

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**  
**IZTAPALAPA**  
**CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**



Casa abierta al tiempo

/// **“CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *Aspergillus niger***  
**SOBREPRODUCTORAS DE PECTINASAS” \ \**

U. A. M. IZTAPALAPA BIOTECNOLOGÍA

Tesis que para obtener el Grado de Maestro en Biotecnología presenta:

**Ing. Octavio Loera Corral ,**

**México, D. F. a 23 de Junio de 1994**

153900

**Dr. Gustavo Viniegra González. Tutor.**

**Dr. Jesús Aguirre Linares. Asesor.**

**Dr. Christopher Augur. Revisor.**

## R E S U M E N .

En un intento para obtener cepas de *Aspergillus niger* sobreproductoras de pectinasas, Antier y col. (1993) aislaron dos series de mutantes (series *dgrAw99* y *dgrAw96*) resistentes a 2-desoxiglucosa (2DG), llamadas mutantes *dgr*, a partir de la cepa silvestre C28B25, altamente sensible a 2DG.

De la serie *dgrAw99*, seleccionada en un medio con 2DG y alta actividad de agua ( $A_w=0.99$ ), se obtuvieron mutantes sobreproductoras de pectinasas en cultivo sumergido (CS), como la cepa *Aw99-iii2*. Por otro lado, de la serie *dgrAw96*, se obtuvieron mutantes sobreproductoras de pectinasas en fermentación en estado sólido (FES), como la cepa *Aw96-4*, aisladas de un medio con 2DG y baja actividad de agua ( $A_w=0.96$ ).

En general, las mutantes *dgr* mostraron poca represión catabólica sobre la producción de pectinasas, en comparación con la cepa silvestre C28B25. Sin embargo, esto no se relacionó con alguna mutación *creA*.

Las cepas *Aw99-iii2* y *Aw96-4* fueron seleccionadas como representativas de cada una de las series de mutantes. Para la caracterización genética se aislaron auxótrofos de arginina de cada cepa seleccionada. Fue posible obtener transformantes de la cepa auxótrofa *Aw99ARG* (proveniente de la cepa *Aw99-iii2*) usando el plásmido de replicación autónoma *pDHG25*, el cual lleva inserto el gene *argB* de *Aspergillus nidulans* (Gems y col., 1991). Sin embargo, no fue posible el análisis mediante el ciclo parasexual, con una cepa maestra, debido a incompatibilidad para formar heterocariones entre dicha cepa y nuestras mutantes.

A partir de un heterocarión formado entre las dos cepas auxótrofas obtenidas, se aisló un diploide (D4) que resultó altamente sensible a la 2DG, como la cepa silvestre C28B25. Sin embargo, este diploide D4 retuvo la capacidad para sobreproducir pectinasas en CS (122% mayor producción que la cepa silvestre), incluso tuvo una producción ligeramente mayor que la de la cepa *Aw99-iii2* (resistente a 2DG). El fenotipo del diploide D4 sugiere que el requerimiento de arginina en las cepas auxótrofas se debe a mutaciones distintas. Además sugiere que en *Aspergillus niger* hay al menos dos *loci* involucrados en la resistencia a 2DG, y que la resistencia a 2DG no necesariamente está relacionada con la mayor producción de enzimas.

Con respecto a la morfología de crecimiento y respuesta a 2DG en el medio, medidas en caja de Petri, el diploide D4 no parece tener el fenotipo de la cepa silvestre C28B25, también sensible a 2DG, o algún fenotipo dominante de las cepas seleccionadas (*Aw99-iii2* o *Aw96-4*) para construir los auxótrofos que le dieron origen. No se observó una relación directa entre la velocidad de producción de biomasa de las cepas, en un medio con pectina y  $A_w=0.96$ , y la producción de pectinasas en FES, al mismo valor de  $A_w$ .

## LISTA DE ABREVIACIONES.

2DG: 2-desoxi-D-glucosa.  
alcR: Gene regulador de la alcohol-deshidrogenasa.  
ARG<sup>-</sup>: Fenotipo de auxotrofia de arginina.  
ARG: Arginina.  
argB: Gene que codifica la ornitino-transcarbamilasa.  
A<sub>w</sub>: Actividad de agua.  
brlA: Gene maestro de la conidiación en *Aspergillus*.  
CIT: Citrulina.  
cpsA1: Marcador genético de conidióforos cortos en *A. niger*.  
creA: Gene que codifica la proteína de represión catabólica.  
CS: Cultivo Sumergido.  
DGR: Fenotipo de resistencia a 2DG.  
dgr: Genes que confieren resistencia a 2DG.  
DGS: Fenotipo de sensibilidad a 2DG.  
E.L.: Extracto de levadura.  
esp: esporas.  
FES: Fermentación en Estado Sólido.  
FGSC: Fungal Genetic Stock Center.  
fig.: figura.  
fwnA1: Marcador genético que da pigmentación café a las esporas de *Aspergillus niger*.  
G.I.: Germinación Incipiente.  
g: gramos.  
g: Unidad de atracción gravitacional.  
h-c: Cada uno de los grupos compatibles para formar heterocariones entre sí.  
h: horas.  
het: Genes involucrados en la incompatibilidad para formar heterocariones.  
hisD4: Marcador genético de auxotrofia de histidina.  
l: litros.  
lacZ: Gene estructural de la beta-galactosidasa en *Escherichia coli*.  
L<sub>c</sub>: Longitud crítica de una hifa antes de ramificar.  
leuA1: Marcador genético de auxotrofia de leucina.  
L<sub>o</sub>: Longitud promedio de hifas terminales en micelios.

*lysA7*: Marcador genético de auxotrofia de lisina.  
M: molar.  
 $\mu$ : Velocidad específica de crecimiento.  
 $\mu$ W: microwatts.  
mg: miligramos.  
min: minutos.  
 $\mu$ l: microlitros.  
ml: mililitros.  
MM: Medio Mínimo.  
 $\mu$ m: micras.  
mM: milimolar.  
MMF: MM con frutosa 10 g/l.  
MMG: MM con glucosa 10 g/l.  
MML: MM con glicerol 10 g/l.  
MMP: MM con pectina 10 g/l.  
mRNA: RNA mensajero.  
MS: Medio suplementado.  
*niaD*: Gene que codifica la nitrato reductasa.  
*nicA1*: Marcador genético de auxotrofia de nicotinamida.  
*oliC*: Marcador genético de resistencia a oligomicina.  
ORN: Ornitina.  
OTC: ornitino-transcarbamilasa.  
P.E.: Proceso de enriquecimiento.  
*pabA1*: Marcador genético de auxotrofia de ácido para-aminobenzoico.  
PDA: Agar Papa Dextrosa.  
PEG: Polietilenglicol.  
pffen: para-fluorofenilalanina.  
PRO: Prolina.  
psi: Libras por pulgada cuadrada.  
*pyrG*: Gene que codifica la orotidín-5-fosfato descarboxilasa.  
RC: Represión Catabólica.  
rpm: revoluciones por minuto.  
U: Unidades de actividad enzimática.  
UV: Luz ultravioleta.  
Vr: Velocidad de extensión radial.

# INDICE GENERAL.

Resumen.	i
Lista de Abreviaciones.	ii
Indice General.	iv
Indice de Figuras.	vi
Indice de Tablas.	ix

## CAPITULO 1. Introducción.

1.1 Biología general de los hongos filamentosos.	1
1.2 Clasificación.	3
1.2.1 Ascomicetos.	3
1.2.2 Deuteromicetos.	4
1.3 Genética Clásica.	5
1.3.1 El Ciclo Sexual.	5
1.3.2 El Ciclo Parasexual.	7
1.4 Genética Molecular.	11
1.4.1 Introducción.	11
1.4.2 Sistemas de transferencia y desarrollo de vectores.	12
1.4.3 Estrategias de clonación.	15
1.5 Genética molecular de cepas con importancia económica.	16

## CAPITULO 2. Antecedentes.

2.1 Antecedentes.	23
2.2 Hipótesis.	28
2.3 Objetivos.	28
2.3.1 Objetivo General.	28
2.3.2 Objetivos Específicos.	28

## CAPITULO 3. Materiales y Métodos.

3.1 Microorganismos.	29
3.2 Medios y condiciones de cultivo.	30
3.2.1 Medios de cultivo.	30
3.2.2 Cultivo Sumergido.	31
3.2.3 Fermentación en Estado Sólido.	31
3.3 Confirmación de mutaciones creA.	31
3.4 Mutagénesis.	32
3.5 Proceso de Enriquecimiento.	32
3.6 Análisis Genético.	33
3.6.1 Formación de heterocariones.	33
3.6.2 Aislamiento de diploides.	33
3.6.2 Haploidización.	34
3.7 Transformación Genética.	34
3.7.1 Crecimiento del cultivo.	34
3.7.2 Obtención de protoplastos.	34
3.7.3 Transformación.	35
3.8 Análisis de resistencia a 2DG.	36
3.9 Ensayo Enzimático.	36
3.10 Parámetros de morfología de crecimiento.	37

CAPITULO 4. Estrategias para cruzas.	
4.1	Introducción. 39
4.2	Investigación de probables mutaciones <i>creA</i> . 39
4.2.1	Discusiones y conclusiones. 40
4.3	Resistencia a 2DG en distintas fuentes de C. 41
4.3.1	Discusiones y conclusiones. 41
4.4	Formación de heterocariones con presión selectiva de 2DG en MML. 47
4.4.1	Discusiones y conclusiones. 48
CAPITULO 5. Aislamiento de auxótrofos.	
5.1	Introducción. 51
5.2	Selección de cepas y tipo de auxotrofia. 51
5.2.1	Mutagénesis. 52
5.2.2	Discusiones y conclusiones. 54
5.3	Proceso de Enriquecimiento (P.E.). 54
5.3.1	Discusiones y conclusiones. 56
5.4	Características de crecimiento de las cepas <i>arg<sup>-</sup></i> obtenidas. 56
5.4.1	Discusiones y conclusiones. 59
5.5	Perfil de resistencia a 2DG de las cepas <i>arg<sup>-</sup></i> . 60
5.5.1	Discusiones y conclusiones. 61
5.6	Crecimiento de las cepas <i>arg<sup>-</sup></i> con precursores de arginina. 61
5.6.1	Discusiones y conclusiones. 63
5.7	Transformación genética. 64
5.7.1	Inestabilidad mitótica del plásmido pDHG25. 65
5.7.2	Discusiones y conclusiones. 66
CAPITULO 6. Construcción de diploides.	
6.1	Introducción. 67
6.2	Formación de heterocariones. 67
6.2.1	Discusiones y conclusiones. 70
6.3	Aislamiento de diploides y haploidización. 73
6.3.1	Discusiones y conclusiones. 74
6.4	Resistencia a la 2DG en los diploides. 75
6.4.1	Discusiones y conclusiones. 78
CAPITULO 7. Comparación entre el diploide D4 y las cepas <i>drg</i> .	
7.1	Introducción. 79
7.2	Producción de poligalacturonasas. 79
7.2.1	Producción en FES. 79
7.2.2	Producción en CS. 80
7.2.3	Discusiones y conclusiones. 83
7.3	Morfología de crecimiento. 84
7.3.1	Discusiones y conclusiones. 88
Conclusiones Generales. 91	
Bibliografía 94	

## INDICE DE FIGURAS.

- Figura 1.1.** (Pág. 11). Proceso de haploidización en *Aspergillus* por medio de la pérdida subsecuente de cromosomas (sólo se muestran 2 pares de cromosomas). El estado diploide se representa por  $2n$  y los haploides, por  $n$ .
- Figura 2.1.** (Pág. 25). Actividad de poligalacturonasa de las cepas de *A. niger*, aisladas por Antier y col. (1993), tanto en FES como en CS. Las mediciones se hicieron por viscosimetría a los 3 días de cultivo a 25°C.
- Figura 4.1.** (Pág. 40). Perfil de desarrollo de cepas de *A. niger* en presencia de alcohol alílico. Se muestra el comportamiento de la cepa de *A. nidulans* MH440, que lleva la mutación *creA*.
- Figura 4.2.** (Pág. 42). Resistencia a 2DG del diploide D1 en MMP. Se muestra el perfil de cada una de las cepas haploides que lo originaron, para esta cepas el medio se suplementó con los requerimientos necesarios. Cada punto corresponde al promedio de dos observaciones para cada cepa.
- Figura 4.3.** (Pág. 44). Resistencia a 2DG de las cepas en medio mínimo con glucosa (MMG) como única fuente de carbono, la medición de los diámetros se hizo a las 60 h de incubación a 30°C.
- Figura 4.4.** (Pág. 44). Resistencia a 2DG de las cepas en medio mínimo con frutosa (MMF) como única fuente de carbono, la medición de los diámetros se hizo a las 60 h de incubación a 30°C. Los símbolos para cada cepa corresponden a los de la figura 4.3.
- Figura 4.5.** (Pág. 45). Resistencia a 2DG de las cepas en medio mínimo con pectina (MMP) como única fuente de carbono, la medición de los diámetros se hizo a las 60 h de incubación a 30°C.
- Figura 4.6.** (Pág. 45). Resistencia a 2DG de las cepas en medio mínimo con glicerol (MML) como única fuente de carbono, la medición de los diámetros se hizo a las 60 h de incubación a 30°C. Los símbolos para cada cepa corresponden a los de la figura 4.5.
- Figura 4.7.** (Pág. 49). Efecto de la 2DG sobre la velocidad radial ( $V_r$ ) en 2 cepas *dgr*: Aw96-4 (a) y Aw99-iii2 (b), en MMP (2 g/l). En ambas se observa que al crecer en un medio con 2DG (0.10 g/l), la  $V_r$  se incrementa, de 139 a 193  $\mu\text{m/h}$  en la cepa Aw96-4 y de 123 a 189  $\mu\text{m/h}$  en la cepa Aw99-iii2.
- Figura 5.1.** (Pág. 53). Curva de sobrevivencia (%) en función de la irradiación con luz UV sobre las esporas de la cepa Aw96-4. Condiciones:  $8 \times 10^6$  esp/ml y 700  $\mu\text{W/cm}^2$ .



**Figura 5.2.** (Pág. 58). Gráficas de la velocidad radial promedio ( $V_r$ ) de las cepas  $arg^-$  en MMG suplementado con 0.5% de extracto de levadura (E.L.) y arginina 1.5 o 4.0 mM. **Figs. a:** cepa Aw99ARG y **b:** cepa Aw96-4ARG.

**Figura 5.3.** (Pág. 60). Perfil de resistencia a 2DG de las cepas  $arg^-$  en medio mínimo de pectina (MMP) suplementado con arginina 1.5 mM. Se hace la comparación con las cepas originales Aw99-iii2 y Aw96-4. Cada punto es el promedio de dos determinaciones.

**Figura 5.4.** (Pág. 62). Parte final de la ruta biosintética de arginina en *Aspergillus*, según Serlupi-Crescence (1983). Aparece la nomenclatura para designar las mutantes que tienen afectada alguna o varias enzimas responsables de cada paso.

**Figura 6.1.** (Pág. 71). Esquema de incompatibilidad entre 2 cepas de *Aspergillus nidulans* pertenecientes a grupos distintos de compatibilidad para formar heterocariones (h-c G1 y h-c B1). Se muestra que dependiendo del gene alélico de compatibilidad (*het*) que sea distinto, las dos cepas pueden ser incompatibles entre sí (Dales y col., 1983).

**Figura 6.2.** (Pág. 73). Diploides obtenidos (D1 a D4) a partir de las cepas compatibles.

**Figura 6.3.** (Pág. 76). Resistencia a 2DG del diploide D1 en MMP. Se muestra el perfil de cada una de las cepas haploides que lo originaron, para esta cepas el medio se suplementó con los requerimientos necesarios. Cada punto corresponde al promedio de dos observaciones para cada cepa.

**Figura 6.4.** (Pág. 76). Resistencia a 2DG del diploide D2 en MMP. Se muestra el perfil de cada una de las cepas haploides que lo originaron, para esta cepas el medio se suplementó con arginina 1.5 mM. Cada punto corresponde al promedio de dos observaciones para cada cepa.

**Figura 6.5.** (Pág. 77). Resistencia a 2DG del diploide D3 en MMP. Se muestra el perfil de cada una de las cepas haploides que lo originaron, para esta cepas el medio se suplementó con arginina 1.5 mM. Cada punto corresponde al promedio de dos observaciones para cada cepa.

**Figura 6.6.** (Pág. 77). Resistencia a 2DG del diploide D4 en MMP. Se muestra el perfil de cada una de las cepas haploides que lo originaron y el de la cepa silvestre C28B25. Para las cepas  $arg^-$  el medio se suplementó con arginina 1.5 mM. Cada punto corresponde al promedio de dos observaciones para cada cepa.

**Figura 7.1.** (Pág. 81). Curvas de producción de poligalacturonas por fermentación en estado sólido sobre pulpa de café (FES), a través del tiempo, para la cepa silvestre C28B25 y el diploide D4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

**Figura 7.2.** (Pág. 81). Producción de poligalacturonas a las 72 h de cultivo en FES por las cepas estudiadas.

**Figura 7.3.** (Pág. 82). Curvas de producción de poligalacturonasas en cultivo sumergido (CS) en MMP, a través del tiempo, para la cepa silvestre C28B25 y el diploide D4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

**Figura 7.4.** (Pág. 82). Producción de poligalacturonasas a las 72 h de cultivo en CS por las cepas estudiadas.

**Figura 7.5.** (Pág. 86). Distribución de las cepas de *A. niger* en el plano formado por los medios MMP sin 2DG.

**Figura 7.6.** (Pág. 87). Distribución de las cepas de *A. niger* en el plano formado por los medios MMP con 2DG a concentración de 0.01 g/l.

**Figura 7.7.** (Pág. 87). Distribución de las cepas de *A. niger* en el plano formado por los medios MMP con 2DG a concentración de 0.10 g/l.

## INDICE DE TABLAS.

- Tabla 1.1.** (Pág. 3). Clasificación y propiedades principales de los hongos.
- Tabla 1.2.** (Pág. 9). Frecuencias de diploides heterocigotos a partir de esporas cosechadas de heterocariones en tres especies de *Aspergillus*.
- Tabla 1.3.** (Pág. 13). Ejemplos de sistemas de transformación interespecífica basados en auxotrofías.
- Tabla 3.1.** (Pág. 29). Cepas de *A. niger* utilizadas en este trabajo. DGS, sensible a 2DG; DGR, resistente a 2DG; SP, sobreproductora de pectinasas; CS, cultivo sumergido; FES, fermentación en estado sólido; ARG<sup>-</sup>, auxótrofa de arginina.
- Tabla 5.1.** (Pág. 52). Cepas seleccionadas para el proceso de mutagénesis y comparación con la cepa silvestre C28B25 en cuanto a su dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de 2DG y producción de pectinasas en CS y FES (Minjares, 1992).
- Tabla 5.2.** (Pág. 55). Resultados de los procesos de enriquecimiento.
- Tabla 5.3.** (Pág. 62). Comparación del crecimiento de 5 días entre cepas de *A. niger* auxótrofas de arginina. ORN: Ornitina, CIT: Citrulina, PRO: Prolina, ARG: Arginina. Los signos (+) son apreciaciones de crecimiento, el óptimo fue en presencia de arginina. G.I.: Germinación incipiente.
- Tabla 5.4.** (Pág. 64). Resultados de los experimentos de transformación. Los porcentajes de protoplastos viables se dan antes y después del tratamiento con polietilenglicol (PEG), también se dan las cifras de frecuencia de transformación y de transformantes obtenidos por microgramo de DNA.
- Tabla 5.5.** (Pág. 65). Muestra de inestabilidad mitótica del plásmido pDHG25 en algunas transformantes de dos cepas arg<sup>-</sup>.
- Tabla 6.1.** (Pág. 69). Apreciación del crecimiento de las cepas de *A. niger* en MMG suplementado con E.L.(%) a las concentraciones señaladas en el renglón superior de la tabla. G.I.: Germinación incipiente; (+/-): crecimiento muy pobre sin esporulación; (--): No germinó. Las observaciones se hicieron luego de 72 h a 30°C.
- Tabla 7.1.** (Pág. 90). Valores promedio de Vr obtenidos para las cepas en MMP con 3 niveles de 2DG (0, 0.01, 0.10 g/l) y con 2 niveles de A<sub>w</sub> (0.99 y 0.955).
- Tabla 7.2.** (Pág. 90). Valores promedio de L<sub>0</sub> obtenidos para las cepas en MMP con 3 niveles de 2DG (0, 0.01, 0.10 g/l) y con 2 niveles de A<sub>w</sub> (0.99 y 0.955).

**EL GENERO *Aspergillus* COMO SISTEMA GENETICO****1.1 Biología general de los hongos filamentosos.**

Los hongos filamentosos y las levaduras son organismos eucariotes con características de crecimiento que permiten su cultivo y manipulación en el laboratorio.

Las células vegetativas de los hongos se denominan hifas, crecen por extensión apical y se multiplican por ramificación. Estas células están especializadas en la adquisición de nutrientes del medio y a menudo producen hidrolasas extracelulares que degradan los sustratos para el crecimiento. Una hifa consta de una pared celular que recubre a una membrana en cuyo interior pueden existir varios núcleos, además aunque se presentan septos, éstos pueden tener poros que permiten el paso de organelos dando continuidad al citoplasma dentro de una hifa.

Los hongos tienen hábitats muy diversos, la mayoría en ambientes terrestres en los suelos o sobre plantas muertas. Los hongos del género *Aspergillus* adoptaron en la naturaleza un estilo de vida saprófito, que los hizo capaces de utilizar un rango muy amplio de materiales como fuente de nutrición, esto significa que deben existir diferentes rutas bioquímicas para la asimilación de todas las fuentes de C y N susceptibles de ser degradadas. Comúnmente la producción de las enzimas que intervienen en una determinada ruta catabólica está regulada genéticamente, de tal manera que sólo se sintetizan las enzimas requeridas para el crecimiento en las condiciones prevalecientes.

Este estilo de vida saprófita puede explicar la existencia de numerosas isoenzimas con propiedades distintas, como la preferencia por un sustrato o pH óptimo que se presentan en *Aspergillus niger* (Kusters-van Someren y col., 1992). La diversidad de rutas catabólicas y su propiedad de ser reguladas genéticamente atrajo inicialmente a bioquímicos y genetistas para estudiar con más detalle a *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* (Ward, 1991).

Se pensó en los hongos filamentosos como sujetos de estudio de los fenómenos biológicos fundamentales debido a la rapidez con la que crecen y se reproducen, disminuyendo el tiempo para obtener descendencia de varias generaciones en comparación con plantas y animales. Además las esporas haploides de hongos como *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* se pueden producir por meiosis con lo que se generan individuos haploides que dan a los genetistas una oportunidad para análisis de segregación rápido y directo (Alexopoulos y Mims, 1979), con lo que se obtienen datos de la organización del genoma y eventos de recombinación. Otras ventajas que tienen los hongos es que pueden crecer en tubos de ensayo, requieren menos espacio, condiciones más flexibles y equipo más barato que la mayoría de las plantas y animales.

El estudio de *A. nidulans* empezó al final de la década de 1940 por el grupo dirigido por Pontecorvo, quienes hicieron una descripción de la biología y la genética de este organismo, así como de las técnicas clásicas de laboratorio. Entre las ventajas especiales de *A. nidulans* citadas por Pontecorvo y col. (1953) por las que fue seleccionado como un microorganismo apropiado para el estudio genético están las siguientes: tiene ciclo sexual, puede formar heterocariones balanceados, se pueden generar mutantes de conidias con colores distintos al tipo silvestre (verde) que funcionan como marcadores de fácil seguimiento y tiene requerimientos nutricionales mínimos.

La mayoría de las cepas de *A. nidulans* que han sido objeto de estudios bioquímicos y genéticos provienen, de una cepa aislada originalmente por el grupo de Pontecorvo. Lo anterior implica que las cepas son en gran medida isogénicas, excepto por las mutaciones que se les indujeron subsecuentemente. Debido al origen común de las cepas estudiadas y las ventajas como sistemas genéticos, se ha podido elucidar la genética y aspectos muy relevantes del metabolismo hasta el notable avance actual.

## 1.2 Clasificación.

Aunque la taxonomía de los hongos es compleja y está sujeta a revisión constante, se puede hacer una clasificación con base en algunas características, pero la más importante es el tipo de espora reproductiva que se forma, tanto asexual como sexual. De esta manera se pueden clasificar a los hongos en cuatro grupos diferentes como lo indica la tabla 1.1 (Brock y col., 1991).

GRUPO	HIFAS	REPRESENTANTE	ESPORA SEXUAL
<b>Ascomicetos</b>	Septadas	<i>Neurospora</i> <i>Saccharomyces</i>	Ascospora
<b>Basidiomicetos</b>	Septadas	<i>Amanita</i> <i>Agaricus</i>	Basidiospora
<b>Ficomicetos</b>	Sin Septos	<i>Mucor</i> <i>Rhizopus</i>	Cigospora
<b>Deuteromicetos</b>	Septadas	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>	Ninguna

Tabla 1.1. Clasificación y propiedades principales de los hongos.

Durante esta Tesis se hace referencia al estudio de algunas cepas de *Aspergillus niger*, así como su comparación con cepas de otras especies, principalmente de Ascomicetos y de otros Deuteromicetos, por lo que a continuación se dan algunas características de estos dos grupos.

### 1.2.1 Ascomicetos.

Están incluidos algunos hongos filamentosos septados y las levaduras. En los septos existen poros que, como se mencionó anteriormente, permiten el paso de algunos organelos y dan continuidad al citoplasma dentro de una hifa. La reproducción asexual da lugar a las **conidiosporas** o **conidias** sobre extensiones especializadas de las hifas llamadas **conidióforos**,

además no están incluidas dentro de alguna estructura como en los Ficomycetos, es decir, las cadenas de conidiosporas son externas. Actualmente se han llevado a cabo estudios, con técnicas de genética molecular, para comprender las etapas de diferenciación celular durante la conidiación en *A. nidulans* (Timberlake, 1990). La reproducción sexual implica la fusión de dos hifas, lo que puede hacer al hongo heterotálico (para el apareamiento se requieren hifas de distinto tipo) u homotálico (el apareamiento se puede lograr con hifas del mismo tipo). De esta manera se forman estructuras en forma de sacos de nombre **ascas** en cuyo interior se encuentran las **ascosporas**. Aunque se considera a *Saccharomyces cerevisiae* como Ascomyceto, las levaduras se distinguen de los hongos filamentosos por su morfología y varios aspectos de genética molecular (Ward, 1991).

### 1.2.2 Deuteromicetos.

Son hongos septados en los que no se han detectado formas sexuales de reproducción. En botánica, la forma perfecta de una planta es la sexual y los hongos fueron estudiados por los botánicos en los inicios de la Microbiología, por eso se denominó **Fungi imperfecti** u hongos imperfectos a los Deuteromicetos. Aunque se sabe que el medio de crecimiento y las condiciones de cultivo son importantes y deben estar cuidadosamente controladas para favorecer el ciclo sexual, se han efectuado numerosos intentos, sin éxito, entre los Deuteromicetos. Sin embargo, otra explicación para la falta de actividad sexual en este grupo, es que algunos podrían ser heterotálicos y como los cultivos se conservan de manera pura, muchos cultivos de Deuteromicetos seguirán siendo clasificados como tales a menos que se les cultive junto con su complemento para el apareamiento adecuado.

Muchos Deuteromicetos están íntimamente relacionados con miembros de los Ascomicetos, en donde se les agruparía si se les identificara una fase sexual. La mayoría de las especies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae*) son Deuteromicetos, y ahora que se conoce una fase sexual en *A. nidulans*, sería más correcto llamarlo *Emericella nidulans*, aunque aún permanece como uso más común el nombre que hace referencia a su estado imperfecto, conocido con anterioridad (Ward, 1991).

### 1.3 Génética Clásica.

#### 1.3.1 El Ciclo Sexual.

La reproducción sexual en los hongos y otros organismos vivos implica la unión de dos núcleos compatibles. El proceso consiste típicamente en tres fases distintas (Alexopoulos y Mims, 1979):

1) **Plasmogamia.** Consiste en la unión de dos protoplastos con lo que sus núcleos haploides quedan en el interior de la misma célula.

2) **Cariogamia.** Es la unión de dos núcleos que comparten la misma célula, es un evento que sigue casi siempre inmediatamente a la fusión de células dando origen al estado diploide.

3) **Meiosis.** Posterior a la fusión de núcleos se lleva a cabo la meiosis que de nuevo reduce el número de cromosomas al estado haploide, es en esta etapa cuando se da la recombinación genética entre los cromosomas.

En un ciclo sexual verdadero estos tres procesos ocurren en secuencia regular y usualmente en puntos específicos. Debido a la plasmogamia se tiene la presencia de diferentes núcleos en el mismo individuo, fenómeno conocido como **heterocariosis** y al individuo que lo presenta se le llama **heterocarión**.



En un heterocarión cada núcleo es independiente de los demás, pero la estructura y comportamiento del individuo está controlado por los tipos de genes que contiene y la proporción de cada tipo, sin importar si estos están separados en núcleos distintos o no (Alexopoulos y Mims, 1979).

Existen también otros fenómenos que intervienen para que se lleve a cabo el ciclo sexual, por ejemplo, *A. nidulans* es homotálico, es decir, sus hifas vegetativas son autofertilizables pues se reproducen sexualmente sin la ayuda de otra cepa. En contraste, muchos Ascomicetos son heterotálicos, en otras palabras, sus hifas son autoestériles y necesitan crecer junto a las hifas de otra cepa compatible para la reproducción sexual. Por ejemplo, en *N. crassa* hay un locus con dos posibles alelos, A y a, que determinan el tipo sexual. Una cepa con el tipo sexual A sólo puede cruzarse con otra del tipo sexual a y viceversa (Ward, 1991).

El cuerpo fructífero de *A. nidulans* se llama cleistotecio y es una estructura esférica (100 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro) rodeado de una capa de hifas que contienen las llamadas células Hülle. En su interior hay hasta 10 000 ascas, cada una con 8 ascosporas binucleadas que al ser liberadas en un medio con nutrientes germinan rápidamente (Pontecorvo y col., 1953).

Para efectos prácticos, una cruce puede iniciarse al mezclar esporas de dos cepas con diferentes auxotrofías y color de esporas en medio mínimo, suplementado con una cantidad mínima de nutrientes para permitir la germinación inicial y ocasionalmente la fusión de hifas, de esta manera se complementan recíprocamente las mutaciones y se forma un heterocarión, capaz de crecer en medio mínimo. Posteriormente, con el manejo de las condiciones de cultivo se induce la formación de cleistotecios.

