (Cross y Little, 1986). Después de realizar una hibridación tipo Southern con esta sonda y todos los cósmidos que contienen el cromosoma I, se observó que la sonda hibridó con los cósmidos que hibridaron con *pyrG* y con otros cósmidos, los nuevos cósmidos se emplearon ahora como sonda para la segunda hibridación de igual manera que el cósmido

L10G09 y así, en dos ocasiones más.

### **18. Extracción y determinación de ácidos grasos libres.**

Los ácidos grasos libres se extrajeron de micelio seco de acuerdo a una modificación del procedimiento descrito por Christie (Christie, 1982). Se sembraron  $5 \times 10^5$  esporas/ml en 1,000 ml de medio líquido provisto de los requerimientos de cada una de la cepas FGSC26 y CRO1, cada cepa se sembró en dos matraces diferentes, estos se incubaron a 30°C durante 20 h agitando a 300 rpm, pasado este tiempo uno de los matraces de cada cepa se incubó a 42°C y el otro se mantuvo a 30°C, los cuatro se incubaron durante 45 hr, a 300 rpm. Después de el tiempo de incubación y agitando manualmente el contenido de cada matrás se filtró a través de filtro Wathman® No. 1 con ayuda de un embudo Büchner y vacío; cuando se eliminó el exceso de agua, el micelio se transfirió a tubos para microcentrifuga, se congeló inmediatamente con N<sub>2</sub> líquido y se secó en evaporador rotatorio.

La extracción de lípidos se hizo homogeneizando 1 g de micelio seco con eter etílico/HCl (7/1) y extrayendo la fase orgánica con hexano; el solvente se evaporó a sequedad en baño de agua y el residuo se resuspendió en 50 µl de hexano antes de inyectarse en el cromatógrafo de gases. Todos los solventes empleados para la extracción eran grado HPLC y a todas las soluciones se les adicionó BHT al 0.01 % como antioxidante. Los ácidos grasos fueron analizados por cromatografía de gases empleando un cromatógrafo (Varian, Model 3300) equipado con detector de ionización a la flama a 230°C, un inyector a 200°C y una columna capilar de silica. El gas acarreador fue nitrógeno a un flujo de 30 ml/min y un programa de temperatura de 100 a 195°C a una velocidad de 8°C/min, manteniéndose a 195°C durante 15 min. La identificación de los diferentes ácidos grasos se realizó por comparación de la muestra con estándares de referencia previamente identificados y archivados en el integrador computarizado (Varian 4290).

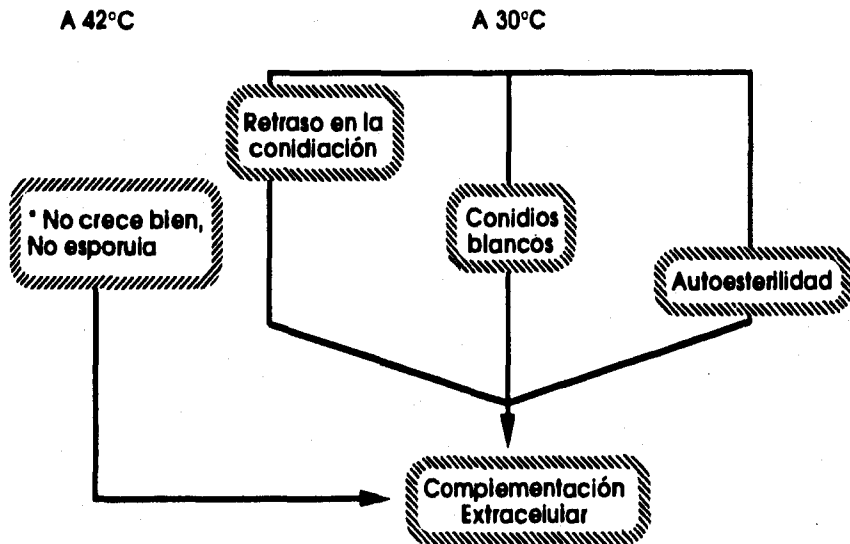


**VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**1.0 CARACTERIZACION FENOTIPICA DE LA CEPA MUTANTE *cfwA2*.**

La cepa mutante original CJA15 (*cfwA2*, *biA1*, *metG1*, *brlA::lacZ*) fué aislada por el Dr. Jesús Aguirre, quien mutagenizó con luz ultravioleta a la cepa TJA22 (*brlA2913p/l/lacZ*; *argB+/argB::CAT*; *metG1*; *biA1*). La seleccionó de un grupo de cepas con defectos morfológicos o por ser incapaces de crecer a 42°C (ver materiales y métodos).

La cepa CJA15 además de su incapacidad para crecer bien a 42°C presenta una serie de características a 30°C, como un retraso en la conidiación, producción de conidios blancos y autoesterilidad sexual por ser incapaz de producir cleistotecios viables por si sola. Se observó que la sensibilidad a temperatura, el retraso en la conidiación, la producción de conidios blancos y la autoesterilidad se remediaron al crecer a una cepa silvestre a un lado de la mutante. En la interfase entre las dos colonias se produjeron conidióforos pigmentados y en las condiciones adecuadas cleistotecios. En la figura 10A se integran estas características.



**Figura 10A. Características fenotípicas de cepas mutantes *cfwA2* a 30 °C y a 42 °C.**

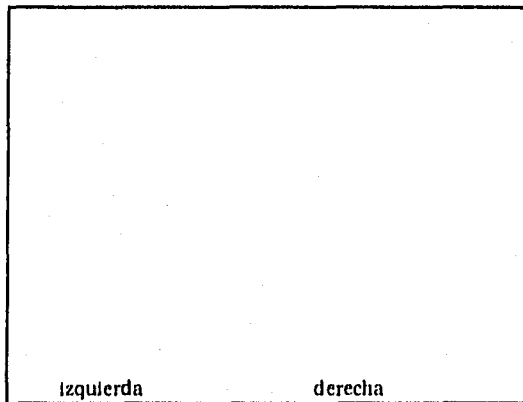
Esta cepa además de su incapacidad para crecer bien a 42°C tiene una serie de características asociadas con la esporulación que pueden ser observadas a 30°C como son:

1) Retraso en la conidiación: Da lugar a hifas no diferenciadas durante un período mayor al observado en una cepa silvestre por lo que la colonia se ve algodonosa. Esto puede observarse en la fotografía de la cepa CJA15 (Figura 10B, derecha).

2) Producción de conidios blancos, a diferencia de una cepa silvestre que produce conidios pigmentados (verdes o amarillos, según su genotipo).

3) Es sexualmente autoestéril ya que es incapaz de producir cleistotecios o ascosporas (esporas sexuales) viables por sí sola.

La sensibilidad a temperatura, el retraso en la conidiación, la producción de conidios blancos y la autoesterilidad se revierten al crecer a una cepa silvestre a un lado de la cepa mutante, en la interfase entre las dos colonias se producen conidióforos pigmentados (Figura 10 B, flecha) y en las condiciones adecuadas cleistotecios.



**Figura 10B. Fotografías de dos cepas mutantes CRO1 y CJA15.**

Las cepas silvestres FGSC26 (*biA1*) o RMSO11 (*pabaA1*  $\gamma$ A2;  $\Delta$ *argB*:: *trpC $\Delta$ B*; *veA1*; *trpC801*), se crecieron cerca de las cepas CRO1 (*cfwA2*, *pabaA1*  $\gamma$ A1) o CJA15 (*cfwA2*, *biA1*, *metG1*, *brlA*::*lacZ*) respectivamente. Las flechas indican una zona de complementación evidente por la pigmentación de los conidios de las mutantes *cfwA2*. En el caso de la complementación entre la cepa FGSC26 y la cepa CRO1 (izquierda), la zona de complementación es amarilla debido a que la cepa CRO1 presenta una mutación en  $\gamma$ A, cuyo producto es necesario para convertir el color amarillo intermedio en el color verde final (como el que se observa en la cepa FGSC26), en el caso de la zona de complementación entre la cepa RMSO11 y la cepa CJA15 (derecha) la zona de complementación es verde ya que la cepa CJA15 no tiene mutación alguna en  $\gamma$ A, pero la cepa RMSO11 sí, por lo que tiene conidios amarillos.

### 1.1 Complementación extracelular.

Como se observa en las fotografías de la figura 10B, la zona de complementación presenta el color de la cepa que contienen la mutación *cfwA*. Este hecho sugiere que la complementación es extracelular; es decir, que no hay fusión de hifas ni intercambio de núcleos. Esto se comprobó cuando con ayuda de un microscopio estereoscópico, se aislaron conidios de la interfase de complementación y se estiraron en medio nuevo con los requerimientos de ambas cepas. Todas las colonias recuperadas presentaron un fenotipo idéntico al de la cepa *cfwA*<sup>-</sup>. La complementación extracelular no se observó cuando entre las dos cepas *cfwA*<sup>+</sup>/*cfwA*<sup>-</sup>, se interpuso una membrana de diálisis, con un corte de peso molecular de 4,000 a 6,000 Da o inclusive papel filtro Whatman 3mm. Este resultado sugiere que existe un compuesto no dializable de peso molecular > 6,000 Da y que además se requiere de un contacto muy cercano entre las hifas. Recientemente se ha reportado que una señal extracelular (CsgA) indispensable para el desarrollo de *Mixococcus xantus* requiere no solo de la proximidad célula-célula sino también de una orientación específica. Esta proteína presenta homología con miembros de la familia SCAD (short-chain alcohol dehydrogenase).

Los miembros de la familia SCAD catalizan reacciones de oxidación/reducción, algunos sustratos o productos de estas reacciones son moléculas que actúan como señal para otras reacciones, como prostaglandinas y esteroides en vertebrados y factores de nodulación en *Rhizobium*. Esta familia también está involucrada en la producción de numerosos metabolitos secundarios que incluyen policétidos, como aflatoxinas y melaninas de hongos (Lee et al., 1995). El factor de complementación que necesita esta mutante podría estar relacionado con este tipo de señales extracelulares.

Dado que el gen *brlA* es indispensable para la conidiación en etapas muy tempranas y de que mutaciones en el gen *wA* resultan en la producción de esporas blancas, resultaba interesante probar mutantes afectadas en estos genes en cuanto a su capacidad para complementar a la mutante *cfwA2*.

