

03072

RECEBIDA EN LA SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS Y DOCUMENTACION
10/10/97

TESIS DE MAESTRIA

**CARACTERIZACION GENETICA DE MUTANTES DE *Aspergillus niger* RESISTENTES A
2-DESOXIGLUCOSA Y SOBREPDUCTORAS DE PECTINASAS.**

**PROYECTO DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA. UACPyP DEL CCH - FACULTAD DE
QUIMICA. UNAM**

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

B.E. Sergio de Jesús Romero Gómez.

Octubre de 1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Resumen.	1
1 Introducción.	2
2 Información General	3
2.1 Antecedentes sobre el organismos estudiado	3
2.1.1 Los hongos	3
2.1.2 Clasificación de los hongos	4
2.2 Bología de <i>Aspergillus niger</i>	4
2.3 Genética de <i>Aspergillus niger</i>	5
2.3.1 Dificultades de la genética de <i>Aspergillus niger</i>	7
2.4 Antecedentes sobre el sustrato utilizado	10
2.4.1 Pectina.	10
2.5 Antecedentes sobre las enzimas estudiadas	11
2.5.1 Pectinasas	11
2.6 Regulación de la síntesis de enzimas	13
2.7 Resistencia a 2-desoxiglucosa.	17
2.8 Obtención de pectinasas de <i>A. Niger</i>	20
3 Antecedentes de este trabajo	22
4 Hipótesis	24
5 Objetivos	25
6 Material y métodos	27
6.1 Cepas utilizadas	27
6.2 Medio y condiciones de cultivo	27
6.3 Obtención de esporas	28
6.4 Mutagénesis	28
6.5 Métodos de enriquecimiento	28
6.6 Determinación de la auxotrofia de las cepas obtenidas	29
6.7 Determinación de la resistencia a oligomicina y acriflavina	30

6.8 Método de heterocariotización	30
6.9 Aislamiento de diploides	30
6.10 Obtención de los patrones de resistencia a 2dg de las cepas	30
6.11 Preparación de los extractos enzimáticos de las cepas	31
6.12 Determinación de la actividad enzimática de los extractos	31
7 Resultados	32
7.1 Obtención de la curva de mortalidad de <i>A. niger</i> con UV	32
7.2 Obtención de las dosis de nistatina necesarias para llevar a cabo el proceso de enriquecimiento	33
7.3 Obtención de cepa mutantes por procesos de enriquecimiento	34
7.4. Determinación del nivel de resistencia a 2-desoxiglucosa (2DG) de las cepas mutantes	35
7.5. Determinación de los niveles de represión de la síntesis de pectinasas por las cepas mutantes	36
7.6. Determinación de los niveles de represión de la síntesis de amilasas por las cepas mutantes	37
7.7. Obtención de cepas resistentes a acriflavina y oligomicina	38
7.8. Determinación de los patrones de resistencia a 2dg de las cepas heterocarióticas	39
7.9 Obtención de las cepas diploides a partir de los heterocariotes aislados	40
7.10 Determinación de los niveles de represión catabólica en las cepas diploides	43
7.10.1 Regulación de la pectinasas con pectina o con pectina y glucosa como sustrato	43
7.10.2 Regulación de la sacarasa (invertasa) con sacarosa o con sacarosa y glucosa como sustrato.	44
7.10.3 Regulación de amilasa con almidón o con almidón y glucosa como sustrato.	45
7.11 Obtención de cepas segregantes a partir de las cepas diploides D1, D3 y D4	46
7.11.1 Segregación de los marcadores genéticos de las cepas haploides obtenidas	46
7.11.2. Determinación de los niveles de represión catabólica de las cepas segregantes.	49
8 Discusión	52
8.1 Curva de mortalidad de <i>A. niger</i> por mutagénesis con luz UV	52
8.2 Procesos de enriquecimiento	53
8.3 Mutaciones inducidas	54
8.4 Determinación del nivel de resistencia a 2dg de las cepas mutantes obtenidas	55
8.5 Niveles de represión catabólica de las cepas mutantes	56
8.6 Análisis de dominancia/recesividad del carácter de resistencia a 2dg en heterocariotes y diploides	57

8.9 Represión catabólica en las cepas parentales y diploides aisladas	59
8.10 Análisis de la segregación de marcadores genéticos en las cepas segregantes a partir de las cepas diploides D1, D3 Y D4	61
8.11 Análisis de los niveles de represión catabólica de las cepas segregantes obtenidas	62
9 Conclusiones	64
10 Bibliografía	65

RESUMEN:

En un trabajo previo realizado en este laboratorio, Antier y col.(1993a) obtuvieron cepas sobreproductoras de pectinasa de *A. niger* a partir de la cepa silvestre C28B25 por mutagénesis con radiación UV, un grupo de cepas se aisló en medio con $a_w = 0.99$ y otro con $a_w = 0.96$. A ambos lotes se les añadió 2-desoxiglucosa para aislar cepas con desrepresión catabólica. Las cepas aisladas en medio con $a_w = 0.99$ (serie DGRAW99) resultaron ser sobreproductoras en cultivo líquido mientras que en cultivo sólido ($A_w=0.96$) presentaron niveles de producción menores al de la cepa silvestre. En tanto las cepas mutantes aisladas en a_w deprimida (serie DGRAW96) presentaron sobreproducción en medio sólido y menor producción que la cepa C28B25 en cultivo líquido.

Dado que la resistencia a 2 desoxiglucosa ha sido relacionada a nivel genético con fenómenos pleiotrópicos de desregulación de enzimas hidrolíticas en trabajos previos (Entian, 1981; Entian y Mecke, 1982), en este trabajo se propuso dilucidar si la resistencia a 2-desoxi-D-glucosa esta relacionada a nivel genético con la sobreproducción de pectinasas en las cepas aisladas por Antier y col. (1993a). Para determinarlo se realizó la cruce parasexual de cepas de ambos grupos entre sí y de cada una de estas con la cepa silvestre, se determinaron los patrones de regulación de pectinasas, amilasa y sacarasa de las cepas diploides obtenidas, posteriormente se realizó la haploidización de estas cepas y se determinaron los patrones de segregación cada una de las caracteres genéticas en las cepas haploides obtenidas. Los resultados encontrados indican que la regulación catabólica de las hidrolasas es muy compleja y no parece estar regulada de manera coordinada en las cepas diploides, las característica de sobreproducción de pectinasas y resistencia a 2 DG segregan de manera independiente y que las cepas de las series DGRAW99 y DGRAW96 presentan mutaciones responsables de la desrepresión catabólica y la resistencia a 2DG que son diferentes entre sí y entre las series de mutantes.

1 INTRODUCCION:

La pectina es un polímero de ácido D-galacturónico unido por enlace α glucosídico, que actúa como cementante de las células vegetales (Badui, 1988). Esta molécula tiene uso en la elaboración de jaleas, flanes, como coberturas y rellenos de repostería, texturizante en helados, salsas, refrescos y algunas formulaciones farmacéuticas contra la diarrea y úlceras pépticas (Charley, 1987). Las principales fuentes comerciales de pectina son cascaras de manzana o de cítricos (May, 1990).

La degradación enzimática de la pectina es un fenómeno asociado a numerosos procesos biológicos en vegetales (Alabi y col., 1977, McGuire y col., 1991). Debido a esto las enzimas que degradan pectina se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en vegetales como en organismos simbióticos o fitopatógenos (Runlin y col., 1990). Las pectinasas se utilizan a nivel industrial para la clarificación de jugos de frutas y vinos, la extracción de néctares de frutas tropicales y aumento del rendimiento en la extracción de jugos de cítricos (Ward, 1985).

Las restricciones impuestas por la FDA sobre el origen de las materias primas utilizadas en la manufactura de alimentos y medicinas ha limitado las fuentes posibles de producción de estas enzimas para su utilización industrial (Bailey y col., 1990). Los organismos aprobados para la producción industrial de pectinasas son hongos del género *Aspergillus* y sobre todo de la especie *Aspergillus niger* (Tsuyumu, 1977).

La producción industrial de estas enzimas se lleva a cabo por cualquiera de los dos procedimientos: el líquido y el sólido. El primero es muy utilizado por la facilidad de su control, sin embargo el segundo rinde mayor cantidad de enzima por gramo de sustrato, a una concentración mayor y es relativamente más económico (Pandey, 1992). Debido a esto, en nuestro laboratorio se han desarrollado estudios para aumentar la producción de pectinasas en fermentación sólida, así como para obtener cepas adaptadas a este tipo de fermentación. En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio Antier y col. (1993a) aislaron 2 series de mutantes resistentes a 2-desoxiglucosa,

de las cuales una serie llamada AW99 resultó sobreproductora de pectinasas en fermentación líquida y la serie denominada AW96 resultó sobreproductora en fermentación sólida.

En este trabajo se intentó determinar si la sobreproducción de pectinasa y la resistencia a 2-desoxiglucosa propia de las cepas representativas de las series AW96 y AW99, se debían a una sola mutación pleiotrópica, para cada serie de mutantes o se debían a una serie de mutaciones independientes.

2. INFORMACIÓN GENERAL.

2.1 ANTECEDENTES SOBRE EL ORGANISMO ESTUDIADO-

2.1.1 Los hongos

Los hongos son organismos eucarióticos, que se caracterizan por: ser inmóviles, presentar talos, que pueden ser estructuras ramificadas llamadas micelios o cuerpos más compactos denominados basidiocarpos, en lugar de tejidos. Los hongos no realizan la fotosíntesis pues son heterótrofos que viven a partir de la materia orgánica producida por otros organismos. Pueden reproducirse por esporas o por medio de la ramificación de estructuras tubulares y arborescentes llamadas hifas. Una hifa es una estructura cilíndrica que consta de una pared celular que recubre a una membrana en cuyo interior pueden existir uno o varios núcleos, además, puede tener septos que son paredes internas que cortan la continuidad del citoplasma dentro de la hifa y en algunos casos estos septos pueden presentar poros que permiten el paso del citoplasma, incluyendo a sus organelos, estableciendo así, la continuidad citoplásmica dentro de la hifa. Las hifas crecen por extensión apical o de las puntas y se multiplican por ramificación. En los extremos de estas células es donde se lleva a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la excreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de sustratos complejos. (Alexopoulos, 1970).

2.1.2 Clasificación.

Taxonómicamente los hongos están agrupados en el reino Fungi, la clasificación dentro del reino es complicada y se basa principalmente en el tipo de estructuras reproductivas que se forman tanto en los ciclos sexuales como asexuales. En forma más precisa: la presencia de ciclo sexual, el tipo de estructuras reproductivas, el número de grupos de complementación y la presencia o ausencia de septos, son los principales caracteres para clasificar a los hongos en 3 grandes grupos Myxomycota (hongos mucilaginosos), Eumycota (hongos verdaderos) y Lichens (hongos simbioses), el grupo de Eumycota se divide a su vez en cuatro grupos que son Ascomicetos, Basidiomicetos, Ficomicetos y Deuteromicetos (Herrera, 1990).

2.2 BIOLOGIA DE *Aspergillus niger*.

Los Deuteromicetos y Ascomicetos son conocidos también por el nombre común de hongos filamentosos porque no forman cuerpos fructificantes o basidiocarpos, sino que se reproducen exclusivamente en forma de micelos. Han sido considerados por largo tiempo organismos ideales para el estudio de las características fisiológicas y genéticas de los eucariontes debido a su fácil manipulación en laboratorio, su capacidad para crecer en medios químicamente definidos de bajo costo y la rapidez de su crecimiento que permite obtener varias generaciones en poco tiempo, además de que tradicionalmente se ha utilizado a algunos de estos microorganismos para fermentar alimentos y como productores de antibióticos y enzimas hidrolíticas (Debets, 1990).

Aspergillus niger es un hongo filamentoso perteneciente al grupo de los Deuteromicetos, y a la familia Eurotium, los cuales se caracterizan por presentar: hifas septadas, esporas asexuales llamadas conidiosporas, las cuales se encuentran en una estructura llamada conidióforo que al llegar a la madurez adquiere la forma de un hisopo, aspersor o regadera la cual origina el nombre del género. Este organismo no presenta ciclo sexual, por lo que también se le incluye entre los llamados hongos imperfectos que incluyen otros *Aspergillus* y algunas especies de los géneros *Mucor* y *Penicillium*. La forma vegetativa o micelio de *A. niger*, de color blanco o amarillento, al llegar a la madurez

produce estructuras reproductivas llamadas conidióforos que dan origen, en el tipo silvestre, a esporas negras y de ahí el nombre de la especie. Sin embargo, cuando a algún representante de este grupo se le observa ciclo sexual se le traslada al grupo Ascomiceto y el nombre se cambia de *Aspergillus* a *Emericela* tal es el caso de *A. nidulans* que presenta ciclo sexual por lo que sería más adecuado llamarle *Emericela nidulans*. Sin embargo, la mayoría de las personas lo conocen y citan con su primer nombre por lo cual se ha conservado (Alexopolous, 1970; Herrera, 1990).