### 1.3.3 El ciclo parasexual.

En el ciclo parasexual se llevan a cabo la plasmogamia, la cariogamia y la haploidización, pero esta última no ocurre a través de la meiosis. Para los Deuteromicetos como *Aspergillus niger*, en los que no existe una reproducción sexual, el ciclo parasexual es de suma importancia. Sin embargo, los ciclos sexual y parasexual no son mutuamente exclusivos, puesto que en algunos hongos como *A. nidulans*, se llavan a cabo los dos.

El ciclo parasexual fue descubierto en *A. nidulans* en 1952 por Pontecorvo y Roper de la Universidad de Glasgow, desde entonces se ha identificado en Deuteromicetos, Basidomicetos y otros Ascomicetos (Hastie, 1981).

La secuencia de eventos en el ciclo parasexual es como sigue (Alexopoulos y Mims, 1979):

- 1) Formación del micelio heterocarión.
- 2) Fusión entre dos núcleos.
  - a. Fusión entre núcleos iguales.
  - b. Fusión entre núcleos distintos.
- 3) Multiplicación simultánea de los núcleos haploides y diploides.
- 4) Entrecruzamiento mitótico ocasional de los núcleos diploides durante su multiplicación.
- 5) Diseminación de los núcleos diploides.
- 6) Haploidización ocasional de los núcleos diploides.
- 7) Aparición de nuevas cepas haploides.

En el inicio del ciclo parasexual se forma el micelio heterocarión por anastomosis o fusión de dos hifas somáticas, de constituciones genéticas distintas, cuya distribución y multiplicación de núcleos es precisamente lo que da origen al heterocarión.

Por otro lado, un heterocarión también puede formarse por mutación en uno o más núcleos a partir de un homocarión, o bien por fusión de núcleos en la misma hifa y su posterior distribución entre los núcleos haploides, aunque este tipo de heterocariosis no es muy significativa porque no se forman nuevas combinaciones genéticas.

Por lo anterior se puede decir que la cariogamia puede suceder entre núcleos iguales y entre núcleos diferentes, de aquí que un micelio heterocarión que provenga de dos cepas distintas pueda contener al menos 5 tipos de núcleos: 2 tipos de haploides (uno de cada cepa), 2 tipos de diploides homocigotos y un tipo de diploide heterocigoto que contiene todos los cromosomas de cada cepa. Aunque estos núcleos presumiblemente se multiplican a la misma velocidad, los núcleos diploides están presentes en cantidades mucho más bajas que los haploides.

Durante la mutiplicación de los núcleos diploides se presenta el entrecruzamiento mitótico, que probablemente es la fase más importante del ciclo parasexual, pues con ello se dan al hongo las ventajas de la sexualidad. Alexopoulos y Mims (1979) mencionan que Pontecorvo calculó que la recombinación en un Ascomiceto vía los mecanismos parasexuales es 500 veces menor que la que ocurre a través del ciclo sexual. Sin embargo, en *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* la diploidización y el entrecruzamiento mitótico ocurren mucho más frecuentemente, de ahí que el ciclo parasexual en los Deuteromicetos sea tan importante como el ciclo sexual en otros hongos, pues así se lleva a cabo la recombinación genética tanto por entrecruzamineto mitótico entre cromátidas de cromosomas homólogos, como por segregación de los cromosomas durante la haploidización (Bos y col., 1993), trayendo como consecuencia la variación genética y la evolución de las especies. En la Tabla 1 se comparan las frecuencias de diploides heterocigotos entre esporas de tres especies de *Aspergillus* y se aprecia cómo se favorece en los Deuteromicetos.

ESPECIE	FRECUENCIA	REFERENCIA
<i>A.nidulans</i>	$10^{-6}$ a $10^{-7}$	Ward (1991)
<i>A. niger</i>	$10^{-5}$ a $10^{-6}$	Bos y col. (1988, 1993)
<i>A. parasiticus</i>	$1.5 \times 10^{-4}$	Papa (1978)

**TABLA 1.2.** Frecuencias de diploides heterocigotos a partir de esporas cosechadas de heterocariones en tres especies de *Aspergillus*.

En los hongos que producen conidias uninucleadas, la dispersión de los núcleos diploides ocurre por su incorporación a conidias que pueden germinar y producir micelios diploides, y aunque la diploidía en especies de *Aspergillus* no es común en la naturaleza, se han reportado en *A. niger* (Nga y col., 1975). En algunas especies, el tamaño de la espora es un buen criterio para determinar si una conidia es diploide, pues tienen aproximadamente el doble del diámetro que las haploides, como es el caso para *A.nidulans* (Pontecorvo y col., 1953) y para *A. niger* (Bos y col., 1988), sin embargo, no es un criterio para especies de conidias multinucleadas como *A. parasiticus*, *A. oryzae*, *A. sojae* (Papa, 1978).

Una cepa diploide perderá gradualmente sus cromosomas y eventualmente volverá al estado haploide. En el laboratorio, este proceso se puede acelerar usando dosis subletales de los agentes benomyl (Upshall y col., 1977) o de paraflourofenilalanina (pffen) (Lhoas, 1961). Los haploides resultantes contendrán unos cromosomas de un padre y otros del otro. Por este rearrreglo de cromosomas se pueden asignar mutaciones a un cromosoma específico. Para un mapeo más fino se recurre al análisis de la segregación de marcadores genéticos a través del ciclo sexual en *A. nidulans*, o bien, a través del entrecruzamiento mitótico en especies como *A. niger* (Debets y col., 1989).

Si un nuevo gene se identifica por una mutación fenotípicamente reconocible, se puede inducir a esa cepa mutante para que lleve a cabo el ciclo parasexual con una cepa maestra (disponibles en colecciones como la Fungal Genetic Stock Center para *A. nidulans* y para *A. niger*). Las cepas maestras tienen una mutación fenotípicamente reconocible en cada uno de sus cromosomas, éstas pueden ser modificaciones morfológicas (color, enanismo), resistencia a inhibidores o auxotrofías. Analizando la segregación de los haploides, a partir de diploides heterocigotos entre la cepa mutante y la cepa maestra, se notará que la mutación examinada estará presente, sólo en muy raras ocasiones, en individuos con uno de los marcadores de la cepa maestra. Esto indica que el gene que se desea mapear se encuentra en el cromosoma equivalente donde se halla el marcador con el que no se puede asociar (ligamiento en repulsión). La figura 1.1 esquematiza el fenómeno anterior, donde los marcadores asociados a un cromosoma (a y m) segregarán en *bloc* durante la haploidización (frecuencia de recombinación cercana a 0%), mientras que los marcadores en distintos cromosomas (a y b, m y b) segregarán de manera independiente (frecuencia de recombinación alrededor del 50%).

El entrecruzamiento mitótico puede alterar estos resultados, pero se puede minimizar al reducir el tiempo del estado diploide (Ward, 1991). En el caso de *A. niger*, los marcadores en el mismo cromosoma pero en distinto brazo, usualmente muestran entrecruzamiento mitótico, pero éste permanece por debajo del 20%, mientras que la recombinación libre (50%) se observa entre marcadores de distintos cromosomas (Bos y col., 1993).

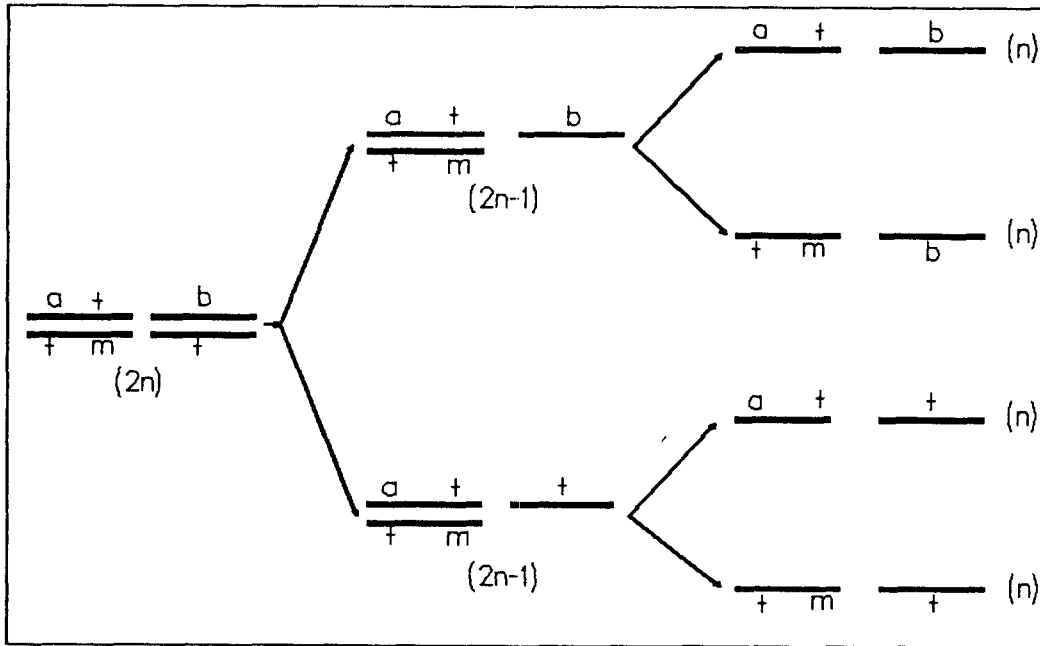


Fig. 1.1. Proceso de haploidización en *Aspergillus* por medio de la pérdida subsecuente de cromosomas (sólo se muestran 2 pares de cromosomas). El estado diploide se representa por  $2n$  y los haploides, por  $n$ .

#### 1.4 Genética Molecular.

##### 1.4.1 Introducción.

Cuando se aplicaron los métodos de genética clásica y bioquímica al estudio de microorganismos como *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*, se generó gran información sobre la regulación de muchas rutas metabólicas. Se identificaron genes reguladores a través de mutaciones, que eran capaces de inducir o reprimir la expresión de otros genes codificadores de enzimas.

Las técnicas de genética molecular se desarrollaron en procariotes y hubo un gran impulso para extenderlas a hongos filamentosos, en primera instancia se aplicaron en aquellos en los que se conocía más sobre genética clásica y bioquímica. Las técnicas de genética molecular permiten el estudio en la

clonación de genes, y eliminación o reemplazo de partes del genoma a partir de mutaciones creadas *in vitro*.

#### **1.4.2 Sistemas de transferencia y desarrollo de vectores.**

Para muchos de los estudios en los que interviene la manipulación genética de hongos filamentosos, se requiere de un sistema de transferencia para introducir el DNA exógeno y seleccionar las células que lo hayan incorporado. El DNA exógeno se puede unir covalentemente a un vector que contenga un marcador selectivo para facilitar la selección de las cepas transformadas.

Tanto la frecuencia como el tipo de transformación se pueden variar usando diferentes tipos de vectores. Los procesos de transformación se basan en las siguientes etapas (van den Hondel y Punt, 1991):

- + Preparación de los protoplastos incubando las células con enzimas que degradan la pared celular.
- + Tratamiento de estas células con DNA exógeno.
- + Regeneración de las unidades formadoras de colonias.
- + Selección de las colonias que hayan tenido una incorporación estable del DNA.

Existen trabajos en los que se ha usado la electroporación para transformar protoplastos, incluso en *A. niger* (Ward y col., 1989). Una vez que se obtienen los protoplastos, el principio de esta metodología está basado en que las moléculas que se encuentran en el medio, como DNA exógeno, pueden entrar a la célula particularmente durante el momento en que se aplica un pulso eléctrico. Sin embargo, no se han tenido mejoras significativas en la frecuencia de transformación con respecto al método tradicional (van den Hondel y Punt, 1991).

Los marcadores selectivos que se usan para seleccionar las células transformadas están basados principalmente en la

complementación de auxotrofías, pero es necesario aislar la cepa receptora que tenga la mutación apropiada. Algunos marcadores han sido usados con éxito en diversos trabajos porque resultan funcionales en varias especies (Tabla 1.3).

MARCADOR	FUNCION CODIFICADORA	TRANSFORMANTE
<i>niaD</i> De <i>A. niger</i>	nitrito reductasa	<i>P. chrysogenum</i> (Whitehead y col., 1989)
<i>niaD</i> De <i>A. nidulans</i>	nitrito reductasa	<i>P. chrysogenum</i> (Whitehead y col., 1989)
<i>pyrG</i> De <i>A. niger</i>	orotidin-5'fosfato descarboxilasa	<i>A. oryzae</i> (Mattern y col., 1987)
<i>argB</i> De <i>A. nidulans</i>	ornitino trans- carbamilasa	<i>A. niger</i> (Buxton y col., 1985)
<i>argB</i> De <i>A. nidulans</i>	ornitino trans- carbamilasa	<i>A. oryzae</i> (Tae-Hahm y col., 1988)

TABLA 1.3. Ejemplos de sistemas de transformación interespecífica basados en auxotrofías.

Por otro lado, existen marcadores selectivos dominantes que se pueden usar para transformar cepas silvestres y mutantes. Varios de estos marcadores se usan en diferentes especies de hongos porque son funcionales en un amplio rango de huéspedes. La mayoría de estos marcadores dominantes se basa en resistencia a inhibidores. Un ejemplo de ello es la resistencia a oligomicina, conferida por el gene *oliC3* de *A. niger*, que ha funcionado para la selección de transformantes (Ward y col., 1988), o bien, el gene *amdS*, que aún cuando se usa con mutantes *amdS*, es capaz de transformar una cepa silvestre de *A. nidulans*, haciendo que crezca más rápido en acetamida como única fuente de carbono. Es decir, este marcador permite la selección de transformantes en cepas silvestres y mutantes (Kelly y Hynes, 1985).



El modelo generalizado de vectores usados en transformaciones llevan una parte de DNA de *E. coli*, un marcador apropiado y la secuencia homóloga o heteróloga que se desea expresar, también debe estar incluida la secuencia terminadora de la transcripción del gene. En la mayoría de las especies de hongos, el DNA del vector se integra al genoma del huésped. En levaduras existen plásmidos de replicación autónoma y hasta recientemente, se ha aislado un plásmido de replicación autónoma en *A. nidulans* y que ha probado tener el mismo comportamiento en *A. niger* y *A. oryzae* (Gems y col., 1991).

Con base en estudios bioquímicos del DNA de transformantes, como análisis de hibridación, se han detectado al menos tres tipos de integración (Ward, 1991):

**Tipo I.** Es el tipo de integración más frecuente en *A. nidulans* (70 a 80% de transformantes para la mayoría de los marcadores) y la integración es en una región homóloga del genoma. También se puede dar el caso de integración múltiple del plásmido en secuencias de uno al lado del otro.

**Tipo II.** La integración del plásmido se da en sitios del genoma en donde no se conoce homología. Aproximadamente del 10 al 20% de las transformantes son de este tipo.

**Tipo III.** Se da cuando no se detectan secuencias del plásmido debido a que hay un reemplazo del gene completo. Por lo general, sólo del 10 al 20% de los transformantes son de este tipo. Pudiera pensarse en una reversión de la mutación original, pero ocurre a frecuencias más altas que la frecuencia de reversión en experimentos de control.

La integración homóloga permite desarrollar técnicas de interrupción y reemplazo de genes. Estos pueden ser alterados *in vitro*, y posteriormente reemplazarlos por los correspondientes alelos silvestres para estudiar el efecto de una mutagénesis dirigida. Lo anterior es particularmente importante en estudios de regulación genética, donde se investiga el efecto de la eliminación de secuencias de genes reguladores sobre la expresión de otros genes.

### 1.4.3 Estrategias de clonación.

Hasta ahora se han mencionado algunos genes que se usan en estrategias de selección de transformantes, pero también hay genes provenientes de otras especies, como *Saccharomyces cerevisiae* o *Escherichia coli*, revisados por van den Hondel y Punt (1991), que también se han usado como marcadores para seleccionar transformantes de *A. nidulans* y de *A. niger*.

Sin embargo, los métodos de clonación de genes de otras especies no pueden ser aplicables en general para aislar genes de *Aspergillus*, debido principalmente a que muchos genes de *Aspergillus* no se expresan en *S. cerevisiae* o en *E. coli*, y no pueden aislarse por complementación interespecífica en estos huéspedes. Además hay métodos de clonación que requieren el aislamiento del mRNA específico, para eso es necesario que se encuentre en abundancia relativa en el total de la población de mRNA's, y no es el caso para muchos genes, como los genes reguladores.

Una vez que se establecieron las bases para los sistemas de transformación en *A. nidulans*, los trabajos se centraron en afinar las técnicas para que los genes de *A. nidulans* pudieran ser clonados por complementación de mutaciones en el mismo *A. nidulans*. A esto se le conoce como **autocloneación**.

La técnica que más se usa en estos trabajos es la construcción de bibliotecas genómicas del total del DNA de *A. nidulans*, digerido con enzimas de restricción, después se transforma una cepa de *A. nidulans* que lleve una mutación específica. Se han usado cósmidos, plásmidos y bacteriófagos como vehículos apropiados para la construcción de librerías de todo el DNA del hongo o con cDNA, obtenido por transcripción inversa a partir de mRNA, con el fin de eliminar intrones (Turner, 1991).

Una vez que se tiene el sistema de transformación adecuado, se prueba la biblioteca genómica para seleccionar las transformantes cuya mutación haya sido complementada, y el

vector que lleve la secuencia responsable para la complementación es entonces recuperado. Mediante esta técnica, cualquier mutación factible de complementación permite aislar el gene de interés.

La secuenciación del DNA, de los genes clonados de hongos filamentosos, ha permitido la comparación de su estructura primaria con los de otros eucariotes, además la clonación y secuenciación de genes es un paso importante para comprender su función y expresión. La variación de técnicas de clonación para aislar genes de hongos ha llevado a una rápida aparición de publicaciones con datos de la secuencia de genes de muchas especies de hongos. Los resultados de estas investigaciones se pueden almacenar en bases de datos como GenBank o EMBL con acceso mediante redes de computadoras para cualquier investigador interesado (Turner, 1991).

### **1.5 Genética Molecular de cepas con importancia económica.**

Los hongos filamentosos pueden tener importancia económica ya sea en un aspecto negativo (hongos patógenos que afectan plantas) o positivo, donde se pueden contar a aquellos hongos que se usan directamente como alimento o aquellos cuyos productos tienen interés comercial como antibióticos, enzimas y ácidos orgánicos.

Los métodos para mejorar la producción de cepas se han basados en mutaciones clásicas, siguiendo con procesos de selección y análisis en forma empírica, pero que han resultado en mejoras notables en cuanto a la producción de varios metabolitos (Rowlands, 1983).

Estas técnicas están limitadas por el genotipo de la cepa y, a través de los años, los incrementos se han hecho menores y los tiempos en los que se logran tales incrementos han aumentado.

La mayoría de las cepas industrialmente importantes pertenecen a especies de Deuteromicetos, como *A. niger*, con una caracterización pobre en genética clásica, con mutantes poco definidas y mapas genéticos limitados, en comparación con *N. crassa* y *A. nidulans*. Sin embargo, no es necesario conocer ampliamente la genética clásica de una cepa para aplicar algunas técnicas de genética molecular.

Entre las especies industriales, *A. niger* es probablemente la que más atención ha recibido. El interés por manipular genéticamente esta especie se debe a la diversidad de procesos biotecnológicos en donde interviene. Por ello se han desarrollado una cantidad considerable de mutantes y cepas maestras, creadas muy recientemente (Bos y col., 1988; Bos y col., 1993), gracias a las cuales se ha podido avanzar significativamente en la genética de *A. niger*. Lo anterior se puede constatar por medio de algunas publicaciones recientes en las que se ha llegado a establecer el número de cromosomas, el tamaño del genoma (Debets y col., 1990b), incluso el mapa genético de los cromosomas de *A. niger* (Debets y col., 1989).

Pero ahora no sólo se sabe que *A. niger* tiene 8 cromosomas y que tiene un genoma estimado en 35.5 a 38.5 millones de pares de bases, sino que se han desarrollado algunos sistemas de transformación propios de la especie, como se mencionó anteriormente, tanto por complementación de auxotrofías (Buxton y col., 1985; Van Hartingsveldt y col., 1987) como de marcadores dominantes (Kelly y Hynes, 1985; Ward y col., 1988).

En *A. niger*, como en otros hongos de interés comercial, el propósito principal para desarrollar los sistemas de transformación es su aplicación para estudios de genética molecular. Por medio de estos estudios se ha analizado la regulación de genes codificadores de enzimas, que se producen industrialmente como las pectinasas (Bussnik y col., 1992; Kusters-van Someren y col., 1992), y también se ha estudiado la represión catabólica a nivel molecular (Drysdale y col., 1993).

Van den Hondel y Punt (1991) dan otros ejemplos recientes del uso de genética molecular de *A. niger* en estudios de eliminación de genes, expresión de genes bajo el dominio de distintos promotores, expresión de genes cuando estos se integran en distintas partes del genoma, incluyendo experimentos de reemplazo de genes para la expresión heteróloga.

Por otra parte, Upshall (1986) hace notar que en las industrias biotecnológicas, la genética molecular, y sus métodos de DNA recombinante, están teniendo un papel primordial en el mejoramiento de procesos existentes y desarrollo de nuevas áreas de investigación poco claras aún. Aunque las alternativas probables tienen ventajas según las circunstancias, naturaleza del producto y condiciones de cultivo, siendo parte del nuevo reto definir esas ventajas relativas.

La tecnología que usa DNA recombinante permite la manipulación de un sólo gene, con lo que se evita la necesidad de fusionar dos genomas posiblemente incompatibles o exponer a genomas balanceados a dosis altas de mutágeno, esto último puede acarrear mutaciones indeseables en cepas de producción (Bos, 1987).

Es importante señalar que a través de la genética molecular se pueden elevar los niveles de actividad enzimática en cepas de producción, ya sea por introducción de copias múltiples de un gene, o bien, construyendo una unidad de expresión en la que una secuencia de un gene codificador esté fusionada con un promotor bien caracterizado, que puede ser de otro gene. Sin embargo, dados los distintos tipos de integración mencionados anteriormente, es posible que no exista correlación entre el número de copias de un gene con el incremento en la actividad enzimática (Bussnik y col., 1992). Recientemente, Khanh y col. (1992) han descrito cómo se eleva hasta 200 veces la producción de pectin-metil-esterasa (E.C. 3.1.1.11) en transformantes de *A. niger*, cuando el gene que codifica para esta enzima se fusiona en un plásmido con el promotor de alfa-amilasa de *A. oryzae*.

Otra área con gran interés es la que se relaciona con el manejo del genoma de cepas productoras, para el desarrollo de enzimas con propiedades alteradas pero deseadas, tales como incremento en la termoestabilidad, rango óptimo de pH, etc. Esto se puede lograr con la mutación *in vitro* del gene que permite la sustitución de aminoácidos específicos, alterando las propiedades fisicoquímicas y conservar la actividad enzimática (Upshall, 1986).

Otros de los productos comerciales donde se aplica la genética molecular son los antibióticos. Mediante métodos clásicos de mejoramiento de cepas, se ha incrementado drásticamente la producción de penicilina y cefalosporina, en *Penicilium chrysogenum* y *Cephalosporium acremonium*, respectivamente. Sin embargo, ahora se han clonado varios genes de las rutas biosintéticas de penicilina y cefalosporina y se ha estudiado el efecto de copias múltiples en la producción. El estudio de la secuenciación y eliminación de partes no transcritas de un gene puede demostrar sitios de unión de proteínas reguladoras, así se pueden diseñar mutantes desreguladas para dar producciones más elevadas o constitutivas. Aunque quizá sea de más interés el uso de mutaciones *in vitro* de los correspondientes genes para producir formas nuevas de antibióticos (Ward, 1991).

Otro aspecto de interés comercial es el uso de los hongos filamentosos como huéspedes para la producción de proteínas heterólogas, principalmente porque presentan algunas ventajas como son (Saunders y col., 1989):

- + Secreción natural de un gran rango de proteínas.
- + Patrones de glucosilación similares a eucariotes superiores.
- + Muchas especies están reconocidas como generalmente seguras (GRAS) por las autoridades regulatorias.
- + Existe experiencia en procesos de fermentación y de recuperación.

Los intentos de expresión heteróloga de genes han seguido estrategias similares entre sí, como el uso de promotores altamente expresados y a menudo bien regulados.

Es común que los genes que se desean expresar estén en forma de cDNA, debido a que los hongos filamentosos no pueden procesar los intrones de algunos genes de organismos como los mamíferos.

La secreción de una proteína requiere de una secuencia corta de aminoácidos que funciona como señal de excreción. Esta secuencia actúa como etiqueta para dirigir a la proteína hacia el retículo endoplásmico, y de ahí a los canales de excreción. En eucariotes, estas señales de excreción son hidrofóbicas y desprendidas por endopeptidasas antes de la secreción (Ward, 1991).

Entre las ventajas de la secreción en un sistema de expresión heteróloga según Saunders y col. (1989) están:

- + Evita la lisis celular en el proceso de recuperación.
- + Evita la acumulación de formas insolubles de producto dentro de la célula.
- + Permite la glucosilación y procesamiento postraducciona.
- + Facilita la purificación del producto.
- + Se reducen los daños al huésped causados por acumulación intracelular de proteínas potencialmente tóxicas.

Estos investigadores también mencionan algunos aspectos que deben considerarse, según la experiencia en la expresión heteróloga de proteínas en hongos filamentosos de interés industrial. Destacan el hecho de que el sitio de integración en el genoma del huésped puede ser importante para la óptima expresión. Pero también hay características del huésped que resultan importantes para mejorar la expresión. Por ejemplo, muchas especies de *Aspergillus* producen proteasas extracelulares que pueden degradar a las proteínas homólogas o heterólogas (Kusters-van Someren y col., 1992). En Zymogenetics Inc., algunas mutantes *areA* de *A. nidulans*, que se encuentran

afectadas en la regulación de la producción de proteasas, se han usado para reducir la proteólisis (Saunders y col., 1989).

La manipulación genética de una cepa huésped para sobreproducir un factor positivo de la transcripción también puede resultar beneficioso, por ejemplo, investigadores de Allelix Inc. han generado cepas de *A. nidulans* con un gran número de copias del gene regulador de la alcohol deshidrogenasa (*alcR*). Las respectivas transformantes que llevaban copias múltiples del gene estructural del interferón, expresado a partir del promotor de la alcohol deshidrogenasa, aumentaron significativamente la producción del interferón. En procesos de escalado, sistemas inducibles basados en el modelo anterior, producen de 2 a 3 g/l de proteínas de hongos como la glucoamilasa de *A. niger* y secretan de 100 a 300 mg/l de proteínas activas de mamífero (Davies, 1991).

En estudios donde se han incluido cepas de *A. niger* sobreproductoras de glucoamilasas se ha observado que usando los mismos sistemas de expresión que en *A. nidulans*, las cantidades de quimocina secretada (proteína heteróloga) en las mejores transformantes de *A. niger* no varían significativamente (aproximadamente 7 mg/l), en comparación con la producción de las transformantes de la cepa estándar de *A. nidulans*. Esto sugiere que los componentes estructurales y enzimáticos de las rutas de secreción no son lo suficientemente distintos, como para tener efecto en la excreción de proteínas heterólogas (Davies, 1991). Es claro entonces que se requieren más estudios sobre los mecanismos de excreción, con respecto a los que ya existen sobre la transcripción y traducción de genes heterólogos.

Los investigadores de las empresas donde se hace ingeniería genética ponen énfasis en los siguientes puntos para mejorar la expresión de genes heterólogos (Davies, 1991):



+ Investigación de los elementos estructurales de proteínas de hongos filamentosos que les permiten ser secretadas con mayor eficiencia que las proteínas de mamíferos.

+ Caracterización precisa de las estructuras de glucosilación, porque aunque los hongos filamentosos pueden tener patrones muy similares de adición de carbohidratos en sus proteínas a los de otros organismos, las proteínas producidas en sistemas heterólogos deben ser idénticas a las formas naturales para ser usadas comercialmente.

+ Investigación de la estabilidad y traducción del mRNA, debido a que cada especie de mRNA tiene su propia vida media, y aún se sabe poco acerca de las enzimas y factores involucrados en la estabilidad y degradación de los mRNA en hongos filamentosos.

+ Estudio de las condiciones de cultivo que optimizan la secreción de proteínas heterólogas, pues ha sido probado que estas condiciones pueden hacer la diferencia entre un buen resultado y uno malo en una misma cepa transformante, tanto en bacterias (Galindo y col., 1990) como en hongos filamentosos (Archer y col., 1990).

## A N T E C E D E N T E S.

## 2.1 Antecedentes.

La utilización de los desechos agroindustriales, como la pulpa de café, para generar nuevos productos contribuye al uso integral de las materias primas. Por ejemplo, los residuos de frutas cítricas han sido utilizados para la producción de pectinasas por fermentación en estado sólido (FES) (Siessere y Said, 1989).

La referencia a las pectinasas se debe a que juegan un papel muy importante en la naturaleza, son sintetizadas por muchas plantas en el proceso de maduración de frutas y por muchos microorganismos que degradan pectina extracelular, incluyendo los hongos fitopatógenos, en estos casos las enzimas que degradan la pared (pectinasas) son cruciales para la penetración y colonización de los tejidos de plantas por hongos fitopatógenos (Dean y Timberlake, 1989).

En la industria, las pectinasas se usan ampliamente en el procesamiento de frutas y vegetales puesto que bajan la viscosidad de jugos y facilitan la extracción, maceración, filtración y procesos de clarificación. Son de particular interés la poligalacturonasa, la pectinesterasa y la pectatoliasa (Brawman, 1981).