Los resultados se muestran en la figura 11. Dado que ambas mutantes complementan a *cfwA2*, se puede concluir que el factor

responsable de la complementación es independiente de *brlA*. Asimismo, es posible concluir que aunque la mutante *wA* produce conidios blancos por carecer de una enzima policétido sintasa (Mayorga y Timberlake, 1990), es capaz de producir el factor de complementación, que posiblemente da lugar al sustrato de la misma.

**Figura 11. Mutaciones en otros genes específicos de la esporulación no afectan la complementación extracelular.**

En esta fotografía se observan las cepas mutante CRO1 (*cfwA2, pabaA1 yA1*), mutante CJA15 (*cfwA2, brlA1, melG*), silvestre FGSC26 (*brlA1*), mutante NK002 (*wA1 yA2, brlA1, trpC801, pabaA1*) y mutante AJC7.1 (*brlA1, brlA1*). Las flechas indican las zonas de complementación extracelular. Entre la cepa FGSC26 y CRO1, así como entre NK002 y CRO1 y AJC7.1 y CRO1, la zona de complementación es amarilla debido a que la cepa CRO1 tiene una mutación en el gen *yA* y si esta cepa produjera esporas pigmentadas serían amarillas. En el caso de la zona de complementación entre NK002 y CJA15, así como AJC7.1 y CJA15, la zona de complementación es verde ya que la cepa CJA15 no tiene mutación alguna en *yA* y si esta cepa produjera esporas pigmentadas serían verdes.

## 2.0 CARACTERIZACION GENETICA DE LA CEPA MUTANTE *cfwA2*.

### 2.1 La mutación es en un sólo gen.

Dada la complejidad del fenotipo descrito antes, resultaba indispensable demostrar que este fué producto de una sola mutación. Esto se determinó a partir de varias cruzas entre la cepa CJA15 y otras cepas, a partir de las cuales se obtuvieron cerca de 700 cepas todas ellas con retraso en la esporulación, esporas blancas, incapaces de crecer a 42°C y presentaron complementación extracelular al crecer cerca de una cepa *cfwA*<sup>+</sup>.

Cabe aquí mencionar algunos resultados particularmente intrigantes. Toda vez que se cruzó una cepa con la mutación *cfwA2*, con cualquier otra cepa que contenía la mutación nula *argB2*, después de hacer una búsqueda exhaustiva jamás se recuperaron mutantes dobles *cfwA2/argB2*. El gen *argB* codifica para la enzima ornitina transcarbamilasa; OTC, la cual cataliza la síntesis de citrulina a partir de ornitina. Para probar si ésto tenía que ver específicamente con la enzima OTC o con el metabolismo de arginina, se llevaron a cabo cruzas con la cepa A256, la cual contiene una mutación nula en *argC*. El gen *argC* codifica para la enzima arginino succinato sintasa, la cual cataliza la síntesis de arginosuccinato a partir de citrulina y aspartato.

Al igual que con *argB*, no fué posible obtener mutantes dobles *argC/cfwA2*.

Aunque hasta este momento ignoramos el significado de este resultado, sin duda es importante para comprender los efectos de la mutación *cfwA*. Existe el antecedente de mutantes en *argB12* con efectos dramáticos en la conidiación, aunque el fenómeno permanece sin explicación (Serlupi-Crescenzi et al., 1983).

## 2.2 Localización cromosomal de la mutación.

Con el fin de determinar en que cromosoma se encuentra la mutación *cfwA2*, se obtuvieron diploides entre la cepa CJA15 y una cepa maestra MSF, con un marcador genético en cada uno de los ocho cromosomas de *Aspergillus nidulans*.

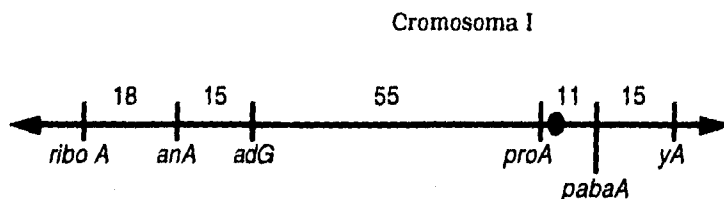
Marcador	cromosoma
<i>yA2</i>	I
<i>acrA</i>	II
<i>galA1</i>	III
<i>pyraA4</i>	IV
<i>fac A303</i>	V
<i>sB3</i>	VI
<i>nicB8</i>	VII
<i>riboB2</i>	VIII

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos tras la haploidización de dos diploides, a partir de la cual se obtuvieron 19 cepas haploides. Cada una de estas cepas presentaron los fenotipos enlistados. Los resultados indicaron que la mutación estaba localizada en el cromosoma I o en el cromosoma VII. Sin embargo, se concluyó que la mutación *cfwA2* se encontraba en el cromosoma I ya que todos los haploides seleccionados por su mutación en *cfwA2* resultaron ser auxótrofos de biotina y la mutación de *biA1* se encuentra en el cromosoma I. Además en el laboratorio se repitió este análisis con otros fines y si se encontraron cepas *cfwA2<sup>-</sup>* y *nicB8<sup>-</sup>*.

Número de Cepas	Fenotipo
0	<i>cfwA2<sup>-</sup></i> y <i>yA2<sup>-</sup></i>
13	<i>cfwA2<sup>-</sup></i> y <i>acrA<sup>-</sup></i>
10	<i>cfwA2<sup>-</sup></i> y <i>galA1<sup>-</sup></i>
8	<i>cfwA2<sup>-</sup></i> y <i>pyraA4<sup>-</sup></i>
16	<i>cfwA2<sup>-</sup></i> y <i>fac A303<sup>-</sup></i>
8	<i>cfwA2<sup>-</sup></i> y <i>sB3<sup>-</sup></i>
0	<i>cfwA2<sup>-</sup></i> y <i>nicB8<sup>-</sup></i>
1	<i>cfwA2<sup>-</sup></i> y <i>riboB2<sup>-</sup></i>

### 2.3 Mapeo Genético de *cfwA2*.

Después de haber determinado que *cfwA* se localizaba en el cromosoma I, se procedió a ubicarlo dentro del cromosoma, primero mediante la cruce sexual entre la cepa CJA15 (*cfwA2*, *biA1*, *metG1*, *brlA::lacZ*) y la cepa A362 (*riboA1*, *anA1*, *adG14*, *proA1*, *pabaA1* y *A2*), cuyos marcadores genéticos están distribuidos a lo largo del cromosoma I, en el orden indicado de izquierda a derecha, como se muestra en el siguiente esquema. Los números indican la distancia aproximadas entre un gen y otro, en unidades de mapa y el punto indica el centrómero del cromosoma.



Después de hacer esta cruce, el número de cepas con la combinación *cfwA2<sup>-</sup>*, *riboA1<sup>-</sup>* fué menor al obtenido con las otras combinaciones, lo que indicó un ligero ligamiento entre *cfwA2* y *riboA1* y sugirió que *cfwA* se encontraba en el brazo izquierdo del cromosoma I. Para continuar la ubicación de *cfwA* en el cromosoma, ahora se seleccionaron cepas con marcadores en el brazo izquierdo.

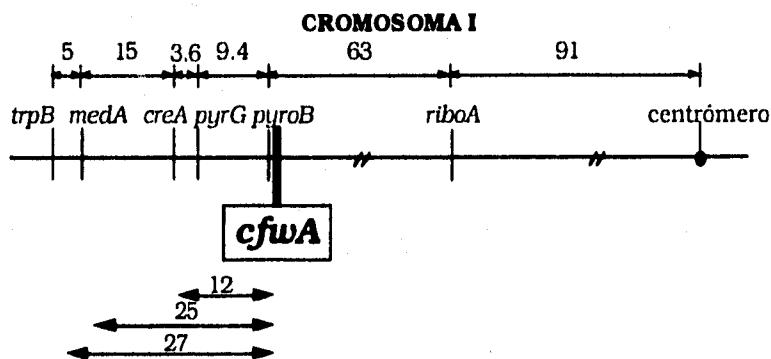
La cepa CJA15 (*cfwA2*, *biA1*, *metG1*, *brlA::lacZ*) se cruzó con las cepas G196 (*trpB403*, *pabaA1* y *A2*) y MH440 (*yA2*, *suadE20*, *adeE20*, *riboB2*, *areA217*, *creA204*) y la cepa CRO1 (*cfwA2*; *pabaA1* y *A2*) se cruzó con la cepa SJA14 (*medA26* y *A2*, *metG1*, *brlA::lacZ*), obteniéndose los diferentes porcentajes de recombinación entre el gen *cfwA* y el marcador genético relevante. Los resultados se presentan en la tabla V.

El porcentaje de recombinación indica la distancia entre un gen y otro, 1% de recombinación corresponde a una unidad de mapa indicada en centiMorgan's ó cM, como se observar en el mapa genético que se presenta en la figura 12, la distancia en unidades de mapa es consistente con la reportada en la literatura (Clutterbuck, 1990).

Cepas que se cruzaron y sus genotipos	No. total de cepas obtenidas	Número de cepas recombinantes	% de Recombinantes ( <i>cfwA2<sup>+</sup></i> , marcador selectivo <sup>+</sup> )
<b>CRO1</b> ( <i>cfwA2<sup>-</sup>, medA<sup>+</sup></i> ) <b>SJA14</b> ( <i>cfwA2<sup>+</sup>, medA<sup>-</sup></i> )	394	( <i>cfwA2<sup>+</sup>medA<sup>+</sup></i> ) 57 ( <i>cfwA2<sup>-</sup>medA<sup>-</sup></i> ) 42	25
<b>CJA15</b> ( <i>cfwA2<sup>-</sup>, creA<sup>+</sup></i> ) <b>MH440</b> ( <i>cfwA2<sup>+</sup>, creA<sup>-</sup></i> )	605	( <i>cfwA2<sup>+</sup>, creA<sup>+</sup></i> ) 40 ( <i>cfwA2<sup>-</sup>, creA<sup>-</sup></i> ) 33	12
<b>CJA15</b> ( <i>cfwA2<sup>-</sup>, trpB<sup>+</sup></i> ) <b>G196</b> ( <i>cfwA2<sup>+</sup>, trpB<sup>-</sup></i> )	190	( <i>cfwA2<sup>+</sup>, trpB<sup>+</sup></i> ) 33 ( <i>cfwA2<sup>-</sup>, trpB<sup>-</sup></i> ) 18	27

**Tabla V. Recombinación genética entre *cfwA2* y distintos marcadores situados en el brazo izquierdo del cromosoma I.**

En esta tabla se presentan los porcentajes de recombinación entre *cfwA* y los diferentes marcadores genéticos en el brazo izquierdo del cromosoma I. El número de progenie corresponde a las cepas con el genotipo (*cfwA2<sup>+</sup>*, marcador selectivo<sup>+</sup>) o con el genotipo (*cfwA2<sup>-</sup>* y el gen marcador selectivo<sup>-</sup>). El porcentaje de recombinación se da con respecto al número total de cepas analizadas. Para determinar si una cepa poseía ambas mutaciones primero se seleccionaron las que presentaban las características fenotípicas dadas por la mutación *cfwA2* y, en el caso de *medA* la combinación con la morfología medusa, en el caso de *creA* colonias compactas y en el caso de *trpB* las cepas que no pudieron crecer en ausencia de triptófano.



