

Mutantes de diferenciación en *Aspergillus nidulans*: III Características de crecimiento.

Carmen Pereira, Facultad de Biología, Universidad de La Habana

RESUMEN

Se determinaron las características de crecimiento de cinco mutantes de diferenciación de *Aspergillus nidulans* a cuatro temperaturas diferentes. Se estableció que las mutaciones que definen el fallo en la diferenciación muestran un efecto pleiotrópico sobre el crecimiento. Mutantes con este tipo de efecto no han sido antes descritos. Se identificó para cada mutante un patrón de comportamiento temperatura específico, aunque en general a temperatura superior a la óptima de crecimiento, no se observó tal efecto.

ABSTRACT

The growth characteristics of five differentiation mutants of *Aspergillus nidulans* at four different temperatures were determined. It was established that the mutations determining differentiation failure had a pleiotropic effect over growth. Mutants with such type of pleiotropic effect have not been described before. For each mutant a specific pattern of temperature dependent behavior was identified, although in general supraoptimum growth temperature failed to elicit a pleiotropic effect.

INTRODUCCIÓN

El diámetro de la colonia y la velocidad de crecimiento radial se emplean como parámetros indicadores de crecimiento en los hongos. La velocidad específica de crecimiento es también una medida directa del crecimiento de estos organismos en cultivo sumergido (Trinci, 1969).

Cuando se pretende la caracterización morfológica o estudios de diferenciación y se quiere también caracterizar el crecimiento en hongos, se impone la utilización de un medio sólido, tal y como ha sido utilizado en el presente trabajo en el estudio de cinco mutantes de diferenciación de *Aspergillus nidulans*.

La caracterización de mutantes de diferenciación no ha incluido regularmente estudios de crecimiento, e.g., los trabajos de Dorn, 1970 y Hannan, 1975. En aquellas publicaciones en que se describen, generalmente se observa el cultivo durante un período de 64 horas (Martinelli y Clutterbuck, 1971; Waldron y Roberts, 1974).

Sin embargo, un período mayor puede ser recomendable, ya que cambios originados por el crecimiento "per se" pueden ser de interés. Trinci en 1969 demostró que si las condiciones ambientales alrededor de la periferia de la colonia devienen desfavorables para el crecimiento, el mismo se verá afectado. En particular, cuando estudiamos líneas mutantes pueden originarse cambios en el medio, producto de la acumulación de productos tóxicos o cambios de pH que no se hagan evidentes en las primeras fases de crecimiento.

La velocidad de crecimiento de mutantes de diferenciación a diferentes temperaturas es de especial interés. Si esta mostrase diferencia entre parental y mutante a la temperatura óptima de crecimiento, el estudio de este efecto a otras temperaturas puede aportar elementos para establecer su relación con el fallo en la diferenciación.

MATERIALES Y MÉTODOS

LÍNEAS

Las líneas de *A. nidulans* empleadas en este estudio pertenecen a la colección del Dpto. de Genética y Evolución de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana

UH - 74 : biA; alX

UH - 76 : pabaA; ya; au; fw

UH - 156 : suA adE₂₀, pabaA, ya; acrA; chaA

UH - 187 : prototrófica

UH - 403 : dilB, adE₂₀, biA; wa₂, cnxE; sC; nicA₂, lacA; choA; chaA

Los mutantes UH-74-F, UH-76-F, UH-156-F, UH-187-F y UH-403-F presentan el mismo genotipo parental excepto por la mutación que determina un patrón anómalo en su diferenciación.

Para detalles de los símbolos empleados se hace referencia al trabajo de Clutterbuck en 1973. Los alelos mutantes y su localización se da por Pontecorvo y cols. 1953; Roper y Käfer, 1957; Käfer, 1958; Pontecorvo, 1963 y Clutterbuck, 1974.

MEDIOS

Medio completo (MC) básicamente descrito por Pontecorvo y cols., 1953; Käfer, 1958 y Barrat y cols., 1965.

PRUEBAS DE CRECIMIENTO:

Las placas de agar fueron preparadas con 20 ml de MC. Las mismas fueron de un tamaño uniforme, 100 x 15 mm. Como algunos de los mutantes no forman conidios, para evitar posibles diferencias en el crecimiento inicial de cultivos originados de conidios o hifas, las puntas hifales extremas provenientes de cultivos en MC a 37°, incubados durante 48 horas, fueron usadas como inóculo. El tamaño del inóculo fue de aproximadamente 4 mm² y cada placa fue inoculada en un solo punto.