2.3 GENÉTICA DE *Aspergillus niger*.

A pesar de la amplia utilización de *A. niger* como productor compuestos de interés para la industria (ácidos orgánicos y enzimas), hasta hace poco no se había iniciado un estudio sistemático de la genética de este organismo. La principal dificultad para el estudio de la genética de este organismo es la ausencia de un ciclo sexual que permita obtener cruces entre razas o cepas con distintos fenotipos. Posteriormente Lhoas (1967) desarrolló un análisis parasexual de la genética de *A. niger*. Este tipo de estudio consiste en la recombinación de material genético a través de la anastomosis de las hifas. Pero su trabajo había tenido continuación solo esporádica hasta el establecimiento del grupo de Bos y col. (1988) quienes realizaron estudios sistemáticos de la genética de este organismo.

La reseña de los trabajos del grupo de Wageningen sobre la genética de *A. niger* incluye los siguientes resultados: Bos y col. (1988) obtuvieron una cepa maestra con marcadores en 6 grupos de unión, Bos y col. (1989) mapearon los genes para la síntesis de adenina y pirimidina y encontraron evidencias de un séptimo grupo de unión. Debets y col (1989) reportan el uso de las nistatina para obtener auxótrofas dobles en cepas diploides de *A. niger*, y el mapeo del V grupo de unión. Swart y col. (1990) localizaron los genes que modifican la síntesis de glucosa oxidasa. Debets y col. (1990) reportaron el aislamiento de cepas resistentes a clorato. Debets y col.(1991) reportaron la utilización de novozima para el enriquecimiento de diploides. Swart y col. (1992) mapearon los genes de arginina y prolina. Bos y col. (1992) describieron un método de enriquecimiento de mutantes por filtración y la utilización de novozima para la selección de cepas mutantes auxótrofas, Bos y col. (1993) reportaron y analizaron el hallazgo de un octavo grupo de unión con lo cual completaron el

marcaje de los 8 cromosomas de *A. niger*. Bos y col. (1993) publicaron el mapa genético de *A. niger* donde localizaron una serie de genes de auxotrofias y resistencia que podria ser muy útil para el seguimiento de los estudios genéticos de este hongo. De esta manera se pudo contar con un conjunto de mutaciones localizadas en cada uno de los cromosomas de *A. niger* (Tabla 1).

Tabla 1. Mapa de Grupos de Unión de *A. niger*

I	II	III	IV	v	VI	VII	VIII
<i>acrA</i>	<i>adeC</i>	<i>adeB</i>	<i>adeA</i>	<i>argA</i>	<i>argE</i>	<i>adeF</i>	<i>crnA</i>
<i>brnA</i>	<i>argH</i>	<i>adeE</i>	<i>adeD</i>	<i>argB</i>	<i>argG</i>	<i>cnxC</i>	<i>crnB</i>
<i>cnxF</i>	<i>hisA</i>	<i>adeG</i>	<i>argF</i>	<i>hisB</i>	<i>argK</i>	<i>lysF</i>	<i>niaD</i>
<i>cnxG</i>	<i>hisD</i>	<i>argD</i>	<i>cnxB</i>	<i>metB</i>	<i>cnxA</i>	<i>nicB</i>	<i>nirA</i>
<i>cysB</i>	<i>hisE</i>	<i>argL</i>	<i>cysC</i>	<i>nicA</i>	<i>cnxE</i>	<i>olic</i>	<i>pyrD</i>
<i>fwnA</i>	<i>hisF</i>	<i>bioA</i>	<i>hisC</i>	<i>pheA</i>	<i>lysB</i>		<i>pyrE</i>
<i>metC</i>	<i>hisI</i>	<i>bioB</i>	<i>leuA</i>	<i>pheB</i>	<i>lysD</i>		<i>trpB</i>
<i>metD</i>	<i>leuC</i>	<i>cnxD</i>	<i>leuB</i>	<i>serA</i>	<i>pabA</i>		<i>trpE</i>
<i>nirA</i>	<i>kenE</i>	<i>cysA</i>	<i>leuD</i>		<i>pabB</i>		
<i>olvA</i>	<i>pabB</i>	<i>hisH</i>	<i>lysC</i>		<i>pabD</i>		
	<i>pyrC</i>	<i>lysA</i>	<i>ntrB</i>		<i>pdxA</i>		
	<i>trpA</i>	<i>lysE</i>	<i>ntrC</i>		<i>proA</i>		
		<i>pdxB</i>	<i>ntrD</i>		<i>proE</i>		
		<i>proB</i>			<i>pyrB</i>		
		<i>proC</i>					
		<i>proD</i>					
		<i>pyrA</i>					
		<i>thiA</i>					

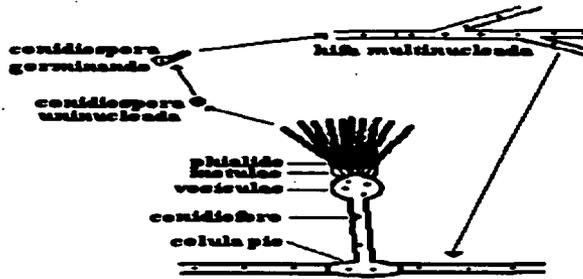
Símbolos de los genes: (Las auxotrofias a aminoácidos están marcadas según el código de tres letras): *acr*, resistencia a acriflavina; *bio*, auxotrofia a biotina; *brn*, conidiosporas de color café; *cnx*, resistencia a clorato que no puede utilizar nitrato como fuente de nitrógeno; *crn*, resistentes a clorato; *fwn*, conidiosporas de color carne; *nic*, auxotrofia a nicotinamida; *nir*, auxotrofia a nicotinamida o triptofano; *oli*: resistencia a oligomicina; *olv*: conodiosporas de color verde oliva; *pab*, auxotrofia a ácido *p*-aminobenzoico; *pdx*, auxotrofia a piridoxina; *pyr*, auxotrofia a pirimidina; *nia*, resistencia a clorato por nitrato reductasa; *nir*, resistencia a clorato (gen de regulación de la reducción de nitrato)(Bos y col, 1993).

2.3.1 Dificultades de la genética de *Aspergillus niger*.

La razón principal para el retraso en el estudio genético de *A. niger* es que pertenece, como se mencionó anteriormente, al grupo de los Deuteromicetos, los cuales por regla no presentan ciclo sexual. Esta característica impide la recombinación sexual del material genético, por lo que estos organismos han desarrollado un sistema para llevar a cabo esta recombinación que se observa aún en los casos en que también existe ciclo sexual como es *A. nidulans*. Este ciclo se denomina **parasexual** y consiste de los siguientes pasos:

- 1) **Plasmogamia** durante la cual se lleva a cabo la unión de dos hifas con una mezcla heterogénea de núcleos haploides situados en el interior de la misma célula (**heterocariontes**).
- 2) **Cariogamia** en la que se unen dos núcleos haploides dentro de la misma hifa, con lo que se obtiene una colección de núcleos diploides.
- 3) **Multiplicación simultánea** de los núcleos haploides y diploides en un micelio compartido.
- 4) **Recombinación mitótica ocasional** de los núcleos diploides durante su multiplicación, los cromosomas de ambos núcleos llevan a cabo un intercambio genético, es este paso el que divide al ciclo parasexual del sexual, ya que en este último la recombinación está guiada por la célula durante la meiosis, mientras que en el ciclo parasexual se lleva a cabo en frecuencia muy baja.
- 5) **Diseminación** aleatoria de los núcleos diploides entre distintos fragmentos o regiones del micelio.
- 6) **Haploidización ocasional** de los núcleos diploides y aparición de nuevas cepas haploides. (Pontecorvo y col., 1953a; Pontecorvo y col., 1953b; Pontecorvo y col., 1959; Bos y col., 1988; Bos y col. 1993).

Figura 1. Ciclo de Vida de *A. niger*.



En el inicio del ciclo parasexual se forma el micelio heterocarión por anastomosis o fusión de dos hifas somáticas de constitución genética diferente. Algunos núcleos se fusionan creando estructuras diploides que consisten en dos núcleos que comparten la misma membrana. Probablemente, estos núcleos se multiplican a la misma velocidad que los haploides pero siempre se presentan en frecuencias mucho más bajas (entre 10^{-5} y 10^{-6}). Durante la multiplicación de los núcleos diploides se da, aleatoriamente, el entrecruzamiento del material genético que se presenta según Pontecorvo con una frecuencia 500 veces menor a la observada durante el entrecruzamiento sexual (Pontecorvo y col., 1953b).

Una cepa diploide perderá gradualmente sus cromosomas y eventualmente volverá al estado haploide. En el laboratorio se puede acelerar este fenómeno usando dosis subletales de *para*-fluorofenilalanina (Lhoas, 1971) o benomil (fungicida del grupo de los compuestos carbamilos) (Hastie 1970). Debets y col. (1989) encontraron que la utilización de *para*-fluorofenilalanina resulta ineficiente para la obtención de segregantes de *A. niger* y recomiendan la utilización de benomil, que permite obtener una alta frecuencia de segregantes con crecimiento más vigoroso. Los haploides resultantes de esta segregación de los diploides contendrán unos cromosomas de un padre y otros del

otro y por este rearrreglo se pueden asignar mutaciones a un cromosoma específico, mediante un análisis de segregación tipo mendeliana (Lhoas, 1971; Hastie, 1970)

Estos procesos pueden utilizarse para mapear una mutación en una cepa dada, pero se necesita que la mutación sea fenotípica o bioquímicamente reconocible. También se necesita que las mutaciones de cada una de las cepas por cruzarse, sean complementarias entre sí, lo que permitirá la selección de los heterocariones por crecimiento en un medio adecuado de selección. Por ejemplo; el cruce de dos auxótrofas distintas que al complementarse en el heterocarión pueden crecer en medio mínimo. A continuación se induce a esa cepa a realizar el ciclo parasexual con una cepa maestra la cual cuenta con un marcador genético para cada cromosoma, es decir tiene una mutación fenotípicamente reconocible en cada uno de sus cromosomas que pueden ser alteraciones morfológicas (color), resistencia a inhibidores o auxotrofías (Bos y col, 1988).

Analizando la segregación de los haploides, a partir de diploides heterocigóticos entre la cepa mutante y la cepa maestra, se puede observar que la mutación por localizar se presentará en combinación con cada una de las mutaciones de la cepa maestra en proporciones iguales, excepto para una, que presentara una proporción mucho menor a las demás; esto indica que el gene que se desea mapear se encuentra en el cromosoma equivalente a aquel donde se encuentra el marcador, y puesto que solo uno de los dos se conserva, solo se observara una de las dos mutaciones (Bos y col., 1988). La posibilidad de observar en un determinado caso las dos mutaciones del mismo cromosoma en un organismo puede deberse a el entrecruzamiento mitótico, que por medio de intercambio de DNA entre los cromosomas, podría poner ambas mutaciones en el mismo cromosoma (Pontecorvo y col., 1953a; Pontecorvo y col., 1959; Bos y col., 1988; Bos y col. 1993).

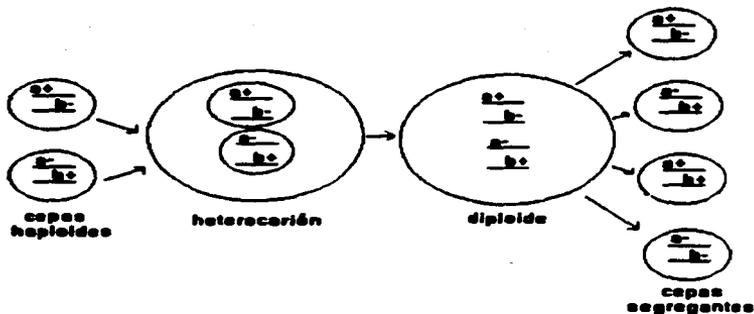


Figura 2 Análisis por haploidización

2.4 Antecedentes sobre el sustrato utilizado.

2.4.1 PECTINA.

Las moléculas de pectina son heteropolímeros lineales de moléculas de ácido galacturónico unidas por enlaces α 1-4 glucosídico, que se clasifican con diversos nombres de acuerdo al grado de esterificación del carbono 6 de los residuos de ácido galacturónico.

A) Ácido péctico: En estas moléculas los grupos carboxílicos de los residuos de ácido galacturónico no están esterificados, pudiendo ser ocupados por iones divalentes como magnesio lo que facilita su solubilidad en agua.

B) Pectina: Presentan diversos porcentajes de esterificación que van del 50 al 85% (alto metoxilo) o de menos del 50% (bajo metoxilo).

C) Protopectina: En estas moléculas mas del 85% de los grupos carboxilo están esterificados, lo que disminuye su solubilidad acuosa.

En estado natural pueden presentar trazas de azúcares neutros como ramnosa, fucosa, xilosa y arabinosa como cadenas laterales a la estructura principal (May, 1990).

Estas moléculas actúan como material cementante entre las células vegetales y se encuentran presentes en proporciones variadas en los tejidos vegetales a lo largo de su desarrollo. Además de esta función la pectina tiene un papel como barrera de protección contra virus, bacterias y hongos fitopatógenos, los cuales se ven obligados a digerir primero la capa de pectina antes de alcanzar la célula vegetal (Charley, 1987; May, 1990).