**Figura 12. Mapa genético de *cfwA*.**

*cfwA* fué localizado en el brazo izquierdo del cromosoma I muy cerca de los genes *pyrG* y *pyroB*. Las distancias están dadas en unidades de mapa (centiMorgan's ó cM). Las distancias en la parte superior son las reportadas en la literatura (Clutterbuck, 1990), las distancias de la parte inferior fueron obtenidas experimentalmente.



#### 2.4 *cfwA* es un gen esencial.

La existencia de una cepa con una mutación alélica sugirió que el producto del gen *cfwA* tiene una función esencial. Esta mutante aún no descrita, nos fué proporcionada por el Dr. Clutterbuck (Universidad de Glasgow, U.K.), quien la aisló en su laboratorio. La característica principal de esta mutante es su incapacidad para crecer por sí sola, pues requiere a una cepa silvestre para crecer. La mutante crece como un borde de conidióforos blancos alrededor de la cepa con la cual se co-inocula. El Dr. Clutterbuck, a través de cruza sexuales, asignó la mutación al cromosoma I, ligada a *medA*.

La mutación de esta mutante se designó *cfwA1* (cross feedable white, alelo 1).

Para determinar que se trataba de una mutación alélica a la nuestra, se seleccionaron conidios de la cepa mutante, se inocularon junto con la cepa CRO1. Se obtuvieron diploides capaces de crecer en medio mínimo. Las esporas obtenidas en la línea de complementación con la cepa silvestre presentaban conidios verdes. Esto indica que realmente era un diploide entre ambas cepas ya que la cepa CRO1 tiene la mutación *yA2* que si produjera conidios serían amarillos. Estos diploides nunca se pudieron haploidizar, concluyéndose que la mutación contenida en la cepa CRO1 es un alelo de *cfwA1* y ha sido designada *cfwA2*.

A partir de este resultado interpretamos que *cfwA1* es una mutación nula o total del gen *cfwA*, el cuál es indispensable para crecer, mientras que *cfwA2* es una mutación parcial o *leaky*, que conserva parte de la función del gen, lo que permite el crecimiento, pero afecta la diferenciación sexual y asexual.

### 3.0 ESTUDIO DEL RETRASO DE LA CONIDIACION EN LA MUTANTE *cfwA2*.

#### 3.1 Expresión del gen *brlA*.

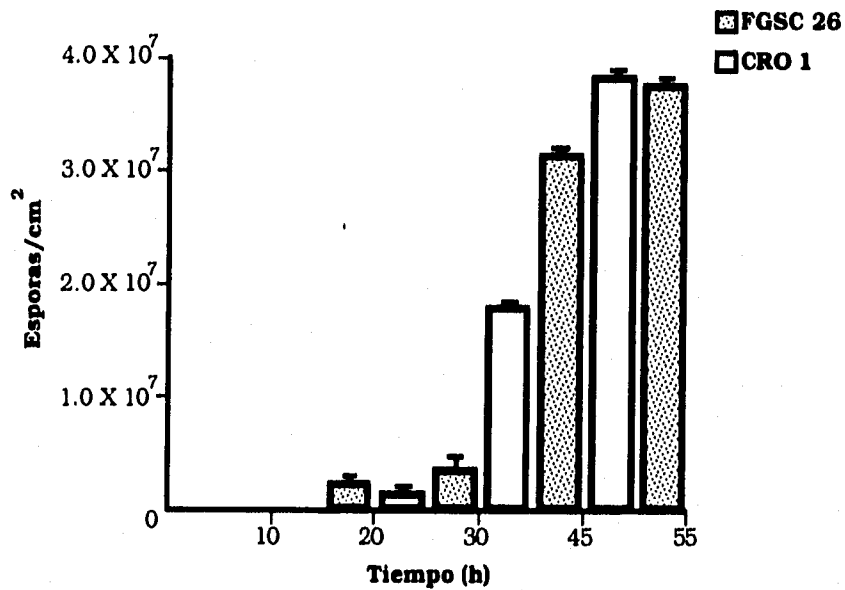
A simple vista, la mutación de *cfwA* da lugar a un retraso en la conidiación a 30°C. Para determinar la relación entre este retraso y la inducción del gen *brlA*, indispensable para la conidiación de *A. nidulans* (Adams et al., 1988), se extrajo RNA total de la cepa mutante (CRO1) y de una cepa silvestre (FGSC26) a diferentes tiempos de inducción de la esporulación (0, 10, 20, 30 y 45 h). Con este RNA se realizó una hibridación tipo northern, empleando como sonda un fragmento del gen *brlA*. En los resultados que se muestran en la figura 13, puede apreciarse un retraso de 10 h en la expresión del gen *brlA* en la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre.

Esto indica que el retraso en la conidiación que presenta la mutante se debe a la expresión tardía del gen *brlA*, por lo que posiblemente el producto del gen *cfwA* regula la expresión del gen *brlA* de manera directa o indirecta ya que su mutación da lugar a un retraso en la expresión del mismo.

**Figura 13. Expresión del gen *brlA* durante la inducción de la conidiación en una mutante *cfwA2* (CRO1) y una cepa silvestre (FGSC26).**

Los detalles metodológicos de las hibridaciones tipo northern se presentan en la sección de materiales y métodos. Los números indican el tiempo de inducción de la esporulación en horas. *brlA $\alpha$*  y *brlA $\beta$*  son las dos unidades de transcripción del gen *brlA* (Prade y Timberlake, 1993). Para confirmar que se puso la misma cantidad de RNA, se lavó la membrana y se hibridó con una sonda del gen *argB*.

La producción de esporas depende del gen *brlA* (Mirabito, et al., 1989). Consistente con esto, la cepa mutante mostró un retraso de 10 h en la producción de esporas con respecto a una cepa silvestre, como se observa en la figura 14. También se observa que el número de esporas es menor en la cepa mutante que en la cepa silvestre en las primeras horas de inducción de la esporulación, pero después de 55 h alcanza un número similar. La mutante *cfwA* a pesar de que expresa tardíamente el gen *brlA*, da lugar a conidióforos normales.



**Figura 14. Producción de esporas en una mutante en *cfwA* (CRO1) y una cepa silvestre (FGSC26).**

Las muestras empleadas para la realización de esta curva fueron las mismas que se emplearon para la extracción del RNA total, pero además se hizo la cuenta de esporas de las muestras correspondientes a las 55 h de inducción de la esporulación. El número de esporas que se presenta en cada tiempo corresponden al promedio de tres experimentos, con una variación máxima del 5% con respecto al promedio. Las esporas se contaron en un hemocitómetro y el cálculo final se hizo por cm<sup>2</sup> debido a que se tomó una área fija de cada muestra a partir de un cultivo conidionte sincrónico.

### 3.2 Expresión del gen *fluG*.

Habiendo encontrado que el retraso en la esporulación en la mutante *cfwA2* está asociado con un retraso en la expresión del gen *brlA*, decidimos explorar la posibilidad de que la expresión de otros genes conocidos, cuya mutación retrasa la expresión de *brlA*, puedan estar afectados en la mutante *cfwA2*. La mutación de estos genes da como resultado colonias *fluffy* (algodonosas), resultado de la proliferación indiferenciada del micelio vegetativo o aéreo dada por un retraso en la esporulación. Se han caracterizado recientemente cuatro de estos genes: *acoB*, *flbA*, *flbD* y *fluG* (Lee y Adams, 1994a, 1994b; Wieser y Adams, 1995; Lewis, C y Champe, S.P., 1995). Del que más se conoce es de *fluG* y se ha propuesto que regula la expresión de los genes *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*, mediante la producción de una señal extracelular y que los productos de estos genes se requieren para la activación de *brlA* (Wieser y Adams, 1995).

Para determinar alguna posible relación entre esta mutante y el gen *fluG*; dado el retraso en la esporulación, producto de la expresión tardía de *brlA*, realizamos una hibridación tipo northern. Se empleó como sonda un fragmento del gen *fluG*, RNA total de la cepa mutante CRO1 y de la cepa silvestre FGSC26, correspondiente a diferentes tiempos de inducción de la esporulación (0, 10, 20, 30 y 45 hr). Observamos que este gen se expresa de manera constitutiva, tanto en la cepa mutante como en la cepa silvestre Figura 15. Este resultado nos indicó que la expresión de el gen *fluG* no esta afectada en la mutante y sugiere que *cfwA2* actúa de manera independiente a *fluG* en la regulación de la expresión de *brlA*. Dobles mutantes (*fluG*<sup>-</sup>, *cfwA2*<sup>-</sup>), presentan un retraso en la esporulación mayor que cualquiera de las dos mutantes individuales y un fenotipo predominantemente *cfwA2* (Tapia y Aguirre, comunicación personal), lo cual apoya que *cfwA2* actúa de manera independiente a *fluG*.

**Figura 15. Expresión del gen *fluG*.**

Las muestras de RNA total empleadas para esta hibridación fueron las mismas que se emplearon para la hibridación con un fragmento del gen *brlA* (figura 13). En este caso, la hibridación tipo northern se hizo empleando como sonda un fragmento del gen *fluG* (ver materiales y métodos). La expresión de *fluG* en la cepa mutante se da de manera constitutiva al igual que en una cepa silvestre, lo que indica que los genes *cfwA* y *fluG* actúan de manera independiente sobre la expresión de *brlA* y la carencia del producto de ambos da lugar a un retraso en la esporulación. Los números indican el tiempo de inducción de la esporulación en horas. Para confirmar que se puso la misma cantidad de RNA en cada canal, se lavó la membrana y se hibridó con una sonda del gen *argB*.