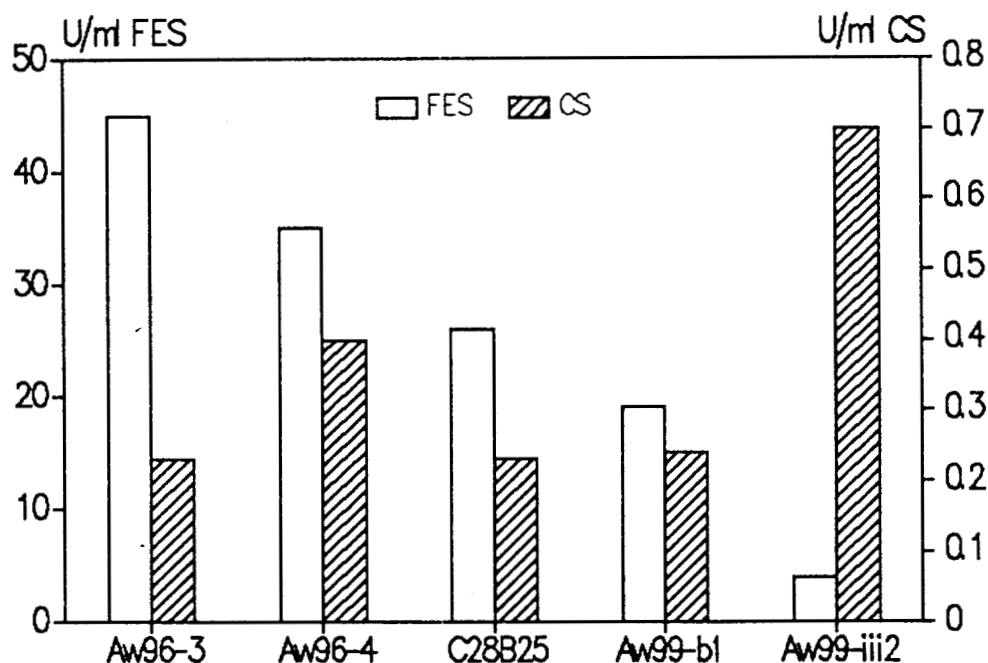
Un microorganismo favorecido para la producción de pectinasas es *Aspergillus niger*, y se ha incrementado la producción de algunas cepas por medio de técnicas como mejoramiento por mutación clásica y selección (Leuchtenberger y Mayer, 1992) y por genética molecular (Bussik y col., 1992; Khanh y col., 1992). En ambos tipos de procedimientos es posible lograr un incremento preferencial en algunas de las enzimas de la familia de las pectinasas, con respecto a las otras.

En el trabajo de Antier y col. (1993), se desarrolló una metodología para mejorar la producción de pectinasas por FES sobre pulpa de café, a partir de la cepa silvestre *Aspergillus niger* C28B25.

Primeramente se obtuvieron mutantes resistentes a la 2-desoxiglucosa (2DG), llamadas cepas *dgr* y seleccionadas a partir de un medio con actividad de agua ( $A_w$ ) de 0.99, a las que se denominó mutantes de la serie *dgrAw99*. Por otra parte, también se obtuvieron mutantes seleccionadas a partir de un medio con actividad de agua baja,  $A_w=0.96$ , en presencia de 2DG, a las que se denominó mutantes de la serie *drgAw96*. Este último valor de  $A_w$  es el que prevalece en la pulpa de café durante la FES en las condiciones probadas por Antier y col. (1993).

Cuando se realizaron los cultivos sumergidos (CS) y las FES, sobre pulpa de café, para cada una de las mutantes obtenidas y se les comparó la producción de endo-poligalacturonasa (endo-p) con respecto a la cepa silvestre C28B25, se observó que aquellas cepas seleccionadas en medios con  $A_w=0.99$  tuvieron en general producciones más elevadas que la cepa silvestre en CS, pero que en FES la actividad enzimática era mucho menor. En contraste, las cepas provenientes de medios con  $A_w=0.96$ , incrementaron notablemente la producción de endo-p en FES, pero no alcanzaron niveles de producción significativamente mejores en CS, con respecto a la cepa silvestre C28B25 (Fig. 2.1).

Los resultados anteriores sugieren que la  $A_w$  tuvo un efecto para seleccionar cepas que soportaran mejor el estrés osmótico en una FES. Hanh-Hargerda (1986) propone que se considere a la  $A_w$  como una variable externa más, como el pH, la presión parcial de  $O_2$ , la temperatura, que bajo ciertas condiciones interactuará con los otros parámetros ambientales, mientras que habrán ocasiones en las que será la  $A_w$  el único parámetro determinante en el desarrollo de un proceso.



**Fig. 2.1.** Actividad de poligalacturonasa de las cepas de *A. niger*, aisladas por Antier y col. (1993), tanto en FES como en CS. Las mediciones se hicieron por viscosimetría a los 3 días de cultivo a 25°C

Además, los resultados de Antier y col. (1993), van de acuerdo con la idea propuesta por Shankaranand y col. (1992), en el sentido de que una buena cepa productora en CS no tiene por qué tener el mismo desempeño notable en FES, de ahí la necesidad de desarrollar técnicas específicas para obtener cepas más apropiadas a las condiciones de la FES.

En general, las mutantes obtenidas por Antier y col. (1993), fueron menos sensibles a la represión catabólica (RC) por sacarosa sobre las pectinasas. Esto coincide con otros trabajos en donde se han obtenido cepas resistentes a 2DG, que han resultado menos sensibles a la RC y que han incrementado notablemente la productividad de ácido cítrico (Kirimura y col., 1992) o la producción de enzimas de interés comercial (Tani y col., 1988; Ghosh y col., 1991).

La 2DG es un análogo tóxico de la glucosa que al ser transportada por una cepa silvestre sensible, se fosforila y el compuesto 2-desoxiglucosa-6-fosfato que resulta, al acumularse llega a inhibir las primeras enzimas de la glucólisis, así como la incorporación de glucosa y manosa en los polisacáridos de la pared celular, además el gasto de ATP durante la fosforilación de la 2DG puede contribuir también al efecto tóxico de este análogo (Allen y col., 1989). Sin embargo, el metabolismo del carbono en hongos se ha estudiado en muchos casos aislando mutantes resistentes a la 2DG. En el caso de *Neurospora crassa*, Allen y col. (1989), encontraron que hay al menos 4 loci involucrados en la resistencia a 2DG y que se relacionan con la desrepresión de algunas enzimas, además la invertasa producida por las mutantes *dgr* tiene patrones distintos en la termoestabilidad y propiedades inmunológicas, con respecto a lo que se observó en la cepa originalmente sensible a la 2DG.

En lo que respecta a las cepas *dgr* de *A. niger* y otras especies que, como se mencionó anteriormente, han demostrado tener interés comercial, se tiene que están muy poco caracterizadas fisiológica y genéticamente. Sin embargo, el trabajo para la obtención de mutantes sobreproductoras de pectinasas, a partir de la cepa silvestre de *A. niger* C28B25 (Antier y col., 1993), no contempló iniciar con alguna cepa que tuviera algún marcador genético tal que permitiera la caracterización genética de las mutantes a través del ciclo parasexual con alguna cepa maestra. El objetivo de la caracterización genética sería poder asignar la mutación *dgr* a algún cromosoma específico, así como determinar el número de grupos de complementación involucrados.

La falta de un marcador genético en las cepas *dgr* se puede solucionar si se les induce una mutación, como por ejemplo una auxotrofia. La selección del nuevo marcador en las cepas puede ser la auxotrofia a arginina, en vista de que es una mutación que no tiene la cepa maestra con la que se cuenta para el análisis genético de las mutantes *dgr*. Además se desean crear cepas con marcadores genéticos para que formen parte de la colección UAM-ORSTOM, de manera que faciliten trabajos

posteriores de manipulación, caracterización genética y transformación. La selección de la auxotrofia a arginina, abre la posibilidad para introducir DNA en nuestras cepas por medio de la transformación, debido a que se cuenta con el plásmido de replicación autónoma pDHG25, gentilmente puesto a disposición del Dr Jesús Aguirre, asesor de la presente tesis, por el Dr. John Clutterbuck. Este plásmido proviene de *A. nidulans*, y lleva la secuencia del gen *argB* de *A. nidulans* que codifica para la ornitino-transcarbamilasa (OTC). El plásmido ya ha sido probado con éxito en mutantes *argB* de *A. nidulans*, *A. niger* y *A. oryzae*, donde se ha sido funcional en las respectivas transformantes (Gems y col., 1991).

Por otra parte, el análisis genético de *A. nidulans*, ha mostrado que el producto del gen *creA* tiene un papel primordial como regulador negativo durante la represión catabólica por carbono. Por lo anterior, muchas enzimas quedan desreprimidas en mutantes afectadas en *creA* (Bailey y Arst, 1975). Recientemente se ha probado que el gen *creA* clonado de *A. niger* es funcional en *A. nidulans*, por complementación heteróloga de la mutación *creA204* de *A. nidulans*, y además los productos del gen *creA* de las dos especies tienen 82% de similitud en la secuencia de aminoácidos (Drysdale y col., 1993). Esto sugiere que las mutantes *creA* de *A. niger* se comportan similarmente a las mutantes *creA* estudiadas en *A. nidulans*, por lo que se hace interesante probar si las mutantes aisladas por Antier y col. (1993), que resultaron menos sensibles a la RC, están relacionadas con posibles mutaciones *creA*.

La necesidad planteada de conocer más sobre la genética y fisiología de las cepas *dgr* justifica el trabajo experimental que sustenta la presente tesis, partiendo de las mutantes obtenidas por Antier y col. (1993).

## 2.2 Hipótesis.

Se ha formulado la hipótesis de que entre las cepas más representativas de cada serie de mutantes (serie *dgrAw99* y serie *dgrAw96*), la mutación que les confirió resistencia a la 2DG, y que probablemente intervino directamente para que sobreprodujeran pectinasas en uno u otro medio, se halla en loci distintos. Es decir, las cepas que tienen mejores niveles de producción de enzima en las condiciones de CS están afectadas en sitios distintos del genoma, con respecto a las cepas capaces de sobreproducir enzima en FES.

## 2.3 Objetivos.

### 2.3.1 Objetivo General.

Caracterizar genética y fenotípicamente mutantes de *Aspergillus niger* sobreproductoras de pectinasas por Fermentación en Estado Sólido o en Cultivo Sumergido.

### 2.3.2 Objetivos Específicos.

- 1) Obtención de cepas con marcadores genéticos.
- 2) Asignación de las mutaciones *dgr* a un cromosoma específico a través del ciclo parasexual con una cepa maestra.
- 3) Comparación morfológica del crecimiento de las cepas en distintos medios.

## MATERIALES Y METODOS

## 3.1 Microorganismos.

La cepas de *Aspergillus niger* usadas durante este estudio fueron: C28B25 (silvestre), Aw99-b1, Aw99-iii2, Aw96-3 y Aw96-4, todas ellas aisladas y caracterizadas en cuanto a su producción de poligalacturonasas por Antier y col. (1993). También se utilizaron la cepa 350.52, con la mutación *argB* (Buxton y col., 1985), y la cepa maestra A731 obtenida del Fungal Genetic Stock Center (FGSC) cuyo genotipo es el siguiente: *cpsA1 fwnA1* (I), *hisD4* (II), *lysA7* (III), *leuA1* (IV), *nicA1* (V), *pabA1* (VI), los números romanos en paréntesis indican el cromosoma en el que se encuentra la mutación. La tabla 3.1 da el fenotipo de cada cepa. Para iniciar los experimentos se partió de inventarios de las cepas conservadas en gránulos de sílica gel (Perkins, 1977).

CEPA	FENOTIPO
C28B25	Silvestre, DGS
Aw99-b1	DGR
Aw99-iii2	DGR, SP-CS
Aw96-3	DGS, SP-FES
Aw96-4	DGR, SP-FES
A731	Cepa maestra
350.52	ARG <sup>-</sup>

**Tabla 3.1.** Cepas de *A. niger* utilizadas en este trabajo. DGS, sensible a 2DG; DGR, resistente a 2DG; SP, sobreproductora de pectinasas; CS, cultivo sumergido; FES, fermentación en estado sólido; ARG<sup>-</sup>, auxótrofa de arginina.



### 3.2 Medios y condiciones de cultivo.

#### 3.2.1 Medios de cultivo.

El medio mínimo (MM) usado fue el mismo reportado por Antier y col. (1993) cuya composición es la siguiente en g/l:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.30;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.13;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.75;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.30; urea 0.25;  $\text{CaCl}_2$  0.30, la fuente de carbono se varió durante los experimentos y esto dió el criterio que se siguió para la nomenclatura de los medios:

- MMG, medio mínimo con glucosa 10 g/l.
- MMF, medio mínimo con fructosa 10 g/l.
- MMP, medio mínimo con pectina 10 g/l.
- MML, medio mínimo con glicerol 10 g/l.

La actividad de agua ( $A_w$ ) se redujo de un valor de 0.99 a un valor de 0.96 por medio de la adición de 15% (v/v) de etilenglicol (EG) a los medios que lo requirieron. Los valores de actividad de agua se midieron en el equilibrio mediante el analizador Decagon.

Los oligoelementos se agregaron al medio para tener una concentración final de 1 mg/l de  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{CuSO}_4$  (Bos y col., 1992). Para solidificar los medios se utilizó agar bacteriológico (15 g/l).

Los medios suplementados (MS) llevaban los nutrientes a concentraciones finales de 250 mg/l para los aminoácidos y 2.5 mg/l para las vitaminas (Bos y col., 1992). En el caso de la arginina, ésta se probó a dos concentraciones distintas: 700 y 260 mg/l (4 y 1.5 mM, respectivamente). En algunos casos se usó extracto de levadura (E.L.) a distintas concentraciones para suplementar los medios, según el experimento.

El pH se ajustó a 5.5 y todos los cultivos se incubaron a 30°C, a menos que se indiquen otras condiciones. La inoculación se hizo después de impregnar la punta de un palillo con las respectivas suspensiones de esporas, a una concentración de  $10^7$  esporas por mililitro (esp/ml), posteriormente se depositaron las esporas por picadura directa con el palillo en los medios en caja de Petri.

### 3.2.2 Cultivo Sumergido (CS).

Cada CS se hizo de acuerdo a Antier y col. (1993), básicamente de la siguiente manera: en matraces de 250 ml, se inocularon 50 ml de MMP líquido con  $5 \times 10^4$  esp/ml. La incubación se hizo en un agitador orbital a 180 rpm y temperatura controlada de 25°C. El micelio se filtró en papel Whatman No. 4 y se secó por 24 h a 60°C para determinar el peso seco de la biomasa. El filtrado se utilizó para el ensayo enzimático.

### 3.2.3 Fermentación en Estado Sólido (FES).

Los cultivos de FES sobre pulpa de café (malla 60) se realizaron en columnas de vidrio como las descritas por Raimbault y Alazard (1980). La temperatura se mantuvo a 25°C mediante un baño de agua en el que se encontraban sumergidas las columnas. El medio para empacar las columnas tuvo la siguiente composición: por cada 100 g de pulpa seca se agregaron 5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 4.3 g de urea. Estas sales se disolvieron previamente antes de la esterilización con la pulpa (30 min a 10 psi). Cada columna se empacó con 20 g de pulpa de café estéril y con la humedad ajustada a 60%, que en términos de actividad de agua corresponde a un valor de  $A_w=0.96$ , mantenida entre 0.955 y 0.965 a lo largo de la fermentación. La aireación se mantuvo a un flujo de 60 ml/min con una corriente de aire que se hizo burbujear en agua antes de pasar por cada columna. El inóculo consistió en  $2 \times 10^7$  esporas por gramo de pulpa seca (g/PS).

### 3.3 Confirmación de mutaciones *creA*.

Como se ha mencionado anteriormente, las cepas que tienen la mutación *creA* se encuentran afectadas en la represión catabólica de algunas enzimas, entre ellas la alcohol deshidrogenasa que es capaz de transformar el alcohol alílico en el compuesto tóxico acroleína. En este experimento se usaron concentraciones de alcohol alílico de 0, 3, 4 y 5 mM en MMG (condición de represión para una cepa silvestre). La cepa maestra también se incluyó en el estudio, por lo

que, para este caso, el medio anterior se suplementó con los requerimientos nutricionales de esta cepa. Como control positivo se incluyó a la cepa MH440 de *Aspergillus nidulans* que lleva la mutación *creA*. La inoculación fue por picadura con palillos, como se explicó anteriormente. A las 60 h de incubación a 30°C se midió el diámetro de las colonias para ver la respuesta al alcohol alílico.

### 3.4 Mutagénesis.

Las mutantes auxotróficas de arginina, de las cepas seleccionadas (Aw99-iii2 y Aw96-4), se indujeron por irradiación con luz ultravioleta (UV) sobre las esporas, usando dosis bajas de mutágeno, equivalentes a niveles de sobrevivencia superiores al 50% (Bos, 1987). Las condiciones de irradiación fueron tales que se tuviera una intensidad de 700  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  sobre los 27 ml de suspensión de esporas a una concentración de  $8 \times 10^6$  esp/ml, recomendada por Witteveen y col. (1990), y con agitación constante por medio de un agitador magnético dentro de la caja de Petri donde se hallaban las esporas. En estas condiciones se realizó la curva de sobrevivencia, para la cual se tomaron muestras, de la suspensión irradiada, por triplicado cada minuto (12 min en total) y se hizo la cuenta viable sobre PDA con desoxicolato de sodio, para reducir el diámetro de las colonias.

### 3.5 Proceso de Enriquecimiento (P.E.).

La suspensión irradiada se dividió en alícuotas que se distribuyeron en matraces con 60 ml de MMG líquido para tener una concentración de  $2.5 \times 10^5$  esp/ml, incubándose a 30°C por un total de 30 a 40 hr a 150 rpm (Bos y col., 1992). A intervalos de 12 a 14 h se filtró el medio a través de una tela miracloth para retener el micelio que se había desarrollado. En promedio se realizaron 3 filtrados en cada P.E. Cada filtrado se centrifugó a 6000 g por 10 minutos y se decantó para resuspender las esporas en medio fresco e iniciar otro período de incubación. Finalmente las esporas que no germinaron durante el

P.E. se recolectaron para sembrarse en MMG suplementado con arginina 1.5 mM. Se hizo una réplica de las colonias que crecieron, mediante un replicador forrado de terciopelo, a cajas con MMG sin arginina. Con esta técnica se detectó qué colonias eran incapaces de crecer en MMG, debido a la auxotrofia. Finalmente, cada mutante auxótrofa de arginina se purificó y se conservó, para posteriores análisis, en sílica gel (Perkins, 1977).

### **3.6 Análisis Genético.**

#### **3.6.1 Formación de heterocariones.**

Los heterocariones se obtuvieron al mezclar esporas de dos cepas con distintos marcadores auxotróficos en 5 ml de MS, a menudo con suplementación extra de los factores de crecimiento. Posteriormente, se incubaron por 1 día a 30°C. El micelio resultante se lavó y algunas partes se transfirieron a cajas con MMG y se incubaron por 6 ó 7 días. Ocasionalmente se producía el crecimiento vigoroso de un sector, indicando la existencia de un heterocarión. Los heterocariones balanceados se pudieron mantener al transferir pequeñas muestras a cajas con MMG fresco.

#### **3.6.2 Aislamiento de diploides.**

A partir de los heterocariones esporulados, se hizo una suspensión de esporas, en una solución de Tween 80 al 0.05%, con la que se inocularon cajas de Petri a las que se vació MMG a punto de solidificar. Los diploides heterocigotos se aislaron al cabo de 5 a 7 días, cuando aparecían varias colonias en la superficie de las cajas, pero sólo una porción muy pequeña de ellas tenía crecimiento radial y esporulación uniformes, por lo que se consideraron diploides. A estos diploides se les hizo un estriado en MMG para obtener colonias provenientes de una sola espora. Todos los diploides obtenidos fueron conservados en MMG a 4°C para posteriores análisis.

El estado de diploidía se corroboró mediante la medición de los diámetros de las esporas y su comparación con las cepas haploides.

### 3.6.3 Haploidización.

Los diploides heterocigotos se inocularon en MS, con todos los requerimientos de las cepas haploides, en presencia de para-fluorofenilalanina (pffen) a una concentración de 90 a 100 mg/l (Lhoas, 1961). Después de 6 a 10 días aparecieron sectores poco esporulados pero que se probaron en MS y MM para estudiar la segregación de los marcadores genéticos.

## 3.7 Transformación Genética.

### 3.7.1 Crecimiento del cultivo

El protocolo de transformación para las cepas auxótrofas fue básicamente de acuerdo a Yelton y col. (1984), como primer paso se obtuvieron micelios jóvenes con 12, 16 y 18 h (para la cepas Aw99ARG, Aw96-4ARG y 350.52, respectivamente) de incubación a 30°C y 200 rpm en MS con arginina y 0.1% de extracto de levadura (E.L.).

### 3.7.2 Obtención de protoplastos.

Se colectaron los micelios de cada cepa al filtrarlos por piezas estériles de tela miracloth, después se lavaron con la solución para el lavado de micelios ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.6 M estéril y mantenida a 4°C). Posteriormente, se pesó de 0.5 a 1.0 g del micelio colectado en un tubo falcon estéril y se colocó en hielo. En esta etapa se prepararon las soluciones de enzimas líticas en agua destilada estéril: Novozima 234 (15 mg/ml) y BSA (Sigma A-6003, 12 mg/ml), estas cantidades fueron por cada una de las cepas que se pretendía transformar.

Una vez listas las soluciones anteriores, se resuspendieron los distintos micelios en medio osmótico ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.2 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mM, pH 5.8, estéril y mantenido a 4°C) usando 5 ml de este medio por cada gramo de micelio colectado. A continuación se transfirieron a matraces de 250 ml y se les agregó la solución de Novozima 234 (1 ml/5 ml de células), se mantuvo en hielo cada matraz por 5 min, para finalmente agregarle la solución de BSA (0.5 ml/5 ml de células).

Como siguiente, paso cada uno de los matraces se incubó a 30°C y 80 rpm por 50-60 min, después se filtraron a través de miracloth y se recuperaron los protoplastos en tubos falcon de 15 ml para centrifugarse por 15 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y se resuspendió con 10 ml de Buffer STC (Sorbitol 1.2 M,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 7.5, estéril y mantenido a 4°C) para centrifugar y repetir el proceso 2 veces más (3 lavados en total). Los protoplastos se resuspendieron en 1 ml de Buffer STC y se guardaron en hielo. La solución se diluyó 1:100 en Buffer STC para contar los protoplastos en un hematocímetro.

### 3.7.3 Transformación.

A los protoplastos de las tres cepas que se pretendían transformar, se les incorporó el plásmido de replicación autónoma pDHG25 que lleva inserto el gene *argB* de *Aspergillus nidulans* (Gems y col., 1991), el cual codifica para la ornitino transcarbamilasa (OTC). En el caso de la cepa 350.52, se realizó una cotransformación con el plásmido pJA22 y otra con el plásmido pJA12B, estos plásmidos llevan la fusión del gene *brlA* de *A. nidulans* y del gene estructural de la beta-galactosidasa (*lacZ*) de *E. coli*. La diferencia entre estos dos últimos plásmidos es la orientación de la fusión *brlA-lacZ*. (Aguirre y col., 1990).

Se usaron 100  $\mu\text{l}$  de solución de protoplastos y 4  $\mu\text{g}$  de DNA (plásmido) que se incubaron a temperatura ambiente por 25 min en un eppendorf de 1.5 ml de capacidad. Después de lo anterior, se añadió 1 ml de PEG (PEG 4000 al 60% (BDH),  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 7.5, estéril y mantenido a temperatura ambiente) mezclando

suavemente cada tubo, para después incubarlo a temperatura ambiente por 20 min más.

Finalmente, se desechó el PEG y se resuspendieron los protoplastos en 1 ml de Buffer STC. Se inocularon pequeñas gotas de estas soluciones de protoplastos en el fondo de cajas de Petri, a las que se vació medio a punto de solidificar. Para seleccionar las colonias transformantes, el medio utilizado fue MM con sorbitol 1.2 M y las sales minerales ya especificadas.

Se hicieron controles en el medio anterior sembrando los protoplastos sin transformar, esto para verificar la presencia de contaminantes o revertantes. También se determinó la viabilidad de los protoplastos antes y después del PEG, en este caso el medio se adicionó con arginina 1.5 mM.

### **3.8 Análisis de resistencia a 2DG.**

Se inocularon por picadura cajas con MM o MS con arginina, según el caso. Se probaron 4 distintas fuentes de Carbono: glucosa, fructosa, pectina o glicerol, y para todos los casos se incluyeron en el medio concentraciones de 2DG que iban de 0 a 0.50 g/l. Al cabo de 60 h a 30°C se midió el diámetro de cada colonia para cada cepa, esto se hizo por duplicado y se presentan los promedios de cada medición.

### **3.9 Ensayo enzimático.**

La actividad pectinolítica se midió a partir de los filtrados de cada CS. Para el caso de las muestras obtenidas de las FES, se tomaron 10 g de pulpa de café fermentada y se mezclaron con 10 ml de agua destilada, a continuación se prensaron a 1000 psi en una prensa hidráulica. El extracto obtenido se centrifugó a 6000 g por 5 min y se utilizó el sobrenadante para el ensayo enzimático.

La actividad pectinolítica, que fue principalmente del tipo de la poli-1, *alfa*-D-galacturonido glicanohidrolasa (E.C. 3.2.1.15)

(Leuchtenberger y Mayer, 1992), fue medida de acuerdo con Antier y col. (1993). Esto se hizo por viscosimetría, registrando la reducción de la viscosidad de una solución de pectina (20 g/l, en buffer de citratos-fosfatos 0.1 M y pH 5.5), usando para ello un viscosímetro Brookfield. A 18 ml de la solución de pectina se le añadió 1 ml del filtrado o del extrato, según proviniera de CS o FES, y se dejaba incubándose por 10 min a 45°C. Una unidad (U) de actividad pectinolítica se definió como la cantidad de enzima que reduce en 10 min la viscosidad, de la solución de pectina, a 50% de su valor inicial.

### 3.10 Morfología de crecimiento.

Los parámetros de velocidad de extensión radial ( $V_r$ ) y longitud de las hifas terminales ( $L_0$ ) se midieron mediante el procesador de imágenes.  $L_0$  corresponde a la media de 30 mediciones de la zona periférica de crecimiento en cada colonia, esta medición se hace durante la última lectura de  $V_r$ , después de fijar el micelio mediante la inmersión por 24 h en una solución que contiene 2.5 ml de  $\text{CrO}_3$  al 10%, 5.0 ml de ácido acético al 10%, aforando a 100 ml con agua destilada (Clark, 1981).  $V_r$  se midió obteniendo los radios de cada colonia a intervalos regulares de tiempo, cada 24 h, durante 100 h para los medios con  $A_w=0.990$  y cada 48 h, durante 220 h, para el caso de los medios con  $A_w=0.955$ . A continuación se obtuvieron las regresiones lineales para cada caso. En este trabajo se presentan las medias de 3 colonias por medio de cultivo.

Con la expresión propuesta por Larralde-Corona y col. (1994) se calculó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). El valor de  $\mu$  se estimó por la fórmula:

$$\mu = \ln 2 \phi_s,$$

Siendo  $\phi_s$  la frecuencia de ramificación del micelio, estimada como:

$$\phi_s = V_r / [L_c \ln(L_c/L_0)],$$



donde  $L_c$  es la longitud crítica de una hifa antes de ramificar y  $L_0$  es la longitud promedio de las hifas terminales ( $L_c=2.5L_0$ ), y como ya se ha mencionado, este valor se obtiene midiendo directamente en la periferia de la colonia en cuestión. Los resultados se analizaron con el paquete estadístico SAS.

**ESTRATEGIAS PARA CRUZAS.****4.1 Introducción.**

La mutación *creA* en *Aspergillus nidulans* altera la represión catabólica de varias enzimas dando un fenotipo de desrepresión (Bailey y Arst, 1975). Por ejemplo, las mutantes *creA* tienen desreprimida la alcohol deshidrogenasa, esto las hace incapaces de crecer en un medio con glucosa al 1% (condición de represión en una cepa silvestre) en presencia de alcohol alílico, pues la alcohol deshidrogenasa desreprimida convierte este compuesto en acroleína, que resulta tóxico para el microorganismo (Hynes y Kelly, 1977).

Por otra parte, las mutaciones *creA* son recesivas en diploides (Bailey y Arst, 1975) por lo que se pueden formar heterocariones entre una cepa con esa mutación, incluso con otra mutación adicional como la de las cepas *dgr*, y una cepa maestra (con la alcohol deshidrogenasa reprimida), para ello se puede emplear un medio selectivo consistente en MMG con alcohol alílico a concentración letal para cualquier cepa *creA*. En este medio podría crecer un heterocarión con un alelo silvestre del gene *creA* (proveniente de la cepa maestra) y con todos los alelos silvestres de los genes mutados en la cepa maestra (provenientes de la cepa *creA*). El aislamiento de un diploide en el medio anterior permitiría el mapeo de genes a través del ciclo parasexual partiendo directamente de las cepas aisladas por Antier y col. (1993), que no tienen otro marcador genético fuera de la resistencia a 2DG.

En este capítulo, se describen las estrategias usadas para tratar de forzar la formación de heterocariones, entre las mutantes *dgr* y la cepa maestra A731.

**4.2 Investigación de probables mutaciones *creA*.**

La figura 4.1 muestra el perfil de resistencia al alcohol alílico de las cepas, y se puede notar que aún a concentraciones de alcohol alílico 5 mM hay crecimiento en todas las cepas. Sólo la cepa Aw99-

iii2 tiene una disminución sensible del diámetro de la colonia y esporulación a concentraciones mayores de 3 mM. En general las cepas disminuyen su esporulación a concentraciones de 4 y 5 mM con respecto al medio control sin alcohol alílico.

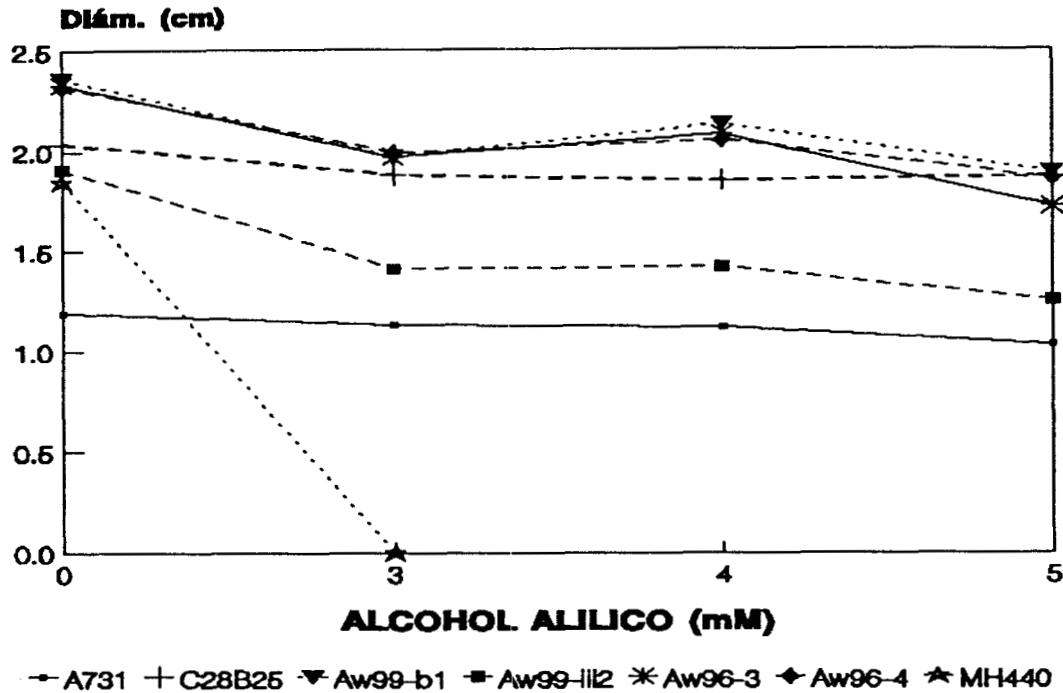


Figura 4.1. Perfil de crecimiento de cepas de *A. niger* en presencia de alcohol alílico. Se muestra el comportamiento de la cepa MH440 de *A. nidulans*, que lleva la mutación *creA*.