El crecimiento se registró midiendo el diámetro de la colonia en tres direcciones, manteniendo una buena iluminación para asegurar la medición de las puntas hifales no conidiadas, ya que en el caso de los mutantes, aún en los que conidian, puede representar una superficie bastante amplia.

La velocidad de crecimiento fue calculada de mediciones efectuadas a intervalos de 24 horas en cuatro temperaturas, 22°C, 28°C, 37°C y 42°C. Al menos se realizaron dos experimentos independientes con tres réplicas cada uno.

El análisis estadístico de los datos consistió en la prueba "t" de Student para comparar las medias mutante y parental del diámetro de la colonia dentro de cada línea, para cada temperatura a cada tiempo. Se estimó la regresión lineal entre el período de tiempo (x) y diámetro de la colonia (y) para cada línea a cada temperatura.

La velocidad de crecimiento está representada por (b) en la ecuación $y = a + bx$. El análisis de la significación de las diferencias en la velocidad de crecimiento se efectuó mediante un análisis de varianza. Se efectuaron comparaciones de la velocidad de crecimiento:

1. Entre la línea mutante y parental a cada temperatura.
2. Entre temperaturas a cada línea (mutante o parental)

Cuando se comparaban más de dos medias en el análisis de varianza, se aplicó la prueba "t" de Student para establecer la significación de la diferencia entre medias. Un nivel de significación de $P < 0,05$ ó $P < 0,01$ fue establecido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los datos de crecimiento de los cinco mutantes de diferenciación muestra que la mayoría de las mutaciones son pleiotrópicas, ya que fueron establecidas diferencias en el crecimiento entre estas líneas mutantes de diferenciación y la línea parental correspondiente. Se enfatiza que las diferencias entre ambos tipos de líneas no fueron drásticas, sino más bien ligeras.

En general, a 37° no se encontraron diferencias significativas consistentes, (tablas 1, 2, 3, 4, 5), en el diámetro de la colonia ya que las velocidades de crecimiento fueron las mismas para cada mutante y parental, con excepción del mutante 76F (tabla 6).

Es de interés hacer notar que a 42° no se observó un efecto pleiotrópico sobre el crecimiento en los mutantes 156F, 74F y 76F (tablas 2, 3, 4 y 6). Aún más, en dos de ellos, 187F y 403F, se estableció una mayor velocidad de crecimiento a esta temperatura (tablas 1, 5 y 6). Puede sugerirse, que como a esta temperatura el crecimiento en las líneas de tipo salvaje (parentales) es deprimido en relación con 37°C, las ligeras diferencias de crecimiento observadas en esta última temperatura, se hacen negligibles a 42°. Esto puede ser una explicación plausible para el comportamiento de los mutantes 156F, 74F y 76F. Sin embargo, en el caso de los otros dos mutantes, es más bien difícil explicar por cuáles mecanismos se alcanzan estas características de crecimiento.

Sobre la base del diámetro de la colonia, la tasa de crecimiento mutante/parental y velocidad de crecimiento, se observa que el efecto pleiotrópico sobre el crecimiento en los mutantes 156F, 187F, 76F y 74F es más notable a 28°C, aunque para el mutante 74F en un sentido diferente. La relación establecida entre el mutante y parental en la línea 403 a 37°, no fue afectada por esta temperatura.

Era de esperar que a 22°, las relaciones y efectos observados a 28° se expresasen de igual forma o en todo caso fuesen más pronunciados. Este es el caso en los mutantes 74F y 187F (tablas 3, 5 y 6). Sin embargo, para el mutante 76F aunque su crecimiento se vio más afectado a 28° que a 37°, un efecto favorable se presenta a 22°C (tabla 4). También las características de crecimiento del mutante 156F son más similares entre 37° y 22° que a 28°. En el caso de la línea 403, ni siquiera las pequeñas diferencias presentes a 37° y 28° durante las primeras 24 horas pudieron ser observadas a 22°. Es un hecho bien conocido y también mostrado en nuestros resultados (tablas 1 a 6), que a temperaturas diferentes a la óptima, el crecimiento de una cepa salvaje se reduce considerablemente, y este efecto es aún más evidente a temperaturas extremas, e.g., 22° y 42°. Por lo tanto, es posible sugerir la posibilidad de que el efecto pleiotrópico sobre el crecimiento, encontrado en estos mutantes de diferenciación no depende de la temperatura

"per se"; sino de cambios específicos causados por la temperatura sobre el metabolismo celular. Vargha y Szabó en 1984 sugerían la existencia de diversos estados metabólicos en mutantes de *Streptomyces*, transformables entre sí en dependencia de estímulos exógenos.