#### 4.0 PRODUCCION DE CONIDIOS BLANCOS EN MUTANTES *cfwA2*.

##### 4.1 Expresión del gen $\omega A$ .

Aunque la mutación de *cfwA* provoca que la conidiación se retrase, las cepas mutantes finalmente producen conidióforos normales pero con conidios blancos. La síntesis de los pigmentos de las esporas depende de varios genes, entre los que destacan *yA* y  $\omega A$  (Aramayo y Timberlake, 1993; Mayorga y Timberlake, 1990). Los productos de estos genes catalizan secuencialmente la síntesis del pigmento a partir de un precursor incoloro.  $\omega A$  da lugar a una policétido sintasa necesaria para la producción del color amarillo, mientras que *yA* codifica para una *p*-difenoil oxidasa, necesaria para dar lugar al color verde final (ver Figura 6).

Dado que la mutación de *cfwA* da lugar a conidios blancos al igual que la mutación de  $\omega A$  (Mayorga y Timberlake, 1990), podría pensarse que una mutante *cfwA* produce esporas blancas porque no expresa  $\omega A$ . Para determinar si esto ocurre, se realizó una hibridación tipo northern empleando como sonda un fragmento del gen  $\omega A$ . Los resultados obtenidos se presentan en la figura 16, observamos que  $\omega A$  sí se expresa en la mutante, aunque tardamente, con respecto a una cepa silvestre. Esto es consistente con el hecho de que la expresión del gen  $\omega A$  esta regulada por *AbaA*, cuya presencia depende de *BrlA* (Aramayo y Timberlake, 1993; Andrianopoulos y Timberlake, 1994). Sin embargo, el retraso en la expresión de  $\omega A$  no explica porque las esporas son blancas ya que al mutar genes como *acoB*, *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE*, que también dan lugar a una expresión tardía de *brlA* y posiblemente de  $\omega A$ , se producen conidióforos con esporas pigmentadas (Lee y Adams, 1994a, 1994b; Wieser y Adams, 1995; Lewis, C y Champe, S.P., 1995). Considerando este resultado y que las mutantes dobles (*fluG*, *cfwA2*) presentaron un retraso en la esporulación mayor que cualquiera de las dos mutantes individuales, pero producen conidióforos con esporas blancas (Tapia y Aguirre, comunicación personal), proponemos que la mutación del gen *cfwA* impide que el precursor incoloro sobre el cual actúa el producto del gen  $\omega A$  se produzca en cantidades adecuadas. Se ha propuesto que el precursor de éste es la acetil-CoA ya que a partir de

ella se sintetiza malonil-CoA, precursor de policétidos como el precursor del pigmento amarillo intermedio (Armitt et al., 1976; Mayorga y Timberlake, 1992).

**Figura 16. Réplica tipo northern de la expresión del gen *wA*.**

Las muestras de RNA total empleadas para esta hibridación fueron las mismas que se emplearon para la hibridación con un fragmento del gen *brlA* (figura 13). En este caso, la hibridación tipo northern se hizo empleando como sonda un fragmento del gen *wA*. La mutación de este gen da lugar a la producción de esporas blancas y su expresión está regulada por *brlA* (Mayorga y Timberlake, 1990; Aramayo y Timberlake, 1993; Andrianopoulos y Timberlake, 1994). Para confirmar que se puso la misma cantidad de RNA en cada canal, se lavó la membrana y se hibridó con una sonda del gen *argB*. Los números indican el tiempo de inducción de la esporulación en horas.

## 5.0 AUTOESTERILIDAD EN MUTANTES *cfwA2*.

### 5.1 Efecto del factor PsiA.

La mutación de *cfwA* causa también un bloqueo en los procesos que se dan durante la esporulación sexual ya que cepas con esta mutación son autoestériles, es decir, pueden producir células Hülle (nodrizas), pero no pueden desarrollar cleistotecios (cuerpos fructíferos) ni ascosporas (esporas sexuales) viables por sí solas. Únicamente al cruzarlas con otra cepa que no este mutada en *cfwA* pueden obtenerse cleistotecios híbridos (producto de las dos cepas) o propios (*self*).

El Dr. S. P. Champe determinó que *A. nidulans* produce factores hormonales difusibles derivados del ácido linoleico ó factores Psi (precocious sexual inducers). Los factores Psi hasta ahora descritos son tres; PsiA, PsiB y PsiC. El primero es una lactona que se requiere para la esporulación asexual, que al parecer se interconvierte en PsiB *in vivo* y PsiC es un promotor de la esporulación sexual (Champe y Simon, 1992; figura 10).

Para explorar la posibilidad de que el retraso en la esporulación y la autoesterilidad se debieran a la falta de estos factores, decidimos probar el efecto de los mismos sobre la cepa CRO1. El Dr. Champe nos proporcionó PsiA únicamente ya que la purificación de PsiB o PsiC, es más complicada que la de PsiA por su inestabilidad. Lo deseable hubiera sido probar también PsiC y ver si la mutante sola en presencia de éste factor podía producir cleistotecios viables.

Como se observa en la figura 17, el retraso en la esporulación parece remediarse en presencia del factor PsiA ya que en la zona alrededor del papel filtro con PsiA, se observó una esporulación mas rápida y más sincrónica que en el resto del cultivo. Este resultado hace suponer que los mecanismos sobre los cuales actúa este factor, no están dañados en esta mutante. Sin embargo, dado que esta mutante si posee actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de estos factores (Champe, comunicación personal), podría pensarse que el retraso en la esporulación y la autoesterilidad se deben a que los precursores para la síntesis de los mismos es deficiente con respecto a la de una cepa silvestre, o bien que esta cepa no produce otros factores no descritos, con una actividad similar.



**Figura 17. Efecto del factor PsiA sobre la mutante *cfwA2*.**

Para determinar el efecto de PsiA, sobre la cepa mutante se inocularon esporas de la cepa CRO1 en agar suave sobre agar, se colocaron en la superficie 2 filtros de 4 mm de diámetro, a uno se le adicionaron 23 ng (20 µl) del metil ester de PsiA (forma activa) en (acetato de etilo, metanol/ácido) y en el otro filtro se colocó igual volumen de los disolventes. La fotografía corresponde a 16 h de incubación a 30°C. El retraso en la esporulación se remedia en presencia del factor PsiA ya que en la zona alrededor del papel filtro que lo contiene (señalada con flechas, de aproximadamente 0.8 cm de diámetro), se observó una esporulación mas rápida y más sincrónica que el resto del cultivo. Los detalles metodológicos se encuentran en material y métodos. Como control se realizó exactamente lo mismo para la cepa silvestre FGSC26, observándose también una estimulación de la conidiación por PsiA

### **6.0 Posible relación entre el producto del gen *cfwA* y la acetil CoA carboxilasa.**

Con el fin de dilucidar la naturaleza del producto del gen *cfwA2* consideramos los siguientes puntos:

1. El producto del gen *cfwA* regula al gen *brlA*, de manera directa o indirecta ya que la mutación de *cfwA* da lugar a una expresión tardía del mismo. Este y los defectos en el desarrollo sexual podrían ser mediados a través de una producción defectuosa de hormonas del tipo *PsIA*, las cuales son derivadas del ácido linoleico o de otro tipo de hormonas.
2. Este producto también está involucrado en la síntesis de pigmentos de los conidios, pues la mutación de *cfwA* prácticamente anula su producción.
3. Por ser un gen esencial, debe estar involucrado en la síntesis de metabolitos fundamentales para la vida del hongo.

De acuerdo a estas consideraciones, podría pensarse que la mutación de *cfwA2* daría lugar a un polipéptido alterado, el cual sería sensible a altas temperaturas. A 30°C, presentaría sólo una función parcial (*leakyness*), reflejándose esto en el fenotipo al que da lugar la mutación de *cfwA*.

En esta parte del trabajo nos propusimos explorar la posibilidad de que *cfwA* codificara para la enzima acetil-Co A carboxilasa. La mutante *cfwA* presenta alteraciones en la producción de los policétidos y posiblemente en las hormonas derivadas de ácidos grasos y considerando que la enzima que está involucrada en la síntesis de ambos es la acetil-Co A carboxilasa, mediante la síntesis de malonil-CoA (Hopwood y Sherman, 1990; Haßlacher et al., 1993), esta enzima resultaba un buen candidato para ser el producto de este gen. Aunque esto parece poco probable por tratarse de una enzima esencial, no lo es si se considera que existe una mutante alélica (*cfwA1*) que para crecer requiere de una cepa silvestre; lo que indica la mutación de un gen esencial. Por otra

parte han sido reportadas mutantes en acetil-CoA carboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae* que resultan auxótrofas para ácidos grasos de cadena larga, por lo que una mutante en esta enzima es viable.

### **6.1 Efecto de Soraphen A® sobre una cepa silvestre de *A. nidulans***

Soraphen A® es un policétido con acción fungicida que inhibe a la acetil-CoA carboxilasa en *Ustilago maydis* *in vitro* y en *S. cerevisiae* *in vivo* (Vahlensieck, et al., 1994). Para determinar si existía una relación entre el fenotipo observado en la mutante *cfwA* y la inhibición de acetil-CoA carboxilasa (ACC), decidimos probar el efecto de este policétido sobre una cepa silvestre de *Aspergillus nidulans*.

Para realizar este experimento colocamos diferentes concentraciones de este fungicida en papel filtro en una caja sembrada de manera homogénea con la cepa RMSO11. En la figura 18 puede observarse que justo alrededor de los papeles filtro con mayores concentraciones de Soraphen A® se formó un círculo claro carente de crecimiento micelial, mostrando que este compuesto también funciona como fungicida en *A. nidulans*. En la menor concentración probada (5 ng), no se observó el halo de inhibición de crecimiento, sino una area circular de crecimiento micelial blanca, la cual posteriormente formó conidióforos con esporas blancas, a semejanza de la mutante *cfwA*.

**Figura 18. Efecto de Soraphen A<sup>®</sup> sobre la cepa silvestre RMSO11.**

Para determinar la posible relación entre *cfwA* y la acetil-CoA carboxilasa, probamos el efecto de Soraphen A<sup>®</sup>, un policétido con acción fungicida que inhibe a la acetil-CoA carboxilasa, en otros hongos, sobre una cepa silvestre de *Aspergillus nidulans*. Para la realización de este experimento se sembraron esporas de la cepa RMSO11. Sobre la superficie se colocaron filtros de 4 mm de diámetro a los que se les adicionaron 0, 0.005, 0.05, 0.1, 0.5 y 1.25 µg de Soraphen A<sup>®</sup> (ver material y métodos).