#### 4.2.1 Discusiones y conclusiones.

Por la evidencia del experimento anterior parece que no existe una desrepresión catabólica de la alcohol deshidrogenasa en ninguna de las cepas probadas, incluso, la cepa silvestre resultó ser resistente al alcohol alílico en todas las concentraciones probadas.

Ninguna de las mutantes sobreproductoras de pectinasas probadas en este estudio resultó tener un fenotipo como el que se presenta en las mutantes *creA* de *A. nidulans*, como la cepa MH440 (Fig. 4.1). Esto sugiere que la desrepresión y sobreproducción de pectinasas en

estas cepas pueden no estar relacionadas con la desrepresión catabólica debida a mutaciones *creA*.

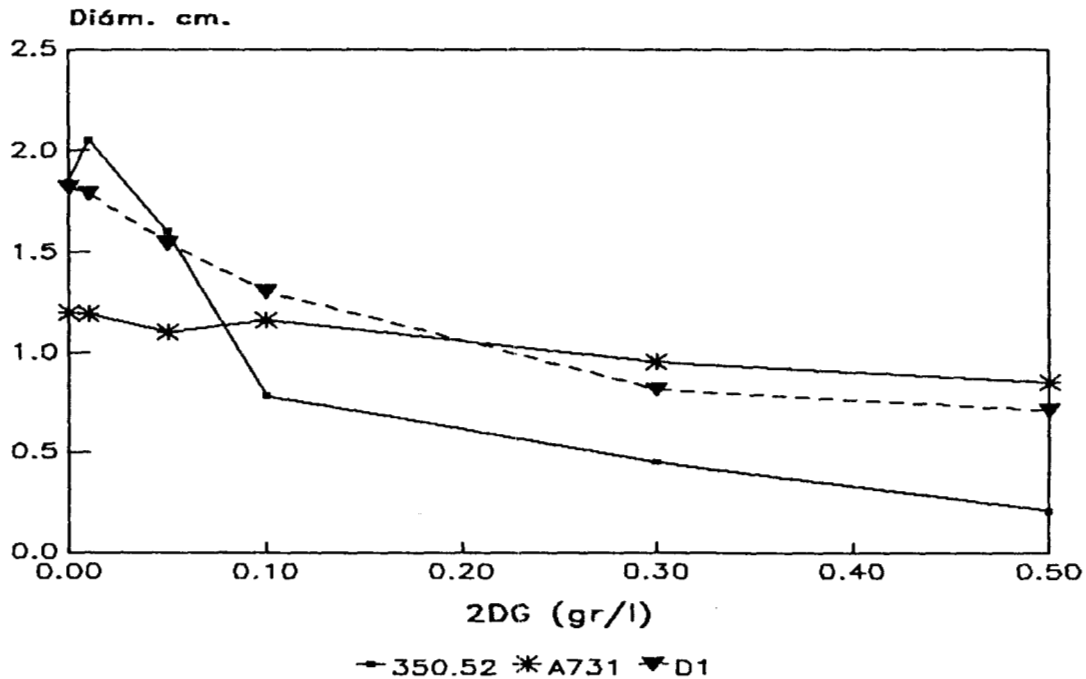
Recientemente se ha reportado que mutantes *creA* de *A. nidulans* aún presentan represión catabólica por glucosa, para al menos un gene de la ruta biosintética de la penicilina (Espeso y col., 1993) y para el gene *brlA*, involucrado en la conidiación (Skromne y col., 1993).

Por lo anterior, la posibilidad de usar el alcohol alílico como presión selectiva, para formar un heterocarión y aislar un diploide, no resultó viable porque las cepas estudiadas no tuvieron un fenotipo como el que se presenta en las mutantes *creA* de *A. nidulans*. Es importante señalar que aunque se ha clonado el gene *creA* de *A. niger* y ha sido capaz de complementar mutantes *creA* de *A. nidulans* (Drysdale y col., 1993), no se ha aislado aún una mutante *creA* de *A. niger* y además las mutantes *dgr* en *A. nidulans* no han mapeado en el locus *creA* (J.M. Kelly, comunicación personal).

#### 4.3 Resistencia a 2DG en distintas fuentes de carbono.

Se ha visto que para algunas cepas de *Aspergillus niger*, la resistencia a la 2DG disminuye si la fuente de C es glicerol, en vez de glucosa (Kirimura y col., 1992). Por otro lado, la cepa EK-6B de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de 2DG es incapaz de fermentar rafinosa, sacarosa o maltosa, pero la glucosa es fermentada de igual forma en presencia o no de la 2DG (Hackel y Khan, 1979).

Estas observaciones y el hecho de que la cepa maestra tiene una resistencia a 2DG como caracter dominante, como se observó con el diploide D1 (Fig. 4.2), dieron pauta para que se analizara la resistencia a 2DG, en distintas fuentes de C, para algunas de las cepas *dgr*.



**Fig. 4.2.** Resistencia a 2DG del diploide D1 en MMP. Se muestra el perfil de cada una de las cepas haploides que lo originaron, para esta cepas el medio se suplementó con los requerimientos necesarios. Cada punto corresponde al promedio de dos observaciones para cada cepa.

Con los experimentos planteados existía la posibilidad de hallar un medio, con una fuente de C específica, en el que la 2DG funcionara como agente selectivo para formar un heterocarión entre la cepa maestra y alguna de las cepas *dgr*. Es decir, se podría tener un medio, con cierta concentración de 2DG, en el que alguna cepa *dgr* no creciera, o lo hiciera con mucha dificultad, pero la cepa maestra sí lo creciera, siempre que dicho medio estuviera suplementado con sus nutrientes requeridos. Con los datos de fuente de C y concentración de 2DG apropiados en el medio, se podría inducir un heterocarión en ese medio mínimo, de tal manera que las auxotrofías de la cepa maestra serían curadas por los respectivos alelos silvestres de la cepa *dgr*, y la resistencia a la 2DG, de carácter dominante, sería aportada por la cepa maestra A731.

El resultado del crecimiento de las cepas (medido como diámetro alcanzado a las 60 h) se muestra en las figs. 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6, para las fuentes de C: glucosa, fructosa, pectina y glicerol, respectivamente.

En el medio con glucosa como única fuente de carbono (MMG) todas las cepas logran crecer en el rango de 2DG probado, incluyendo la cepa maestra A731 (Fig. 4.3). Tanto la cepa silvestre C28B25, como la cepa Aw96-3 (que es sensible a 2DG, a pesar de haber sido aislada como *dgr* en un principio) tienen una zona esporulada muy pequeña a niveles de 2DG superiores a 0.30 g/l, y a 0.50 g/l se desarrollan únicamente como micelio vegetativo.

Cuando la fuente de carbono se cambió a fructosa (MMF), las cepas Aw99-iii2, Aw96-4 y A731 tuvieron un crecimiento radial semejante al mostrado en MMG (fig. 4.4). Sin embargo, las cepas C28B25 y Aw96-3 no germinaron a concentraciones de 2DG por encima de 0.10 g/l, nivel en el que para estas dos cepas sólo se observó una germinación incipiente en algunas cajas.

En el caso de pectina como fuente única de carbono (MMP), se obtuvo un perfil de resistencia en el que la sensibilidad al análogo tóxico fue más evidente que en los medios MMG y MMF para todas las cepas (Fig. 4.5). De hecho las cepas C28B25 y Aw96-3 ni siquiera germinaron a una concentración de 2DG de 0.05 g/l y todas las demás cepas presentaron menor crecimiento radial al aumentar el nivel de 2DG. Además la esporulación es muy pobre a concentraciones de 0.30 y 0.50 g/l para las cepas que lograron formar una colonia.

En cuanto a los resultados de los medios con glicerol como única fuente de carbono (MML), se observó que fue el medio donde las colonias de todas las cepas tuvieron el crecimiento radial más pobre (Fig. 4.6), incluso sin 2DG, el área esporulada es menor con respecto a los otros medios. Además en este medio MML, el efecto de la 2DG sobre todas las cepas es más notorio al aumentar el nivel del análogo tóxico en el medio.

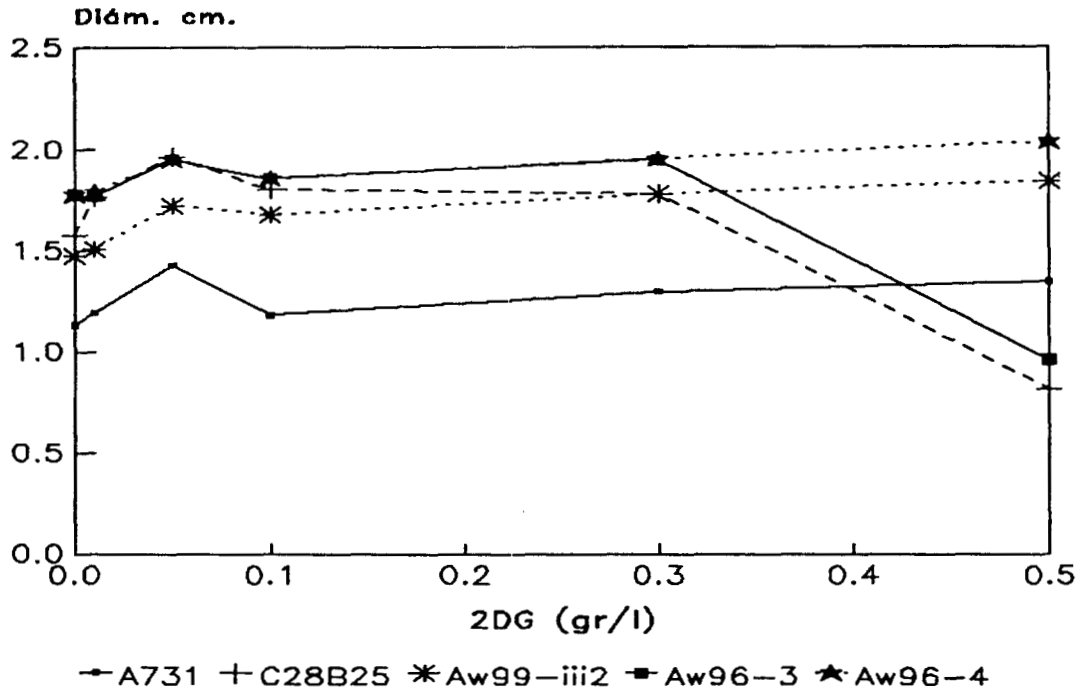


Figura 4.3. Resistencia de las cepas a 2DG en medio mínimo con glucosa (MMG) como única fuente de carbono, la medición de los diámetros se hizo a las 60 h de incubación a 30°C.

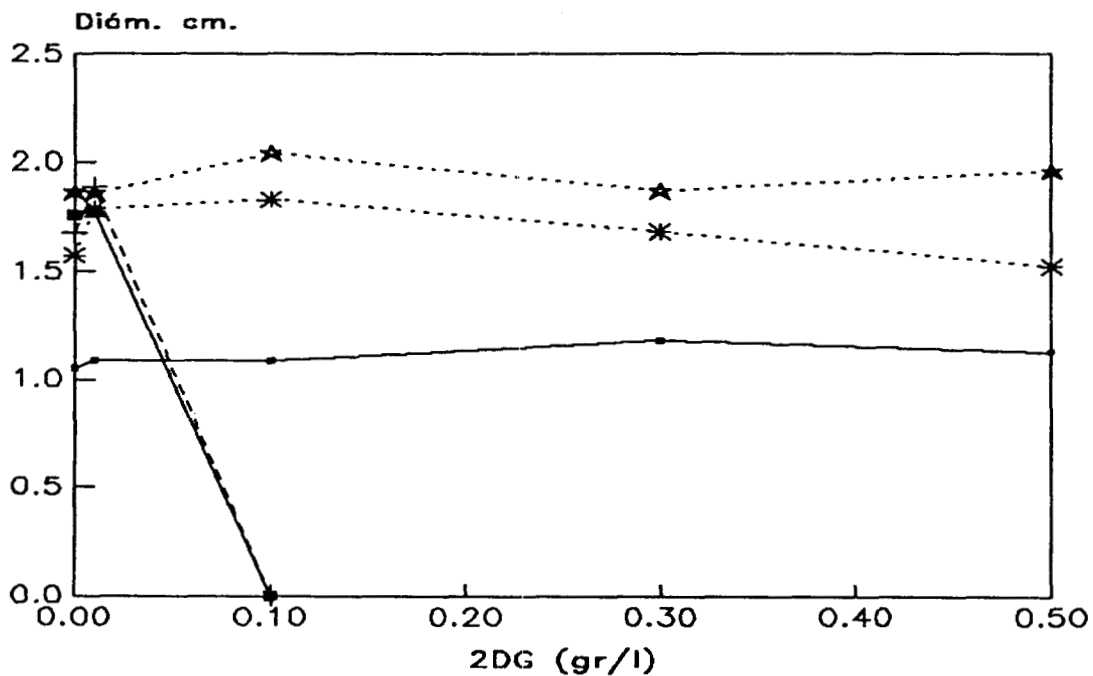


Figura 4.4. Resistencia de las cepas a 2DG en medio mínimo con frutosa (MMF) como única fuente de carbono, la medición de los diámetros se hizo a las 60 h de incubación a 30°C. Los símbolos para cada cepa corresponden a los de la figura 4.3.

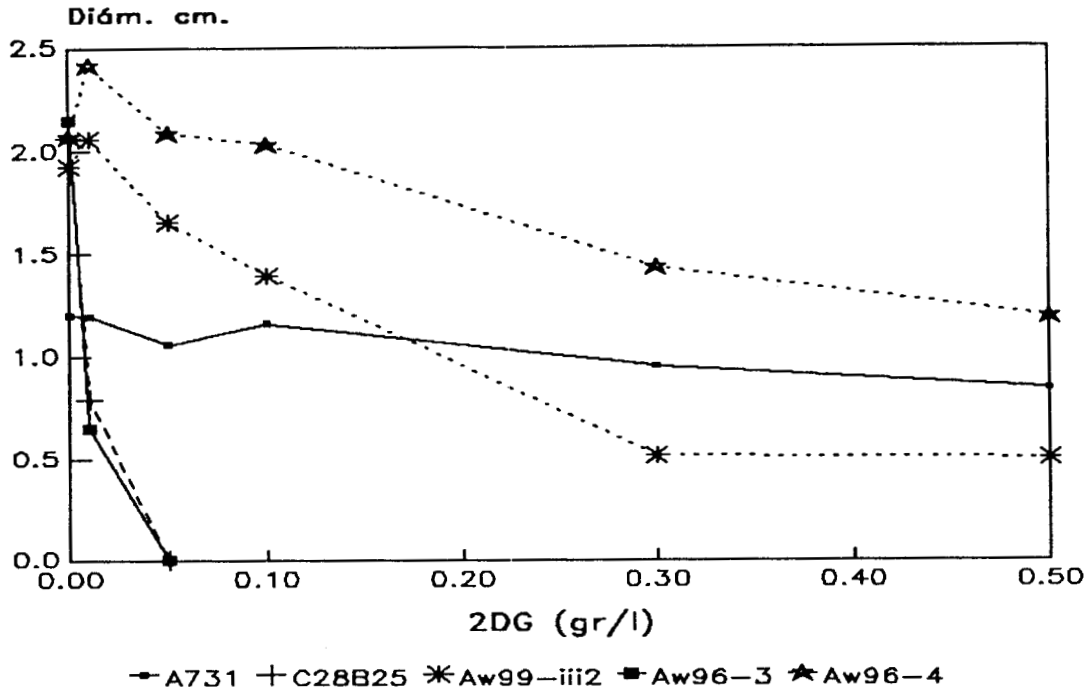


Figura 4.5. Resistencia de las cepas a 2DG en medio mínimo con pectina (MMP) como única fuente de carbono, la medición de los diámetros se hizo a las 60 h de incubación a 30°C.

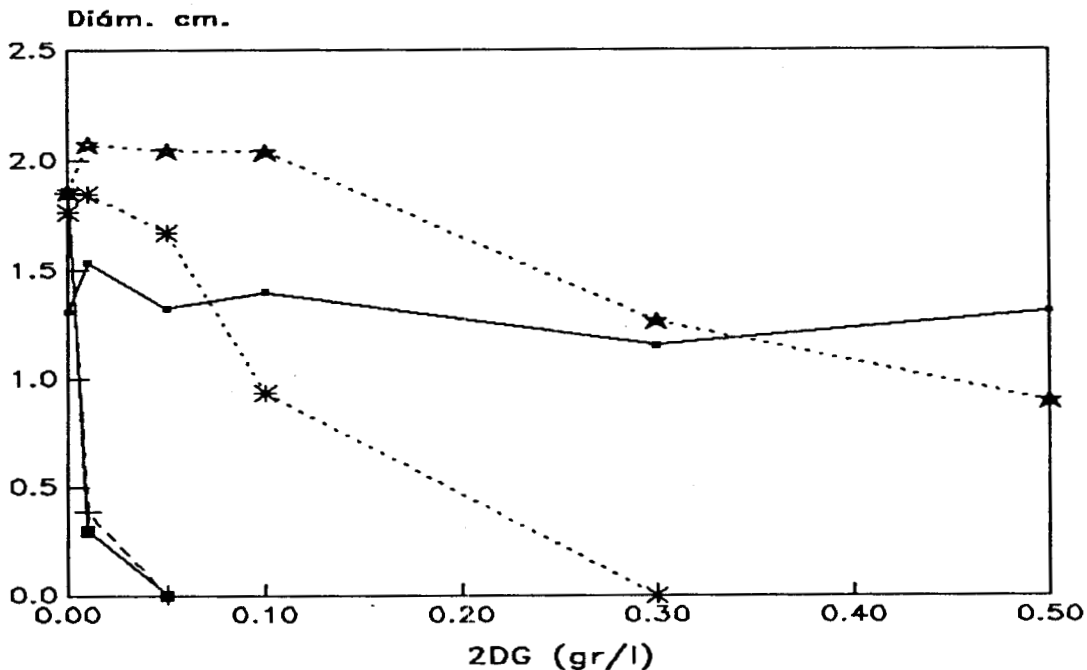


Figura 4.6. Resistencia de las cepas a 2DG en medio mínimo con glicerol (MML) como única fuente de carbono, la medición de los diámetros se hizo a las 60 h de incubación a 30°C. Los símbolos para cada cepa corresponden a los de la figura 4.5.



#### 4.3.1 Discusiones y conclusiones.

La 2DG es un análogo tóxico de la glucosa, cuyo efecto tóxico se manifiesta cuando se transporta y en el interior de la célula es fosforilada por la hexosinasa, dando un gasto inútil de ATP, además de inhibir tanto algunas enzimas de la ruta glucolítica, como la incorporación de glucosa y manosa en los polisacáridos de la pared (Allen y col., 1989).

La variación del efecto de la 2DG en los diferentes sustratos empleados probablemente pueda explicarse de la siguiente manera: Si en el medio existe glucosa como única fuente de C, como en los medios MMG, la 2DG entra simultáneamente y por la misma vía que la glucosa para fosforilarse. Puesto que se tienen dosis bajas del análogo, con respecto a la cantidad de glucosa total en el medio, puede haber un efecto de dilución, de tal manera que las hexocinasas tienen mayor probabilidad de fosforilar una molécula de glucosa que una de 2DG, permitiendo que la ruta glucolítica continúe sin efecto aparente del análogo, hasta una concentración crítica que depende de la cepa, como se pudo notar en este trabajo.

También se observó que las cepas resistentes a 2DG, a baja concentración del análogo (0.01 g/l), tienen una respuesta tal que incrementan su velocidad de extensión radial, sugiriendo que una manera de sobreponerse al efecto tóxico de la 2DG es acelerar su metabolismo. Este fenómeno se observa como un pico en las curvas de diámetro de las colonias contra concentración de 2DG para las fuentes de C empleadas (Figs. 4.3-4.6). El metabolismo más acelerado de las cepas resistentes a 2DG se confirmó en otra serie de experimentos que se detallan posteriormente. Estos consistieron en la medición de la velocidad específica de crecimiento a través del procesamiento de imágenes.

Al cambiar la fuente de C, en presencia de la 2DG, ésta y la fuente de C entran a la célula por vías distintas, y cada molécula de 2DG puede fosforilarse libremente mientras no se forme una molécula de glucosa con la que pueda competir para ser fosforilada.

Resulta claro que entre más tardan las moléculas del sustrato en formar una molécula de glucosa dentro de la célula, mayor tiempo tendrá la 2DG para fosforilarse, con un gasto inútil del ATP y la subsecuente inhibición de enzimas glucolíticas. A partir de un sustrato, distinto de glucosa, se puede formar glucosa por diversos mecanismos, por ejemplo: isomerización de fructosa o por condensación de triosas a partir del glicerol.

La cepa A731 en el medio MML suplementado con sus requerimientos, y a una concentración de 2DG de 0.30 g/l logra crecer con la formación incipiente de conidióforos, mientras que la cepa Aw99-iii2 en el mejor de los casos sólo logra germinar luego de 60 a 70 horas en esas condiciones (Fig. 4.6).

Se podría especular, por tanto que si se fusionan las hifas de las cepas A731 y Aw99-iii2, se podría mantener el heterocarión entre ellas en un medio MML con 2DG a una concentración mínima de 0.30 g/l, donde las auxotrofías de la cepa maestra A731 serían complementadas por la cepa Aw99-iii2, en tanto que la resistencia para crecer en tales niveles de 2DG sería aportada por la cepa A731, que tiene carácter dominante (Fig. 4.2).

#### **4.4 Formación de heterocariones con presión selectiva de 2DG en MML.**

La estrategia planteada a partir de los resultados del experimento anterior, sugirió la formación de heterocariones entre las cepas A731 y Aw99-iii2 bajo la presión selectiva de la 2DG a 0.30 g/l en MML.

Sin embargo, luego de varios intentos bajo esas condiciones, no se pudo aislar ningún diploide de las colonias que parecían ser heterocariones.

La 2DG se incrementó de 0.30 a 0.35 y 0.40 g/l para ver si se tenía una mejor presión selectiva, incluso se hicieron transferencias sucesivas del micelio a MML fresco, pero no se recuperó ningún diploide.

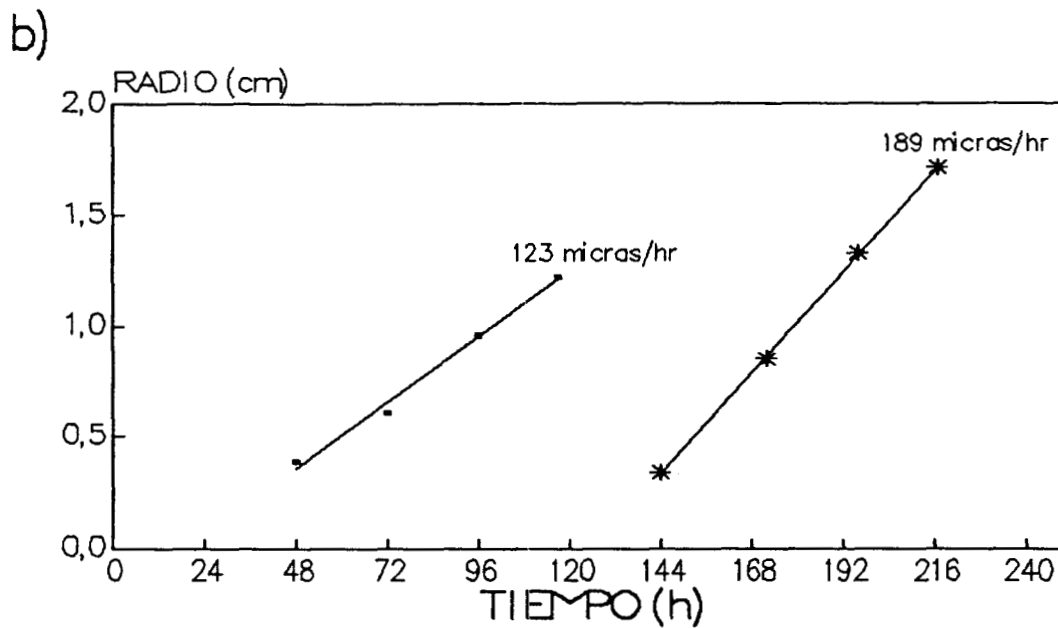
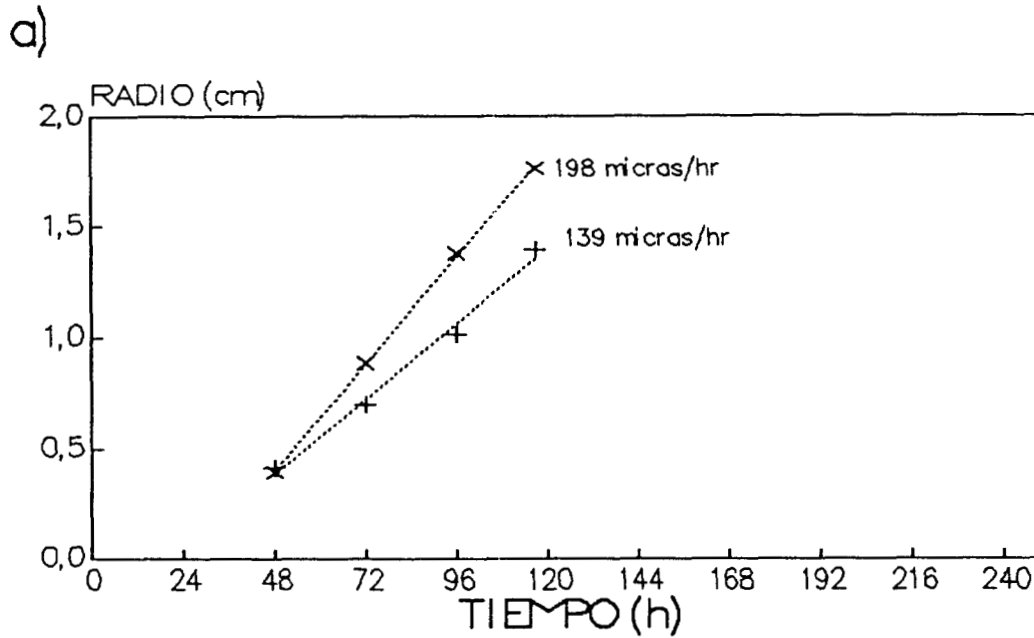
#### 4.4.1 Discusiones y conclusiones.

Se puede pensar que los sectores con apariencia de heterocariones en realidad no lo eran, y tal vez se trataba de la misma cepa Aw99-iii2, que simplemente aletargaba su germinación en esas condiciones.

Esta suposición se ve reforzada por una observación previa en que la cepa Aw99-iii2 retarda su germinación, en comparación con otras cepas *dgr*, en un medio con una concentración baja de pectina como única fuente de carbono (2 g/l) con 2DG a una concentración de 0.10 g/l. Sin embargo, cuando comenzó a crecer lo hizo a mayor velocidad radial que en un medio sin 2DG a la misma concentración de pectina (fig 4.7).

Una observación importante de esta serie de experimentos es que la cepa maestra A731 resultó ser resistente a la 2DG, incluso a niveles mayores que las cepas *dgr* originadas de la cepa silvestre C28B25, lo cual podría ser un obstáculo para mapear la mutación que confiere la resistencia a 2DG en las cepas sobreproductoras de pectinasas, puesto que al haploidizar un diploide formado entre la cepa A731 y una de nuestras cepas, no podría distinguirse la resistencia proveniente de nuestras mutantes de la proveniente de la cepa maestra.

No obstante, se podía especular que esos genes *dgr* segregarían libremente entre los haploides. De tal manera que un sector haploide determinado resistiría la 2DG hasta una concentración característica de la correspondiente cepa *dgr*, o bien, hasta una concentración mayor, característica de la cepa A731.



**Figura 4.7.** Efecto de la 2DG sobre la velocidad radial ( $V_r$ ) en 2 cepas *dgr*: Aw96-4 (a) y Aw99-iii2 (b), en MMP (2 g/l). En ambas se observa que al crecer en un medio con 2DG (0.10 g/l), la  $V_r$  se incrementa, de 139 a 193  $\mu\text{m/h}$  en la cepa Aw96-4 y de 123 a 189  $\mu\text{m/h}$  en la cepa Aw99-iii2.

El seguimiento entonces de la cepa haploide, capaz de crecer sólo hasta concentraciones de 2DG tolerables por la respectiva cepa *dgr*, daría la pauta para asignar ese gene *dgr* a algún cromosoma de la correspondiente cepa *dgr*.

De cualquier forma, quedaba el problema de formar los heterocariones entre la cepa maestra y algunas de las cepas más representativas de la colección originada por Antier y col. (1993). Para tener más probabilidades de éxito, se crearon auxótrofos de las cepas *dgr*. Con ello se podría forzar el crecimiento de los heterocariones entre los auxótrofos y la cepa maestra A731 en MM. En el capítulo siguiente se expone la estrategia seguida para obtener los auxótrofos y algunas características sobresalientes de los mismos.

**AISLAMIENTO DE AUXOTROFOS.****5.1 Introducción.**

La formación de heterocariones se puede dar en forma espontánea entre cepas compatibles de *A. niger*, sin embargo se puede facilitar la formación de heterocariones entre 2 cepas si se induce una presión selectiva por requerimientos nutricionales, donde se da la complementación de mutaciones en forma recíproca. Es decir, ninguna de las dos cepas parentales crecen en MM, pero sí lo hacen en forma de heterocarión.

Las cepas aisladas por Antier y col. (1993) no tienen marcadores genéticos, como auxotrofías, de ahí que se requiera introducir algún marcador de este tipo para forzar el heterocarión entre estas cepas y la cepa maestra.

En este capítulo se expone la forma en que se obtuvieron estos auxótrofos y algunas características sobresalientes de los mismos.