Debido a la propiedad de la pectina para formar geles en solución acuosa ligeramente ácida, tiene una gran variedad de usos dentro de la industria alimentaria como materia prima para la elaboración de jaleas y mermeladas; como espesante en flanes y mayonesas; como estabilizante de leches y bebidas lácteas fermentadas; como texturizante en helados, refrescos y jarabes; y en la industria farmacéutica se utiliza como material absorbente para la elaboración de preparados antidiarreicos (Charley, 1987; May, 1990).

2.5 Antecedentes sobre las enzimas estudiadas.

2.5.1 PECTINASAS.

Las pectinasas son una familia enzimática muy amplia que degradan la pectina, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se han dividido para su estudio en diferentes tipos de

acuerdo al modo de ataque que presentan hacia la molécula de pectina, de modo que encontramos la siguiente división (Ward, 1985):

A) Pectinesterasas: que atacan el enlace éster entre el metoxilo y el carbono 6 de cada residuo de ácido galacturónico de la cadena de pectina.

B) Despolimerasas: que rompen el enlace α -1,4 glucosídico entre dos residuos de ácido galacturónico adyacentes y que se dividen a su vez en:

I) Liasas: también llamadas transeliminasas que rompen el enlace glucosídico por β -eliminación formando un doble enlace entre los carbonos 4 y 5 del extremo reductor recién formado, y que se dividen a su vez en:

1) **Exopectatoliasas:** que liberan dímero insaturados a partir del extremo reductor de la pectina.

2) **Endopectatoliasas:** que rompen la molécula de manera aleatoria a lo largo de toda la cadena, produciendo una serie de oligogalacturonatos de distintos tamaños, que sigue atacando hasta reducirlos a dímeros o trímeros de galacturonato.

II) Hidrolasas: que rompen el enlace glucosídico por hidrólisis, dentro de estos dos grupos se realiza una segunda división análoga a las liasas:

1) **Exopoligalacturonasas:** Liberan galacturonatos o metilgalacturonatos a partir de la cadena de pectina por la inclusión de una molécula de agua.

2) **Endopoligalacturonasas:** Ataca la molécula de manera aleatoria, liberando finalmente dímeros y trímeros de galacturonato (Ward, 1985; Tuttobello, 1961).

Debido a la amplia distribución de la pectina en los tejidos vegetales, la degradación enzimática de la pectina está asociada con numerosos procesos biológicos, como es la caída de las hojas durante el otoño en árboles caducifolios, la maduración de los frutos y el crecimiento de los vegetales (Alabi y col. 1977), además la degradación se realiza durante el establecimiento de asociaciones simbióticas entre los vegetales con algunos microorganismos y durante los procesos de ataque por organismos fitopatógenos (McGuire y col., 1991). La degradación de pectina también está involucrada en la digestión de los animales herbívoros. (Rambouts y Pilnik, 1980, Runlin y col., 1990).

Gracias a la presencia de la pectina en los tejidos vegetales, la utilización de las pectinasas está ampliamente relacionada con la obtención y procesamiento de productos vegetales, como son principalmente la clarificación de jugo de manzana, zumo de uva, la modificación de texturas de jaleas y mermeladas y la maceración de tejidos vegetales (May, 1990).

Debido a la gran distribución de las pectinasas en la naturaleza, los organismos capaces de sintetizarlas son muy variados incluyendo principalmente bacterias, plantas superiores, protozoos y hongos tanto fitopatógenos como saprófitos. Dentro de este último grupo *A. niger* es el único que cuenta con la aprobación de la FDA como libre de cualquier efecto tóxico (Tsuyumu, 1977), por lo que ha sido ampliamente utilizado para la obtención de ácido cítrico y enzimas hidrolíticas de uso industrial, en especial pectinasas (Bailey y col., 1990), ya que además tiene las ventajas de sintetizarlas en cantidades significativas y de excretarlas al medio lo que facilita su recuperación a nivel industrial.

2.6 Regulación de la síntesis de enzimas.

Los hongos filamentosos como *A. niger* son típicamente organismos saprófitos, por lo que secretan una gran variedad de enzimas que les permiten la asimilación de polímeros complejos de tejidos animales y vegetales que utilizan como fuentes de carbono y nitrógeno, sin embargo no sería

eficiente energicamente para un hongo sintetizar continuamente todas las enzimas hidroliticas de que es capaz, en cambio los hongos filamentosos sintetizan y secretan en grandes cantidades solo las enzimas hidroliticas necesarias para degradar el sustrato en el medio en el cual se desarrollan, a esta caracteristica se le llama control de la expresi3n genetica (Debets, 1990, MacKenzie, 1993).

El esquema actual de la regulaci3n de la sintesis de proteinas en hongos, est3 basado en tres elementos geneticos b3sicos:

a) **Gen regulador.** Gen que puede localizarse antes o despu3s del gen estructural, asi como en alguna otra regi3n de DNA, que codifica para un producto que regula la transcripci3n del gen estructural.

b) **Promotor.** Es un sitio de fijaci3n de represores o activadores , es donde inicia la lectura del gen estructural por la RNA pol. Esta formado por varias secuencias como son la caja TATA, CAT, CG, responsables de los niveles basales de transcripci3n de los genes. La uni3n del represor al operador evita la transcripci3n de los genes estructurales, mientras que la uni3n de un activador aumenta la transcripci3n del gen estructural.

c) **Gen estructural.** Es la regi3n de DNA que codifica para una macromol3cula (tRNA, mRNA o proteina) que puede tener una funci3n estructural o catalitica.

REGULACI3N NEGATIVA: En condiciones normales, la uni3n continua del represor con el promotor impide la transcripci3n del gen estructural, cuando el inductor se halla presente se une al represor, impidiendole que se una al promotor, lo que permite la transcripci3n de los genes estructurales. Solo algunos genes de *Aspergillus* se han reportado con este sistema de regulaci3n (Mackenzie y col. 1993).

REGULACI3N POSITIVA: Se han localizado varias proteinas que se unen a los promotores en presencia del inductor aumentando los niveles de transcripci3n del gen estructural. Estas proteinas se denominan factores de transcripci3n. Se han formulado varias hip3tesis para explicar la regulaci3n de

estas proteínas: En la primera se propone que la presencia del inductor modifica estructuralmente a las proteínas habilitándolas para unirse a la región del promotor, la segunda hipótesis propone que la presencia de glucosa promueve la fosforilación de los factores de transcripción permitiendo la unión de estas proteínas a las regiones promotoras aumentando la transcripción del gen estructural. También se han localizado promotores sensibles a nitrógeno, azufre y fósforo, incluso el gen *pacc* de *A. nidulans* el cual modifica la expresión genética positiva o negativamente dependiendo del pH extracelular (Mackenzie y col., 1993; Ronne, 1995).

En el caso de los hongos filamentosos la regulación de la síntesis proteica se realiza a diferentes niveles (MacKenzie y col., 1993; Ronne, 1995).

a) **Secuencias promotoras en la región reguladora de cada uno de los genes.** Este tipo de regulación de la expresión genética en los hongos filamentosos se realiza por la actuación de varias secuencias nucleotídicas anteriores al gen estructural que promueven la transcripción del gen al que pertenecen, se piensa que estas secuencias son responsables de los niveles basales de la expresión enzimática.

b) **Secuencias de DNA responsables del control genético por inducción.** En estas secuencias es donde se unen proteínas represoras o activadoras, las cuales actúan como reguladores de la respuesta de inducción y represión.

c) **Retroalimentación de una ruta metabólica específica.** Dentro de la regulación por retroalimentación se ha identificado, una serie de proteínas activadoras que se unen al DNA en regiones de control, pero se han ido encontrando un número creciente de represores. Estos activadores o represores actúan no solo sobre un gen, sino sobre un grupo de genes involucrados en una ruta metabólica, como es el caso del gen *alcR* de *A. nidulans* que promueve la expresión de los genes inducibles *alcA*, *alcR*, *aldA* involucrados en el metabolismo del etanol (Kulmburg y col., 1992; Schneider y col., 1971).

d) Regulación global que depende de los niveles de carbono, nitrógeno o fósforo. La expresión de muchos genes esta regulada además por controles globales, que son mediados por un numero relativamente pequeño de proteínas reguladoras, de modo que, los niveles de carbono, nitrógeno, fósforo o azufre detiene o aumenta la expresión de algunas enzimas o de vías metabólicas completas. Se ha encontrado que las proteínas responsables de la regulación enzimática son frecuentemente similares entre grupos afines (Zimmermann y col., 1977; Mackenzie y col., 1993).

Es de especial interés la regulación catabólica por carbono en la cual la expresión de un determinado grupo enzimático no solo esta dictado por la presencia del inductor, sino principalmente por la ausencia de glucosa o algún otro azúcar de asimilación mas sencilla en cantidades apreciables. En *A. nidulans* se han localizado 3 genes involucrados en represión catabólica por carbono *creA*, *creB* y *creC*. *creA* es un inhibidor que actúa uniéndose al DNA en múltiples zonas capaces de aceptarlo y que han sido localizadas en *A. nidulans*, *Neurospora crassa* y *Trichoderma viridae*. La delección o mutación de los sitios de unión a *creA* en el DNA impide la represión por glucosa del gen en cuestión, sin afectar la regulación de los demás, pero la mutación del gen *creA* produce mutantes desreprimidos catabólicamente en una amplia variedad de enzimas (Mackenzie y col., 1993).

La evidencia acumulada sugiere que los sitios de regulación por unión de proteínas disponibles pueden sobreponerse o ser adyacentes unos a otros indicando una competencia por unión al DNA de tal modo que la expresión de una proteína especifica seria resultado de la suma de efectos causados por esta competencia (Nasser y col., 1994).

Otro nivel de regulación se localiza a nivel postranscripcional y mas especificamente en el procesamiento postraduccional en el lumen del reticulo endoplásmico, donde se modifican las proteínas a secretarse principalmente por el proceso de glucosilación.

De este modo la regulación de la expresión enzimática en hongos filamentosos queda ordenada de la siguiente manera:

Las enzimas se mantienen expresándose de manera constitutiva en cantidades básicas muy pequeñas, debido a la presencia de secuencias promotoras en las inmediaciones del gen estructural; además, en presencia del inductor, el represor se une a este y libera el sitio de unión del gen regulador, pero con concentraciones altas de glucosa los sitios de unión a proteína son ocupados por inhibidores de tipo creA. Al disminuir la concentración de glucosa en el medio se inicia la liberación de los sitios de regulación, al separarse el inhibidor del sitio de unión, es sustituido por factores específicos de transcripción, de tal modo que las enzimas empiezan a secretarse dando origen a más inductor llevando entonces a un control por retroalimentación con el sustrato. Además las condiciones prevaletentes en el medio promueven modificaciones postranscripcionales en las proteínas (Acuña-Argüelles y col., 1995; MacKenzie, 1993), dentro de las modificaciones postranscripcionales más importantes, se ha estudiado la glucosilación de las proteínas en relación con la eficiencia de la secreción en el caso de la quimosina en *Aspergillus niger* Var. *awamori* (Berka y col., 1992).

2.7 Resistencia a 2-desoxiglucosa.

El sistema de regulación de la síntesis de proteínas, que permite al hongo sobrevivir y producir enzimas de manera eficiente, es un gran obstáculo para incrementar la producción enzimática en cepas de interés industrial. Debido a esto es que se ha intentado modificarlo, especialmente en la regulación catabólica por carbono, ya que la inducción de algunas enzimas requiere sustratos caros, haciendo poco rentable su utilización. En cambio una cepa mutante constitutiva podría sintetizar estas enzimas utilizando mezclas de sustratos en los cuales se encontrara presente la glucosa o sacarosa (Chopra y Mehta, 1985).

Una aproximación para resolver este problema es la selección de cepas desreprimidas catabólicamente por medio de la utilización de análogos tóxicos de glucosa, las cuales son moléculas que dañan a las células normales que no incorporan otras fuentes de carbono, mientras que las cepas desreprimidas que incorporan fuentes de carbono alternativas diluyen el efecto tóxico (Allen y col.

1989). Muchas de las mejoras y estudios sobre cepas hiperproductoras de enzimas ha provenido del aislamiento de mutantes resistentes a los análogos tóxicos de azúcares, como lo son isómeros "D" o ciertos derivado metilados. En general, estos análogos de sustrato ocupan el sitio activo de una enzima dada que los reconoce, pero, al no presentar la misma estructura que el sustrato original, no pueden ser degradados, bloqueando esa determinada vía metabólica (Lehninger, 1979).

Un ejemplo claro de este caso es la utilización de la 2-desoxiglucosa (2DG) (Allen y col., 1989). De entre los análogos tóxicos de azúcares, la 2DG ha sido ampliamente usada debido a que, además de no ser metabolizable, actúa como un represor gratuito para un cierto número de enzimas, por lo cual, las mutantes que sean resistentes a ella y capaces de crecer en su presencia pueden llegar a exhibir el fenómeno de desrepresión (Novak y col., 1991).