Este resultado nos pareció sugestivo ya que el blanco de este fungicida es la acetil-CoA carboxilasa en otros hongos, podría considerarse que en *Aspergillus nidulans* fuera el mismo, por lo que el resultado observado podría interpretarse como una inhibición parcial de la acetil-Co A carboxilasa.

Es importante hacer notar que la mutante *cfwA2* no produce esterigmatocistina, a diferencia de una cepa silvestre (Ruiz-Herrera, comunicación personal). La esterigmatocistina es una micotoxina precursora de la aflatoxina B<sub>1</sub> sintetizada a partir de un policétido (octacétido yu y Leonard, 1995). Esto indica, nuevamente, que el producto de *cfwA* está involucrado en la síntesis de policétidos. Además, esta mutante presenta un perfil de policétidos diferente al que presenta

una cepa silvestre (Schnabel y Aguirre, comunicación personal). Estos datos confirman que esta mutante está afectada en la síntesis de policétidos.

También debe considerarse que se han encontrado variaciones en la composición de ácidos grasos libres en mutantes de *Aspergillus nidulans* sensibles a temperatura (Roshanara et al., 1980), al igual que en otros organismos sensibles a temperatura afectados en la acetil-CoA carboxilasa (Hori, et al., 1987). La composición de ácidos grasos de la membrana varía con la temperatura, gracias a que los termorreceptores de membrana reconocen un cambio de temperatura y varían la actividad de ACC/FAS, provocando un cambio en la proporción de acetil-CoA/malonil-CoA (Hori et al., 1987).

Encaminados a explorar de manera más directa la relación *cfwA*/acetil-CoA carboxilasa, realizamos dos tipos de experimentos de manera simultánea:

Por un lado transformamos la mutante *cfwA2* con cósmidos seleccionados por su hibridación con el gen de la acetil-CoA carboxilasa de levadura y por otro, determinamos los niveles de ácidos grasos libres en la mutante *cfwA2*, en comparación con una cepa silvestre.

### **6.2 Transformación de una cepa mutante con cósmidos que presumiblemente contienen el gen de la acetil-CoA carboxilasa.**

Primero determinamos, por hibridación tipo Southern, si un fragmento del gen de levadura que codifica para la ACC (Haßbacher et al., 1993), hibridaba con DNA de *A. nidulans* y encontramos que sí. Mediante otra hibridación tipo Southern, determinamos si alguno de los cósmidos del cromosoma I de la biblioteca genómica de *A. nidulans* separada por cromosomas (Brody et al., 1990), contenía este gen. Encontramos que 7 cósmidos (L13A06, L20C09, W13F01, W01C10, W28C01, W12E11 y W19B07) del cromosoma I hibridaron con la sonda de levadura, lo cual nos llevó a pensar que *cfwA* realmente codificaba para la acetil-CoA carboxilasa o bien, por coincidencia, este gen se encontraba también en el cromosoma I.

Co-transformamos a una cepa con la mutación *cfwA2*, con los siete cósmidos detectados.

Es importante hacer notar que los siete cósmidos identificados de esta manera hibridaron entre sí en experimentos encaminados a ordenar los cósmidos del cromosoma I (Prade, comunicación personal) y por lo tanto comparten secuencias.

La cepa que se co-transformó fué CMC2 (*cfwA2*, *riboB2*, *pyroA4*, *biA1*). La transformación se hizo empleando protoplastos obtenidos a partir de germinulas de esta cepa (los detalles metodológicos se encuentran en materiales y métodos). La misma cantidad de protoplastos obtenidos se mezcló en diferentes tubos con el DNA de los plásmidos (un plásmido integrativo pPL1 y un plásmido de replicación autónoma pHelp) y los cósmidos que hibridaron con la ACC fueron L13A06, L20C09, W13F01, W01C10, W28C01, W12E11 y W19B07, como se enlista en la siguiente tabla.

Tubo	protoplastos	pPL1	pHelp	ACC
1	√	√	---	---
2	√	√	√	---
3	√	√	√	√

pHelp es un plásmido de replicación autónoma capaz de formar cointegrados con pPL1 y/o los cósmidos utilizados, incrementando la frecuencia de transformación. El plásmido pPL1 contiene una copia del gen *riboB2* la cual es capaz de complementar cepas con la mutación *riboB2*, que son auxótrofas para riboflavina, por lo que se seleccionaron como cepas transformantes aquellas que eran capaces de crecer en un medio sin riboflavina.

Los resultados de la co-transformación se muestran en la tabla VI.

	sin DNA	pPL1	pPL1 y pHelp	pPL1, pHelp y "ACC"
	----	6.00	37.00	1.00
	----	3.00	44.00	2.00
$\bar{X}$	----	4.50	40.50	1.50
t/ml	----	45.00	405.00	15.00
t/ $\mu$ g	----	11.25	101.25	3.75

Controles de viabilidad

Pre-PEG	No. de colonias	Post-PEG	No. de colonias
conc.	incontables	conc.	incontables
1:100	incontables	1:100	156
1:1,000	17	1:1,000	2
1:10,000	0	1:10,000	0

**Tabla VI. Resultados de la co-transformación de la cepa CMC2 (*riboB2*; *pyroA4*; *bia1*; *cfwA2*).**

Para la cotransformación de la cepa CMC2 (*riboB2*; *pyroA4*; *bia1*; *cfwA2*), se emplearon el plásmido pPL1 que contiene al gen *riboB2*, el plásmido pHelp y los cósmidos que presumiblemente contienen al gen de la acetil-CoA carboxilasa L13A06, L20C09, W13F01, W01C10, W28C01, W12E11 y W19B07 "ACC". Los detalles de la transformación se encuentran en la sección de materiales y métodos.  $\bar{X}$  representa en promedio de dos experimentos, t/ml se refiere al número de transformantes por ml de mezcla de transformación y t/ $\mu$ g se refiere al número de transformante por  $\mu$ g del plásmido pPL1. Sin DNA se refiere a protoplastos a los que no se les adicionó DNA de plásmidos o cósmidos y se sembraron en medio selectivo. Los controles de viabilidad corresponden a: Pre-PEG protoplastos a los que no se les adicionó DNA de plásmidos o cósmidos y se plaquearon en medio no selectivo y Post-PEG protoplastos a los que no se les adicionó DNA de plásmidos o cósmidos, pero se les trató de igual manera que a los que sí se les adicionó DNA y fueron plaqueados en medio no selectivo.

En los resultados de la transformación que se presentan en la Tabla VI, puede observarse que el plásmido pHelp incrementó cerca de 10 veces el número de transformantes en relación al pPL1 solo (de 45 a 405). Sin embargo, la presencia de los cósmidos de la ACC redujo este incremento notablemente (15 transformantes totales contra 405). Las 15 transformantes obtenidas los cósmidos de la ACC mostraron un fenotipo indistinguible de la cepa CMC2 en cuanto a la producción de esporas blancas.

Este resultado habla en contra de la posibilidad de que *cfwA* codifique para la ACC y sugiere que copias extras del supuesto gen de la ACC no modifican los patrones de pigmentación de las esporas en *A. nidulans*.

Aún cuando no se demostró formalmente que las transformantes *riboB+* contuvieran los cósmidos probados, se sabe que en experimentos

de co-transformación aproximadamente el 50% de las transformantes incorporan los dos ó mas tipos de DNA probados, por lo que al menos la mitad de las transformantes deben contener los cósmidos de ACC.

Existe también la posibilidad de que el gen de la ACC de *A. nidulans* no esté representado de manera intacta en los siete cósmidos probados.

### 6.3 Caminata en el cromosoma I a partir de *pyrG*.

Dado que los resultados obtenidos hasta el momento no indicaban que la acetil-CoA carboxilasa fuera el producto del gen *cfwA*, decidimos localizar los cósmidos de la biblioteca que pudieran contener al gen *cfwA*, para ello se "caminó" sobre el cromosoma I a partir del gen *pyrG* empleando a los cósmidos de la biblioteca genómica de *Aspergillus nidulans*, que hibridan con *pyrG* (Prade, comunicación personal). Esto se determinó mediante una hibridación tipo Southern, en la que los cósmidos que contienen el cromosoma I, se hibridaron con una sonda que se preparó a partir de uno de los cósmidos que contienen al gen *pyrG* (L10G09; los detalles metodológicos se encuentran en la sección de materiales y métodos). Después de una serie de hibridaciones, además de los cósmidos L10F09, L19A12, L10G09 y L19B11, se localizaron los cósmidos L24O07, W07C06, W26C10, L25C12, W27G11 y L30C03.

La cepa CMC2 (*cfwA2*, *riboB2*, *pyroA4*, *biA1*) se co-transformó con una mezcla de estos cósmidos y con una mezcla de los que contienen *pyrG*. La transformación se hizo empleando protoplastos obtenidos a partir de germinulas de esta cepa. La misma cantidad de protoplastos se mezcló en diferentes tubos con el DNA de los plásmidos (un plásmido integrativo pPLI y un plásmido de replicación autónoma pHelp) y los cósmidos que hibridaron con *pyrG* que fueron L10F09, L19A12, L10G09 y L19B11 y los cósmidos obtenidos durante la "caminata" por el cromosoma "CW" L24O07, W07C06, W26C10, L25C12, W27G11 y L30C03 como se enlista en la siguiente tabla.

Tubo	protoplastos	pPLI	pHelp	" <i>pyrG</i> "	"CW"
1	√	√	--	--	--
2	√	√	√	--	--
3	√	√	√	√	--
4	√	√	√	--	√



Los resultados de la co-transformación se presentan en la Tabla VII.

El número de transformantes (70) obtenidas con los cósmidos que contienen "pyrG", excluye la posibilidad de que el gen *cfwA* se encuentre muy cercano a *pyrG*. De acuerdo con nuestro mapa genético, hay menos de 12 unidades de mapa entre *cfwA* y *pyrG*.