**5.2 Elección de cepas y tipo de auxotrofia.**

Para iniciar la estrategia de la formación de heterocariones entre la cepas maestra y una auxótrofa, se pensó en aislar tal auxótrofa a partir de una cepa representativa de cada serie de mutantes reportadas por Antier y col. (1993), (fig. 2.1). De la serie *dgrAw99* se tomó a la cepa *Aw99-iii2*, pues es la cepa que produjo las mayores cantidades de pectinasas en CS. En cuanto a la serie *dgrAw96*, se tomó a la cepa *Aw96-4*, pues es la cepa que produjo las mayores cantidades de pectinasas en FES, con respecto a las demás cepas resistentes a 2DG. En la Tabla 5.1 se muestran datos cuantitativos de producción de estas dos cepas seleccionadas, así como de la cepa silvestre C28B25 a manera de comparación. La razón por la que no se consideró a la cepa de mayor producción en FES (cepa *Aw96-3*) durante la presente selección, es porque esta cepa, no obstante que se aisló como *dgr*, revirtió al fenotipo silvestre de sensibilidad a la 2DG, sin perder su capacidad de sobreproducir pectinasas en FES.

CEPA	DL <sub>50</sub> (g/l)	CS (U/g BS)	FES (U/g PS)
Aw99-iii2	0.042	140	24
Aw96-4	0.574	78	220
C28B25	0.005	35	130

**Tabla 5.1.** Cepas seleccionadas para el proceso de mutagénesis y comparación con la cepa C28B25 en cuanto a su dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de 2DG y producción de pectinasas en CS y FES (Minjares, 1992).

En lo que se refiere a la selección de auxotrofia, ésta se basó en la búsqueda de un marcador que no estuviera presente en la cepa maestra y que, por otro lado, permitiera tener una cepa con la cual formar un sistema de transformación genética. Para esto último se contaba ya con el plásmido de replicación autónoma pDHG25, que lleva el gene *argB* de *A. nidulans* y que ha sido probado con éxito en mutantes *argB* de *A. niger* (Gems y col., 1991).

Por lo anterior se pensó en construir auxótrofos de arginina partiendo de las cepas seleccionadas de cada serie de mutantes, esto abriría la posibilidad de tener alguna mutante específica del gene *argB* factible de transformación genética. Los resultados referentes a la transformación genética se expondrán más adelante.

### 5.2.1 Mutagénesis.

Un estudio realizado por Bos (1987) hace referencia a que generalmente se utilizan dosis altas de mutágeno (alta mortalidad) para obtener una frecuencia relativamente alta de mutantes deseadas. Sin embargo, tales dosis pueden resultar en aberraciones cromosómicas y daños generales de la información genética, con una carga de mutaciones indeseables. De ahí la recomendación de llevar a cabo procesos de mutagénesis a dosis bajas de mutágeno, compensando la baja frecuencia de mutantes entre las esporas sobrevivientes con un proceso de enriquecimiento apropiado.

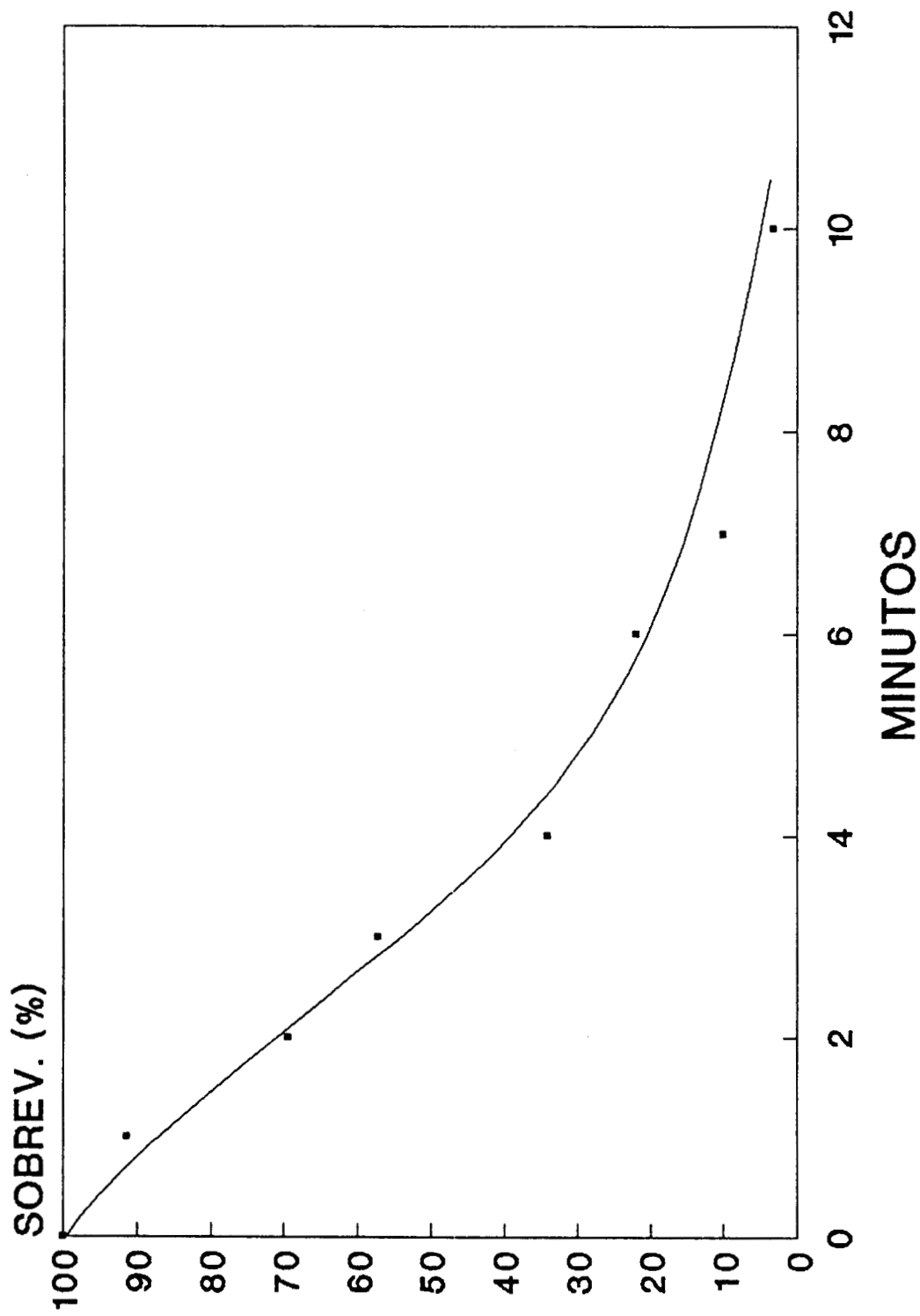


Fig. 5.1. Curva de Supervivencia (%) en función de la irradiación con luz UV sobre la cepa Aw96-4. Condiciones: 8E6 esp/ml y 700  $\mu$ W/cm<sup>2</sup>.



Por otro lado, van Tuyl (1977) hace notar que varias mutantes auxotróficas de *A. niger* obtenidas con nitosoguanidina crecían más lento y con esporulación pobre, comparadas con las obtenidas mediante irradiación con luz UV.

Tomando en cuenta las observaciones anteriores, se siguió un protocolo de mutagénesis por irradiación con luz UV., para ello se obtuvo la curva de sobrevivencia para una de las cepas seleccionadas, cepa Aw96-4, a través de cuentas viables a distintos tiempos de irradiación (fig. 5.1).

### **5.2.2 Discusiones y conclusiones.**

Una vez obtenida la curva de sobrevivencia, se pudo establecer que para garantizar una sobrevivencia superior al 50% de las esporas, recomendado por Bos (1987), era necesario irradiar las esporas por tiempos menores a 3.5 minutos bajo las condiciones establecidas (Fig 5.1). En general, las cepas con esporas negras, como es el caso de las cepas seleccionadas, tienen el mismo perfil de sobrevivencia cuando son irradiadas con luz UV en las mismas condiciones (Bos y col., 1992). Por esto último, los resultados obtenidos se tomaron como representativos para la otra cepa seleccionada (cepa Aw99-iii2) para el proceso de mutagénesis.

### **5.3 Proceso de Enriquecimiento (P.E.).**

Como se ha mencionado antes, el proceso de enriquecimiento surge como una necesidad para compensar la baja frecuencia de mutantes obtenidas con dosis bajas de mutágeno.

El P.E. empleado consistió en la eliminación paulatina de las esporas germinadas, capaces de crecer en MM, mediante filtraciones sucesivas, con objeto de recuperar las esporas no germinadas con alta probabilidad de ser auxótrofas. Finalmente se probaron esporas

no germinadas, durante todo el P.E., para ver si alguna era auxótrofa de arginina.

Es importante notar que se hicieron varios P.E. para cada cepa y se obtuvo una mutante  $arg^-$  a partir de cada cepa (Tabla 5.2).

CEPA	% SOBREVIVENCIA EN CADA P.E.	COLONIAS ANALIZADAS	MUTANTES $arg^-$
Aw99-iii2	50-60	$4.5 \times 10^3$	1
Aw96-4	50-60	$1.0 \times 10^4$	1

**Tabla 5.2.** Resultados de los procesos de enriquecimiento.

Una vez establecidas las condiciones para el proceso de mutagénesis, se detectaron algunos problemas durante los P.E. Uno de estos problemas fué el que muchas esporas se adherían unas con otras, o bien, quedaban atrapadas en el micelio que lograba desarrollarse antes de la primera filtración, esto trajo como consecuencia la pérdida muy grande de esporas no germinadas. Estas esporas no germinaron porque pudieron estar muertas desde el principio o porque sufrieron alguna mutación que las hizo incapaces de crecer en MM, por ejemplo las auxótrofas de arginina.

Sin embargo, el problema más serio resultó ser la dispersión de los tiempos de germinación. Bos y col. (1992) estudiaron este fenómeno de dispersión de los tiempos de germinación en esporas a partir de una suspensión irradiada con luz UV. En el caso de las esporas irradiadas en nuestro laboratorio, se observó que la mayoría de las esporas que no germinaron, no eran auxótrofas, sino que simplemente retardaron su germinación, pues la mayoría pudo germinar en MMG después de cada P.E.

Por otro lado, las cepas de *A. niger* utilizadas tienen conidióforos muy altos y, en el proceso de réplica de una caja a otra, ocasionan una dispersión de esporas más allá del área de la colonia replicada, obviamente esto dificulta el proceso de análisis de las réplicas. Cuando se hacen trabajos de este tipo, es conveniente que las cepas tengan conidióforos cortos (mutantes *cps*) que permitan un manejo más

confiable por medio de réplicas sobre distintos medios (Klaas y col., 1992). La dispersión de esporas hizo necesario utilizar un criterio más seguro para encontrar cepas realmente  $arg^-$ , esto se hizo mediante el uso de cajas maestras donde se inoculaban en una distribución especial todas aquellas colonias con más probabilidad de ser  $arg^-$  después de un P.E. De esta manera se podía trabajar hasta con 100 colonias distribuidas en 4 o 5 cajas maestras, gracias a esto se simplificó el proceso de réplica usando un replicador de colonias que respetaba la posición de cada colonia en cada caja para su rápida identificación.

### **5.3.1 Discusiones y conclusiones.**

A pesar de los problemas como la dispersión de los tiempos de germinación y los conidióforos altos, los P.E. fueron eficientes para encontrar mutantes  $arg^-$  con bajas dosis de mutágeno (60% y 50% de sobrevivencia), aislando las cepas Aw99ARG y Aw96-4ARG, originadas de las cepas Aw99-iii2 y Aw96-4, respectivamente. De no haber sido por estos P.E., hubiera sido prácticamente imposible aislar cepas  $arg^-$  a las dosis de mutágeno empleadas, analizando aproximadamente  $1.5 \times 10^4$  como fue el caso para este trabajo. Existe un P.E. basado en el uso de la enzima Novozima, que degrada la pared celular de los tubos germinales (originados a partir de esporas sin auxotrofías), dejando intactas las esporas muertas o auxótrofas que no germinan en MM. Con este P.E., Debets y col. (1989), han obtenido un factor de enriquecimiento de 250 veces para la obtención de auxótrofos de varios tipos en el mismo P.E.

### **5.4 Características de crecimiento de las cepas $arg^-$ obtenidas.**

Después de un proceso de purificación, cada cepa  $arg^-$  se probó en MMG suplementado con arginina 1.5 y 4 mM (260 y 700 mg/l respectivamente), a otra serie de cajas se le agregaron estos mismos medios pero con 0.5% de extracto de levadura (E.L.). Se estima que la

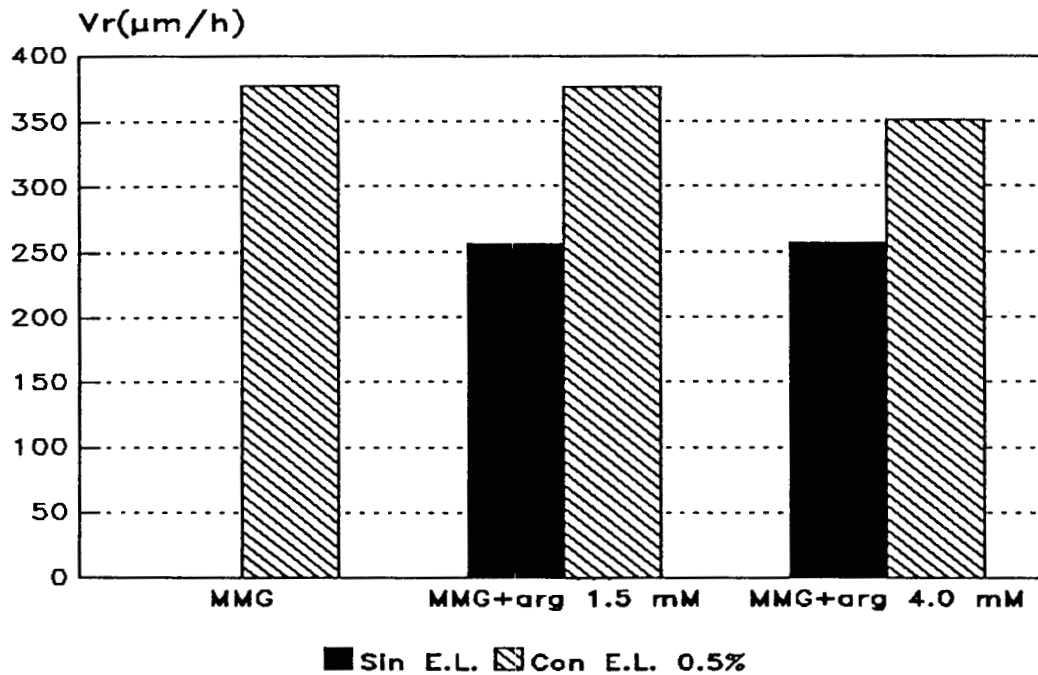
concentración de arginina en un MM suplementado con 0.5% de E.L. es de 0.4 mM (70 mg/l) (Serlupi-Crescenzi y col., 1983).

La figura 5.2 muestra los resultados en el desarrollo de las cepas en los distintos medios. Ninguna auxótrofa fue capaz de germinar en MMG, pero sí lo hicieron cuando el medio se suplementó con E.L. y/o arginina. La cepa Aw99ARG presentó una velocidad radial ( $V_r$ ) máxima de 378  $\mu\text{m/h}$  en MMG suplementado con E.L., pero después de 60 horas no mostró esporulación, presentando sólo micelio vegetativo. Cuando al medio anterior se le añadió arginina 1.5 mM, la  $V_r$  no varió sensiblemente, pero la esporulación fue abundante y cubrió la mayor parte de la colonia, como ocurrió con el medio MMG suplementado con 0.5% de E.L. y arginina 4.0 mM, aunque en este medio la velocidad radial promedio descendió ligeramente a 350  $\mu\text{m/h}$ .

En lo que se refiere a los medios MMG suplementados sólo con arginina 1.5 o 4.0 mM, esta cepa Aw99ARG, tuvo una velocidad promedio de 256  $\mu\text{m/h}$  con una esporulación pobre, más aún a la concentración menor de arginina.

Por otro lado, la cepa Aw96-4ARG tuvo una  $V_r$  promedio de 372  $\mu\text{m/h}$  en MMG suplementado con 0.5% de E.L. y con arginina 1.5 mM, además en este medio se observó su mejor esporulación. Esta cepa sí logró esporular en MMG suplementado sólo con 0.5% de E.L., y tuvo una velocidad radial promedio de 360  $\mu\text{m/h}$ . No obstante que la velocidad radial en los medios que únicamente tenían arginina 1.5 y 4.0 mM fue de 320 y 327  $\mu\text{m/h}$  en promedio respectivamente, la esporulación fue bastante mejor con respecto al MMG suplementado sólo con E.L.

a)



b)

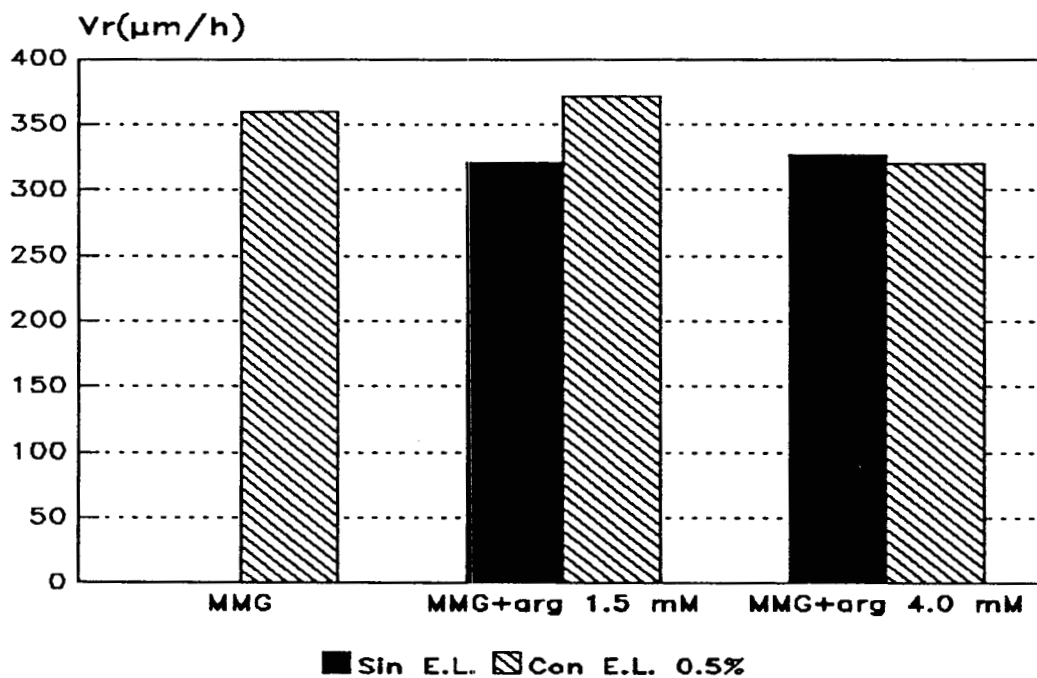


Figura 5.2. Gráficas de la velocidad radial promedio ( $V_r$ ) de las cepas  $arg^-$  en MMG suplementado con 0.5% de extracto de levadura (E.L.) y arginina 1.5 o 4.0 mM. Figs. a: cepa Aw99ARG y b: cepa Aw96-4ARG.

#### 5.4.1 Discusiones y conclusiones.

En cuanto al comportamiento de las cepas *arg<sup>-</sup>* en MMG suplementado sólo con E.L., se observó en forma general que el fenotipo de escasa esporulación (cepa Aw96-4ARG) y nula esporulación (cepa Aw99ARG), se revirtió cuando estos medios estaban suplementados además con arginina 1.5 y 4.0 mM (260 y 700 mg/l, respectivamente). Esta característica ha sido reportada por Serlupi-Crescenzi y col. (1983) en una cepa *argB* de *Aspergillus nidulans*. Estos autores además demostraron que la velocidad radial permanecía constante en el rango adicionado de arginina al medio (0 a 500 mg/l), añadiendo además para todos los casos 0.5% de E.L.

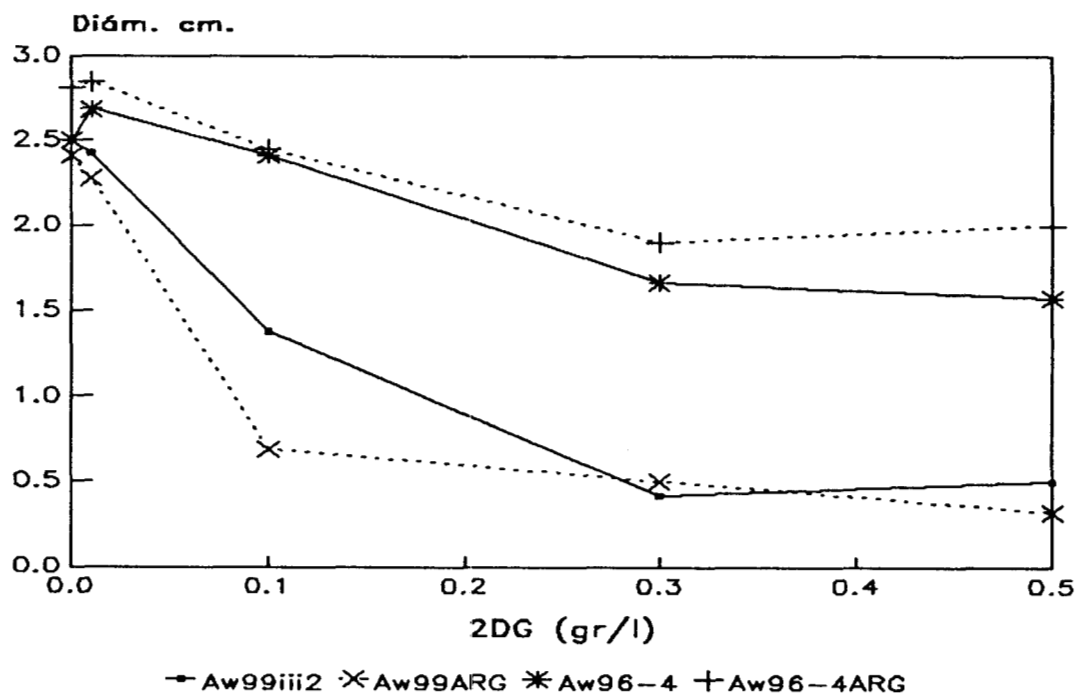
En el presente trabajo se pudo apreciar que la velocidad radial no variaba sensiblemente en los medio con E.L. a las concentraciones adicionadas de arginina, aunque se notó un ligero descenso cuando la concentración de arginina fue de 4 mM (700 mg/l) para ambas cepas. Similarmente, para los casos de MMG suplementados sólo con arginina 1.5 o 4.0 mM, la velocidad radial de las cepas practicamente no varía entre una y otra concentración de arginina.

Por otro lado, el hecho de que la cepa Aw99ARG creciera, pero no esporulara de manera normal en un medio suplementado sólo con arginina, puede sugerir que esta cepa tiene algún requerimiento parcial adicional de algún factor de crecimiento (como vitaminas), o bien, que algún gene involucrado con la esporulación se encuentra afectado. Esta afección puede ser sólo una pérdida parcial de la función de dicho gene. Sin embargo, cuando al medio suplementado con arginina se le añadió 0.5% de E.L. se recuperó la esporulación, esto parece indicar que más bien se trata de la primera opción, es decir, que puede haber un requerimiento parcial de algún factor de crecimiento como una vitamina.

### 5.5 Perfil de resistencia a 2DG de las cepas $arg^-$ .

Una vez obtenidas las cepas  $arg^-$ , era necesario probar que la resistencia a 2DG había variado lo menos posible después de la inducción de la auxotrofia. Para ello se corrió un experimento en el que se midieron los diámetros de las colonias a distintas concentraciones de 2DG en MMP suplementado con 1.5 mM de arginina, de tal manera que en el mismo experimento se comparó el perfil de resistencia a 2DG de las cepas originales (Aw99-iii2 y Aw96-4). La figura 5.3 muestra el resultado obtenido.

Una observación importante fue que la esporulación de las cepas Aw96-4 y Aw96-4ARG no difirió en ninguna concentración de 2DG y ambas presentaron una coloración ligeramente amarilla por debajo de las colonias para todos los casos, que no sucedió con las cepas Aw99-iii2 y Aw99ARG.



**Figura 5.3.** Perfil de resistencia a 2DG de las cepas  $arg^-$  en medio mínimo de pectina (MMP) suplementado con arginina 1.5 mM. Se hace la comparación con las cepas originales Aw99-iii2 y Aw96-4. Cada punto es el promedio de dos determinaciones.

En el caso de las cepas Aw99-iii2 y Aw99ARG, hubo mayor variación en el perfil de resistencia a 2DG entre una y otra cepa. La escasa esporulación de la cepa Aw99ARG observada en MMG suplementado con arginina, no se observó en MMP suplementado con arginina a concentraciones de 2DG de 0 y 0.01 g/l, en donde esporuló tan bien como las demás cepas. Sin embargo, a niveles de 2DG de 0.30 y 0.50 g/l, aunque no se encontró diferencia significativa en la velocidad radial entre las cepas Aw99-iii2 y Aw99ARG, sí se notó una diferencia en la esporulación, de hecho la cepa Aw99ARG es sólo micelio vegetativo cuando la 2DG está presente a una concentración de 0.50 g/l.

#### 5.5.1 Discusiones y conclusiones.

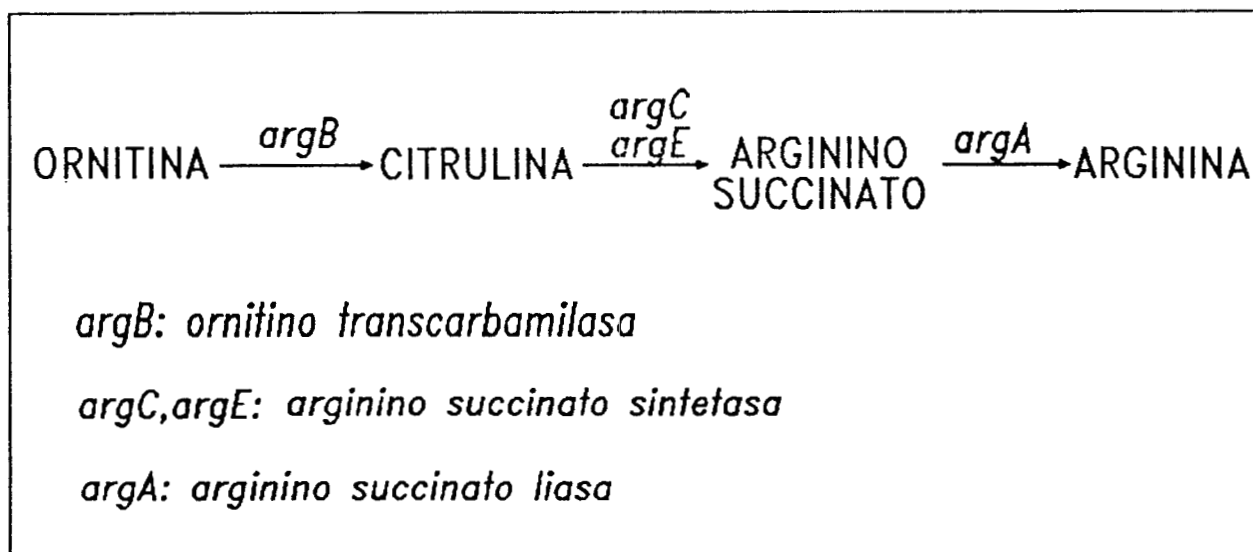
Los resultados anteriores muestran que la resistencia a 2DG no se afectó en forma significativa después de que a las cepas se les indujo una segunda mutación, que las hizo auxótrofas de arginina. Aunque a la concentración de 2DG de 0.10 g/l, sí hubo una diferencia significativa en el análisis estadístico entre las cepas Aw99-iii2 y Aw99ARG.

Lo anterior sugiere que la metodología para aislar mutantes auxótrofas, es decir, las condiciones de mutagénesis y P.E., que se llevaron a cabo fueron adecuados para afectar lo menos posible el genoma de las cepas y evitar mutaciones indeseables. Por otro lado, de ser posible la formación de heterocariones entre estos auxótrofos de arginina y la cepa maestra, se podría llevar a cabo el ciclo parasexual para mapear el gene responsable de la resistencia a 2DG en estas cepas.

#### 5.6 Crecimiento de las cepas arg<sup>-</sup> con precursores de arginina.

La figura 5.4 esquematiza los últimos pasos en la ruta biosintética de arginina en *Aspergillus*, además aparecen las enzimas involucradas en cada paso (Serlupi-Crescenzi y col., 1983). De aquí se entiende que el requerimiento de arginina por un auxótrofo puede ser debido a un bloqueo en uno o varios pasos (enzimas) de la ruta.





**Figura 5.4.** Parte final de la ruta biosintética de arginina en *Aspergillus*, según Serlupi-Crescenzi (1983). Aparece la nomenclatura para designar las mutantes que tienen afectada alguna o varias enzimas responsables de cada paso.

Las cepas aisladas como auxótrofas de arginina, así como la cepa 350.52, también de *A. niger*, que lleva la mutación *argB* (Buxton y col., 1985; Gems y col., 1991), se sembraron en medios con distintos precursores de arginina y los resultados se resumen en la tabla 5.3. Todos los suplementos se agregaron para tener una concentración de 250 mg/l, que es 25% mayor a lo reportado por Bos y col. (1992) para auxótrofos de *A. niger*.

CEPA	MMG	ORN	CIT	PRO	ARG
350.52	--	--	G.I.	G.I.	+++
Aw99ARG	--	--	+/-	G.I.	+++
Aw96-4ARG	G.I.	++	+/-	+/-	+++

**Tabla 5.3.** Comparación del crecimiento de 5 días entre cepas de *A. niger* auxótrofas de arginina. ORN: Ornitina; CIT: Citrulina; PRO: Prolina; ARG: Arginina. Los signos (+) son apreciaciones de crecimiento, el óptimo fue en presencia de arginina. G.I.: Germinación incipiente.

La cepa Aw96-4ARG en MMG suplementado con ornitina tuvo un crecimiento anormal, con esporulación abundante sólo en el centro de la colonia, y pigmentación amarilla en algunas zonas, además fueron colonias que presentaron zonas de crecimiento más rápido, como pseudosectores.

### 5.6.1 Discusiones y conclusiones.

Según la tabla 5.3, las cepas 350.52 y Aw99ARG, tuvieron un perfil de crecimiento, en los medios probados, muy parecido entre sí. Esto sugiere que es probable que ambas cepas requieran arginina debido a que tienen mutado el mismo locus. Si esto fuera cierto, sería factible obtener transformantes usando el plásmido de replicación autónoma pDHG25, que lleva el gene *argB* de *A. nidulans* y que ha sido probado con éxito en la cepa 350.52 (Gems y col., 1991). Por lo que se refiere a la cepa Aw96-4ARG, ésta parece requerir arginina por razones diferentes a cualquiera de las otras cepas.