La 2DG es un análogo de la glucosa en el cual el grupo hidroxilo del carbono 2 esta sustituido por un átomo de hidrógeno. La 2DG no es un compuesto tóxico en si para los hongos filamentosos, sino que requiere ser fosforilada por la hexoquinasa formando 2-desoxiglucosa 6-fosfato (2DG6P) que inhibe la actividad de la fosfohexosa isomerasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. La acumulación de este compuesto bloquea la glucólisis produciendo un déficit de fosfato y por ende una disminución de los niveles de ATP; además la acumulación de este compuesto impide el consumo de otros azúcares, con lo cual se bloquea la síntesis de polisacáridos, y la formación de la pared celular se detiene produciendo rompimiento de las puntas de las hifas; todo esto produce la reducción del crecimiento del hongo e incluso su muerte (Moore, 1981).

Se han reportado mutantes resistentes a 2DG en los que se presentan asociados a tal resistencia efectos pleiotrópicos sobre el funcionamiento de las proteínas de transporte de la membrana celular y los fenómenos de represión general por glucosa (Entian, 1981; Entian y Mecke, 1982; Allen y col., 1989).

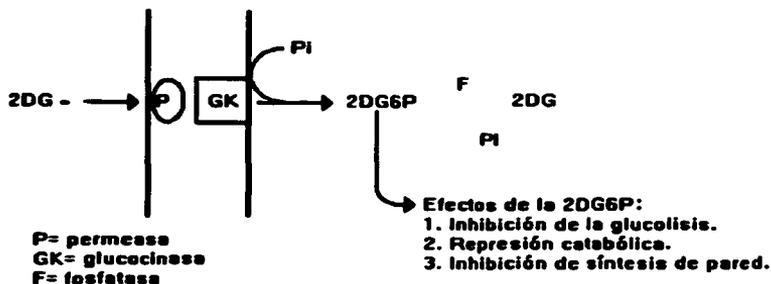
Sin embargo, el crecimiento de los hongos filamentosos no es inhibido uniformemente por la 2DG; se han reportado cepas resistentes de *N. crassa*, *A. nidulans* y *A. niger*; e incluso puede ser

metabolizada por otras y ser usada como única fuente de carbono; como es el caso de algunas especies de *Aspergillus* sp (Moore, 1981; Allen y col., 1989; Antier y col., 1993a).

Los mecanismos de resistencia a 2DG en hongos filamentosos, han sido estudiados principalmente en *N. crassa* y *A. nidulans*, y al parecer existen 3 métodos de resistencia en las cepas aisladas como resistentes a 2DG en estos microorganismos que son: 1) No permitir el ingreso de la 2DG a la célula; 2) Fosforilar deficientemente la 2DG; 3) Desfosforilar la 2DG dentro de la célula y evitar así la acumulación de la 2DG6P; además de la utilización como fuente de carbono ya citada. Las mutaciones que confieren resistencia a 2DG en *N. crassa* han sido localizadas en 4 locii diferentes pertenecientes al menos a tres cromosomas distintos, lo que indica que los fenómenos de resistencia son variados y posiblemente actúan a diferentes niveles (Moore, 1981; Allen y col., 1989).

Figura 3. Mecanismos de resistencia a 2DG en Hongos Filamentosos.

MECANISMOS PROPUESTOS DE RESISTENCIA 2DG EN HONGOS FILAMENTOSOS (Moore, 1981; Allen, 1989)



2.8 Obtención de pectinasas de *A. niger*.

Existe un gran interés en la utilización de *A. niger* para transformar desechos agro-industriales en metabolitos de valor comercial por medio de fermentación en medio sólido, principalmente por que se ha reportado que el método de cultivo sólido imparte algunas características diferentes a los microorganismos en comparación con el cultivo líquido, entre ellas algunas enzimas que son intracelulares en cultivo líquido se excretan al medio en cultivo sólido facilitando su recuperación. Algunas enzimas no presentan represión catabólica en cultivo sólido y presentan también características modificadas, en especial la termorresistencia y diferentes patrones de glicosilación (Hesseltine 1972, Moo-Young, 1983; Tengerdy, 1985; Grajek y Gervais, 1987; Viniegra, 1988; Pandey, 1992; Shankaranand y col., 1992; Solis-Pereira y col., 1996; Acuña-Argüelles y col., 1995).

Existen dos sistemas de cultivo para la obtención de enzimas de hongos filamentosos que son el cultivo líquido o fermentación sumergida en la que la cantidad de agua es tal que el sustrato se halla en suspensión y el cultivo o fermentación sólida en el cual el crecimiento del microorganismo se da sobre una matriz sólida con una cantidad de agua tal que no excede la capacidad de retención de dicha matriz (Hesseltine, 1974)

La fermentación sumergida se da en una matriz líquida, lo que da homogeneidad al medio facilitando el control de la fermentación, además los desechos metabólicos y el calor se dispersan fácilmente por lo que no son un limitante al crecimiento del microorganismo; mientras que el medio de cultivo sólido es heterogéneo dificultando tanto el control como la dispersión de los limitantes de crecimiento, los hongos crecen en contacto directo con el sustrato dificultando la estimación de la biomasa (Rimbault, 1981).

Muchos microorganismos pueden crecer en fermentación en medio sólido pero los hongos filamentosos han sido los mas empleados a nivel industrial. De entre todos los hongos filamentosos que han obtenido importancia económica se encuentran los Phycomicetos (géneros *Mucor* y *Rhizopus*), los Basidiomicetos y los Ascomicetos (*Aspergillus* y *Penicillium*), que producen proteínas,

biomasa, enzimas (amilasas, pectinasas, galactosidasas e invertasas) y antibióticos (Moo-Young y col., 1983) .

La mayor diferencia entre ambos sistemas de cultivo desde el punto de vista fisiológico para los microorganismos lo constituye la cantidad de agua disponible para su crecimiento es decir la actividad de agua (a_w). Scott en 1950 definió la actividad de agua como el resultado de la división de la presión de vapor de agua de un sustrato entre la presión de vapor del agua, al multiplicar este valor por 100 se obtiene la humedad relativa de la atmósfera que esta en equilibrio con la del sustrato. La razón por la cual es mejor utilizar a_w que contenido de agua al definir el crecimiento microbiano es por que los microorganismos no reconocen el contenido de agua del material, sino el contenido de agua utilizable el cual es fácilmente medible con un aparato específico que mide la presión de vapor emitido por una muestra específica. (Hahn, 1986)

Los efectos que se derivan de una disminución en la actividad de agua sobre los microorganismos son múltiples y han sido estudiados incluyendo la acumulación de metabolitos osmorreguladores y compatibles como aminoácidos neutros, KCl y betaina en bacterias y polioles como arabitól, xilitol y glicerol en eucariotes. También se han encontrado modificaciones en el transporte de azúcares, la composición de la pared, la membrana celular y en la actividad enzimática (Grajek, 1984; Gervais, 1988; Hahn, 1986; Maldonado y col, 1989; Pandey, 1992; Prior, 1990). Mientras las bacterias y las levaduras requieren de alta actividad de aguas, los hongos filamentosos pueden crecer a a_w de hasta 0.85, y son microorganismos favorables para la fermentación sólida. Pandey (1992) y Hahn (1986) reportan que una baja a_w favorece la germinación y el crecimiento miceliar de los hongos (Hahn, 1986; Pandey, 1992; Raimbault, 1981).

3 ANTECEDENTES DE ESTE TRABAJO.

En el laboratorio de enzimología industrial de la UAM-I se han realizado estudios sobre la fisiología y mejoramiento genético de *A. niger* para obtener mutantes sobreproductores de pectinasas en fermentación sólida, debido principalmente a las características novedosas que se pueden observar en este medio.

Antier y col.(1993a) utilizaron una cepa silvestre de *A. niger* denominada C28B25 que fue aislada de un cafetal del estado de Chiapas por Aquíhualt y col. (1987) como sobreproductora natural de pectinasas en cultivo sólido. Esta cepa fue mutagenizada por medio de radiación UV, las esporas mutagenizadas se germinaron en dos lotes: uno en agar con $a_w = 0.99$ y otro en agar con $a_w = 0.96$ deprimida con etilenglicol. A ambos lotes se les añadió 2-desoxiglucosa para aislar cepas con desrepresión catabólica. A las mutantes obtenidas se les determinó la actividad pectinolítica mediante la detección de halo de hidrólisis en placas de agar con pectina y las que presentaron mejor relación halo de hidrólisis/tamaño de colonia fueron seleccionadas para determinar sus niveles de producción de las enzimas en medios líquidos y sólidos.

Las cepas aisladas en medio con $a_w = 0.99$ resultaron ser hiperproductoras en cultivo líquido mientras que en pulpa de café ($a_w=0.96$) presentaron niveles de producción menores al de la cepa silvestre (C28B25). En tanto las cepas mutantes aisladas en a_w deprimida presentaron sobreproducción en medio sólido y menor producción que la cepa C28B25 en cultivo líquido. Las cepas aisladas en medio con $a_w = 0.99$ se denominaron serie DGRAW99 (resistentes a desoxiglucosa en medio con $a_w = 0.99$) y las obtenidas en medio con $a_w = 0.96$ se les llamó DGRAW96 (resistentes a desoxiglucosa en medio con $a_w = 0.96$) (Antier y col., 1993b; Minjares, 1992).

En un estudio genético realizado por Loera (1994) sobre las mutantes obtenidas por Antier y col.(1993a) se obtuvieron una cepa diploide a partir de las cepas mutantes DGRAW99-III (sobreproductora de pectinasas en medio líquido y resistente a 2DG) y la cepa mutante DGRAW96-4 (sobreproductora de pectinasas en medio sólido y resistente a 2DG), la cual presentó una sensibilidad

a la 2-desoxiglucosa igual a la de la cepa silvestre C28B25 y sobreproducción de pectinasas en medio líquido.

Estos resultados indican que, la mutación de resistencia a 2-desoxiglucosa es diferente para cada una de las mutantes, mientras que la mutación responsable de la sobreproducción de pectinasas presenta dominancia. Por lo tanto, es importante determinar si se trata de una mutación puntual pleiotrópica o si son dos mutaciones diferentes lo que da estas características a las mutantes ya que esto definirá la estrategia subsecuente para el mejoramiento de las cepas.

4 HIPOTESIS DE TRABAJO:

En base al marco teórico se proponen las siguientes hipótesis:

- 1- Suponemos que las cepas aisladas por Antier y col.(1993a) presentan el fenotipo de AW96 o AW99 causado por mutaciones pleiotrópicas que confieren resistencia a 2DG y desrepresión de la síntesis de alguna enzima.
- 2- Las mutaciones pueden ser distintas para las cepas especializadas en fermentación sólida y en fermentación líquida, (AW96 y AW99) respectivamente.
- 3- El análisis genético es capaz de distinguir estas alternativas

La demostración de estas hipótesis permitirá sistematizar la búsqueda y la modificación de los mecanismos regulatorios para la síntesis de las enzimas, facilitando la obtención de cepas sobreproductoras de interés industrial.

La caracterización genética de cepas resistentes a 2DG y sobreproductoras de pectinasa ayudará a este fin, como lo demuestran los resultados obtenidos al analizar las mutaciones *cre* (Dowser y col. 1991) en ese estudio se demostró la presencia de un represor común a diversos sistemas productivos, este conocimiento ha permitido obtener mutantes de este tipo que son de gran interés para aumentar la producción de enzimas y antibióticos

5 OBJETIVOS.

En este trabajo pretendemos contestar la siguiente pregunta: ¿A nivel genético cual es la relación entre la resistencia a 2DG y la sobreproducción de pectinasas en distintas cepas AW96 y AW99 derivadas de C28B25?

La estrategia experimental que seguimos, consiste en utilizar el ciclo parasexual de *A. niger* para realizar cruza entre cepas con diferentes grados de resistencia a 2DG. El comportamiento exhibido por las cepas diploides podría dar una primera indicación acerca del tipo de mutación responsable de la resistencia a 2DG en las cepas resistentes. Posteriormente se realizó la haploidización de las cepas diploides, para analizar los patrones de segregación de la resistencia a 2DG. Esto podría dar una indicación acerca de la ubicación y tipo de mutación responsable de la resistencia a 2DG en medio sólido y en medio líquido. Además estos experimentos podrán aportar información acerca de la regulación de síntesis de proteínas inducibles en medio sólido y líquido, tanto en las cepas diploides, como en las cepas segregantes.

La estrategia ideal sería la obtención de una cepa maestra isogénica a las mutantes, pero la obtención requiere demasiado tiempo, por lo que nos limitaremos a la obtención de una serie de cepas con marcadores individuales que permitan entre otros estudios el mapeo de las mutaciones responsables de la resistencia a 2DG y la sobreproducción de pectinasas en las cepas mutantes y después puedan utilizarse para la obtención de una cepa maestra por recombinación mitótica.

Cabe aclarar que en este estudio no se pudo utilizar la cepa maestra de *A. niger* 350-52 donada por el grupo de Wageningen, debido a que Loera (1994) no pudo obtener heterocariones con ninguna de las cepas derivadas de *A. niger* C28B25, lo cual indica que pertenece a otro grupo genético, incompatible con el de C28B25. Por ello se tuvieron que desarrollar mutantes auxotróficas nuevas derivadas de C28B25.