Aunque la relación entre la distancia entre dos genes medida por recombinación y la distancia física real, no siempre correlaciona linealmente, se ha observado que en *A. nidulans*, una unidad de mapa corresponde a aproximadamente 6 Kb (Clutterbuck et al., 1994). De esta manera, una distancia entre *pyrG* y *cfwA* de 10 cM correspondería a aproximadamente 60 Kb. Los cósmidos utilizados en este estudio, poseen insertos de aproximadamente 50 kb, por lo que la estrategia de la caminata parecería plausible. Sin embargo, la biblioteca utilizada es altamente redundante (Prade, comunicación personal). Después de tres ciclos de hibridación a partir del cósmido L10G09, se avanzó muy poco en ambas direcciones. Esto fué evidenciado por el hecho de que en la última hibridación, se siguió observando hibridación con el cósmido inicial L10G09.

	sin DNA	pPL1	pPL1, pHelp	pPL1, pHelp y "pool pyrG"	pPL1, pHelp y "pool CW"
	----	6.00	37.00	5.0	1.00
	----	3.00	44.00	9.0	000
X̄	----	4.50	40.50	7.0	0.50
t/ml	----	45.00	405.00	70.0	5.00
t/μg	----	11.25	101.25	17.5	1.25

**Tabla VII. Resultados de la co-transformación de la cepa CMC2 (*riboB2*; *pyroA4*; *bia1*; *cfwA2*).**

Para la co-transformación de la cepa CMC2 (*riboB2*; *pyroA4*; *bia1*; *cfwA2*), se emplearon el plásmido pPL1, el plásmido pHelp, los cósmidos que hibridaron con *pyrG* "pyrG" (L10F09, L19A12, L10G09 y L19B11) y los cósmidos obtenidos durante la "caminata por el cromosoma" "CW" (L24007, W07C06, W26C10, L25C12, W27G11 y L30C03). X representa en promedio de dos experimentos, t/ml se refiere al número de transformantes por ml de mezcla de transformación y t/μg se refiere al número de transformante por μg del plásmido pPL1. Sin DNA se refiere a protoplastos a los que no se les adicionó DNA de plásmidos o cósmidos y se sembraron en medio selectivo. Los valores de las columnas "sin DNA", "pPL1" y "pPL1, pHelp", así como los controles de viabilidad son los mismos que se reportan en la tabla VI.

#### 6.4 Determinación de ácidos grasos libres, en una cepa mutada en *cfwA2*.

Se ha observado que el contenido de ácidos grasos libres varía en mutantes afectadas en la acetil-Co A carboxilasa (Hori et al., 1987) y aunque con la transformación no encontramos que la mutante *cfwA2* estaba afectada en esta enzima, decidimos determinar si presentaba alguna variación en el contenido de ácidos grasos libres con respecto a una cepa silvestre. Estos cambios podrían acentuarse a 42°C, si se considera que la composición de ácidos grasos de la membrana varía con la temperatura (Rhoshanara, et al., 1980; Hori et al., 1987).

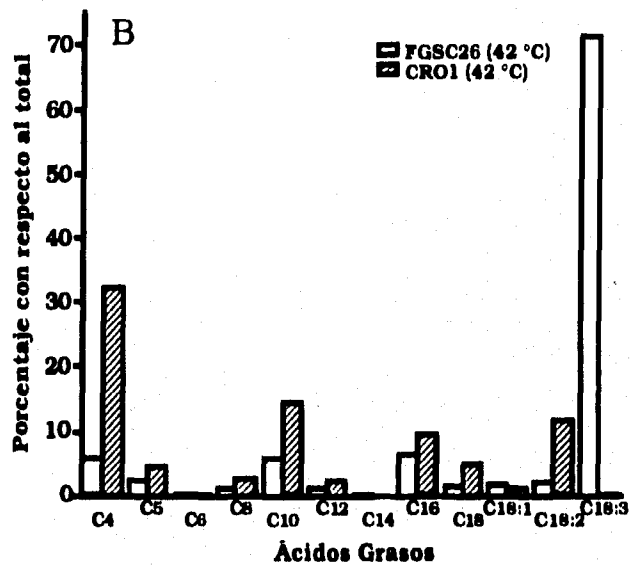
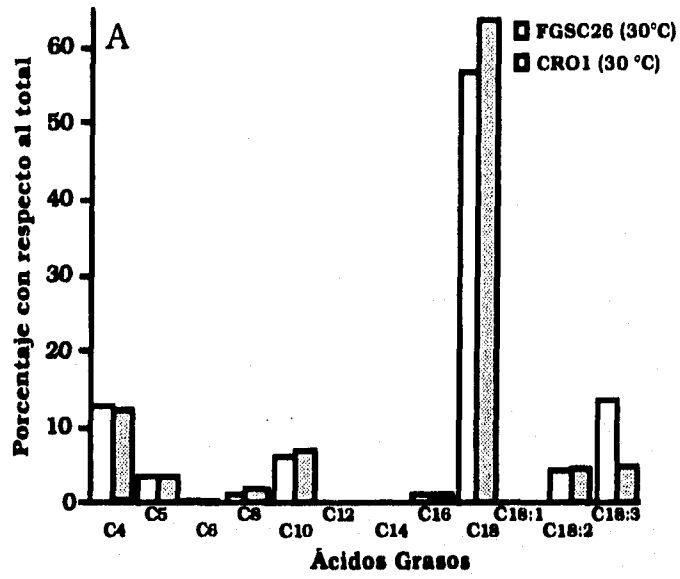
Los ácidos grasos libres se extrajeron de micelio seco a partir de un cultivo líquido de cada una de la cepas FGSC26 y CRO1. Los detalles metodológicos se encuentran en la sección de Materiales y Métodos.

Este análisis se hizo por duplicado a partir de un solo extracto de ácidos grasos y los resultados que se presentan son el promedio de ambos.

En los resultados que se presentan en la figura 19 se observa que a 30°C (Figura 19A), no hay cambios notables en las pozas de ácidos grasos libres entre la cepa mutante *cfwA2* y la cepa silvestre, excepto por el C18:3 (ácido linolénico), el cual es aproximadamente tres veces mayor en la cepa silvestre. A 42°C (Figura 19B), se observan diferencias notables entre las cepas silvestre y mutante.

Hay aproximadamente 70 veces más ácido linolénico en la cepa silvestre. Contrariamente, hay entre 5 y 3 veces más ácido linolénico, butírico y estéarico en la cepa mutante.

De los resultados a 30°C podría concluirse que no parece haber un gran desbalance en las pozas de ácidos grasos libres entre las dos cepas analizadas excepto por una menor concentración de ácido linolénico en a mutante. Esta diferencia se ve exacerbada a 42°C, lo cual sugeriría problemas para sintetizar ácidos grasos libres de cadena larga en la mutante. Esto sería consistente con la acumulación de ácidos grasos libres de cadena corta observada en la mutante a 42°C. De confirmarse estos datos serían consistentes con la hipótesis de que la mutante *cfwA* esta afectada en la síntesis de ácidos grasos por lo menos a 42° y esto podría explicar en parte su sensibilidad a temperatura.



**Figura 19. Porcentaje de ácidos grasos libres en una cepa mutante (CRO1) y en una cepa silvestre (FGSC26).**

Con el fin de determinar si esta mutante tiene diferentes niveles de ácidos grasos como otras mutantes sensibles a temperatura (Roshanara y Shanmugasundaram, 1980) y la variación de estos sea la causa de su sensibilidad a temperatura, así como la falta de producción de policétidos y posiblemente de factores hormonales derivados de ácidos grasos, analizamos la concentración de ácidos grasos libres, tanto de la cepa mutante como de una cepa silvestre a 30 y 42 °C.

Los ácidos grasos libres se extrajeron de micelio seco a partir de un cultivo líquido de cada una de la cepas FGSC26 y CRO1. Los detalles metodológicos se encuentran en la sección de materiales y métodos.

La gráfica superior muestra el porcentaje de ácidos grasos libres en ambas cepas a 30°C y la inferior a 42°C.

Los porcentajes son con respecto al total de ácidos grasos en cada caso. La identificación de los diferentes ácidos grasos se realizó por comparación de la muestra con estándares de referencia previamente identificados. Los ácidos grasos, están representados con el número de carbonos que contiene cada uno, de acuerdo a la siguiente lista.

C <sub>4</sub> =ácido butírico.	C <sub>5</sub> =ácido pentanóico.	C <sub>6</sub> =ácido capríco.
C <sub>8</sub> = ácido caprílico.	C <sub>10</sub> =ácido cáprico.	C <sub>12</sub> =ácido laúrico.
C <sub>14</sub> =ácido mirístico.	C <sub>16</sub> =ácido palmítico.	C <sub>18</sub> =ácido esteárico.
C <sub>18:1</sub> =ácido oléico.	C <sub>18:2</sub> =ácido linoleico.	C <sub>18:3</sub> =ácido linolénico.

## VII. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados en esta tesis, puede decirse lo siguiente:

1. El fenotipo pleiotrópico de la nueva mutante de *Aspergillus nidulans* aquí estudiada, es el resultado de una mutación recesiva en un solo gen (*cfwA*). Este gen se encuentra en el brazo izquierdo del cromosoma I, cercano a los genes *pyrG* y *pyroB*.

2. Este gen es esencial ya que una mutación alélica a la aquí estudiada, provoca que la cepa que la posee sea incapaz de crecer por sí sola; únicamente crece junto a una cepa silvestre.

3. *cfwA* regula directa o indirectamente la expresión del gen *brlA*. La mutación *cfwA2* da lugar a la expresión tardía de *brlA*. Esta regulación es independiente de la que se ha propuesto para genes como *fluG* (Lee y Adams, 1994).

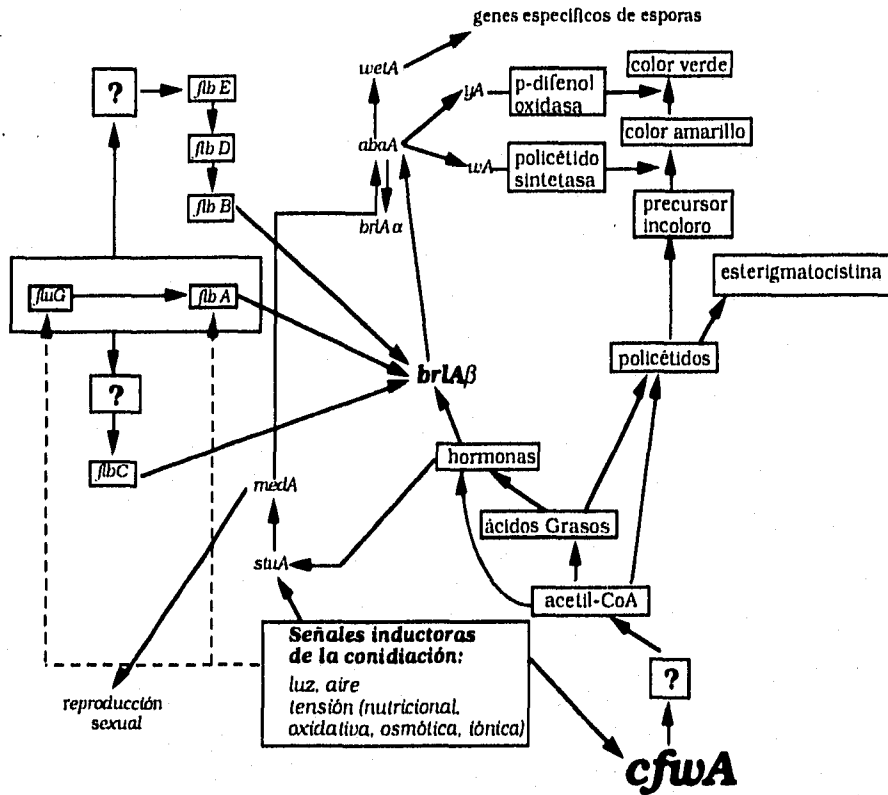
4. Aunque *wA* se expresa tardíamente por estar regulado por *brlA*, finalmente se expresa en la mutante *cfwA*. El hecho de que el gen *wA* si transcriba no indica que se esté traduciendo. Sin embargo, el que durante la complementación extracelular se detecte la producción de conidios pigmentados por la mutante (en la zona de complementación), indica que el mRNA de *wA* se está traduciendo y que la proteína que produce es funcional. Por lo que el fenotipo de conidios blancos parece corresponder a la falta del precursor, sustrato de la policétido sintasa producida por el gen *wA*.