Por otro lado, la cepa 350.52 tiene la mutación *argB* y teóricamente un MMG suplementado con citrulina, sería suficiente para permitir el crecimiento de esta cepa, pues la mutación *argB* bloquea el paso de la ornitina a citrulina (fig 5.4), no obstante, esto no resultó tan claro en el experimento. Sin embargo, se ha visto que la citrulina y la ornitina son sustratos pobres para que una mutante *arg<sup>-</sup>*, que las requiera, pueda crecer en MM, quizás esto se deba a una falta en la inducción de las permeasas necesarias en *A. nidulans* (Serlupi-Crescenzi y col., 1983) y en *A. niger* (Klaas y col., 1992). En *A. oryzae* parece que no se da este fenómeno, pues Tae y Batt (1988) reportaron que una mutante *argB* de esta especie sí es capaz de crecer en MM suplementado sólo con citrulina.

En los resultados de este experimento se vió también que la cepa Aw96-4ARG fue capaz de utilizar la ornitina, pero tuvo un crecimiento muy pobre en citrulina, tal vez por una adaptación menos efectiva para este sustrato, como se ha observado con otras mutantes de *A. niger* (Klass y col., 1992).

### 5.7 Transformación Genética

Las tres cepas *arg<sup>-</sup>* se sometieron al proceso de transformación genética con el plásmido de replicación autónoma pDHG25 que lleva el gene *argB* de *A. nidulans*. La cepa 350.52 se usó como control positivo, pues ya había sido probada con éxito como cepa receptora de este plásmido (Gems y col., 1991).

Al cabo de 4 días de incubación, después de la transformación, en MM se detectaron colonias de transformantes en las cajas de las cepas 350.52 y Aw99ARG, pero no en las cajas de la cepa Aw96-4ARG. La tabla 5.4 muestra los resultados obtenidos en este proceso de transformación.

CEPA	% PROTOP. VIABLES prePEG	posPEG	FREC. TRANSF.	TRANSF. µg DNA
350.52	12.7	0.21	$2.9 \times 10^{-5}$	4
Aw99ARG	22.7	0.21	$5.5 \times 10^{-5}$	21
Aw96-4ARG	27.7	0.27	0	0

**Tabla 5.4.** Resultados de los experimentos de transformación. Los porcentajes de protoplastos viables se dan antes y después del tratamiento con polietilenglicol (PEG), también se dan las cifras de frecuencia de transformación y de transformantes obtenidos por microgramo de DNA.

La cepa 350.52 fue seleccionada para un proceso de cotransformación con dos variantes:

- 1) Plásmido pDHG25 y plásmido pJA22.
- 2) Plásmido pDHG25 y plásmido pJA12B.

Los plásmidos pJA22 y pJA12B llevan inserto el promotor del gene *brlA*, involucrado en la conidiación de *A. nidulans*, unido al gene estructural de la beta-galactosidasa (*lacZ*) de *E. coli*, sólo que el sentido de la fusión *brlA-lacZ* en cada plásmido está invertido (Aguirre y col., 1990). Esto se hizo con el fin de estudiar la viabilidad de cotransformación con estos plásmidos, como vehículos potenciales para la expresión heteróloga (gene *lacZ*) en *A. niger*.

En cuanto a los resultados de esto último, sólo se obtuvieron cotransformantes usando los plásmidos pDHG25 y pJA12B. Estas colonias fueron permeabilizadas con vapores de cloroformo para hacer reaccionar la beta-galactosidasa expresada con el reactivo X-Gal, incorporado al medio. Esta reacción tiñe de azul a la colonia que está expresando la beta-galactosidasa, y por lo tanto que haya incorporado de forma estable los plásmidos pDHG25 y pJA12B, pues el experimento se hizo en MM para mantener la presión selectiva. Al menos 4 de las 8 transformantes probadas capaces de crecer sin arginina, se tiñeron de azul.

### 5.7.1 Inestabilidad mitótica del plásmido pDHG25.

Como ya se ha mencionado, el plásmido pDHG25 es capaz de replicarse autónomamente, de ahí que exista inestabilidad en las transformantes, es decir, no en todas las esporas formadas en los conidióforos de las transformantes está incorporado el plásmido pDHG25, esto es lo que se conoce como **Inestabilidad Mitótica** del plásmido, pues no segrega de manera proporcional en cada división mitótica del núcleo.

En las transformantes obtenidas con las cepas  $arg^-$  en este trabajo, se midió la inestabilidad mitótica del plásmido pDHG25, y los resultados se reportan como el porcentaje de esporas de una colonia transformante, que por haber incorporado al plásmido son capaces de crecer sin arginina. Esto se muestran en la tabla 5.5.

CEPA	% DE COLONIAS ARG <sup>+</sup>			PROM.
350.52	21.7	13.0	23.6	19.4
AW99ARG	5.4	30.0	14.6	16.7

**Tabla 5.5.** Muestra de inestabilidad mitótica del plásmido pDHG25 en algunas transformantes de dos cepas  $arg^-$ .

### 5.7.2 Discusiones y conclusiones

La conclusión más importante es que la cepa Aw99ARG es transformable por el plásmido pDHG25 que lleva el gene *argB* de *A. nidulans*, con lo que se tiene evidencia de que se trata de una mutante de *A. niger* afectada en el locus equivalente. En *A. niger* el gene homólogo al de *argB* de *A. nidulans*, se encuentra en el cromosoma V (Klaas y col., 1992).

Lo anterior abre la posibilidad de usar a la cepa Aw99ARG como receptora en otros trabajos de transformación usando el gene *argB* como marcador selectivo, es decir, se tiene ya un sistema de transformación para las cepas de la colección UAM-ORSTOM. También es posible usar otros plásmidos con este marcador, o bien, combinaciones de plásmidos, en experimentos de cotransformación para estudiar la expresión heteróloga de proteínas, con las ventajas que presenta *A. niger* en estos procesos (Saunders y col., 1989).

Por otro lado, se confirmó que sí es posible una cotransformación exitosa con los plásmidos pDHG25 y pJA12B, al menos usando la cepa 350.52. No se descarta un error experimental durante la cotransformación con el plásmido pJA22, pues no se obtuvo ninguna cotransformante con esta combinación.

El hecho de que no se hayan obtenido transformantes con la cepa Aw96-4ARG, coincide con los resultados de la tabla 5.3, pues esta cepa tuvo un fenotipo de crecimiento, en los medios suplementados con precursores de arginina, distinto con respecto a las otras dos cepas que sí fueron transformables.

Por otro lado, los resultados de la estabilidad mitótica del plásmido pDHG25, están muy cercanos a los valores reportados para *A. niger* (aprox. 20%) usando este mismo plásmido (Gems y col., 1991), indicando que en general el protocolo de transformación fue adecuado.

## CONSTRUCCION DE DIPLOIDES.

## 6.1 Introducción.

La formación de heterocariones balanceados permite el aislamiento de cepas diploides, que hacen posible el análisis de su progenie haploide para la asignación de mutaciones a cromosomas específicos, con lo que se completa el ciclo parasexual. Esto es lo que se pretendía hacer con nuestras cepas y la cepa maestra A731, es decir, se deseaba asignar a un cromosoma específico cada una de las mutaciones (*dgr* y de auxotrofia de arginina) que tenían las cepas seleccionadas: Aw99-iii2 y Aw96-4, sobreproductoras de pectinasas en CS y FES, respectivamente.

## 6.2 Formación de Heterocariones.

A partir de las cepas auxótrofas de arginina obtenidas en los experimentos anteriores, así como la cepa maestra A731 y la cepa 350.52, se hizo el intento de forzar el crecimiento de heterocariones entre pares de cepas. Se trabajaron 6 pares de cepas, indicadas a continuación:

A731*350.52	350.52*Aw96-4ARG
A731*Aw99ARG	350.52*Aw99ARG
A731*Aw96-4ARG	Aw99ARG*Aw96-4ARG

En las cruzas donde participó la cepa maestra A731, sólo se obtuvo un heterocarión en la cepa 350.52, esto a partir de la primera transferencia a MM del micelio con mayor probabilidad de tener hifas fusionadas de las dos cepas (Plasmogamia). Por otra parte, no fue posible obtener heterocariones entre la cepa maestra A731 y las cepas  $arg^-$  generadas en el laboratorio, aún después de repetidas transferencias a MM fresco del micelio con más probabilidad de presentar plasmogamia. Las observaciones del micelio al microscopio después de cada transferencia dejaron ver las formaciones bulbosas o micelios excesivamente ramificados, que lograban crecer pero que al cabo de poco tiempo (4 a 8 h) cesaban su crecimiento en MM.

También se intentó la formación de heterocariones a partir de la suspensión de esporas (de la cepa maestra y de alguna cepa arg<sup>-</sup>) en tubos de ensayo, como lo recomiendan Bos y col. (1988), pero tampoco se tuvo éxito, es decir, al transferir el micelio, formado por el conjunto de esporas germinadas de ambas cepas, a MM, sólo habían algunas hifas que lograban extenderse fuera del área de transferencia. En estos casos se repetía el fenómeno del cese de crecimiento luego de poco tiempo (4 a 8 h), cuando tenían una longitud aproximada de 3 mm, también se observó la morfología anormal en ellas.

Se utilizó E.L. en las cajas con MMG en cantidades de 0.005 a 0.025% como factor de ayuda para el crecimiento de los heterocariones. Previamente se había analizado el crecimiento de las cepas arg<sup>-</sup> en estos medios, viendo que el E.L. en estas concentraciones sólo permitía el crecimiento de un micelio muy ralo incapaz de esporular, las apreciaciones del crecimiento aparecen en la tabla 6.1.

CEPA	0.005	0.010	0.025
Aw99ARG	G.I.	+/-	+/-
Aw96-4ARG	G.I.	+/-	+/-
A731	--	--	G.I.

**Tabla 6.1.** Apreciación del crecimiento de las cepas de *A. niger* en MMG suplementado con E.L.(%) a las concentraciones señaladas en el renglón superior de la tabla. G.I.: Germinación incipiente; (+/-): crecimiento muy pobre sin esporulación; (--): No germinó. Las observaciones se hicieron luego de 72 h a 30°C.

Cuando algunos fragmentos de micelio de las cruces A731\*Aw99ARG o A731\*Aw96-4ARG se transferían a cajas con MMG suplementadas con E.L. a las concentraciones mencionadas, y al cabo de una semana en incubación, un micelio ralo y sin esporulación invadía la caja. Este micelio era muy probablemente de alguna de las cepas arg<sup>-</sup> que podían crecer de esa forma en esos medios, según se ve en la tabla 6.1. Para comprobar lo anterior, se transfirieron fragmentos de estos micelios a MMG pero sin E.L. No se detectó más crecimiento y en

algunos casos hubo esporulación sólo sobre el área de transferencia. Tampoco se recuperó algún diploide de estos fragmentos esporulados.

Con lo que respecta a las combinaciones de cepas 350.52\*Aw99ARG, 350.52\*Aw96-4ARG y Aw99ARG\*Aw96-4ARG, sí se obtuvieron heterocariones sanos luego de 2 o 3 transferencias sucesivas a MMG fresco, en un tiempo que varió de 4 a 10 días entre cada transferencia.

### 6.2.1 Discusiones y conclusiones.

Por los resultados anteriores, se puede concluir que las cepas arg<sup>-</sup> originadas a partir de las cepas *dgr* (Antier y col., 1993) son incompatibles con la cepa maestra A731. Es muy poco probable que la nula formación de heterocariones entre estas cepas se deba a algún problema experimental puesto que, bajo las mismas condiciones, fue posible la formación de heterocariones de estas cepas arg<sup>-</sup> con la cepa 350.52.

En lo referente a la incompatibilidad entre algunos cepas, es importante señalar que este fenómeno ha sido estudiado ampliamente en *A. nidulans*. Grindale (1963 a,b) fue el primero en detectar la presencia de incompatibilidad para formar heterocariones entre cepas de *A. nidulans*. A partir de entonces se han dividido las cepas de esta especie aisladas de la naturaleza en grupos de compatibilidad para formar heterocariones (h-c), donde todos los miembros de un grupo pueden formar heterocariones entre sí, pero no con miembros de cualquier otro grupo.

De un total de 100 cepas aisladas de *A. nidulans*, se han descubierto al menos 20 h-c, ninguno compatible entre sí. Muchos de estos grupos tienen miembros recolectados de distintas zonas geográficas de Inglaterra. Se han detectado situaciones similares en otras especies de *Aspergillus*: *A. niger*, *A. fonsecaeus*, *A. heterothallicus*, *A. terreus* y *A. versicolor* (Croft y Jinks, 1977) .

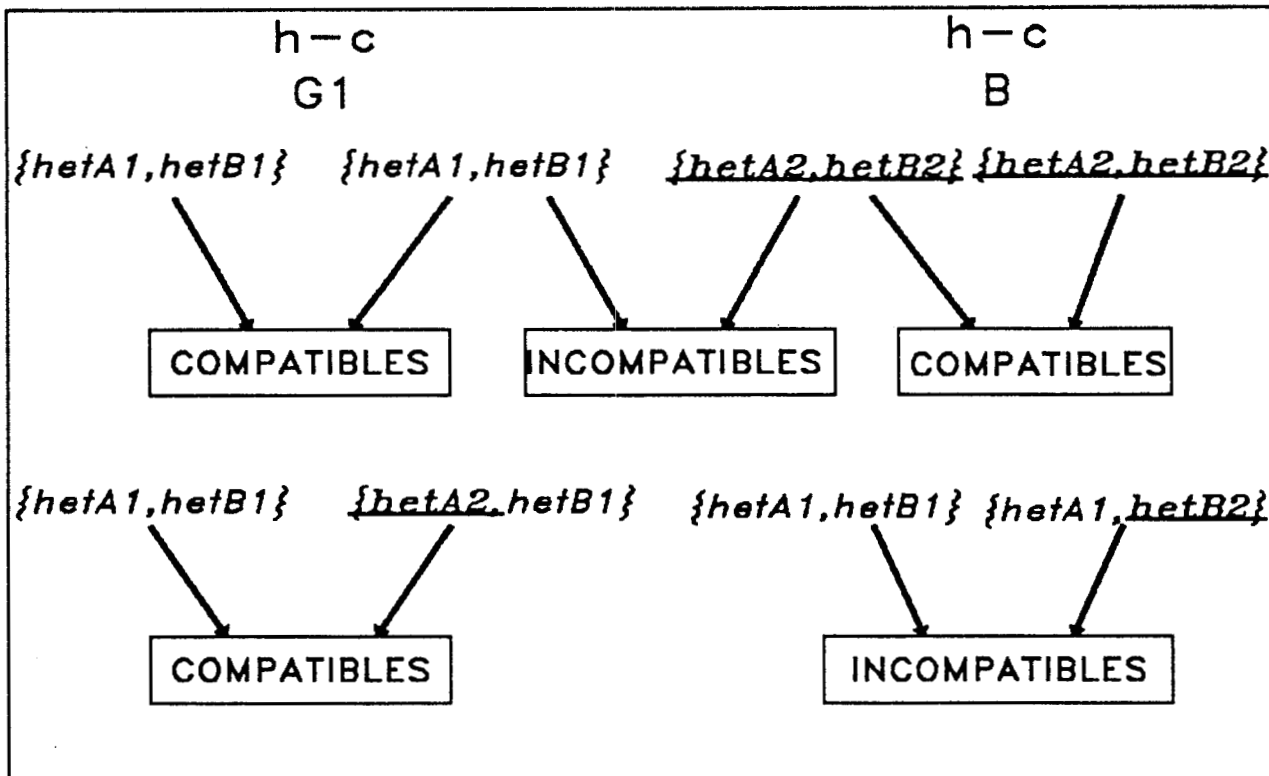


El fenómeno de incompatibilidad se ha observado además en ascomicetos como *Podospora anserina*, en donde Turq y col. (1991) detectaron 2 genes alélicos responsables de la incompatibilidad vegetativa (para formar heterocariones), pero que no son esenciales para la viabilidad de la célula. Lo anterior se comprobó mediante mutantes inducidas por interrupción de tales genes, las cuales se hacían compatibles con cepas antes incompatibles, sin perder el fenotipo silvestre.

Se ha demostrado que la incompatibilidad está bajo control nuclear, y que resulta de un estado heterocigoto para uno o más de una serie de loci het. Es decir, una sólo diferencia en un gene het puede ser suficiente para prevenir la formación de heterocariones, además entre ellos pueden actuar aditivamente en la prevención de heterocariosis en *A. nidulans* (Dales y col., 1983). La figura 6.1 esquematiza lo anterior, que podría aplicarse a las cepas incompatibles de *A. niger* encontradas en este trabajo.

Otras observaciones hechas entre miembros de un mismo grupo h-c, llevaron a la conclusión de que tienen morfologías similares y se demostró que hay una similitud intragrupo y diferencias intergrupo en cuanto a la velocidad de crecimiento radial (Grindale, 1963b), esto es similar a lo que sucede con la variación genética en la progenie de cruzas intragrupo (no hay variación genética significativa) y cruzas intergrupo (gran variación genética).

Algunas características que han mostrado diferencias significativas intergrupo (Croft y Jinks, 1977) en *A. nidulans* son: Velocidad radial, habilidad para cruzarse, producción de penicilina, producción de cordicipina, movilidad electroforética de algunas enzimas, respuesta a varios ambientes. No obstante las evidencias para algunas variaciones entre miembros del mismo grupo h-c, la conclusión que se puede tener es que todos los miembros de un mismo grupo h-c aislados de la naturaleza están clonalmente relacionados.



**Figura 6.1.** Esquema de incompatibilidad entre 2 cepas de *Aspergillus nidulans* pertenecientes a grupos distintos de compatibilidad para formar heterocariones (h-c G1 y h-c B). Se muestra que dependiendo del gene alélico de compatibilidad (*het*) que sea distinto, las dos cepas pueden ser incompatibles entre sí. Los genes *hetA* y *hetB* se hallan en los cromosomas V y VI, respectivamente (Dales y col., 1983).

La evidencia que se presenta en los trabajos mencionados lleva a la conclusión de que la población silvestre de *A. nidulans* se divide en varias subpoblaciones independientes y que cada una está relacionada clonalmente, es decir, son un grupo de cepas en las cuales la evolución puede proceder independientemente con poco intercambio genético entre ellas, esto se extiende en la naturaleza a otras especies y géneros de hongos filamentosos, como ya se mencionó. Es posible que la incompatibilidad sea importante como un mecanismo de defensa celular, al prevenir el paso de virus y otros elementos citoplasmáticos supresivos de célula a célula en la naturaleza (Lhoas, 1971).

Por lo expresado anteriormente, se puede pensar que una de las razones principales para el éxito de muchos estudios genéticos de *A. nidulans*, ha sido indudablemente el uso de cepas mutantes derivadas de una sólo cepa aislada de la naturaleza (Croft y Jinks, 1977).

Bajo estos principios se ha retomado el estudio de la genética de *A. niger*, principalmente en la Universidad de Wageningen (Países Bajos), pues se había visto que hasta años recientes la mayoría de los genes clonados de *A. niger*, no se han utilizado en análisis genéticos, entre otras razones porque las mutaciones se han inducido en cepas incompatibles con las cepas estándar disponibles para tales propósitos (Debets y col., 1990b).

Por otra parte, la formación del heterocarión a partir de la cruce 350.52\*Aw99ARG, se puede deber a que aún cuando ambas cepas están mutadas en el mismo gene, como lo sugiere la obtención de transformantes con el plásmido pDHG25, se puede dar el fenómeno de mezcla de subunidades en el heterocarión y en el diploide (Beckwith y Rossow, 1974). Otra explicación puede ser que aunque la mutación está en el mismo *locus*, tal vez en una cepa esté directamente sobre un gene regulador y en la otra cepa esté sobre el gene estructural, se puede dar esta posibilidad pues el plásmido pDHG25 también lleva secuencias de la parte regulatoria del gene *argB* (Jesús Aguirre, comunicación personal), de manera que se daría una complementación entre ambas cepas.

### **6.3 Aislamiento de diploides y haploidización.**

La figura 6.2 muestra a manera de esquema los diploides obtenidos entre las diversas cepas. La existencia de cada diploide se comprobó por dos criterios: diámetro de la espora y formación de sectores haploides, en un medio haploidizante.

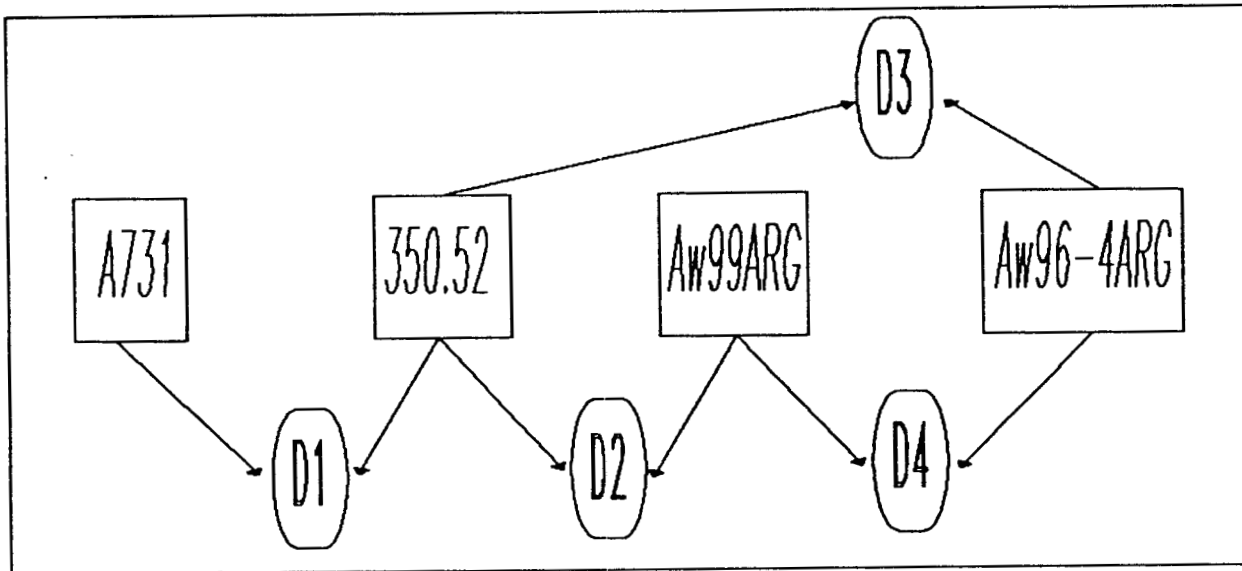


Figura 6.2. Diploides obtenidos (D1 a D4) usando las cepa indicadas.

Para el caso de los diploides obtenidos a partir de las cepas Aw99ARG y Aw96-4ARG, se observó un diámetro de espora en promedio de  $6.51 \mu\text{m} (\pm 0.34)$ , contra  $4.69 \mu\text{m} (\pm 0.22)$  para las cepas haploides. En general, todos los otros diploides tuvieron valores de diámetro de espora muy cercanos al ejemplo dado, y todos con diferencia significativa con respecto a las cepas haploides.

Como ya se detalló en el primer capítulo, la parte final del ciclo parasexual es precisamente la haploidización de los diploides obtenidos. Para ello se utilizan compuestos haploidizantes como la *p*-flouorofenilalanina (pffen) (Lhoas, 1961) o el benomil (Bos y col., 1988).

Los diploides obtenidos de las diversas cruzas se sometieron a un proceso de haploidización y se obtuvieron algunos sectores incapaces de crecer en MM, al menos que se suplementaran con arginina o con algún requerimiento de la cepa maestra. Sin embargo, aproximadamente el 50% del total de sectores, aún conservaron la capacidad de crecer en MM.

### 6.3.1 Discusiones y conclusiones.

No obstante que se presentó incompatibilidad entre algunas cepas, fue posible la formación de 4 diploides, entre los que destaca la formación del diploide D4, a partir de una cepa de la serie *dgrAw99* y otra cepa de la serie *dgrAw96* descritas por Antier y col. (1993).

Los diploides, con diámetro de espora significativamente mayores que las cepas haploides, fueron capaces de formar sectores haploides después de 5-8 días en un MC en presencia de pffen. Esto significa que basta medir el diámetro de la espora después de purificar un diploide, para dilucidar si se trata de un diploide o no, para posteriores análisis genéticos, de hecho, el diámetro de la espora es un criterio que se puede utilizar para reconocer diploides en *A. niger* (Bos y col., 1988; Nga y col., 1975).

Los sectores capaces de crecer en MM, luego de la haploidización, sugieren la presencia de merodiploides, en los que no todos los pares de cromosomas se separan entre sí. Aún cuando la pffen se ha utilizado como agente haploidizante probado con éxito en algunas cepas de *A. niger* (Lhoas, 1961; Nga y col., 1975), existen reportes en los que ha resultado más eficiente el uso de benomil como agente haploidizante, pues en las mismas cepas, la pffen ha inducido la formación de sectores con esporulación muy pobre y la presencia de merodiploides (Bos y col., 1988; Klaas y col., 1992).

### 6.4 Resistencia a la 2DG en los diploides.

Cada diploide se sometió a una prueba de resistencia a 2DG en MMP, comparando en el mismo experimento, la resistencia de las cepas haploides que lo habían formado. Los resultados mostrados son bastante reproducibles, pues se hicieron por lo menos dos corridas independientes en distintos períodos de tiempo, teniendo resultados muy parecidos entre sí para cada caso.

La figura 6.3 muestra que las cepas A731, 350.52 y su respectivo diploide D1 fueron resistentes a 2DG.

153900

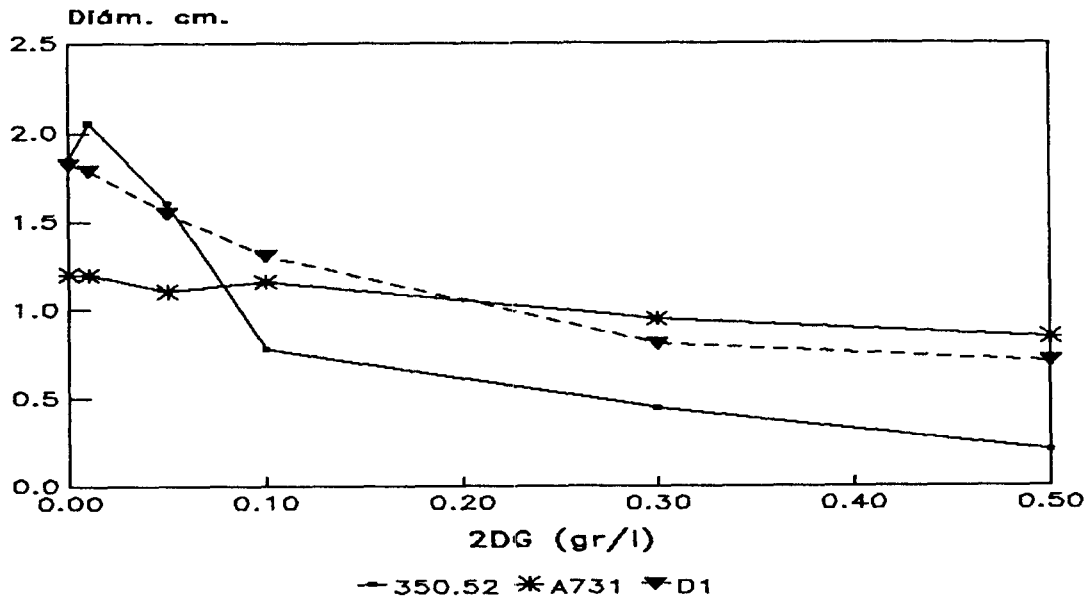


Figura 6.3. Resistencia a 2DG del diploide D1 en MMP, se muestra el perfil de cada una de las cepas haploides que lo originaron. Para esta cepas, el medio se suplementó con los requerimientos necesarios. Cada punto corresponde al promedio de dos observaciones para cada cepa.

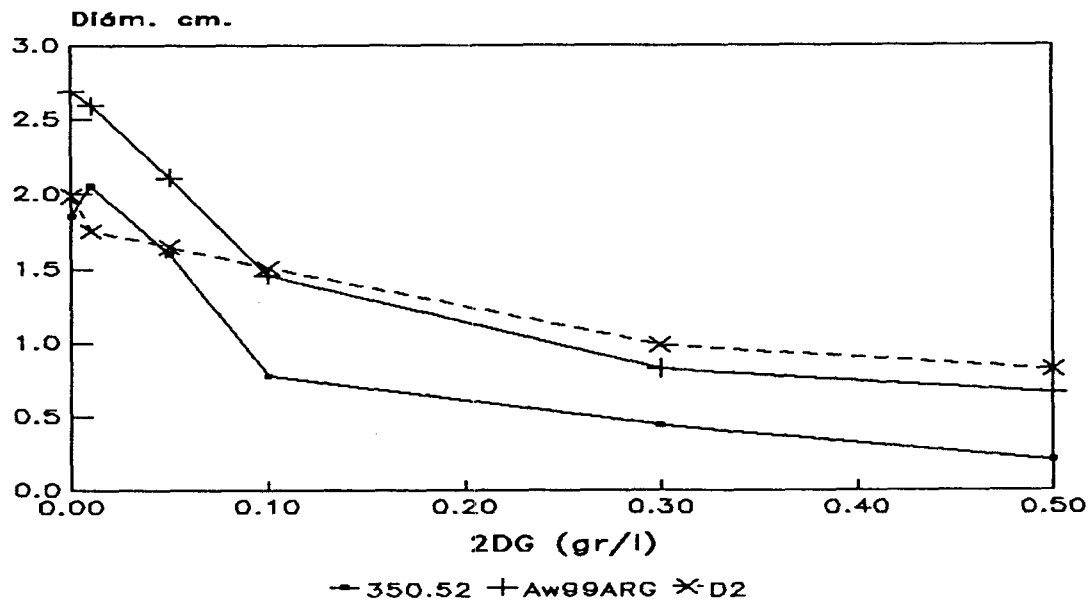


Figura 6.4. Resistencia a 2DG del diploide D2 en MMP, se muestra el perfil de cada una de las cepas haploides que lo originaron. Para esta cepas, el medio se suplementó con arginina 1.5 mM. Cada punto corresponde al promedio de dos observaciones para cada cepa.