Para cumplir con lo anterior se proponen los siguientes objetivos:

- 1) Obtención de cepas derivadas de la silvestre C28B25 portadoras de marcadores genéticos adecuados tales como, la auxotofias y la resistencia a acriflavina, oligomicina y clorato.**
- 2) Realizar el análisis de haploidización de cepas diploides resultantes de la cruce de las cepas portadoras de marcadores con las cepas DGRAW99-IIIARG- y DGRAW96-IIIARG- obtenidas por Loera (1994) a fin de obtener las proporciones de segregación de unas mutaciones con respecto a los marcadores y llevar a cabo el mapeo de las mutaciones de resistencia a 2DG y la sobreproducción de pectinasas en uno y otro medio.**

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 CEPAS UTILIZADAS.

En la tabla 2 se muestran las cepas de *A. niger* utilizadas en este estudio, sus características y su origen.

Tabla 2. Cepas de *A. niger* utilizadas en este estudio.

Cepa	Características genéticas	Origen
C28B25	Tipo silvestre	Aislada de Chiapas por Aquihuatl y col.(1988)
AW96-4	arg-	Loera (1994).
AW99-iii	argB-	Loera (1994).
SG53	pro-	Este estudio
SG5	conidias de color verde oliva	Este estudio
SG6	conidias de color carne	Este estudio

Todas las cepas se derivan de la silvestre C28B25. Todas las cepas fueron inoculadas en PDA, y se encuentran depositadas en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de Hongos Filamentosos de la UAM-Iztapalapa, conservadas a 4° C.

6.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

El medio mínimo empleado constó de la siguiente composición (g/l): NaNO_3 6.0, KH_2PO_4 1.52, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.52, KCl 0.52, FeSO_4 0.001, MnSO_4 0.001, CuSO_4 0.001, ZnCl 0.001; Se utilizaron como fuentes de carbono (g/l): glucosa 10.0, pectina 1.0, almidón soluble 10.0, sacarosa 10.0 o cada uno de estos azúcares más glucosa 10.0. El medio completo contenía además (g/l): bactopectona 2.0, hidrolizado de caseína 1.5 y extracto de levadura 1.0. Para el cultivo de cepas auxótrofas se suplementaron los medios ya estériles con prolina 40 mg/l o arginina 700 mg/l, esterilizadas por filtración. A menos que se indique lo contrario el medio mínimo y completo

utilizaron glucosa como fuente de carbono. El medio utilizado para el aislamiento de cepas auxótrofas, se suplementó con casaminoácidos a 250 mg/l. Todos los medios se ajustaron a un pH de 5.5, y para el cultivo en placa se agregó agar 15 g/l; todos los medios se esterilizaron por 10 minutos a 10 libras de presión. Los cultivos en líquido se inocularon con 2×10^5 esp/ml, la siembra en placa se realizó por picadura con palillo; en todos los casos se incubó a 30°C por 72 horas

6.3 OBTENCIÓN DE ESPORAS.

Para la obtención de esporas se sembró en PDA por 72 horas, la cosecha se realizó dispersando las esporas por medio de un agitador magnético en agua con Tween 20 al 0.01% por 5 min. La cuenta de las esporas se realizó por medio de una cámara de Neubauer al microscopio y se realizaron las diluciones necesarias con agua destilada.

6.4 MUTAGÉNESIS.

La mutagénesis se realizó por medio de radiación ultravioleta lejana (254 nm) utilizando una Lámpara mineralight UVG-54 (Ultraviolet Products Inc. USA) con una intensidad de 700 mW/cm^2 a 10 centímetros de la caja Petri durante 5 minutos. La densidad de esporas utilizadas durante la mutagénesis, fue de 6×10^6 esporas por ml, las esporas irradiadas fueron cultivadas en medio mínimo más glucosa por 72 horas.

6.5 METODOS DE ENRIQUECIMIENTO.

Los métodos de enriquecimiento utilizados fueron, el enriquecimiento por filtración reportado por Bos y col. (1987) según el cual se sembró la suspensión de esporas irradiadas en medio líquido mínimo con glucosa a una densidad de 25000 esporas/ml, y se filtró a través de fibra de vidrio cada 8 horas durante 24 horas tras lo cual las esporas que no germinaron se resembraron en medio completo con glucosa. Las colonias con crecimiento en este medio se probaron en medio mínimo con glucosa suplementado con aminoácidos. El segundo método empleado fue una modificación del método

reportado por Ditchburn (1971) en el cual se precultivó a las esporas con una densidad de siembra de 2500 esp/ml por 5 horas en medio mínimo sin fuente de nitrógeno, después se añadió el NaNO_3 6.0 g/l y se cultivó de 0,3, 5, 7 y 9 h más, tras esto se añadió nistatina en concentraciones de 0, 50, 70 90, 110 y 130 U/ml y se incubó por 19 h, después las esporas se sembraron en placa con medio completo con glucosa con una densidad de 250 esp/placa. Se determinó el porcentaje de colonias sobrevivientes de una población de esporas silvestres, tratando de encontrar la combinación de tiempo y dosis mínima que permitiera obtener una mortalidad del 99%. Tras esto se realizó el proceso de enriquecimiento con esporas irradiadas usando una preincubación de 5 h en medio mínimo sin nitrógeno, 5 h tras la adición de nitrógeno, se añadieron 90 U/ml de nistatina al cultivo, se incubó por 19 h en matraz y se sembró en placa con medio completo, en todos los casos se utilizaron las mismas densidades de cultivo.

6.6 DETERMINACIÓN DE LA AUXOTROFÍA DE LAS CEPAS OBTENIDAS.

Tras el proceso de enriquecimiento por filtración y tratamiento con nistatina, se aislaron las posibles mutantes auxotrofas que se desarrollaron en medio completo después de la filtración. Se realizó el proceso de replica en terciopelo y se aislaron las colonias que no se desarrollaron en medio mínimo después de 72 horas. La cepas obtenidas se sembraron en medio mínimo suplementado con aminoácidos, por último se realizó un análisis para determinar el aminoácido limitante del desarrollo de la cepa auxotrofa, de acuerdo con la tabla 3:

Tabla 3. Combinaciones de aminoácidos utilizados para determinar el aminoácido responsable de la auxotrofia (Gunasekaran, 1995).

	MEZCLA 1	MEZCLA 2	MEZCLA 3	MEZCLA 4
MEZCLA 5	met	thr	leu	asn
MEZCLA 6	arg	lis	his	trp
MEZCLA 7	phe	val	gly	cys
MEZCLA 8	glu	asp	pro	ala

La concentración final de los aminoácidos fue de 25 $\mu\text{g/ml}$, excepto thr 200, val 150, asp, glu 100, phe 50, pro 40, lis y leu 30.

6.7 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A OLIGOMICINA Y ACRIFLAVINA.

La determinación de la resistencia a acriflavina se realizó por la siembra por picadura en medio completo con 0.1 g/l de acriflavina o 0.1g/l de oligomicina, de cada una de las cepas silvestre y auxótrofas obtenidas hasta el momento. Después de 72 horas de incubación a 30°C, se determinó el diámetro de las colonias desarrolladas y se comparó con el de la cepa C28B25 en medio completo.

6.8 MÉTODO DE HETEROCARJOTIZACIÓN.

La obtención de heterocariones se realizó de acuerdo al método de complementación reportado por Pontecorvo y col.(1953a) y modificado por Bos y col.(1988), que consiste en cultivar esporas de dos cepas auxótrofas complementarias con una concentración de 1×10^9 esp/ml en medio completo por 24 horas; tras este periodo de tiempo se separa el micelio formado, y se lave con agua destilada estéril, se cortan las orillas y se resiembran en medio mínimo por 72 horas, después de esto se eligieron las colonias con crecimiento vigoroso, y se obtuvo micelio joven para resembrarlo en medio mínimo.

6.9 AISLAMIENTO DE DIPLOIDES.

La obtención de diploides se realizó de acuerdo al método de Bos y col. (1988), se cultivo el micelio heterocarión en medio mínimo por 72 horas a 30°C, tras la esporulación se cosecharon las esporas y se filtraron a través de fibra de vidrio para separar el micelio y se sembraron en placa con medio mínimo por picadura, las colonias que se desarrollaron se aislaron como cepas diploides.

6.10 OBTENCIÓN DE LOS PATRONES DE RESISTENCIA A 2DG DE LAS CEPAS.

Las cepas se inocularon por picadura en medio mínimo con pectina (suplementado con arginina o prolina en caso necesario) mas 2DG en las concentraciones indicadas para cada experimento, y se

incubaron por 60 horas a 30° C, después de este tiempo se midió el diámetro de las colonias desarrolladas, para comparar con respecto al diámetro de la colonia de la cepa silvestre.

6.11 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS DE LAS CEPAS.

En el caso del cultivo en placa se utilizaron placas para de cultivo de tejidos con 16 pozos de 2.5 cm de diámetro, con 3ml de medio completo con pectina y pectina más glucosa inoculadas por picadura. Se extrajeron los 3 ml de agar del cultivo de la caja y se maceraron por 3 minutos en 5 ml de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.5, se separó el sobrenadante al cual se le determinó la actividad. En el caso del cultivo líquido se filtró el medio para separar el micelio y se determinó la actividad del sobrenadante.

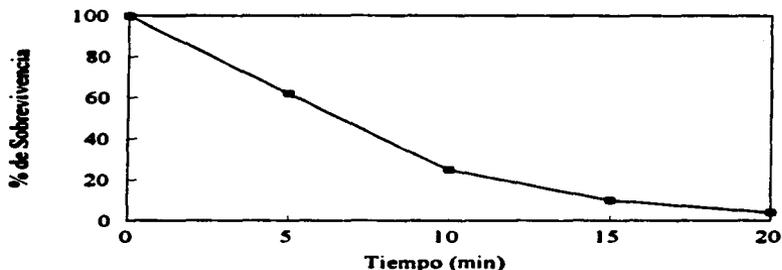
6.12 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS EXTRACTOS.

En el caso de la determinación de actividad enzimática de cultivos en placa se siguieron dos métodos, en el primero se determinó el halo de hidrólisis de pectina por reacción rojo de rutenio, y en el caso de la amilasa con lugol. En el segundo método, el ensayo de la actividad de pectinasa, amilasa e invertasa, se realizó incubando 0.3 ml del extracto enzimático con 0.7 ml de buffer de acetatos 0.1 M pH 5.5 y 1 ml de solución de pectina, almidón o sacarosa al 10% (P/V) respectivamente, y se determinó la concentración de azúcares reductores liberados por el método de ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959). La actividad enzimática se reporta como U/ml de extracto.

7 RESULTADOS

7.1 OBTENCIÓN DE LA CURVA DE MORTALIDAD DE *A. niger* CON UV.

Gráfica 1. Porcentaje de colonias desarrolladas por placa tras exposición a UV



En la gráfica 1, se muestra el porcentaje de germinación las esporas de *A. niger* contra el tiempo de exposición a luz ultravioleta, tras 3 días de incubación en medio completo. A los 5 minutos de exposición se observa una viabilidad del 60%, a los 10 minutos se observa un porcentaje de supervivencia del 25%, a los 15 minutos se disminuye al 10% y a los 20 minutos es de solo el 5%. Es interesante observar que tras una rápida disminución de la viabilidad en los primeros 10 minutos, se ve una disminución en la mortalidad de las esporas, lo que indica una relación exponencial $f = e^{-D \cdot D_0}$ que es la usual en curvas de mortalidad, donde D es la dosis (tiempo) de exposición al mutágeno (Bos, 1986).

7.2 OBTENCIÓN DE LAS DOSIS DE NISTATINA NECESARIAS PARA LLEVAR A CABO EL PROCESO DE ENRIQUECIMIENTO.

Después de la irradiación, las esporas se cultivaron por un ciclo de vida en caja de petri, se cosecharon, se filtraron para separarlas del micelio y se inocularon en matraz Erlenmeyer por tiempos variables en medio mínimo sin nitrógeno, se añadió la nistatina en concentraciones variables (50-130 U/ml) y se incubó por 19 h más, tras esto se sembraron 250 esporas por caja de petri con medio completo. De acuerdo con Ditchburn y col. (1971) la nistatina se une a las membranas de las esporas protótrofas en germinación, por lo que pierde actividad durante los primeros momentos del cultivo y no afecta a las cepas auxótrofas que germinen en el medio completo. Los resultados se reportan a continuación.

Tabla 4 Efecto del tiempo de preincubación y dosis de nistatina sobre la germinación de esporas de *A. niger* C28B25.

Concentración de nistatina (U/ml)	0 %	Tiempo de 3	de 5	Preincubación 7	(hrs) 9
		de	sobrevivencia	cia	
0	100	100	100	100	100
50	29.82	13.56	9.23	16.9	10.53
70	12.28	5.08	6.15	5.63	8.77
90	7.01	5	1.53	4.22	7.01
110	1.75	3.39	1.5	2.81	5.26
130	1.7	1.69	1.5	0	0

En la tabla 4 se observa con 50 U/ml de nistatina a tiempo 0 se obtuvo una sobrevivencia del 30%, mientras que a 9 hrs se obtuvo el 10.5% de sobrevivencia; al usar 130 U/ml de nistatina el porcentaje de sobrevivencia es del 1.7, y al preincubar por 9 hrs es del 0%; Mientras que con 90 U/ml de nistatina se obtuvo una supervivencia del 7.01% a 0 y 9 hrs; pero con una preincubación de 5 hrs

el porcentaje de supervivencia fue del 1.5%. Debido a que este tiempo y dosis fueron los menores para obtener una mortalidad mayor al 95%, se utilizaron para realizar el proceso de enriquecimiento.