Algunos estados serían permisivos y otros no para la expresión de una característica dada. Sería entonces plausible interpretar en nuestros resultados de manera similar el efecto de la temperatura sobre el efecto pleiotrópico en el crecimiento.

CONCLUSIONES

En los cinco mutantes de diferenciación estudiados se determinó un efecto de la mutación sobre el crecimiento. Este efecto pleiotrópico, aunque relacionado con la temperatura de crecimiento, no puede plantearse que se deba a la existencia de algún tipo de metabolito termolábil relacionado de manera directa o indirecta con el crecimiento, ya que la comparación de las velocidades de crecimiento mostradas por cada mutante en las diferentes temperaturas es inconsistente con esta hipótesis.

Estos estudios demostraron que el fallo en la diferenciación no es consecuencia de una alteración en el metabolismo vegetativo de los mutantes ("support" loci, Clutterbuck, 1977). Estas diferencias en el crecimiento deben ser consideradas como una expresión de la diferenciación anómala ya que a temperaturas en las cuales no se detectó diferencia alguna respecto al crecimiento entre el mutante y el parental, se mantuvo el fenotipo mutante de diferenciación.

BIBLIOGRAFÍA

Barrat, R.W.; G.B. Johnson and W.N. Ogata

1965. Wild - type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52: 233-242.

Clutterbuck, A.J.

1974. *Aspergillus nidulans*. Handbook of genetics. 1st. ed. R.C. King. Plenum Publishing Corp., New York, p. 447-510.

Clutterbuck, A.J.

1977. The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*. In *Genetics and Physiology of Aspergillus*. Ed. J.E. Smith and J.A. Pateman. Academic Press, London.

Dorn, G.L.

1970. Genetic and morphological properties of undifferentiated and invasive variants of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 66: 267-279.

Hannan, M.A.

1975. Isolation and analysis of conidiation defective mutants of *Aspergillus niger*. *Molec. Gen. Genet.* 142: 333-340.

- Käfer, E.
1958. An eight - chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 9: 105-145.
- Pontecorvo, G.
1963. Glasgow list of located or partially located mutants of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus Newsletter* 4: 12.
- Pontecorvo, G.; J.A. Roper and L.M. Hemmons; K.D. Macdonald and A.W.J. Bufton
1953. The genetic of *Aspergillus nidulans*. *Advan. Genet.* 5: 141-238.
- Martinelli, S.D. and A.J. Clutterbuck
1971. A quantitative survey of conidiation mutants in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 69: 261-268.
- Roper, J.A. and E. Käfer
1957. Acriflavine resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 16:660-664.
- Trinci, A.P.J.
1969. A Kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* 57: 11-24.
- Waldron, C. and C. Roberts
1974. Cold Sensitive mutants in *Aspergillus nidulans*. I. Isolation and general characterization. *Molec gen. Genet.* 134: 99-113.

Recibido: 12 de mayo de 1986.

Tabla 1. Comparación del crecimiento de la cepa mutante y parental 403 en medio sólido a diferentes temperaturas^a

Temperatura	Período de tiempo (horas)						
	24	48	72	96	120	168	
22°C							
Parental	-	16.9	26.2	34.8	42.7	59.7	
Mutante	-	16.3	26.7	35.0	43.3	61.1	
Tasa Crecimiento ^b	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
28°C							
Parental	14.4	29.4	44.4	59.3	72.8	-	
Mutante	15.6*	30.9	45.3	59.4	74.2	-	
Tasa Crecimiento	0.92	1.0	1.0	1.0	1.0	-	
37°C							
Parental	17.2	32.2	50.2	61.7	80.6	-	
Mutante	16.1*	32.0	48.6	64.4	79.0	-	
Tasa Crecimiento	0.94	1.0	1.0	1.0	1.0	-	
42°C							
Parental	-	18.1	24.9	32.5	39.7	53.5	
Mutante	-	19.2	26.6	34.4	41.8	56.4	
Tasa Crecimiento	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	

aValores de crecimiento expresados en mm y equivalentes al diámetro colonial

^bMutante: Parental

* $P < .05$. Comparación entre medias para cada temperatura y en cada período de tiempo ("t" Student)