5. El gen *cfwA* está relacionado con los procesos que se dan durante la esporulación sexual ya que su mutación da lugar a cepas autoestériles. Esto puede deberse a una baja producción de factores hormonales como los factores Psi (precocious sexual inducers), promotores de la esporulación sexual. Aunque la mutante *cfwA2* produce las enzimas necesarias para la producción de estos factores y sus precursores (Champe, comunicación personal), el factor *psiA* fué capaz de remediar el retraso en la esporulación en la mutante.

6. Aunque los resultados que aquí presentados, no indican que el producto de *cfwA* sea la acetil-CoA carboxilasa; el producto de este gen al igual que dicha enzima, vincula el metabolismo primario con el metabolismo secundario.

7. La mutación del gen *cfwA2* parece disminuir los niveles de un precursor de policétidos necesario para la síntesis de pigmentos (posible sustrato de la proteína WA), así como los sustratos de otras dos policétido sintetas indispensables para la síntesis de esterigmatocistina (micotoxina precursora de la aflatoxina B<sub>1</sub> sintetizada a partir de un policétido; octacétido (Yu y Leonard, 1995; Chang et al., 1995) ya que la mutante *cfwA2* no produce esterigmatocistina (Guzmán, Aguirre y Ruiz-Herrera, comunicación personal) y produce un perfil de policétidos diferente al de una cepa silvestre (Schnabel y Aguirre, comunicación personal).

Considerando los resultados mencionados, proponemos el siguiente esquema (Figura 20) en el que se relaciona a *cfwA* con *brlA*, *wA* y la síntesis de policétidos y factores hormonales derivados de ácidos grasos.



**Figura 20.** Posible papel del gen *cfwA*, en el crecimiento, la esporulación y el metabolismo secundario.

Este esquema se pretende relacionar *cfwA*, *brlA*, *wA*, la síntesis de policétidos y factores hormonales derivados de ácidos grasos.

Proponemos que el gen *cfwA2* está involucrado en la síntesis de un metabolito esencial ligado con la producción de factores hormonales (similares al factor Psi) y con la producción de policétidos (precursores de pigmentos). Un candidato sería un regulador de la síntesis de acetil CoA o de sus niveles, pues está es precursor de la síntesis de policétidos y de ácidos grasos (Hopwood, et al., 1990). *cfwA* actuaría de manera independiente a otros genes propuestos como reguladores de la expresión de *brlA*, tales como *fluG* (Wieser y Adams, 1995, Lee y Adams, 1995).

La caracterización de la nueva mutante de *Aspergillus nidulans*, presentada en este trabajo, nos indicó que el producto de este gen está involucrado en el metabolismo primario, el metabolismo secundario y la diferenciación celular de este hongo. Esto incrementa el interés en determinar cuál es la función del gen *cfwA*, tanto por razones básicas como aplicadas.

Para la identificación de este gen se propone lo siguiente:

1. Seguir transformando la mutante *cfwA* con el Cromosoma I de bibliotecas genómicas de *A. nidulans* hasta clonar por complementación el gen mutado. Alternativamente, proseguir con la caminata en el cromosoma I a partir de *creA* y *pyrG* hasta encontrar el punto de contigüidad.

2. El producto del gen *wA* es una policétido sintasa cuya secuencia presenta homología con secuencias de otras policétido sintasas y sintasas de ácidos grasos de diferentes organismos. Sería interesante determinar si en el cromosoma I existen secuencias similares a la de este gen, en regiones cercanas a *pyrG* y *pyroB*, hibridando con un fragmento de *wA*. Simultáneamente podría determinarse si alguno de los cósmidos del cromosoma I tienen homología con alguno de los transcritos que definen el grupo de genes aislados e identificados recientemente participan en la síntesis de esterigmatocistina (Brown, et al., 1996).

3. La sensibilidad a temperatura, el retraso en esporulación asexual, la producción de conidios (esporas asexuales) blancas en lugar de pigmentadas y la incapacidad de producir cleistotecios viables o ascosporas (esporas sexuales) por sí sola, se revierten por complementación extracelular al crecer a una cepa silvestre a un lado de la mutante. En la interfase entre las dos colonias se producen conidióforos pigmentados y en las condiciones adecuadas cleistotecios. Por ello, debe realizarse un mayor esfuerzo en intentar determinar la naturaleza de esta sustancia. Esto puede hacerse mediante una purificación exhaustiva a partir del medio sólido que rodea a una colonia de una cepa silvestre o directamente de una cepa silvestre.



4. Recientemente se ha reportado que una señal extracelular (CsgA) indispensable para el desarrollo de *Mixococcus xantus* requiere no solo de la proximidad célula-célula sino que también de una orientación específica. Curiosamente, esta proteína presenta homología con miembros de la familia SCAD (short-chain alcohol dehydrogenase),

Los miembros de la familia SCAD catalizan reacciones de oxido/reducción, algunos sustratos o productos son moléculas que actúan como señal para otras reacciones, como prostaglandinas y esteroides en vertebrados y factores de nodulación en *Rhizobium*. Esta familia también está involucrada en la producción de numerosos metabolitos secundarios que incluyen policétidos, aflatoxinas y melaninas de hongos (Lee et al., 1995). Por lo que podría determinarse si los cósmidos del cromosoma I hibridan con genes de la familia SCAD y determinar si el gen *cfwA* tiene alguna relación con este tipo de señales extracelulares que requieren de la proximidad célula-célula.

## VOLUME REFERENCES

- Adams, T.H., Boylan, M.T. y Timberlake, W.E. (1988). *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 54: 353-362.
- Adams, T.H., Deising, H. y Timberlake, W.E. (1990). *brlA* requires both zinc fingers to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1815-1817
- Aguirre, J. (1993). Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol. Microbiol.* 8 (2) 211-218.
- Aguirre, J., Adams, T.H. y Timberlake, W.E. (1990). Spatial control of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. *Exp. Mycol.* 14: 290-293.
- Andrianopoulos, A. y Timberlake, W.E. (1994). The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol. Cell Biol.* 14: 2503-2525.
- Aramayo, R. y Timberlake, W.E. (1990). Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans yA* (laccase I) gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 3415.
- Aramayo, R. y Timberlake, W.E. (1993). The *Aspergillus nidulans yA* gene is regulated by *abaA* *EMBO J.* 12: 2039-2048.
- Armitt, S., McCullough, W. y Roberts, C.F. (1976). Analysis of acetate non-utilizing (*acu*) mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 92: 263-282.
- Axelrod, D.E. (1972). Kinetics of differentiation of conidiophores and conidio by colonies of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 73: 541-545.
- Axelrod, D.E.; Gealt, M. y Pastushak, M. (1973). Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Develop. Biol.* 34: 9-15.
- Bartnicki-García, S.; Braker, C.E.; Reyes, E. y Ruiz-Herrera, J. (1978). Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrils in vitro. *Exp. Mycol.* 2: 173-192.
- Boylan, M.T., Mirabito, P.M., Willett, C.E., Zimmerman, C.R. y Timberlake, W.E. (1987). Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 3113-3118
- Brody, H.; Griffith, J.; Cuticchia, A.J.; Arnold, J. y Timberlake, W. (1991). Chromosome-specific recombinant DNA libraries from the fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* 19: 3105-3109.

- Brown, D.W.; Yu, J.H., Kelkar, H.S.; Fernandes, M.; Nesbitt, T.C.; Keller, N.P. y Adams, T.H. (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 1-6.
- Butnick, N.Z.; Yager, L.N.; Kurtz, M.B. y Champe, S.P. (1984). Genetic analysis of mutants of *Aspergillus nidulans* blocked at an early stage of sporulation. *J. Bacteriol.* 160: 541-545.
- Clutterbuck, A.J. (1969). A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63: 317-327.
- Clutterbuck, A.J. (1970). A variegated positional effect in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res.* 16: 303-316.
- Clutterbuck, A.J. (1977). The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*. En: *Genetics and Physiology of Aspergillus*, editores: Pateman, J.A. y Smith, J.E. p. 305-317, Academic Press. New York, EUA.
- Clutterbuck, A.J. (1990). *Aspergillus nidulans*. En: *Genetic maps. Locus maps of complex genomes*. 5ta. ed., editor: O'Brien, S.J. p. 3.97-3.108. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EUA.
- Clutterbuck, A.J. y Timberlake, W.E. (1992). Genetic regulation of sporulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. En: *Development, The molecular genetic approach*, editores: Russo, V.E.A.; Brody, S.; Cove, D.J. y Ottolenghi, S. Springer-Verlag. Berlin, Alemania.
- Clutterbuck, A.J.; Gems, D.H. y Robertson, T. (1994). ARp1 an *Aspergillus* replicating plasmid. En: *The Genus Aspergillus. The taxonomy and genetics to industrial application*. FEMS Symposium No.69, editores: Powell, K.; Renwick, A y Pervade, J.F. p. 189-196. Plenum Press, New York, EUA.
- Cole, G.T. (1986). Models of cell differentiation in conidial fungi. *Microbiol. Rev.* 50 (2) 95-132.
- Cross, S.H. y Little, P.F.R. (1986). A cosmid vector for systematic chromosome walking. *Gene* 49:9-22.
- Champe, S.P. y El-Zayat, A. E. (1989). Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 171: 3982-3988.
- Champe, S.P. y Simon, L.D. (1992). Cellular differentiation and tissue formation in the fungus *Aspergillus nidulans*. En: *Morphogenesis: An analysis of the development of biological form*, editores: Rossumondo, E. y Alexander, S.p. 63-91. Marcel Dekker Inc. New York, EUA.
- Champe, S.P.; Kurtz, M.B.; Yager, L.M.; Butnick, N.J. y Axelrod, D.E. (1981). Spore formation in *Aspergillus nidulans*: Competence and other developmental processes, En: *The fungal spore: Morphogenetic controls*, editores: Turian, G. y How, H.R. p. 255-276. Academic Press. New York. EUA.