7.3 OBTENCIÓN DE CEPA MUTANTES POR PROCESOS DE ENRIQUECIMIENTO

Se realizaron varios procesos paralelos de enriquecimiento por filtración y tratamiento con nistatina y de estas experiencias se aislaron 108 posibles mutantes auxótrofos que se desarrollaron en medio completo con glucosa después de la filtración en un caso (56 colonias) o la aplicación de nistatina en el otro (52 colonias), al realizar el proceso de replica en terciopelo se aislaron 6 colonias que no se desarrollaron en medio mínimo con glucosa (MMG) después de 72 hrs, al obtener las cepas aisladas para confirmar la auxotrofia, una de las cepas no se desarrollo en medio MCG y de las 5 restantes 4 se desarrollaron bien en medio MMG, por lo cual fueron eliminadas.

La única cepa restante fue obtenida por el método de enriquecimiento por filtración, se le sembró en medio mínimo suplementado con aminoácidos, en donde se desarrollo satisfactoriamente; a esta cepa se le denominó SG53; y se sembró la cepa en medio mínimo más diferentes mezclas de aminoácidos, de este análisis resultó la tabla 5:

Tabla 5. Crecimiento de la auxótrofa de *A. niger* SG53 en MMG complementado con aminoácidos

	MEZCLA 1	MEZCLA 2	MEZCLA 3	MEZCLA 4
MEZCLAS	-	-	+	-
MEZCLA 6	-	-	+	-
MEZCLA 7	-	-	+	-
MEZCLA 8	+	+	+	+

Clave: (+) crecimiento; (-) sin crecimiento. En todos los casos se analizó el crecimiento tras 72 hrs de incubación, la siembra se realizó por replica a partir de una siembra en MCG. El contenido de aminoácidos de cada mezcla se encuentra especificado en la sección de "material y métodos".

En la tabla 5 se muestra el crecimiento de la cepa SG53 en caja de petri para determinar su auxotrofia. Se observa que solo hay crecimiento en las cajas de la mezcla 3 que contienen leu, his, gly y pro, y la mezcla 8 que contiene glu, asp, pro, y ala. Debido a que el único aminoácido en común en los dos grupos es la prolina, podemos afirmar que la cepa SG53 es auxótrofa a prolina. Esta cepa se aisló por cultivo en caja de petri y se sembró para su conservación en PDA .

De las cepas que se descartaron en el primer paso de crecimiento en MMG, como no auxótrofas, se localizaron 3 cepas de color diferente al resto y se procedió a su aislamiento, obteniéndose cepas de color carne (SG6), verde oliva (SG5) y una mosaico con conidias de color negro y carne, que se desarrollaron bien en MMG.

A todas las mutaciones se les realizo una prueba de estabilidad consistente en resembrarla durante 3 ciclos de 72 hrs en MCG, y posteriormente se resembraron en MMG, sin observar cambios ni en la coloración, ni en la capacidad para esporular de ninguna de las cepas.

7.4. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE RESISTENCIA A 2-DESOXIGLUCOSA (2DG) DE LAS CEPAS MUTANTES.

En la tabla 6 se presentan los resultados de la resistencia a 2DG de las cepa a utilizar en este estudio.

Tabla 6 Patrón de resistencia a 2-Desoxiglucosa de las cepas mutantes de *A. niger*.

CEPA	CONCENTRACIÓN DE 2DG (g/l)				
	0.0	0.2	0.5	1.0	5.0
C28B25	++	-	-	-	-
SG53 ⁻	++	-	-	-	-
SG6	++	++	+	-	-
SG5	++	+	-	-	-
AW96-4	++	++	++	++	+
AW99-iii	++	++	++	+	-

++crecimiento similar al del control. + crecimiento menor al del control. - sin crecimiento.

Se consideró necesario el que las cepas fuesen sensibles a 2DG para poder estudiar la segregación de este carácter al mezclarlas con las cepas aisladas por Loera (1994). Se observa en la Tabla 6 que la única cepa que conserva la misma sensibilidad a 2DG de la cepa C28B25 es la SG53, mientras que las cepas SG5 y SG6 presentan problemas de crecimiento a 0.2 y 0.5 g/l respectivamente, también se muestra que los niveles de resistencia de las cepas aisladas por Loera (1994) siguen siendo altos, lo que permite utilizar las cepas para llevar a cabo el análisis genético. De paso, cabe señalarse que esta última observación indica una gran estabilidad de las mutaciones dgr aisladas por Antier y col. (1993a), pues han sido cultivadas y estudiadas en múltiples ocasiones sin cambio en este fenotipo

7.5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE REPRESIÓN DE LA SÍNTESIS DE PECTINASAS POR LAS CEPAS MUTANTES.

Para determinar los niveles de represión catabólica de las cepas, se sembraron en medio mínimo con glucosa, medio mínimo con pectina y medio mínimo con pectina mas glucosa, en caja de petri, tras 3 días de cultivo se determinó el diámetro de la colonia formada y se comparo con el del halo de hidrólisis obtenido.

Tabla 7. Efecto de la fuente de carbono en el diámetro de las colonias y de las zonas de hidrólisis de pectina.

Cepa	Diámetro (mm)	Medio mínimo suplementado con		
		Glucosa	Pectina	Pect+glc
C28B25	Colonia	35	20	25
	Halo	0	35	0
SG53	Colonia	25	15	15
	Halo	0	35	0
AW99-iii	Colonia	30	25	40
	Halo	0	35	40
AW96-4	Colonia	35	25	50
	Halo	0	35	52

Se presenta el promedio de tres ensayos.

En la tabla 7 se muestra el diámetro de las colonias de mutantes de *A. niger* C28B25, SG53, AW 99-iii, AW96-4. Las cepas se cultivaron en medio mínimo con glucosa, pectina y pectina con glucosa como fuente de carbono.

Se observa que la cepa silvestre C28B25 presentó un diámetro de colonia de 35 mm en glucosa, al cultivarla en medio con pectina el diámetro de la colonia disminuyó a 20 mm y el diámetro del halo de hidrólisis fue de 35 mm. En el medio con pectina mas glucosa la colonia creció 25 mm y el halo fue indetectable. La cepa SG53 presentó un comportamiento muy parecido en todos los medios.

La cepa AW99-iii en medio con pectina y glucosa presentó un diámetro de 40mm y un halo de hidrólisis del mismo tamaño. La cepa AW96-4 desarrolló una colonia de 50 mm de diámetro y un halo de hidrólisis de 52 mm. Estas dos ultimas cepas presentaron diámetros de colonia mayores al de las dos anteriores y sobre todo desarrollaron halo de hidrólisis en medio con pectina y glucosa, lo que no hicieron las dos primeras cepas.

7.6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE REPRESIÓN DE LA SÍNTESIS DE AMILASAS POR LAS CEPAS MUTANTES.

Para determinar si las cepas presentaban diferentes niveles de represión en distintas enzimas se realizo el mismo análisis que en el experimento anterior utilizando almidón en lugar de pectina como inductor.

En la tabla 8 podemos observar que la cepa C28B25 desarrolló una colonia de 20 mm de diámetro en medio con glucosa, en medio con almidón el diámetro de la colonia fue de 16 mm al igual que el halo. En almidón mas glucosa el diámetro de la colonia fue de 25 mm y no se detecto halo de hidrólisis. El comportamiento de la cepa SG53 fue muy parecido. Pero las cepas AW99-iii y AW96-4 en medio con almidón y glucosa formaron colonias mayores 42 y 40 mm respectivamente con halos del mismo tamaño.

Tabla 8. Efecto de la fuente de carbono en el diámetro de las colonias y en las zonas de hidrólisis de almidón.

Cepa	Diámetro (mm)	Medio mínimo suplementado con		
		Glucosa	Almidón	Alm+glc
C28B25	Colonia	20	16	25
	Halo	0	16	0
SG53	Colonia	15	12	15
	Halo	0	15	0
AW99-iii	Colonia	25	25	40
	Halo	0	25	40
AW96-4	Colonia	20	32	42
	Halo	0	35	42

Se presenta el promedio de tres ensayos.

7.7. OBTENCIÓN DE CEPAS RESISTENTES A ACRIFLAVINA Y OLIGOMICINA.

La resistencia a antibióticos a sido ampliamente utilizada como marcador genético, ya que permite realizar la selección de cepas heterocarióticas y diploides. Este análisis se realizó al añadir 100 µg/ml de acriflavina o 100 µg/ml de oligomicina en medio completo (MC), para obtener cepas mutantes resistentes de *A. niger* a partir de las cepas disponibles.

En la tabla 9 se presenta el patrón de resistencia de las cepas de *A. niger* utilizadas en este estudio con la mayor dosis empleada, se puede observar que todas las cepas se desarrollan bien en presencia de la acriflavina en especial la silvestre C28B25 que se desarrolla mejor que en ausencia de la acriflavina, mientras que la cepa SG5 es la que mejor se desarrolla en presencia de oligomicina, mejorando su crecimiento de medio completo. Este comportamiento se sale por completo de lo esperado, primero porque ninguna cepa presenta disminución en el crecimiento con respecto al control y después, porque ni Pontecorvo y col. (1953a), ni Bos y col. (1987) reportan el hallazgo de cepas silvestres resistentes a oligomicina o acriflavina.

Tabla 9. Resistencia a acriflavina y oligomicina de las cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	MC	MC+Acriflavina.	MC+Oligomicina
C28B25	+	++	+
AW96-4	+	+	+
AW99-iii	+	+	+
SG53	+	+	+
SG5	+	+	++
SG6	+	+	+

++ crecimiento mayor al del control; +crecimiento similar al del control. Los antibióticos fueron usados en una concentración de 100 µg/ml. en medio completo.

7.8. DETERMINACION DE LOS PATRONES DE RESISTENCIA A 2DG DE LAS CEPAS HETEROCARIOTICAS.

Para poder determinar los patrones de dominancia/recesividad de las mutaciones de resistencia a 2DG, se pudieron obtener cepas heterocariontes a partir de las cepas auxótrofas resistentes a 2DG con la cepa SG53 auxótrofa a prolina y sensible a 2DG.

Los heterocariontes de las cepas AW96-4 con SG53, AW99-iii con SG53 y AW99-iii con AW96-4, se purificaron y conservaron por medio de sucesivas resiembras del micelio antes de esporular. Los heterocariontes fueron denominados H1, H3 y H4, respectivamente.

En la tabla 10 se presentan los niveles de resistencia a 2DG de las cepas parentales y heterocarióticas.

Se observa que el heterocarión H1 (SG53 X AW96) presenta crecimiento hasta una concentración de 2DG de 0.5 g/l. El heterocarión H3 (SG53 X AW99-iii) se desarrolla hasta una concentración de 2DG de 0.2 g/l. Es decir ambos heterocariontes presentan un patrón de resistencia

aproximadamente intermedio al de las cepas parentales. Mientras que el heterocarión H4 es sensible a 2DG.

Tabla 10. Patrón de resistencia a 2-Desoxiglucosa de los micelios heterocariontes.

CEPA	Concentración de 2DG (g/l).				
	0.0	0.1	0.2	0.5	1.0
SG53	+	-	-	-	-
AW96-4	+	+	+	+	+
H1	+	+	+	+/-	-
SG53	+	-	-	-	-
AW99-iii	+	+	+	+	+/-
H3	+	+	+/-	-	-
AW99-iii	+	+	+	+	+
AW96-4	+	+	+	+	+/-
H4	+	-	-	-	-

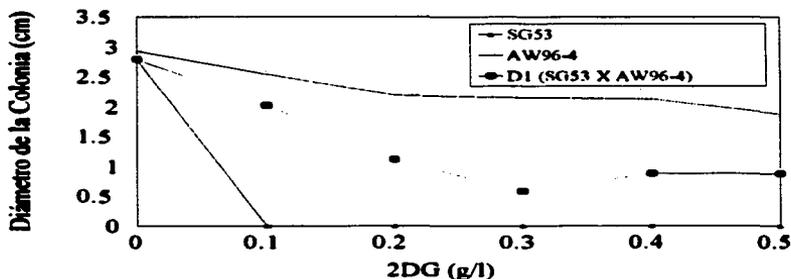
+crecimiento similar al del control. +/- crecimiento menor al del control. - sin crecimiento.

7.9 OBTENCIÓN DE LAS CEPAS DIPLOÍDES A PARTIR DE LOS HETEROCARIONES AISLADOS.

Para obtener las cepas diploides se llevo a cabo el protocolo reportado por Bos y col (1988). Las cepas aisladas por este método generaron colonias capaces de crecer en medio mínimo por lo que se consideró que eran cepas diploides. Las cepas aisladas de la cruz de SG53 X AW 96-4; SG53 X AW 99-iii y AW96-4 X AW 99-iii (obtenida por Loera, 1994). se denominaron D1, D3 y D4 respectivamente.

Se determinó además la resistencia a 2DG de las cepas diploides y se comparó con las cepas parentales.