Tabla 2. Comparación del crecimiento de la cepa mutante y parental 156 en medio sólido a diferentes temperaturas

Temperatura	Períodos de tiempo (horas)					
	24	48	72	96	120	168
22°C						
Parental	-	16.1	22.5	27.8	33.1	44.0
Mutante	-	13.8**	19.6*	24.0	29.0**	42.4
Tasa Crecimiento ^b	-	0.86	0.88	0.86	0.88	1.0
28°C						
Parental	16.8	31.2	42.2	62.2	75.3	-
Mutante	13.4**	25.1**	37.1*	48.9**	60.8**	-
Tasa Crecimiento	0.80	0.80	0.88	0.79	0.81	-
37°C						
Parental	17.2	42.1	48.7	64.0	78.2	-
Mutante	15.3	29.4*	44.4*	58.7*	72.3*	-
Tasa Crecimiento	1.0	0.92	0.91	0.92	0.92	-
42°C						
Parental	-	17.1	23.9	31.1	38.4	51.6
Mutante	-	16.6	23.1	30.6	37.5	51.0
Tasa Crecimiento	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

^aValores de crecimiento expresados en mm y equivalentes al diámetro colonial.

^bMutante; Parental

* $p < .05$; ** $p < .01$. Comparación entre medias para cada temperatura y en cada período de tiempo ("t" Student)

Tabla 3. Comparación del crecimiento de la cepa mutante y parental 74 en medio sólido a diferentes temperaturas^a

Temperatura	Períodos de tiempo (horas)						
	24	48	72	96	120	168	
22°C							
Parental	-	17.5	26.0	33.7	41.2	57.7	
Mutante	-	19.6	28.2**	35.2	42.3	57.7	
Tasa Crecimiento ^b	-	1.0	1.08	1.0	1.0	1.0	
28°C							
Parental	16.5	31.1	43.8	59.9	73.2	-	
Mutante	17.3	42.5*	49.7	54.5**	78.5**	-	
Tasa Crecimiento	1.0	1.05	1.0	1.08	1.07	-	
37°C							
Parental	16.4	33.3	49.6	63.3	77.3	-	
Mutante	18.8	34.1	49.2	61.5	77.3	-	
Tasa Crecimiento	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	
42°C							
Parental	-	17.8	23.7	29.8	36.5	47.0	
Mutante	-	16.8	23.4	29.4	37.3	48.2	
Tasa Crecimiento	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	

^aValores de crecimiento expresados en mm y equivalente al diámetro colonial

^bMutante; Parental

* $p < .05$; ** $p < .01$. Comparación entre medias para cada temperatura y en cada período de tiempo ("t" Student)

Tabla 4. Comparación del crecimiento de la cepa mutante y parental 76 en medio sólido a diferentes temperaturas^a

Temperatura	Período de tiempo (horas)					
	24	48	72	96	120	168
22°C						
Parental	-	14.8	21.8	27.5	33.6	50.2
Mutante	-	12.7	17.5	21.7	27.2	39.6*
Tasa Crecimiento ^b	-	1.0	1.0	1.0	1.0	0.79
28°C						
Parental	12.8	26.3	39.7	52.4	65.8	-
Mutante	11.1**	20.3**	33.0**	45.9**	54.3**	-
Tasa Crecimiento	0.87	0.77	0.83	0.88	0.93	-
37°C						
Parental	15.8	30.9	46.6	61.6	76.7	-
Mutante	14.4	27.5**	42.3**	56.7**	70.6**	-
Tasa Crecimiento	1.0	0.89	0.91	0.92	0.92	-
42°C						
Parental	-	17.3	23.4	32.0	39.4	53.4
Mutante	-	15.9	22.6	30.4	37.0	50.7
Tasa Crecimiento	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