- Champe, S.P.; Rao, P. y Chang, A. (1987). An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1383-1387.
- Chang, P-K; Cary, J. W.; Yu, J.; Bhatnagar, D. y Cleveland, T. E. (1995) The *Aspergillus parasiticus* poliketide synthase gene *pksA*, a homolog of *Aspergillus nidulans* *wA*, is required for aflatoxin B<sub>1</sub> biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 248: 270-277.
- Christie, W.W. (1982). The isolation of lipids from tissues. En: *Lipid Analysis*, 2da ed., p. 17-23 Pergamon Press, Oxford, EUA.
- Fennel, D.I. (1977). *Aspergillus* taxonomy, En: *Genetics and Physiology of Aspergillus*, editores: Paterman, J.A. y Smith, J.E. p. 1-21. Academic Press, New York, EUA.
- Gems, D. H.; Johnstone, I.L.; Clutterbuck, A.J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98: 61-67.
- Gems, D.H. y Clutterbuck, J.A. (1993). Co-transformation with autonomously-replicating helper plasmids facilitates gene cloning from an *Aspergillus nidulans* gene library. *Curr. Genet.* 24: 520-524.
- Gibson, T.J., Rosenthal, A. y Waterson, R.H. (1987) Loris6, a cosmid vector with *Bam*HI, *Not*I, *Sca*I and *Hind*III cloning sites and altered neomycin phosphotransferase gene expression. *Gene* 53: 283-286.
- Gooday, G.W. (1983). Hormones and sexuality in fungi. En: *Secondary metabolism and differentiation in fungi*. p.239-266, Marcel Dekker, Inc., New York, EUA.
- Goodrich-Tanrikulu, M.; Mahoney, N.E. y Rodriguez S.B. (1995). The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Microbiology* 141: 2831-2837.
- Hamberg, M. y Gardner, W. (1992) Oxylipin pathway to jasmonates biochemistry and biological significance. *Biochem. Biophys. Acta.* 1165: 1-18.
- Hans, S.; Navarro, J.; Greve, R.A. y Adams, T.H. (1993). Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J.* 12 (6) 2449-2457.
- Hansberg, W. y Aguirre, J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.* 142: 201-221.
- Haßlacher, M.; Ivessa, A.S.; Paltauf, F. y Kohlwein, S.D. (1993). Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 268: 10946-10952.

- Hopwood, D. A. y Sherman, D. H. (1990). Molecular genetics of poliketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 24: 37-66.
- Hori, T.; Nakamura, N. y Okuyama, H. (1987). Possible involvement of Acetyl-Coenzyme A carboxylase as well as fatty acid synthetase in the temperature controlled synthesis of fatty acids. *J. Biochem.* 101: 949-956.
- Käfer, E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its cromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19: 33-131.
- Kurjan, J. (1992). Pheromone response in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1097-1129.
- Kurtz, M.B. y Champe, S.P. (1981). Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidulans* defective in germination and sexual development. *J. Bacteriol.* 148: 629-638.
- Kurtz, M.B. y Champe, S.P. (1982). Purification and characterization of the conidiol laccase of *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol* 151: 1338-1345.
- Law, D.J. y Timberlake, W.E. (1980). Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 114: 509-517.
- Lee, B-U., Lee, K., Mendez, J. y Shinkerts, L.J. (1995) A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD(P)<sup>+</sup>-containing protein. *Genes Develop.* 9: 2964-2973.
- Lee, B. N. y Adams, T. (1994 a). The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Develop.* 8: 641-651.
- Lee, B.N. y Adams, T. (1994 b). Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol. Microbiol.* 14: 323-334.
- Lee, B.N. y Adams, T. (1995). *fluG* and *flbA* function iterdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* activation. *EMBO J.* 15 (2) 299-309.
- Lewis, C. y Champe, S.P. (1995). A pre-induction sporulation gene from *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* 141: 1821-1828.
- Li, S. J. y Cronan, J. E. (1993). Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl-coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 175: 332-340.
- Marshall, M.A. y Timberlake, W.E. (1991). *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 11: 55-62.
- Martinelli, S.D. (1979). Phenotypes of double conidiation mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 114: 277-287.

- Martinelli, S.D. y Clutterbuck, A.J. (1971). A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 69: 261-268.
- Mayorga, M.E. and Timberlake, W.E. (1990). Isolation and molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *wA* gene. *Genetics* 126: 73-79.
- Mayorga, M.E. y Timberlake, W.E. (1992). The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* *wA* gene encodes a polypeptide homologous to poliketide and fatty acid synthase. *Mol. Gen. Genet.* 235: 205-212.
- McKerracher, L.J. y Heath, I.B. (1987). Cytoplasmic migration and intracellular organelle movement during tip growth of fungal hyphae. *Exp. Mycol.* 11: 79-100.
- Miller, B.L. (1993). Brushing up on bristless complex genes and morphogenesis in mold. *Trends Genet.* 9: 293-295.
- Mirabito, P.M.; Adams T.H. y Timberlake, W.E. (1989). Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* 57: 859-868.
- Mooney, J.L. y Yager, L.N. (1990). Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Develop.* 4: 1473-1483.
- 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.
- Oliver, P.T.P. (1972). Conidiophore and spore development in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 73: 45-54.
- O'Hara, E.B. y Timberlake, W. E. (1989). Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *yA* locus. *Genetics* 121: 249-254.
- Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; MacDonald, K.D. y Bufton, A.W.J. (1953). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5:141.
- Prade, R.A. y Timberlake, W.E. (1993). The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus consist of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J.* 12: 2439-2447.
- Raper, K.B. y Fennel, D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. Williams y Wilkins, Baltimore.
- Roshanara, B.; Shanmugasundaram, E.R.B. (1980). Lipid components variation among the temperature-sensitive mutants and wild strain of *Aspergillus nidulans*. *Ital. J. Biochem.* 30: 127-140.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning a laboratory manual, 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Samuelsson, B. y Funk, C. D. (1989). Enzymes involved in the biosynthesis of Leukotriene B<sub>4</sub>. *J. Biol. Chem.* 264: 19469-19472.
- Sembdener, G. y Pharthier, B. (1993). The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 569-589.
- Serlupi-Crescenzi, O.; Kurtz, M. B. y Champe, S. P. (1983). Developmental defects resulting from arginine auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 3535-3544.
- Silver, J.C.; Brunt, Sh.A.; Kyriakopoulou, G.; Borkar, M. y Nazarian-Armavil, V. (1993). Regulation of two different hsp70 transcript populations in steroid hormone-induced fungal development. *Develop. Genet.* 14: 6-14.
- Skromne, I.; Sánchez, O. y Aguirre, J. (1995). Starvation stress modulates the expression of *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* 141: 21-28.
- Smith, J. E.; Anderson, J. G.; Deans, S. G. y Davis, B. (1977). Asexual development in *Aspergillus*. En: *Genetics and Physiology of Aspergillus*, editores: Paterman, J.A. y Smith, J.E. Academic Press. New York, EUA.
- Som, T. y Kolaparthi, V.S.R. (1994) Developmental Decision in *Aspergillus nidulans* are modulated by *ras* activity. *Mol. Cell Biol.* 14: 5333-5348.
- Spelling, T.; Bölker, M.; Lottspeich, F.; Frank, R.W. y Kahmann, R. (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 13 (7) 1620-1627.
- Stringer, M.A.; Dean, R.A. Sewall, T.C. Timberlake, W.E. (1991). *Rodletless*, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene activation. *Genes Develop.* 5: 1161-1171.
- Tamame, M.; Antequera, F.; Villanueva, J.R. y Santos, T. (1983). High frequency conversion to a "fluffy" developmental phenotype in *Aspergillus spp* by 5-azacytidine treatment; evidence for involvement of single nuclear gene. *Mol. Cell Biol.* 3: 2287-2297.
- Timberlake, W.E. (1980). Developmental gene regulation in *Aspergillus nidulans*. *Develop. Biol.* 78: 497-510.
- Timberlake, W.E. (1991a) Temporal and spatial controls of *Aspergillus* development *Curr. Biology* 1: 351-357.
- Timberlake, W.E. (1991b). Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu. Rev. Genet.* 24: 5-36.
- Timberlake, W.E. (1993). Translational triggering and feedback fixation in the control of fungal development. *Plant Cell* 5: 1453-1460.
- Timberlake, W.E. y Marshall, M.A. (1988). Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet.* 4: 162-169.

- Vahlensieck, H.F.; Pridzum, L.; Reichenbach y Hinnen, A. (1994). Identification of the yeast ACC1 genen product (acetyl-CoA carboxylase) as the target of the polyketide fungicide soraphen A. *Curr. Genet.* 25: 95-100.
- Ward, M. (1991). *Aspergillus nidulans* and other filamentous Fungi as Genetic systems, En: *Modern Microbial Genetics* p. 455-496, Wiley-Liss, Inc.
- Wieser, J. y Adams, T.H. (1995) *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Develop.* 9: 491-502.
- Yager, L. N. (1992). Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*, En: *Aspergillus, biology and industrial applications*, editores; Bennett, J.W. y Klich, M.A., p. 19-42. Butterworth-Heinemann Publications. Londres, Inglaterra
- Yager, L.N.; Kurtz, M.B. y Champe, S.P. (1982). Temperature shift analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Develop. Biol.* 93: 92-103.
- 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.
- Zimmerman, C.R.; Orr, W.C.; Leclere, R.F.; Barnard, E.C. y Timberlake, W.E. (1980). Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development. *Cell* 21: 709-715.
- Zonneveld, B.J.M. (1977). Biochemistry and ultrastructure of sexual development in *Aspergillus*, En: *Genetics and Physiology of Aspergillus*, editores; Smith, J.E. y Pateman, J.A. p. 59-95. Academic Press, Londres Inglaterra.