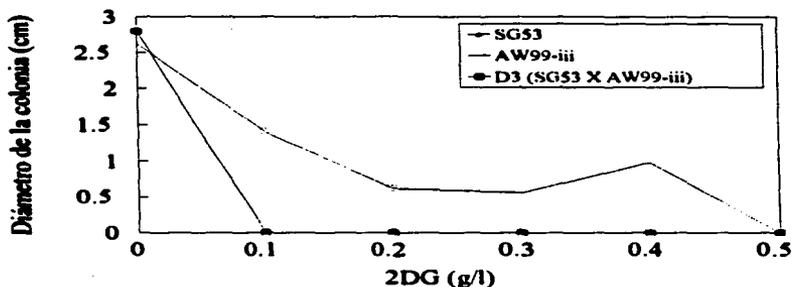
Gráfica 2. Niveles de resistencia a 2DG de las cepa D1 y sus parentales.



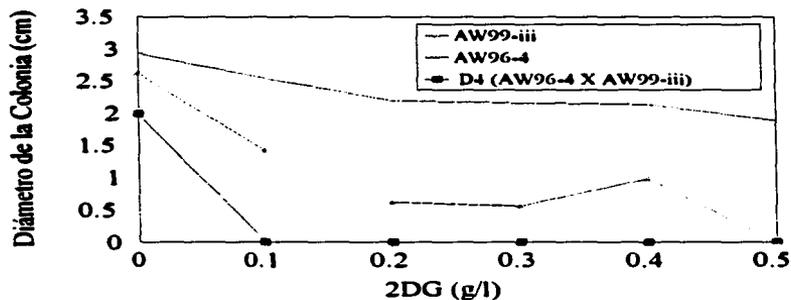
En la gráfica 2, se muestra la resistencia a 2DG de la cepa diploide D1 y sus parentales. La cepa SG53 se muestra sensible a la 2DG, ya que no crece a 0.1 g/l. La cepa AW96-4 tiene poco cambio en el diámetro de la colonia en presencia de la 2DG y a partir de 0.2 g/l se forma una meseta en la gráfica que disminuye un poco a 0.5 g/l. La diploide D1 se comporta de manera intermedia con una fuerte disminución en el diámetro de la colonia hasta 0.3 g/l de 2DG, pero a concentraciones mayores no se muestra cambio en el tamaño de la colonia.

En la gráfica 3, se muestra el patrón de resistencia a 2DG de las cepas SG53, AW99-iii y D3. La cepa AW99-iii presenta disminución en el tamaño de la cepa hasta 0.2 g/l de 2DG y forma posteriormente una meseta hasta 0.4 g/l, donde presenta un ligero aumento en el diámetro de la colonia y a 0.5 g/l ya no se desarrolla. La diploide D3 se muestra sensible a la presencia de 2DG en el medio, al igual que SG53.

Gráfica 3. Niveles de resistencia a 2DG de las cepas D3 y sus parentales.



Gráfica 4. Niveles de resistencia a 2DG de las cepas D4 y sus parentales.



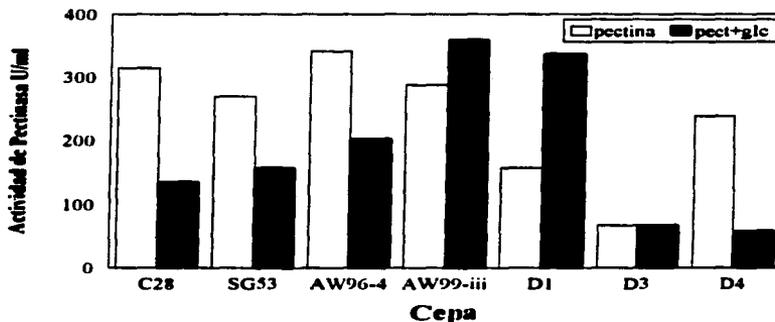
En la gráfica 4 se muestra el patrón de resistencia a 2DG de las cepas AW96-4, AW99-iii y la diploide D4. Se observa que la cepa AW96-4 es resistente hasta 0.5 g/l de 2DG. La cepa AW99-iii es sensible a 0.1 g/l de 2DG. La cepa diploide D4 originada por las dos anteriores presenta una sensibilidad a 2DG igual a la de la cepa silvestre.

7.10 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE REPRESIÓN CATABÓLICA EN LAS CEPAS DIPLOÍDES.

Para determinar la represión catabólica de cada una de las cepas diploides D1, D3 y D4 de *A. niger*, se sembró en un frasco Erlenmeyer con medio líquido a cada una de las cepas diploides en medio mínimo con pectina, sacarosa o almidón como inductores de hidrolasas y en mezclas de cada inductor con glucosa.

7.10.1 Regulación de la pectinasas con pectina o con pectina y glucosa como sustrato.

Gráfica 5. Niveles de producción de pectinasas de las cepas de *A. niger* en medio con pectina y pectina con glucosa.

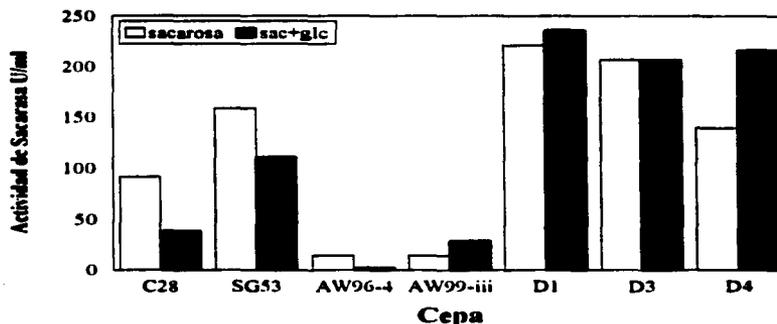


Se observa que las cepas C28B25 y SG53 presentan represión catabólica en la síntesis de pectinasas, ya que en el medio con pectina produjeron aproximadamente 300 U/ml y 250 U/ml respectivamente, y en cambio en el medio con pectina y glucosa, la producción de pectinasas fue de 120 y 130 U/ml. La cepa AW 96-4 presentó un comportamiento parecido a las cepas C28B25 y SG53 con niveles de 350 U/ml en pectina y 200 U/ml en pectina y glucosa. Por otra parte la cepa

AW99-iii produjo 270 U/ml en pectina y 350 U/ml en medio con pectina y glucosa, mostrando desrepresión catabólica de las pectinasas. La cepa D1 también mostró desrepresión catabólica de las pectinasas produciendo 150 U/ml en pectina y 350 U/ml en pectina mas glucosa. La cepa D3 produjo 50 U/ml en ambos medios. Finalmente, la cepa D4 produjo 250 U/ml en pectina, con una represión del 80% en la producción de pectinasas en pectina mas glucosa, es decir fue la cepa más reprimida por glucosa de esta colección.

7.10.2 Regulación de la sacarasa (invertasa) con sacarosa o con sacarosa y glucosa como sustrato.

Gráfica 6. Niveles de producción de sacarosas por las cepas haploides y diploides de *A. niger* en medio con sacarosa y sacarosa mas glucosa.

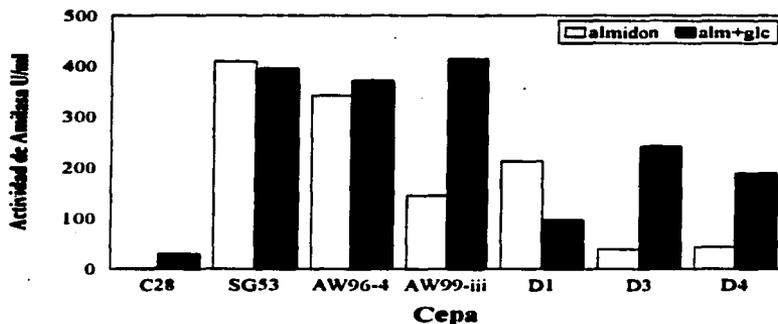


La cepa silvestre C28B25 presentó una producción modesta de invertasa (100 U/ml) en medio con sacarosa, con una represión del 60% en sacarosa más glucosa. La cepa SG53 (mutante pro⁻) presenta el mismo perfil pero con mayores niveles de la enzima. La cepa AW96-4 presentó poca producción 20 U/ml de invertasa en sacarosa y se reprimió en sacarosa con glucosa y solo produjo 5 U/ml. La cepa AW99-iii produjo 20 U/ml de invertasa en sacarosa, no presentó represión en medio con sacarosa mas glucosa (30 U/ml). Todas las diploides produjeron más invertasa que las parentales

y no presentaron represión en medio con sacarosa y glucosa. La diploide D1 produjo 230 U/ml en ambos medios. La cepa D3 se comportó de manera análoga y produjo 200 U/ml en ambos medios. La cepa D4 produjo 150 U/ml en sacarosa, esta producción se incremento un 30% en sacarosa mas glucosa.

7.10.3 Regulación de amilasa con almidón o con almidón y glucosa como sustrato.

Gráfica 7. Niveles de producción de amilasas por las cepas haploides y diploides de *A. niger* en medio con almidón y almidón más glucosa.



En la gráfica 7. La cepa C28B25 no produjo amilasas en medio con almidón como fuente de carbono y solo produjo 20 U/ml en medio con almidón mas glucosa. La cepa SG53 no presentó represión, pues produjo aproximadamente 400 U/ml de amilasa en ambos medios al igual que la cepa AW 96-4 que produjo 350 U/ml de amilasa en ambos medios. En tanto la cepa AW99-iii produjo 150 U/ml de amilasa en almidón y casi triplicó esa producción en almidón con glucosa. D1 produjo 200 U/ml en almidón y reprimió la síntesis de amilasas en un 50% en almidón más glucosa. La cepa D3 produjo 40 U/ml en almidón y sextuplicó la producción en presencia de glucosa. La cepa D4 presentó un perfil parecido al de la cepa anterior.

En resumen, la cepa D1 presentó represión en la síntesis de amilasas, mientras que la exopectinasa y la sacarasa resultan potenciadas al añadir glucosa, que no se localizó un patrón de regulación general para la represión de estas enzimas. La cepa D3 presentó desrepresión para la síntesis de las tres enzimas. En tanto que la cepa D4 presentó represión en la producción de pectinasas y desrepresión catabólica de la invertasa y la amilasa.

7.11 OBTENCIÓN DE CEPAS SEGREGANTES A PARTIR DE LAS CEPAS DIPLOIDES D1, D3 Y D4.

Se obtuvieron 32 cepas segregantes de cada una de las cepas diploides D1, D2 y D3, las cuales fueron aisladas en base a su capacidad para formar colonias de rápido crecimiento en el medio con *p*-fluorofenilalanina y se resembraron en medio completo. Se determinaron las características de represión y auxotrofías.

7.11.1 Segregación de los marcadores genéticos de las cepas haploides obtenidas.

Se presenta los porcentajes de segregación de las auxotrofías utilizadas como marcadores genéticos para la obtención de las cepas diploides.

Tabla 11 Patrón de segregación de los marcadores genéticos *pro* y *arg* de la cepa diploide D1.
SG53 *pro*- *arg*+ X AW96-4 *pro*- *arg*-

Genotipo	# de segregantes	% de incidencia
<i>pro</i> - <i>arg</i> +	4	12.5
<i>pro</i> + <i>arg</i> -	0	0.0
<i>pro</i> + <i>arg</i> -	28	87.5
<i>pro</i> - <i>arg</i> -	0	0.0

pro-, *pro*+: Auxotrofia y prototrofia prolina respectivamente; *arg*-, *arg*+: Auxotrofia y prototrofia a arginina.

En la Tabla 11, se muestran los fenotipos de las segregantes de D1 con respecto a la auxotrofia a prolina y arginina. Se observa que solo el 12,5% de la cepas haploides obtenidas de D1 presentó el fenotipo parental, auxotrofia prolina en todos los casos. Mientras que la auxotrofia a arginina se perdió. El fenotipo más abundante entre las segregantes fue *pro+ arg+* con el 87.5 % de las cepas.

Tabla 12 Patrón de segregación de los marcadores genéticos *pro* y *arg* de la cepa diploide D3.

SG53 <i>pro- arg+</i> X AW99-iii <i>pro+ arg-</i>		
Genotipo	# de segregantes	% de incidencia
<i>pro- arg+</i>	4	12.5
<i>pro+ arg-</i>	2	6.25
<i>pro+ arg+</i>	24	75
<i>pro- arg-</i>	2	6.25

Igual que en la tabla anterior.

En la Tabla 12. Se indica el patrón de segregación de las auxotrofia a arginina y prolina en las cepas derivadas de la diploide D3. Las cepas haploides obtenidas por segregación de la cepa D3 se presentan 2 dobles auxótrofas, 2 auxótrofas a arginina y 4 auxótrofas a prolina, el resto de las cepas resultó ser protótrofa. Las cepas que presentan el genotipo parental (auxotrofia a un solo aminoácido) representaron el 18.75% del total.

Tabla 13 Patrón de segregación del marcador genético *arg* de la cepa diploide D4.