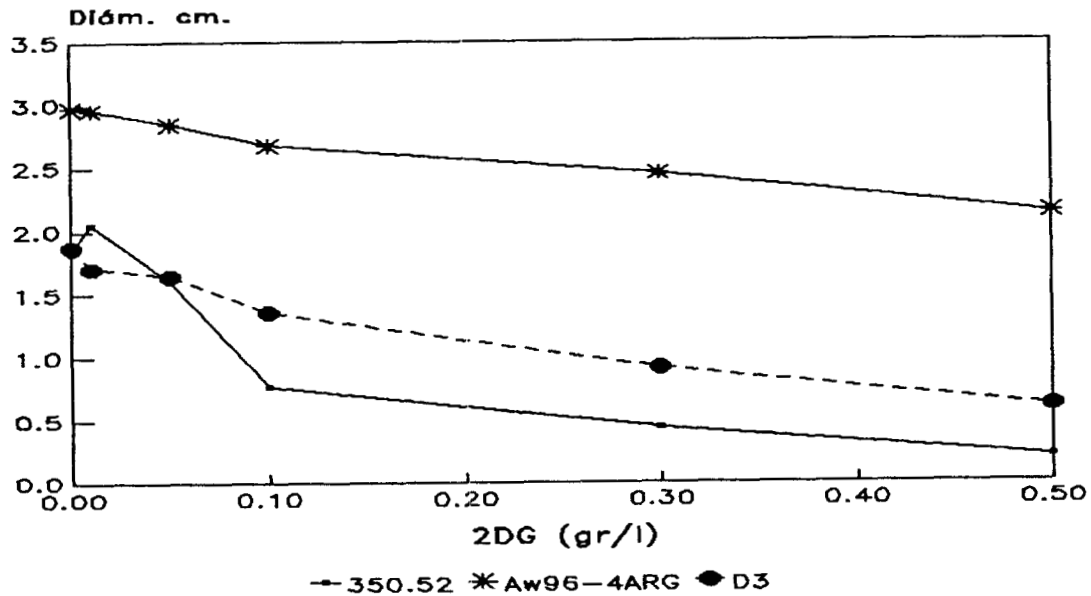


Figura 6.5. Resistencia a 2DG del diploide D3 en MMP, se muestra el perfil de cada una de las cepas haploides que lo originaron. Para esta cepas, el medio se suplementó con arginina 1.5 mM. Cada punto corresponde al promedio de dos observaciones para cada cepa.

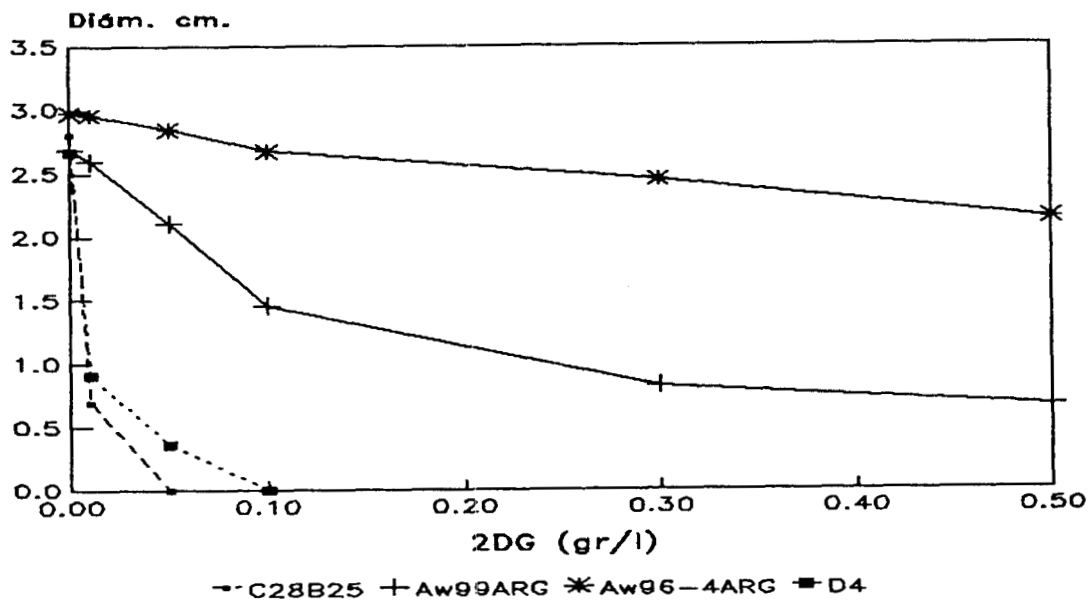


Figura 6.6. Resistencia a 2DG del diploide D4 en MMP, se muestra el perfil de cada una de las cepas haploides que lo originaron y el de la cepa silvestre C28B25. Para las cepas  $arg^-$ , el medio se suplementó con arginina 1.5 mM. Cada punto corresponde al promedio de dos observaciones para cada cepa.

En forma similar, la figura 6.4 muestra que el diploide D2 fue también resistente a 2DG, pero el perfil de resistencia fue más parecido al de la cepa Aw99ARG. La figura 6.5 muestra que el diploide D3 fue resistente y que en este caso, el carácter de resistencia de la cepa 350.52 fue dominante. En cambio, las cepas Aw99ARG y Aw96-ARG fueron resistentes a 2DG, pero su diploide D4 resultó bastante sensible, de manera muy similar a la cepa silvestre C28B25 (Figura 6.6).

#### 6.4.1 Discusiones y conclusiones.

Se puede concluir que las cepas A731 y 350.52 tienen una resistencia natural a 2DG, además el carácter de esa resistencia en la cepa A731 es dominante.

Como ya se había sugerido en resultados anteriores, fue posible probar que las cepas Aw99ARG y Aw96-4ARG están afectadas en *loci* distintos en lo que se refiere a su requerimiento de arginina, puesto que fue posible la formación del diploide D4 entre ellas, capaz de crecer en MM.

Una observación importante fue el comportamiento del diploide D4, que tuvo el fenotipo silvestre de sensibilidad a 2DG (Fig. 6.6). Por ello se pudo concluir que las cepas Aw99ARG y Aw96-4ARG tienen la resistencia a 2DG como carácter recesivo. En mutantes *dgr* de levaduras, se ha visto que esa resistencia también es recesiva (Hackel y Khan, 1978).

Como ya fue planteado por Loera y col.(1993), este comportamiento del diploide D4 sugiere que en *A. niger* hay por lo menos dos *loci* distintos involucrados en la resistencia a 2DG y que pueden estar relacionados con la desrepresión de pectinasas en estas cepas. En *Neurospora crassa* se han detectado al menos cuatro *loci* involucrados en la resistencia a 2DG en cepas en las que también se ha visto la derepresión de algunas enzimas (Allen y col., 1989).



También existe la posibilidad de que el método de selección de cepas para FES, en baja actividad de agua (serie de mutantes *dgrAw96*), propuesto por Antier y col. (1993), influya directamente sobre algún *locus* específico para conferir resistencia a 2DG en las cepas, que es distinto al *locus* afectado en el proceso de selección de cepas para CS, en alta actividad de agua (serie de mutantes *dgrAw99*). Este planteamiento también se basa en que el diploide D4 (sensible a 2DG) se formó a partir de una cepa representativa de cada serie de mutantes, siendo ambas cepas *dgr*.

**COMPARACION DEL DIPLOIDE D4 CON LAS CEPAS *dgr*.****7.1 Introducción.**

Cuando se conocieron los resultados de la resistencia a 2DG en los diploides, se pensó en comparar algunas características del diploide D4 (sensible a 2DG), con la cepa silvestre C28B25 (también sensible a 2DG) y con las cepas *dgr* de las cuales proviene: Aw96-4 y Aw99-iii2, sobreproductoras de pectinasas en fermentación en estado sólido (FES) y en cultivo sumergido (CS), respectivamente.

Una de las hipótesis que se tenían, era que si este diploide D4 tenía el fenotipo silvestre de resistencia a 2DG, entonces tendría perfiles de producción de pectinasas muy parecidos a los de la cepa silvestre C28B25 en FES y CS, sobretodo si se pensaba que la sobreproducción de pectinasas en estas cepas y la resistencia a 2DG eran fenómenos relacionados entre sí.

También se consideró la comparación de la morfología de crecimiento en caja de Petri, estudiando la respuesta de las cepas a la 2DG en el medio. Es decir, investigar si con este criterio se distinguirían fenotipos con diferencia significativa entre las cepas.

Para probar las hipótesis anteriores o considerar otras, se realizaron los experimentos cuyos resultados se detallan en este capítulo.

**7.2 Producción de poligalacturonasas.****7.2.1 Producción en FES.**

La primera comparación del diploide D4 con otras cepas fue la producción de poligalacturonasas en FES, en columnas con pulpa de café como sustrato. La figura 7.1 muestra el perfil de producción de enzima a través del tiempo, para la cepa C28B25 y el diploide D4. Se observa que para todos los puntos analizados, el diploide produce entre 40 y 50% menos actividad enzimática que la cepa C28B25. Para las dos cepas, la producción máxima en Unidades por gramo de pulpa

seca (P.S.), se alcanza a las 96 h de fermentación, con 69.5 U/g P.S. para la cepa C28B25 y 46.3 U/g P.S. para el diploide D4.

Cuando la comparación en la producción promedio de poligalacturonasas en FES se hace a las 72 h de fermentación con las demás cepas (Figura 7.2), se observa que la mayor producción, como se esperaba, es por parte de la cepa Aw96-4 con 113 U/g P.S. La cepa C28B25 tuvo una producción de 63.1 U/g P.S. y , por su parte la cepa Aw99-iii2 sólo produjo en promedio 46 U/g P.S., mientras que el diploide D4 tuvo una producción de 34 U/g P.S. Por otro lado, la cepa auxótrofa Aw99ARG (originada a partir de la cepa Aw99-iii2) tuvo una producción de sólo 13.4 U/g P.S. La otra cepa auxótrofa, cepa Aw96-4ARG (originada a partir de la cepa Aw96-4), tuvo una producción de 14 U/g P.S., considerablemente menor al valor obtenido por el diploide D4, lo que era de esperarse pues la pulpa de café no se suplementó con arginina.

### 7.2.2 Producción en CS.

Cuando se realizó el experimento para comparar la producción de poligalacturonasas en CS, como Unidades por gramo de biomasa seca (B.S.), del diploide D4, la cepa silvestre C28B25 y las otras cepas, se obtuvieron los resultados que se exponen a continuación.

En la figura 7.3 aparece la producción promedio de poligalacturonasas a través del tiempo, para la cepa silvestre C28B25 y para el diploide D4. En contraste con lo observado en FES, el diploide tiene una producción mayor en todos los tiempos, observándose una producción máxima a las 72 h. Precisamente en este punto, la producción del diploide es superior en 122% a la de la cepa silvestre.

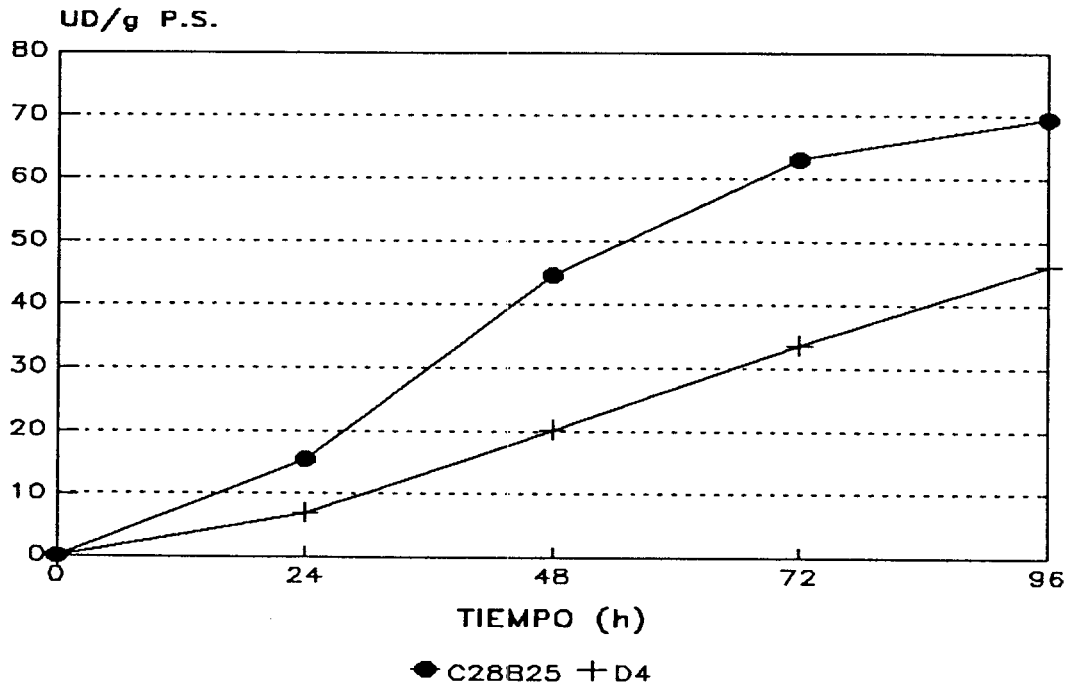


Figura 7.1. Curvas de producción de poligalacturonasas por fermentación en estado sólido sobre pulpa de café (FES), a través del tiempo, para la cepa silvestre C28B25 y el diploide D4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

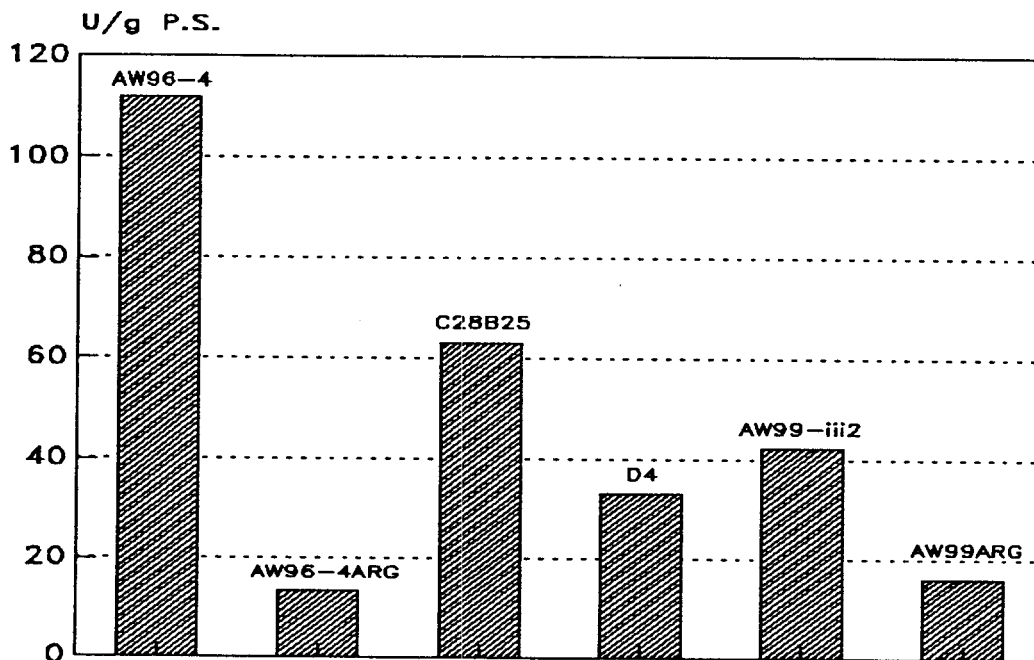


Figura 7.2. Producción de poligalacturonasas a las 72 h de cultivo por FES entre las cepas estudiadas.

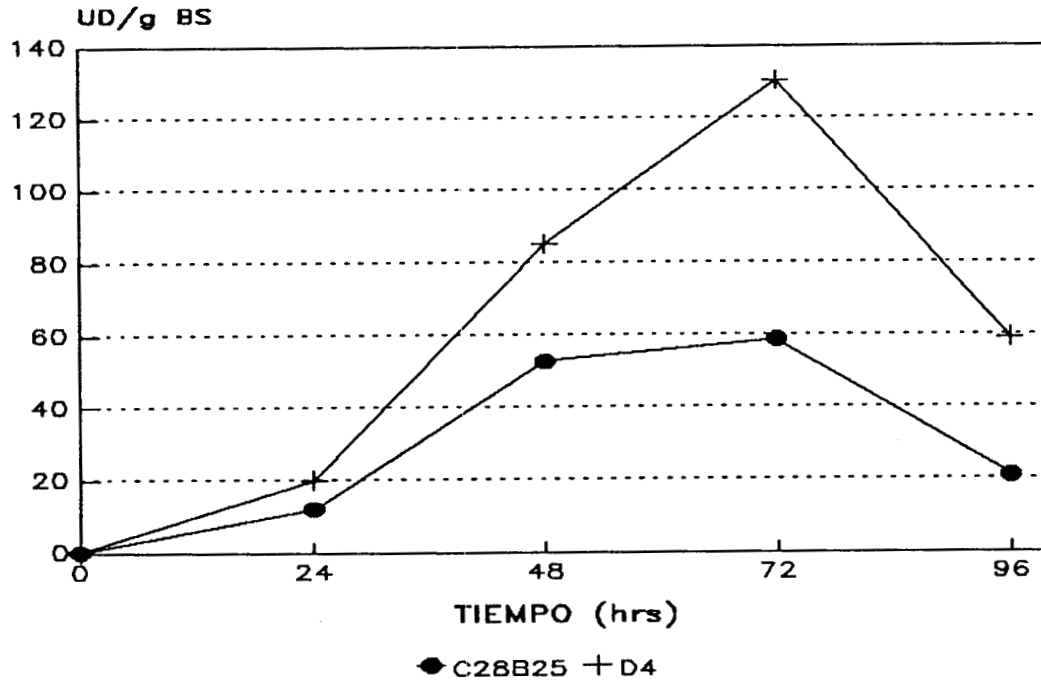


Figura 7.3. Curvas de producción de poligalacturonasas en cultivo sumergido (CS) en MMP, a través del tiempo, para la cepa silvestre C28B25 y el diploide D4. Cada punto corresponde al promedio de dos determinaciones.

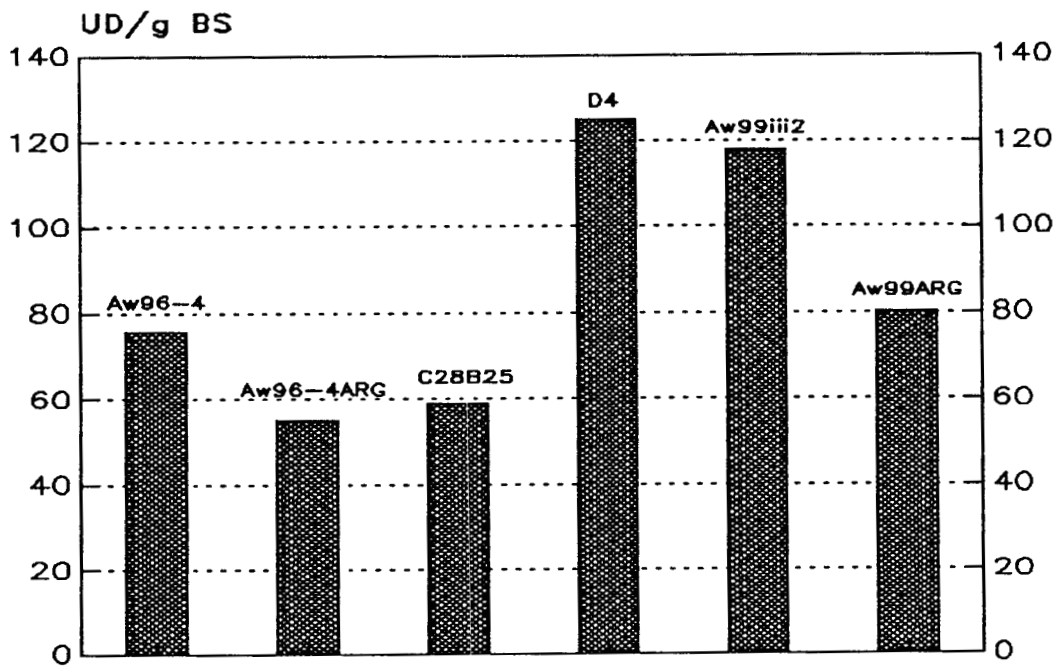


Figura 7.4. Producción de poligalacturonasas a las 72 h de cultivo en CS entre las cepas estudiadas.

Cuando la comparación con las otras cepas se realizó a las 72 h, se tuvieron los resultados que se muestran en la figura 7.4. La producción máxima la tuvo el diploide D4 con 130.4 U/g B.S., seguido por la cepa Aw99-iii2 con 120 U/g B.S., esta cepa había sido caracterizada por Antier y col. (1993), como la de mejor producción de pectinasas en CS. La cepa silvestre C28B25 tuvo una producción de 58.8 U/g B.S., y la cepa Aw96-4, 75.71 U/g B.S. Por su parte, para las cepas  $arg^-$ , el MMP se suplementó con arginina 1.5 mM, y la producción promedio de poligalacturonasas fue de 80.44 y 55.19 U/g B.S. para las cepas Aw99ARG y Aw96-4ARG, respectivamente.

### 7.2.3 Discusiones y conclusiones.

Una conclusión que se obtiene de los resultados anteriores, es que el diploide D4 tiene un fenotipo semejante al de la cepa Aw99-iii2, sobreproductora de poligalacturonasas CS (Fig.7.2). Por otro lado, en FES, el diploide tuvo una producción aún menor a la de la cepa Aw99-iii2 (Fig. 7.2). La producción del diploide en FES fue considerablemente mayor (34 U/g P.S. contra 14 U/g P.S.) a la de las cepas  $arg^-$  que lo formaron.

Puede pensarse que la baja actividad de poligalacturonasa en FES, de las cepas  $arg^-$ , es debida a la escasa arginina libre en la pulpa de café, pues el diploide D4 (capaz de crecer en MM) pudo desarrollar un micelio y esporuló mejor que las cepas  $arg^-$ . En CS, medio MMP suplementado con arginina 1.5 mM, estas cepas produjeron cantidades de enzima más cercanas a las de las cepas *dgr* de las cuales provienen. Sin embargo, tanto en FES como en CS, la producción registrada de las cepas  $arg^-$  (Aw99ARG y Aw96-4) fue menor que la de las cepas Aw99-iii2 y Aw96-4 (fig. 7.4), además la biomasa producida también fue menor, pues la cepa Aw99-iii2 a las 72 h produjo en promedio 0.175 g B.S. contra 0.14 de su respectiva mutante  $arg^-$  (Aw99ARG). La cepa Aw96-4 en promedio produjo 0.197 g B.S. y su respectiva mutante  $arg^-$  (Aw96-4-ARG), 0.151 g B.S.

Una estrategia para incrementar la producción de metabolitos entre cepas productoras, es por medio de cruza, o bien, a través de la construcción de diploides entre ellas (Ball, 1983). Sin embargo, la construcción de diploides puede no dar resultados satisfactorios, e incluso pueden disminuir los niveles de producción, con respecto a las cepas originales.

En los experimentos anteriores se vió que el diploide D4 tuvo en promedio un nivel un poco mayor de producción de poligalacturonasas en CS, con respecto a la cepa mejor productora en CS (Aw99-iii2) de la colección originada por Antier y col. (1993). Aunque este incremento no es muy notable, se puede plantear una alternativa para mejorar la producción de cepas, a través de la construcción de diploides entre dos de las mejores cepas de la serie *dgr*Aw99, y por otro lado, partir de dos de las mejores cepas de la serie *dgr*Aw96. Los diploides así obtenidos tendrían probabilidades de mejorar la producción de enzima en CS o en FES, con respecto a las cepas originales, según el antecedente del diploide D4.

Otra conclusión de los experimentos anteriores es que la resistencia a 2DG no necesariamente está relacionada directamente con la mayor producción de enzimas, pues el diploide D4 que es sensible a 2DG, tuvo niveles de producción ligeramente mayores a los de la cepa Aw99-iii2 (*dgr*) en CS. Además existe el antecedente de la cepa Aw96-3, que a pesar de haber sido aislada como *dgr* revirtió al fenotipo silvestre de sensibilidad a 2DG, sin perder su capacidad para sobreproducir enzimas pectinolíticas en FES. De hecho, esta cepa es la mejor productora de pectinasas en FES (Antier y col., 1993).

### 7.3 Morfología de crecimiento.

La respuesta de algunas cepas *dgr* en el medio puede observarse a través de parámetros de crecimiento (Viniegra-González y col., 1993b; Loera y col., 1994a), o bien, a través de la aplicación de modelos sobre estos parámetros (Viniegra-González y col., 1993a; González-Blanco y col., 1993; Larralde-Corona y col., 1994), con los

cuales se calcula la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) directamente en caja de Petri.

Para las cepas estudiadas, incluyendo el diploide D4, el valor de  $\mu$  se estimó por medio de la expresión propuesta por Larralde-Corona y col., (1994):

$$\mu = \ln 2 \ \phi_S$$

Siendo  $\phi_S$  la frecuencia de ramificación del micelio, estimada como:

$$\phi_S = V_r / [L_c \ln(L_c/L_o)]$$

donde  $L_c$  es la longitud crítica de una hifa antes de ramificar ( $L_c = 2.5L_o$ ) y  $L_o$  es la longitud promedio de las hifas terminales que se obtiene midiendo directamente en la periferia de la colonia en cuestión, a través del procesador de imágenes. Los valores obtenidos de  $V_r$  y  $L_o$  se dan en las tablas 7.1 y 7.2, al final del capítulo.

A partir de los valores de  $\mu$  obtenidos, se pudieron construir gráficas en las que se coloca a cada cepa en un punto del plano, donde las coordenadas en los ejes corresponden a los valores de  $\mu$  en un medio determinado con alta actividad de agua ( $A_w = 0.99$ ) para las abscisas, y el mismo medio pero con actividad de agua baja ( $A_w = 0.955$ ) para las ordenadas.

Una vez que se determina el punto del promedio para situar una cepa en el plano, se construyen elipses cuyos ejes corresponden a las desviaciones estándar en uno y otro medio. Los valores de  $\mu$  para las abscisas, se presentan como porcentajes en relación a la  $\mu$  máxima alcanzada por una cepa entre todos los medios con  $A_w = 0.99$ , y para las ordenadas, en relación a la  $\mu$  máxima alcanzada por una cepa entre todos los medios con  $A_w = 0.955$ .

La figura 7.5 muestra la gráfica que se obtiene al situar a las cepas estudiadas en el plano de los medios sin 2DG. Se observa que la cepa con crecimiento más acelerado en  $A_w = 0.99$  es la C28B25, y que el diploide D4 es el que crece más rápido en  $A_w = 0.955$ , además se



observa que, con excepción de las cepas Aw96-3 y Aw96-4, todas se pueden discriminar entre sí.

La figura 7.6 muestra la distribución de las cepas en el plano de los medios con 2DG a una concentración de 0.01 g/l. Como era de esperarse, las cepas sensibles a 2DG (C28B25, Aw96-3, D4), no se mueven más allá del origen sobre el eje de las abscisas. Sin embargo, son cepas que pudieron resistir la presencia del análogo a esta concentración en un medio con baja Aw, por lo que aparecen sobre el eje de las ordenadas los valores de  $\mu$  respectivos. Ninguna de las cepas sensibles se pudo discriminar entre sí, pero las cepas resistentes sí se lograron discriminar entre sí, es decir, son cepas que se pueden reconocer como diferentes significativamente. Por otro lado, las cepas resistentes respondieron a la 2DG incrementando su  $\mu$ , con respecto al medio sin 2DG (Fig. 7.5).

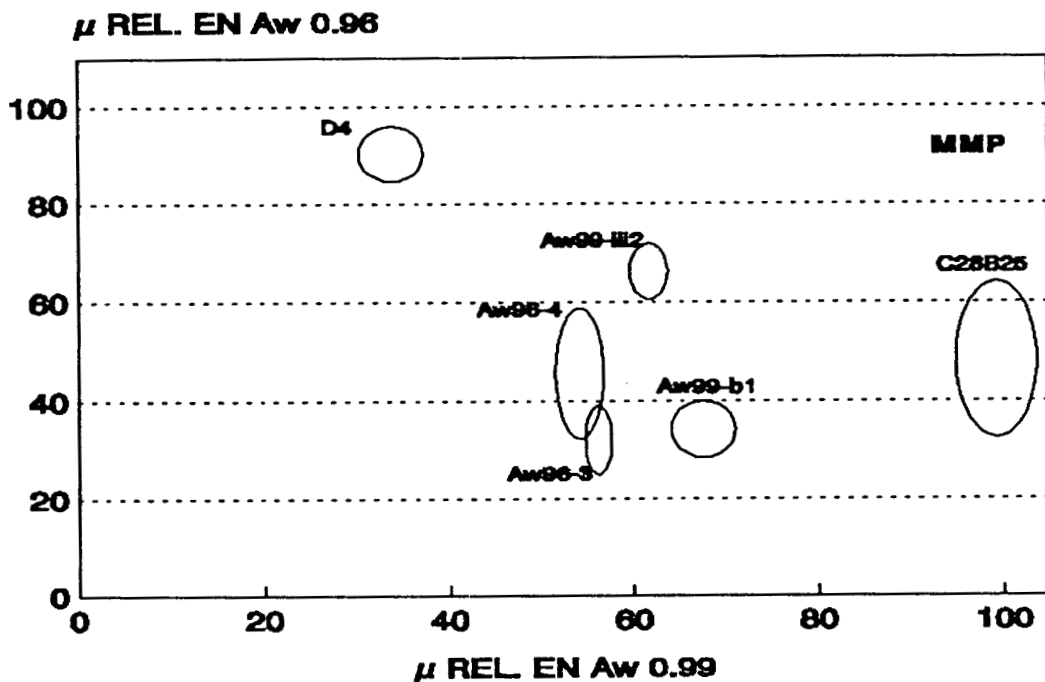


Figura 7.5. Distribución de las cepas de *A. niger* en el plano formado por los medios MMP sin 2DG.