^aValores de crecimiento expresados en mm y equivalentes al diámetro colonial

^bMutante; Parental

*P < .05; **P < .01. Comparación entre medias para cada temperatura y en cada período de tiempo ("t" Student)

Tabla 5. Comparación del crecimiento de la cepa mutante y parental 187 en medio sólido a diferentes temperaturas^a

Temperatura	Período de tiempo (horas)					
	24	48	72	96	120	168
22°C						
Parental	-	14.5	24.5	31.6	39.3	54.6
Mutante	-	12.8**	19.6**	25.8**	32.2**	45.3**
Tasa Crecimiento ^b	-	0.88	0.80	0.82	0.82	0.84
28°C						
Parental	16.3	29.2	45.0	58.4	71.7	-
Mutante	13.7	25.5	32.3**	48.6**	60.8**	-
Tasa Crecimiento	1.0	1.0	0.80	0.83	0.85	-
37°C						
Parental	17.2	32.5	49.3	64.5	77.7	-
Mutante	14.0**	30.1*	44.8*	60.1	74.5	-
Tasa Crecimiento	0.81	0.93	0.91	1.0	1.0	-
42°C						
Parental	-	18.9	26.3	33.3	40.3	50.6
Mutante	-	13.3*	26.0	34.4	41.1	57.1
Tasa Crecimiento	-	0.74	1.0	1.0	1.0	1.0

^aValores de crecimiento expresados en mm y equivalentes al diámetro colonial

^bMutante; Parental

*P < .05; **P < .01. Comparación entre medias para cada temperatura y en cada período de tiempo ("t" Student)

Tabla 6. Comparación de la regresión de la progresión del crecimiento micelial como función de la edad del cultivo en cepas mutantes y parentales a diferentes temperaturas

Cepas	Temperatura (°C)			
	22	28	37	42
403	$\bar{y} = 0.36x + 0.18$	$\bar{y} = 0.61x + 0.10$	$\bar{y} = 0.65x + 1.47$	$\bar{y} = 0.29x + 3.84$
403F	$\bar{y} = 0.36x - 0.22$	$\bar{y} = 0.61x + 1.15$	$\bar{y} = 0.65x + 0.53$	$\bar{y} = 0.31x + 4.30^{**}$
156	$\bar{y} = 0.23x + 5.48$	$\bar{y} = 0.61x + 1.14$	$\bar{y} = 0.62x + 3.40$	$\bar{y} = 0.28x + 3.28$
156F	$\bar{y} = 0.23x + 2.10$	$\bar{y} = 0.49x + 1.48^{**}$	$\bar{y} = 0.62x - 0.62$	$\bar{y} = 0.28x + 2.68$
74	$\bar{y} = 0.33x + 1.65$	$\bar{y} = 0.59x + 2.22$	$\bar{y} = 0.62x + 3.33$	$\bar{y} = 0.25x + 5.81$
74F	$\bar{y} = 0.31x + 4.94^*$	$\bar{y} = 0.64x + 2.19^*$	$\bar{y} = 0.62x + 3.51$	$\bar{y} = 0.25x + 5.77$
76	$\bar{y} = 0.29x + 0.24$	$\bar{y} = 0.55x - 0.22$	$\bar{y} = 0.63x + 0.54$	$\bar{y} = 0.30x + 3.05$
76F	$\bar{y} = 0.22x + 1.20^{**}$	$\bar{y} = 0.46x - 0.69^{**}$	$\bar{y} = 0.59x - 0.20^{**}$	$\bar{y} = 0.30x + 1.26$
187	$\bar{y} = 0.32x + 0.39$	$\bar{y} = 0.58x + 2.15$	$\bar{y} = 0.63x + 2.28$	$\bar{y} = 0.26x + 7.09$
187F	$\bar{y} = 0.27x - 0.32^{**}$	$\bar{y} = 0.48x + 0.97^*$	$\bar{y} = 0.63x - 0.85$	$\bar{y} = 0.35x - 1.21^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Las comparaciones se realizaron para cada cepa (mutante-parental) a cada temperatura. ANOVA de \bar{y} . Además para cada una de las cepas mutantes o parental se compararon las regresiones de las cuatro temperaturas mediante un ANOVA, observando que todas fueron significativamente diferente ($P < 0.01$)