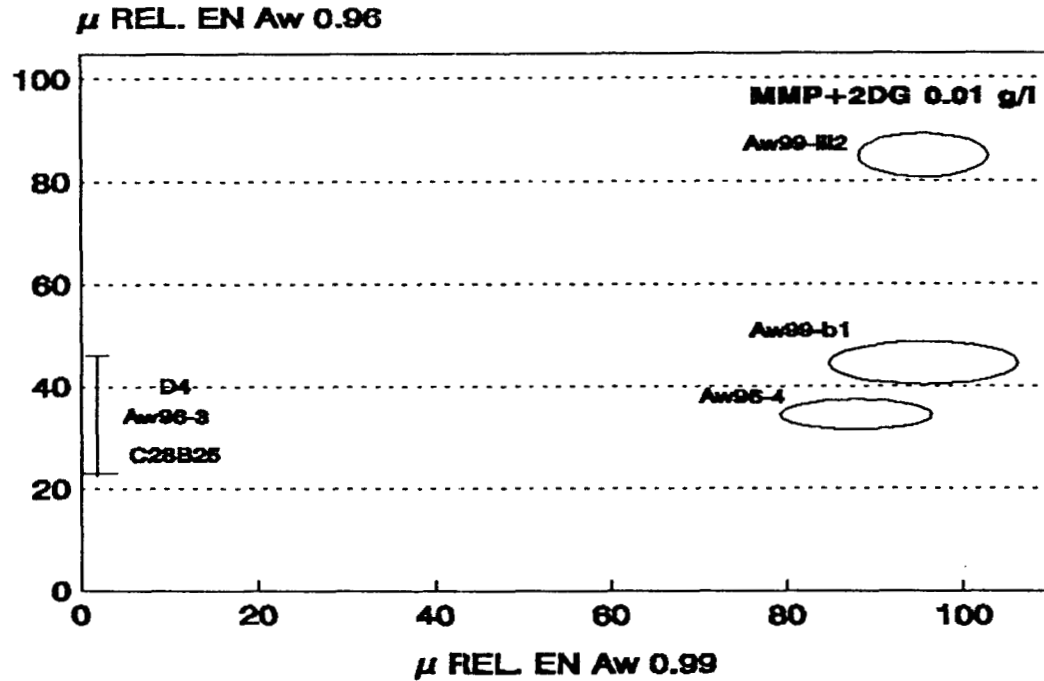


Figura 7.6. Distribución de las cepas de *A. niger* en el plano formado por los medios MMP con 2DG a concentración de 0.01 g/l.

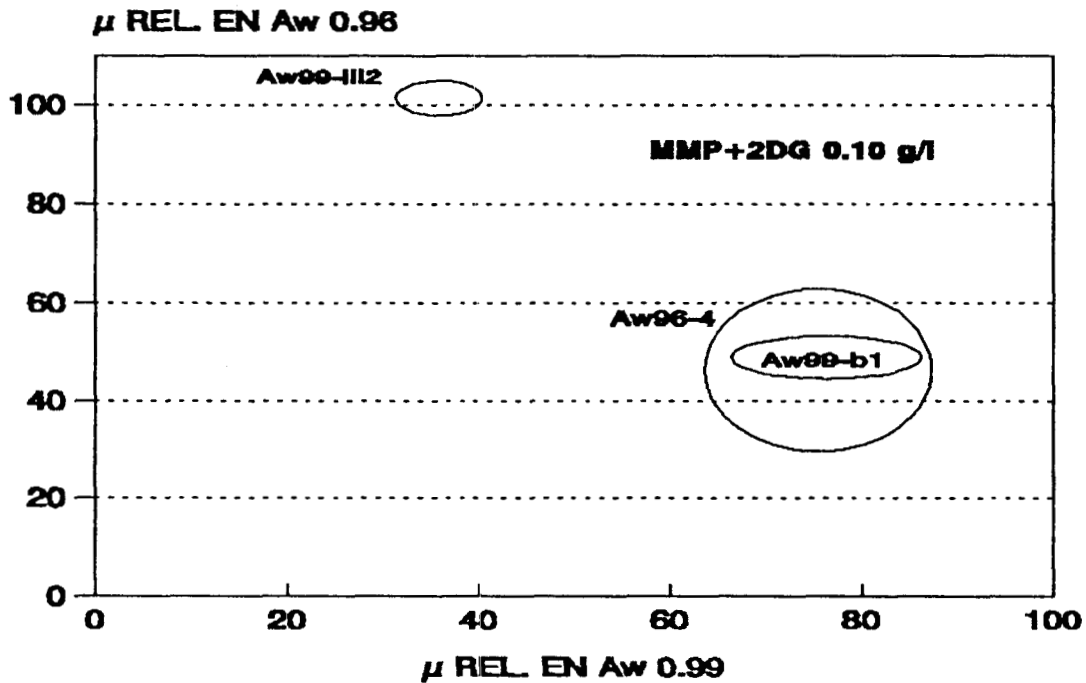


Figura 7.7. Distribución de las cepas de *A. niger* en el plano formado por los medios MMP con 2DG a concentración de 0.10 g/l.

Cuando la concentración de 2DG se elevó a 0.1 g/l, la cepa Aw99-iii2 fue la que tuvo el valor más alto de  $\mu$ , en relación a todos los valores obtenidos entre las cepas en los medios con  $A_w=0.955$  (Fig. 7.7): Con esta concentración de 2DG las cepas C28B25, Aw96-3 y el diploide D4, no crecieron en ningún medio.

### 7.3.1 Discusiones y conclusiones.

Con respecto a la morfología de crecimiento y respuesta a 2DG en caja de Petri, el diploide D4 no parece tener el fenotipo de la cepa silvestre C28B25, que también es sensible a 2DG, o algún fenotipo dominante de cualquiera de las dos cepas seleccionadas (Aw99-iii2 y Aw96-4) para construir los auxótrofos que le dieron origen.

Según la Fig. 7.5, no se encontró una relación directa entre la velocidad de producción de biomasa de las cepas en un medio con  $A_w=0.955$  y la producción de pectinasas en medio sólido, al mismo valor de  $A_w$  (Fig. 7.2).

A través de esta serie de gráficas (Figs. 7.5-7.7), se puede distinguir que las seis cepas estudiadas tienen fenotipos distintos y que la manera de responder a la 2DG depende de cada cepa y sus posibles mecanismos de resistencia. Como ya se ha mencionado, la 2DG debe su toxicidad a la acumulación intracelular de la 2DG-6-fosfato, y los mecanismos de resistencia en levaduras y hongos filamentosos pueden ser de al menos tres tipos. El primero se refiere a la inducción de fosfatasa específica para 2DG-6-fosfato, que previene su acumulación. Este tipo de fosfatasa se ha encontrado en cepas silvestres de levadura, pero sus niveles son de 10 a 20 veces menores que los que se encuentran en mutantes *dgr* (Martin y Heredia, 1977). El segundo tipo de resistencia se puede deber a algún defecto en las glucosinasa o hexocinasa, dificultando la fosforilación de la 2DG (Lobo y Maitre, 1977). Por último, puede haber resistencia debido a defectos en el sistema de transporte de la glucosa, que es el mismo que utiliza la 2DG para entrar a la célula (Moore y Devadatham, 1979).

Una manera de responder a la presencia de concentraciones bajas de 2DG en el medio, de parte de las cepas *dgr* es incrementar su  $\mu$ , probablemente para que se de un efecto de dilución (Fig. 7.5 y 7.6). En otras palabras, para evitar la acumulación de 2DG-6-fosfato (forma tóxica en las células), se acelera el metabolismo para que haya más sustrato (Glucosa disponible) en relación a la 2DG que entra a la célula. Este fenómeno ya se había sugerido en el punto 4.3.1, donde se discutió sobre el aumento en la  $V_r$  de las cepas *dgr*, como respuesta a la 2DG en el medio.

En un medio con  $A_w=0.955$ , las cepas sensibles a 2DG (C28B25, Aw96-3 y D4) resistieron la presencia del análogo a una concentración de 0.01 g/l, letal para estas cepas en el mismo medio, pero con  $A_w=0.99$  (Fig 7.6). Esta resistencia a 2DG a baja actividad de agua se puede deber a que el metabolismo de las cepas en esas condiciones es distinto al que se presenta en medios con alta actividad de agua (Gervais y col., 1988). Además cuando se consideran los medio con baja actividad de agua, las cepas *dgr* (Aw99-iii2, Aw99-b1 y Aw96-4), incrementan su  $\mu$ , debido a concentraciones de 2DG en el medio (probable efecto de dilución), sólo hasta la concentración de 2DG de 0.10 g/l (Fig. 7.7). En otras palabras, estas cepas *dgr* también requieren de mayores concentraciones de 2DG para que se manifieste una respuesta al análogo, en medios con baja actividad de agua.

Vr	A <sub>w</sub> =0.99			A <sub>w</sub> =0.955			
	CEPA	0 DG	0.01 DG	0.10 DG	0 DG	0.01 DG	0.10 DG
C28B25		281 ± 25	0	0	20.4±3.4	15.7±1.5	0
Aw99-b1		247 ± 10	263 ± 8	255 ± 28	16.9±0.6	16.7±0.7	17.5±1.2
Aw99-iii2		208 ± 36	236 ± 5	146 ± 13	14.8±4.7	14.6±5.6	22 ±1.62
Aw96-3		264 ± 29	0	0	17 ± 0.9	14.5±1.1	0
Aw96-4		201 ± 3	263 ± 22	246 ± 17	16.7±2.9	14.5±0.2	19.3 ± 6
D4		267 ± 11	0	0	38 ± 5	18.1±1.3	0

Tabla 7.1. Valores promedio de Vr obtenidos para las cepas en MMP con 3 niveles de 2DG (0, 0.01 y 0.10 g/l) y con 2 niveles de A<sub>w</sub> (0.99 y 0.955).

L <sub>O</sub>	A <sub>w</sub> =0.99			A <sub>w</sub> =0.955			
	CEPA	0 DG	0.01 DG	0.10 DG	0 DG	0.01 DG	0.10 DG
C28B25		79.4±3.9	0	0	102±22.6	154±2.8	0
Aw99-b1		98.7±0.9	79 ± 6.2	91.7±5	116.3±14	102±7.7	108±13.6
Aw99-iii2		92.5±6.7	72.3± 7	108±16	57±12.4	51±12.4	68.7±4.3
Aw96-3		124.5±16	0	0	93.6±22	113.5±21	0
Aw96-4		96.9±0.8	83.9±4.3	90.6±10	122±4.9	115±8.7	130±24.5
D4		184±18.8	0	0	93±15.2	99±12.5	0

Tabla 7.2. Valores promedio de L<sub>O</sub> obtenidos para las cepas en MMP con 3 niveles de 2DG (0, 0.01 y 0.10 g/l) y con 2 niveles de A<sub>w</sub> (0.99 y 0.955).

## CONCLUSIONES Y DISCUSIONES GENERALES.

La desrepresión y sobreproducción de pectinasas en estas cepas, no parecen estar relacionadas con la desrepresión catabólica debida a mutaciones *creA* (Fig. 4.1).

La resistencia a 2DG no se afectó en forma significativa en las cepas, después de inducir la mutación que las hizo auxótrofas de arginina (Fig. 5.3).

Fue posible obtener transformantes de la cepa Aw99ARG usando el plásmido de replicación autónoma pDHG25 que lleva el gene *argB* de *A. nidulans* (Gems y col., 1991), con lo que se tiene evidencia de que se trata de una mutante de *A. niger* afectada en el *locus* equivalente.

Se detectaron problemas de incompatibilidad para formar heterocariones entre nuestras cepas y la cepa maestra A731. Este tipo de problema se ha detectado en otras cepas de *A. niger*, donde se han inducido mutaciones que no se han podido asignar a cromosomas, lo que ha sido un obstáculo en el avance de la genética de *A. niger* (Debets y col., 1989).

Fue posible probar que las cepas Aw99ARG y Aw96-4ARG están afectadas en *loci* distintos en lo que se refiere a su requerimiento de arginina, puesto que fue posible la formación del diploide D4 entre ellas, capaz de crecer en MM (Fig. 6.6). Con esto se tienen 2 nuevas cepas con marcadores genéticos distintos.

El diploide D4 tuvo el fenotipo silvestre de sensibilidad a 2DG (Fig.6.6). Por ello se pudo concluir que las cepas *dgr* probadas tienen la resistencia a 2DG como carácter recesivo. En mutantes *dgr* de levaduras, se ha visto que esta resistencia también es recesiva (Hackel y Khan, 1978).

Como ya fue planteado por Loera y col.(1993, 1994b), el comportamiento del diploide D4 sugiere que en *A. niger* hay por lo menos dos *loci* distintos involucrados en la resistencia a 2DG. En

*Neurospora crassa* se han detectado al menos cuatro *loci* involucrados en la resistencia a 2DG y se ha visto que esas cepas *dgr* también tienen desreprimidas algunas enzimas (Allen y col., 1989).

También existe la posibilidad de que el método de selección de cepas para FES, en baja actividad de agua (serie de mutantes *dgrAw96*), propuesto por Antier y col. (1993), influya directamente sobre algún *locus* específico para conferir resistencia a 2DG en las cepas, que es distinto al *locus* afectado en el proceso de selección de cepas para CS, en alta actividad de agua (serie de mutantes *dgrAw99*). Este planteamiento se basa en que el diploide D4 (sensible a 2DG) se formó a partir de una cepa representativa de cada serie de mutantes, siendo ambas cepas *dgr*.

Sin embargo, si se quiere probar la selectividad del método, se podrían construir diploides entre pares de cepas de una serie de mutantes, y entre pares de cepas de la otra serie de mutantes, para ver si se trata de los mismos grupos de complementación en cada serie. También se podría ver si siempre existe complementación entre mutantes de una y otra serie, esto es, diploides con fenotipo de sensibilidad a 2DG, como el diploide D4.

El diploide D4, sensible a 2DG, tuvo un fenotipo de sobreproducción de poligalacturonasas en CS (Fig. 7.4), incluso su producción fue ligeramente mayor a la de la cepa *Aw99-iii2*, resistente a 2DG y caracterizada por Antier y col. (1993) como la mejor productora de pectinasas en CS. Aunque este incremento en la producción de poligalacturonasas por parte del diploide D4 no es muy notable, se puede plantear una alternativa para mejorar la producción de cepas, a través de la construcción de diploides entre dos de las mejores cepas de la serie *dgrAw99*, y por otro lado, a partir de dos de las mejores cepas de la serie *dgrAw96*. Los diploides así obtenidos tendrían probabilidades de mejorar la producción de enzima en CS o en FES, con respecto a las cepas originales.

Se debe tomar en cuenta que la construcción de diploides puede no dar resultados satisfactorios, e incluso disminuir los niveles de producción, con respecto a las cepas originales (Ball, 1983). Sin

embargo, para el caso de nuestras cepas se tiene un buen antecedente con el diploide D4.

Otra conclusión es que la resistencia a 2DG no necesariamente está relacionada directamente con la mayor producción de enzimas, pues el diploide D4 es sensible a 2DG y sobreproduce poligalacturonasas en CS, hasta 122% más que la cepa silvestre C28B25, también sensible a 2DG. Además existe el antecedente de la cepa Aw96-3, que a pesar de haber sido aislada como *dgr* revirtió al fenotipo silvestre, sin perder su capacidad para sobreproducir pectinasas en FES. De hecho, esta cepa es la mejor productora de pectinasas en FES (Antier y col., 1993).

Con respecto a la morfología de crecimiento y respuesta a 2DG en caja de Petri, el diploide D4 no parece tener el fenotipo de la cepa silvestre C28B25, también sensible a 2DG, o algún fenotipo dominante de cualquiera de las dos cepas seleccionadas (Aw99-iii2 y Aw96-4) para construir los auxótrofos que le dieron origen. De hecho, la manera de responder a la 2DG depende de cada cepa y sus posibles mecanismos de resistencia.

A través de la última serie de gráficas (Figs. 7.5-7.7), se puede distinguir que las seis cepas estudiadas son distintas significativamente, en lo que se refiere a la morfología de crecimiento. Con lo que se puede proponer el estudio de la respuesta morfológica a la presencia de algunos compuestos (como la 2DG), como metodología para distinguir unas cepas de otras (Loera y col., 1994a; Viniegra-González y col., 1993b).

No se encontró una relación directa entre la velocidad de producción de biomasa de las cepas en un medio con pectina y  $A_w=0.96$  (Fig 7.5), y la producción de pectinasas en medio sólido, al mismo valor de  $A_w$  (Fig. 7.2).



## B I B L I O G R A F I A.

- Aguirre J, Adams TH, Timberlake WE. (1990) Spatial control of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans*. *Exp Mycol* 14(3): 290-293.
- Alexopoulos CJ, Mims CW. (1979) *Introductory Mycology*, 3rd. Ed. John Wiley & Sons. USA. Pp 5, 28-31, 541-544.
- Allen KE, McNally MT, Lowendorf HS, Slayman CW, Free SJ. (1989) Deoxyglucose-Resistant mutants of *Neurospora crassa*: Isolation, Mapping and Biochemical Characterization. *J Bacteriol* 171: 53-58.
- Antier P, Minjares A, Roussos S, Raimbault M, Viniegra-González G. (1993) Pectinases hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb Technol* 15: 254-260.
- Archer DB, Roberts IN, MacKenzie DA. (1990) Heterologous protein secretion from *Aspergillus niger* in phosphate-buffered batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 34: 313-315.
- Bailey C, Arst HN. (1975) Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem* 51: 573-577.
- Ball C. (1983) Filamentous Fungi. In C. Ball (Ed), *Genetics and breeding of industrial microorganisms*. CRC Press, Inc. Florida. Pp 159-188.
- Beckwith J, Rossow P. (1974) Analysis of genetic regulatory mechanisms. *Ann Rev Genet* 8: 1-13.
- Bos CJ, Debets JM, Nachtegaal H, Slakhorst SM, Swart K. (1992) Isolation of auxotrophic mutants of *Aspergillus niger* by filtration enrichment and lytic enzymes. *Curr Genet* 21: 117-120.
- Bos CJ, Debets JM, Swart K, Huybers A, Kobus G, Slakhorst SM. (1988) Genetic analysis and the construction of master strains for assignment to six linkage group in *Aspergillus niger*. *Curr Genet* 14: 437-443.
- Bos CJ, Slakhorst SM, Debets AJM, Swart K. (1993) Linkage group analysis in *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 742-745.
- Bos CJ. (1987) Induction and isolation of mutants in fungi at low mutagen doses. *Curr Genet* 12: 471-474.
- Brawman JW. (1981) Application of enzymes in fruit juice technology. In Birch GG, Blakerbrough N, Baker JR (Eds), *Enzyme and Food Processing*. Applied Science Publishers, London. Pp: 129-147.

- Brock TD, Smith DW, Madigan MT. (1991) *Microbiología*, 4a. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, México. Pp: 86-95.
- Bussnik HJD, van den Homberg JPTW, van den Ijssel, Visser J. (1992) Characterization of polygalacturonase-overproducing *Aspergillus niger* transformants. *Appl Microbial Biotechnol* 37: 324-329.
- Buxton FP, Gwynne DI, Davies RW. (1989) Cloning of a new bidirectionally secretable marker for *Aspergillus* strain. *Gene* (Amsterdam) 84: 329-334.
- Buxton FP, Gwynne DI, Davis RW. (1985) Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 37: 207-214.
- Clark G. (1981) Fixing Fluids. In: *Staining Procedures*. 4<sup>th</sup> Edition. Williams & Wilkins. Baltimore, MD 21202, USA. P 16.
- Croft JH, Jinks JL. (1977) Aspects of the population genetics of *Aspergillus nidulans*. In JM Smith & JA Pateman (Eds), *Genetics and Physiology of Aspergillus*. Academic Press, London. Pp 339-360.
- Dales RB, Croft JH. (1990) Investigation of the *het* genes that control heterokaryon incompatibility between members of heterokaryon-compatibility (h-c) groups A and G1 of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 136: 1717-1724.
- Dales RB, Moorehouse J, Croft JH. (1983) The location and analysis of two heterokaryon incompatibility (*het*) loci in strains of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 129: 3637-3642.
- Davies RW. (1991) Expression of heterologous genes in filamentous fungi. In Peberdy JF, Caten CE, Ogden JE, Bennett JW (Eds), *Applied Molecular Genetics of Fungi*. University Press, Cambridge. Pp 103-117.
- Dean RA, Timberlake WE. (1989) Production of cell wall-degrading enzymes by *Aspergillus nidulans*: A model system for fungal pathogenesis of plants. *Plant Cell* 1: 265-273.
- Debets AJM, Holub EF, Swart K, van den Broek HWJ, Bos CJ. (1990b) An electrophoretic karyotype of *Aspergillus niger*. *Mol Gen Genet* 224: 264-268.
- Debets AJM, Swart K, Bos CJ. (1989) Mitotic mapping in linkage group V of *Aspergillus niger* based on selection of auxotrophic recombinants by Novozym enrichment. *Can J Microbiol* 35: 982-988.
- Debets AJM, Swart K, Bos CJ. (1990a) Genetic analysis of *Aspergillus niger*: isolation of chlorate resistant mutants, their use in mitotic mapping and evidence for an eighth linkage group. *Mol Gen Genet* 221: 453-458.

- Drysdale M, Kolze S, Kelly J. (1993) The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. *Gene* 130: 241-245.
- Espeso E, Tilburn J, Arst H, Peñalva M. (1993) pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J* 12: 3947-3956.
- Galindo E, Bolívar F, Quintero F. (1990) Maximizing the expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* by manipulation of culture conditions. *J Ferment Bioengineer* 69(3): 159-165.
- Gems D, Johnstone I, Clutterbuck J. (1991) An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at a high frequency. *Gene* 98: 61-67.
- Gervais P, Molin P, Grajek W, Bensoussan M. (1988) Influence of water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotech Bioeng* 31: 457-463.
- González-Blanco PC, Larralde-Corona CP, Viniegra-González G. (1993) Image processing technique for measuring specific growth rates of *Gibberella fujikoroi*. *Biotechnol Techniques* 7(1): 57-62.
- Gosh A, Chatterjee B, Das A. (1991) Production of glucoamylase by 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Aspergillus terreus* 4. *Biotech Lett* 13(7): 515-520.
- Gray G, Selzer G, Buell G, Shaw P, Escanez S, Hofer S, Voegeli P, Thompson C. (1984) Synthesis of bovine growth hormone by *Streptomyces lividans*. *Gene* 32: 21-30.
- Grindale M. (1963a) Heterokaryon compatibility of unrelated strains in the *Aspergillus nidulans* group. *Heredity, London* 18: 191-204.
- Grindale M. (1963b) Heterokaryon compatibility of closely related wild isolated of *Aspergillus nidulans*. *Heredity, London* 18: 397-405.
- Hackel RA, Khan NA. (1978) Genetic control of invertase formation in *S. cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 164: 295-302.
- Hahn-Hargerda B. (1986). Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes. *Enzyme Microb Technol* 8: 322-327.
- Harkki A, Uusitalo J, Bailey M, Penttilä M, Knowles J. (1989) A novel fungal expression system: Secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnol* 7: 596-603.
- Hastie AC. (1981) The genetics of conidial fungi. In Cole GT, Kendrick B (Eds), *Biologoly of Conidial Fungi*, vol 2. Academic Press. Pp: 511-547.

- Hynes MJ, Kelly M. (1977) Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* altered in carbon metabolism. *Mol Gen Genet* 150: 193-204.
- Kelly JM, Hynes MJ. (1985) Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 4: 475-479.
- Khanh NQ, Leidinger K, Albrecht H, Ruttkowski, Gottschalk M. (1992) Effects of promoters on the enhancement of pectin methyl esterase expression in *Aspergillus niger*. *Biotech Lett* 14(11): 1047-1052.
- Kirimura K, Saragbin S, Rugsaseel S, Usami S. (1992) Citric acid production by 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 573-577.
- Klaas S, Debets A, Kobus G, Bos CJ. (1992) Arginine and proline genes of *Aspergillus niger*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 61: 259-264.
- Kusters-van Someren M, Flipphi M, Leo de Graaff, van den Broek H, Kester H, Hinnen A, Visser J. (1992) Characterization of the *Aspergillus niger pelB* gene: structure and regulation of expression. *Mol Gen Genet* 234: 113-120.
- Larralde-Corona CP, González-Blanco PC, Viniegra-González G. (1994) Comparison of alternative kinetic models for estimating the specific growth rate of *Gibberella fujikuroi* by image analysis techniques. *Biotechnol Techniques* 8(4): 261-266.
- Leuchtenberger A, Mayer G. (1992) Changed pectinase synthesis by aggregated mycelium of some *Aspergillus niger* mutants. *Enzyme Microb Technol* 14: 18-22.
- Lhoas P. (1961) Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with p-fluorofenylalanine. *Nature* 190: 744.
- Lhoas P. (1971) Transmission of double stranded RNA viruses to a strain of *Penicillium stoloniferum* through heterokaryosis. *Nature* 230: 248-249.
- Lobo Z, Maitra PK. (1977) Resistance to 2-deoxyglucose in yeast. Direct selection of mutant lacking glucose-phosphorylating enzymes. *Mol Gen Genet* 157: 297-300.
- Loera O, Aguirre J, Viniegra-González G. Phenotypic and genetic characterization of *Aspergillus niger* mutants adapted for overproducing pectinases in solid or liquid substrates. European Conference on Fungal Genetics 2 (ECFG2), Lunteren, The Netherlands. April 28-May 1, 1994b.
- Loera O, Larralde-Corona CP, Viniegra-González G. Uso de un modelo matemático y del procesamiento de imágenes para comparar mutantes de *Aspergillus niger* sobreproductoras de pectinasas. XXV Congreso Nacional de Microbiología, Cd. Obregón, México. Marzo 1994a.

- Loera O, Viniegra-González G, Aguirre J. (1993) Caracterización genética preliminar de mutantes de *Aspergillus niger* resistentes a 2-desoxiglucosa y sobreproductoras de poligalacturonasas. *Biotecnología (México)* 3(1-2): FB9-FB15.
- Martin M, Heredia CF. (1977) Characterization of a phosphatase specific for 2-deoxyglucose-6-phosphate in a yeast mutant. *FEBS Lett* 83: 245-248.
- Mattern IE, Unkless S, Kinghorn J, Pouwels P, van den Hondel C. (1987) Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger* *pyrG* gene. *Mol Gen Genet* 210: 460-461.
- Minjares A. (1992) Medio selectivo para el aislamiento de mutantes de *Aspergillus niger* C28B25 hiperproductoras de poligalacturonasas para fermentación en estado sólido sobre pulpa de café. Tesis de Grado, UAM-I, México, D.F.
- Moore D, Devadatham MS. (1979) Sugar transport in *Coprineus cinereus*. *Biochem Biophys Acta* 550: 515-526.
- Nga BH, Siew-Poh T, Lim G. (1975) The occurrence in nature of a diploid strain of *Aspergillus niger*. *J Gen Microbiol* 88: 364-366.
- Papa KE. (1978) The parasexual cycle in *Aspergillus parasiticus*. *Mycologia* 70: 766-773.
- Perkins D. (1977) Details for preparing silica gel stocks. *Neurospora Newslett* 24: 16-17.
- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, MacDonald MKD, Bufton AWJ. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 5: 141-238.
- Raimbault M, Alazard D. (1980) Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur J Appl Microbiol* 9: 199-209.
- Rowlands RT. (1983) Industrial fungi and strain selection. In Smith JE, Berry DR, Kristiansen (Eds), *The filamentous Fungi*, vol. IV (Fungal Technology). Edward Arnold, London.
- Saunders G, Picknett T, Tuite M, Ward M. (1989) Heterologous gene expression in filamentous fungi. *TIBTECH* 7: 283-287.
- Serlupi-Crescenzi O, Kurtz M, Champe S. (1983) Developmental defects resulting from arginine auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 129: 3535-3544.
- Shankaranand VS, Ramesh MV, Lonsane BK. (1992) Ideosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochemistry* 27: 33-36.

- Siessere V, Said S. (1989) Pectic enzymes production in solid state fermentation using citrus pulp pellets by *Thalaromyces flavus*, *Tubercularia vulgaris* and *Penicillium charlessi*. *Biotechnol Lett* 11: 343-344.
- Skromne I, González O, Aguirre J. (1994) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. (Enviado a publicación).
- Tae-Hahm Y, Batt C. (1988) Genetic transformation of an *argB* mutant of *Aspergillus oryzae*. *Appl Environm Microbiol* 54(6): 1610-1611.
- Tani Y, Fuji A, Nishie H. (1988) Production of raw cassava starch-digestive glucoamylase by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Rhizopus* sp. *J Ferment Technol* 66: 545-551.
- Timberlake WE. (1990) Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Ann Rev Genet* 24: 5-36.
- Turner G. (1991) Strategies for cloning genes from filamentous fungi. In Peberdy JF, Caten CE, Ogden JE, Bennett JW (Eds), *Applied Molecular Genetics of Fungi*. University Press, Cambridge. Pp 29-43.
- Turq B, Deleu C, Denayrolles M, Bégueret J. (1991) Two allelic genes responsible for vegetative incompatibility in the fungus *Podospora anserina* are not essential for cell viability. *Mol Gen Genet* 228: 265-269.
- Upshall A, Giddings B, Mortimore ID. (1977) The use of benlate for distinguishing between haploid and diploid strains of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*. *J Gen Microbiol* 100: 413-418.
- Upshall A. (1986) Filamentous fungi in biotechnology. *BioFeature* 4: 158-166.
- Van den Hondel CAMJJ, Punt PJ. (1991) Gene transfer system and vector development for filamentous fungi. In Peberdy JF, Caten CE, Ogden JE, Bennett JW (Eds), *Applied Molecular Genetics of Fungi*. University Press, Cambridge. Pp 1-28.
- Van Hartingsvelt W, Mattern IE, van Zeijl CMJ, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ. (1987) Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pryG* gene. *Mol Gen Genet* 206: 71-75.
- Van Tuyl JM. (1977) Thesis, Mededelingen Landbouwhogenschol, Wageningen, 77-2: 1-137.
- Viniegra-González G, Minjares A, Loera O, Sánchez-Hernández C, Aguirre J. (1993b) Evaluación morfológica de cepas de hongos resistentes a la desoxiglucosa. *Biología (México)* 3(5-6): s93-s102.

- Viniegra-González G, Saucedo -Castañeda G, López-Isunza F, Favela-Torres E. (1993a) Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. *Biotechnol Bioengin* **42**: 1-10.
- Ward M, Kodoma KH, Wilson LJ. (1989) Transformation of *Aspergillus awamori* and *Aspergillus niger* by electroporation. *Exp Mycol* **13**: 289-293.
- Ward M, Wilson LJ, Carmona CL, Turner G. (1988) The *oliC3* gene of *Aspergillus niger*: isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. *Curr Genet* **14**: 37-42.
- Ward M. (1991) *Aspergillus nidulans* and other filamentous fungi as genetic systems. In: *Modern Microbial Genetics*. Wiley-Liss, Inc. Pp: 455-496.
- Whitehead M, Unkless S, Ramsdem M, Campbell E, Gurr SJ, Spence D, van den Hondel C, Contreras R, Kinghorn JR. (1989) Transformation of a nitrate reductase deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* with the corresponding *Aspergillus niger* and *A. nidulans niaD* genes. *Mol Gen Genet* **216**: 408-411.
- Witteveen F, Van de Vondervoort P, Dijkema C, Swart K, Viser J. (1990) Characterization of a glycerol kinase mutant of *A. niger*. *J Gen Microb* **136**: 1299-1305.
- Yelton MJ, Hamer J, Timberlake W. (1984) Transformation of *Aspegillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1470-1474.