AW96-4 <i>arg-</i> X AW99-iii <i>arg-</i>		
Genotipo	# de segregantes	% de incidencia
<i>arg-</i>	0	0.0
<i>arg+</i>	32	100.0

Igual que en la Tabla 11

En la tabla 13 se presentan los porcentajes de segregación de la auxotrofia a arginina de las cepas haploidizadas a partir de la cepa D4. El 100% de las cepas resulto ser protótrofa (fenotipo no parental). Debido al bajo porcentaje de cepas auxótrofas a arginina este marcador se eliminó del análisis genético posterior.

Tabla 14 Patrón de segregación de los marcadores genéticos de las cepas diploides D1 y D3.

D1: SG53 <i>pro- DG^S</i> X AW96-4 <i>pro+ DG1^R</i>		
Genotipo	# de segregantes	% de incidencia
<i>pro- DG1^S</i>	1	3.1
<i>pro+ DG1^R</i>	15	46.9
<i>pro+ DG1^S</i>	13	40.6
<i>pro- DG1^R</i>	3	9.4
D3: SG53 <i>pro- DG^S</i> X AW99-iii <i>pro+ DG2^R</i>		
Genotipo	# de segregantes	% de incidencia
<i>pro- DG2^S</i>	1	3.1
<i>pro+ DG2^R</i>	21	65.6
<i>pro+ DG2^S</i>	3	9.4
<i>pro- DG2^R</i>	7	21.9

En la tabla 14 se presenta la segregación de los caracteres de resistencia a 2DG y auxotrofia a prolina de las cepas D1 y D3. En las haploides obtenidas de D1 el genotipo parental se presentó en un 50% de los casos, la combinación *pro- DG^S* se presentó en un 3.1% de los casos, *pro- DG^R* representó un 9.4% de los casos y la combinación *pro+ DG^R* se presentó en el 65.6% de las cepas haploides.

En la parte inferior de la tabla 14 se muestra la segregación de los caracteres auxotrofia a prolina y resistencia a 2DG en las cepas haploides derivadas de la cepa D3; el tipo parental se presentó en un 68.75 de los casos, la combinación parental *pro- DG2^S* se presentó solo en 3.1% de las cepas haploides, y la combinación no parental *pro+ DG^S* se presentó en el 9.4% de los casos.

7.11.2. Determinación de los niveles de represión catabólica de las cepas segregantes.

Se determinó el nivel de represión catabólica en cada una de las cepas haploides obtenidas sembrándolas en placa en medio completo con pectina y en medio completo con pectina más glucosa. Las cepas se dividieron en cuatro grupos de acuerdo con su resistencia a 2DG y su represión catabólica, se reporta el promedio y desviación estándar de la producción de pectinasas de cada grupo, además se reporta el % de incidencia de cada grupo dentro de las cepas haploides.

Tabla 15 Efecto de la glucosa (represión o estímulo) sobre la síntesis de pectinasas en las cepas haploides obtenidas de la cepa D1.

SG53: cat^R DGI^S X AW96-4: cat^R DG^R

Genotipo	# de segregantes	% de incidencia	Medio mínimo suplementado con		% de cambio
			Pectina	Pectina + Glucosa	
DGI ^S cat ^S	8	25.0	125.6 ± 22.6	88.3 ± 26.9	-29.7
DGI ^R cat ^R	11	34.4	77.8 ± 28.6	157.9 ± 27.3	+102.9
DGI ^S cat ^R	6	18.7	142.4 ± 27.0	223.9 ± 84.6	+57.2
DGI ^R cat ^S	7	21.9	133.7 ± 24.9	69.4 ± 23.9	-48.1

* los valores presentados son promedios de la producción de pectinasas de las cepas anotadas en la tabla, mas menos la desviación estándar

En la Tabla 15 se presentan los patrones de represión cat^S o desrepresión cat^R de la actividad de pectinasas por las haploides derivadas de la diploide D1. Aparentemente no se presentó una relación o liga directa entre los fenotipos DGR y catR ya que las cepas segregantes DGR catS y DGS catR representaron el 40% de la muestra estudiada. Los fenotipos parentales se presentan en un 59.4% de los casos, con el fenotipo DGI^R cat^R que se presenta en un 34.4 por lo que es el mas abundante; mientras que la combinación no parental DGI^S cat^R es la que se presenta en un menor numero de casos con 6. en cuanto a la producción de pectinasas por las haploides obtenidas de la cepas D1, el grupo parental cat^R y DG^R presentó un promedio de actividad de 77.8 U / ml de extracto con pectina como única fuente de carbono, contra 157.9 U/ml en presencia de glucosa. El

grupo *cat^R DG^S* produjo 142.4 U/ml en promedio con pectina y 223.9 en pectina mas glucosa; mientras que las cepas con fenotipo *cat^S* tanto *DG^S* (parental) como *DG^R* (no parental) tuvieron producciones muy parecidas alrededor de 125 U/ml con pectina y 75 U/ml con pectina mas glucosa.

Tabla 16 Efecto de la glucosa (represión o estimulo) sobre la síntesis de pectinasas en las cepas haploides obtenidas de la cepa D3.

SG53: *cat^a DG2^a* X AW99-iii: *cat^R DG2^R*

Genotipo	# de segregantes	% de incidencia	Medio minimo suplementado con		% de cambio
			Pectina	Pectina + Glucosa	
DG2 ^S <i>cat^S</i>	2	6.3	62.6 ± 4.0	40.4 ± 26.2	-35.5
DG2 ^R <i>cat^R</i>	13	40.6	85.4 ± 35.5	122.3 ± 32.7	+143.2
DG2 ^S <i>cat^R</i>	6	18.7	86.0 ± 22.5	118.3 ± 24.9	+137.6
DG2 ^R <i>cat^S</i>	11	34.4	88.8 ± 21.0	52.2 ± 22.7	-41.2

En la Tabla 16 se presenta en forma similar a la Tabla 15, la segregación de la resistencia a 2DG y la represión catabólica de las cepas haploides pero ahora obtenidas de D3. Se observa que las cepas con genotipo parental representan el 46.9% de los casos. Las cepas no parentales DG2^R *cat^S* representa el 34.4 % de los casos y DG2^S *cat^R* se presenta en el 18.7% de las cepas. Podemos observar que el grupo de cepas *cat^R*, tanto las DG^R como DG^S tienen patrones de producción muy parecidos aproximadamente 86 U/ml en pectina y 120 U/ml en pectina mas glucosa. En tanto las cepas *cat^S DG^S* o DG^R presentan niveles de producción en pectina de 64.4 y 88.8 U/ml respectivamente, y en pectina mas glucosa produjeron el 60 % de lo producido en pectina. Nuevamente se observa la falta de liga entre los caracteres DG^R y *cat^R* ya que las segregantes con los fenotipos DG^R *cat^S* y DG^S *cat^R* fueron el 42.1% de la muestra.

Tabla 17 Efecto de la glucosa (represión o estímulo) sobre la síntesis de pectinasas en las cepas haploides obtenidas de la cepa D4.

AW96-4: *cat^R DG1^R* X AW99-iii: *cat^R DG2^R*

Genotipo	# de segregantes	% de incidencia	Medio mínimo suplementado con	Pectina + Pectina + Glucosa	% de cambio
DG^S cat^S	14	43.8	241.0 ± 48.1	179.4 ± 53.1	-35.5
DG^R cat^R	2	6.2	198.0 ± 33.4	297.3 ± 0.7	+143.2
DG^S cat^R	14	43.8	219.2 ± 47.6	266.9 ± 54.8	137.6
DG^R cat^S	2	6.2	240.3 ± 54.6	195.2 ± 72.4	-41.2

La tabla 17 muestra que en las cepas derivadas de D4 solo el 6.2% de los casos son de tipo parental, esta misma proporción se da en la combinación DG^R cat^S, las combinaciones restante se presentan en el 43.8% de los casos cada una.

Esta tabla presentan también los resultados de la producción de pectinasas de las cepas obtenidas de la cepa diploide D4. Se observa que las cepas *cat^S* tanto parentales como no parentales presentan promedios de producción muy parecidos, en pectina aproximadamente 240 U/ml y en pectina mas glucosa entre 179.4 U/ml y 195.2. Mientras que las cepas *cat^R* parentales y no parentales presentan a su vez promedios de producción parecidos entre 198 y 219 U/ml en pectina y entre 297 y 266 U/ml en pectina mas glucosa estos resultados muestran que aunque se presenta una variación mayor el nivel es también similar.

Los fenotipos DGS catR y DGR catS suman aproximadamente el 40% en todos los casos. Este patrón de segregación es compatible con el modelo de mutaciones distribuidas en cromosomas diferentes que segregan sin tener una relación causal o vinculación física.

8 DISCUSIÓN

8.1 CURVA DE MORTALIDAD DE *A. niger* POR MUTAGÉNESIS CON LUZ UV.

El objetivo principal de este trabajo fue la realización del análisis por cruce heterosexual de las mutaciones responsables de la resistencia a 2-desoxiglucosa y desrepresión catabólica de las cepas mutantes de *A. niger*, así como la formación de una población de segregantes para cada tipo de diploides. El análisis requiere la selección de cepas heterocarióticas y la selección de las cepas diploides formadas; los mecanismos de selección necesitan que las cepas parentales a cruzar contengan marcadores genéticos adecuados como un par de auxotrofias que complementen entre sí en el heterocarión y le permitan desarrollarse en un medio donde las cepas parentales no puedan crecer.

En este caso para poder estudiar la segregación de la o las mutaciones responsables de la resistencia a 2DG y desrepresión catabólica, se necesita aislar mutantes auxótrofos sensibles a 2DG (fenotipo DG^s) y que presenten represión catabólica (fenotipo cat^s).

Se eligió utilizar radiación ultravioleta para la mutagénesis debido a que este sistema de mutagénesis fue el utilizado por el grupo de Bos y Debets en Wageningen (Bos, 1987) y a que en trabajos anteriores realizados en este laboratorio se observó que la utilización de un mutágeno químico produce cambios morfológicos en la cepa tras la mutagénesis, indicando una gran cantidad de mutaciones de trasfondo (Minjares, 1992).

Tras realizar la curva de mortandad por UV con la cepa silvestre de *A. niger* C28B25, se eligió el tiempo de 5 minutos para realizar la mutagénesis, debido a que en ese tiempo la sobrevivencia de las esporas fue del 50%. Estos resultados coinciden con lo reportado por Minjares (1992), quien utilizó una exposición de 12 minutos para lograr una mortandad del 90% de las esporas de *A. niger* C28B25. Loera (1994), reporta el uso de 5 min de exposición a UV para lograr una mortandad del 60% en las esporas de *A. niger*, correlacionandose bien con los resultados obtenidos en este trabajo. El porcentaje de mortandad elegido coincide con lo recomendado por Bos (1987), quien afirma que se deben evitar las tasas de muerte muy altas, debido al aumento en la incidencia de mutaciones de trasfondo y rearrreglos cromosómicos en las sobrevivientes al aumentar el tiempo de

exposición. Por lo que para aumentar la oportunidad de obtener una mutante útil para el mapeo genético es conveniente mantener una sobrevivencia de las esporas entre el 80 y el 50%. Esta baja proporción de mutantes obliga a llevar a cabo un proceso de enriquecimiento, que consiste en aumentar la relación entre protótrofos y auxótrofos presentes en el medio después de la mutagénesis.

8.2 PROCESOS DE ENRIQUECIMIENTO.

El fundamento de los procesos de enriquecimiento se basa en la muerte o eliminación selectiva de las esporas que germinen en presencia de medio mínimo.

En el proceso de enriquecimiento por filtración se permite la germinación de las esporas protótrofas, atrapando el micelio en un tapón de fibra de vidrio. La germinación de las cepas auxótrofas se detiene por la falta del nutriente del cual se tiene la auxotrofia, de esta manera las cepas auxótrofas siguen pasando a través de la malla formada por la fibra y el porcentaje de auxótrofas aumenta en la mezcla. Sin embargo una gran cantidad de las cepas que no germinan en medio mínimo son cepas muertas y cepas que tienen la germinación retrasada. Para evitar esto, Bos y col. (1992) recomiendan cultivar las esporas mutagenizadas por 72 horas, y cosechar las esporas generadas por el cultivo antes de llevar a cabo el proceso de enriquecimiento. A pesar de esta precaución nosotros localizamos una gran cantidad de cepas que presentaron germinación retrasada, por lo que pasaban por falsas auxótrofas dificultando la selección de auxótrofas de *A. niger*. Otro problema asociado al método de enriquecimiento que es reportado por Bos y col. (1992), es la pérdida inespecífica de esporas no germinadas que se adhieren al micelio formado. Estos dos fenómenos podrían explicar el hecho de que tras varios procesos de mutagénesis y enriquecimiento realizados en este trabajo solo haya sido posible aislar una mutante auxótrofa.

El proceso de enriquecimiento por nistatina se basa en la muerte de las esporas que germinan en el medio mínimo. La nistatina es un antimicótico de uso externo ampliamente usado en la terapéutica. La nistatina inhibe el ingreso de diferentes metabolitos al interior de la espora en germinación provocando así la muerte de la misma.

Los resultados de este experimento, indican que el efecto de la nistatina es dependiente del tiempo de preincubación tal como lo reporta Ditchburn (1971), para *A. nidulans*. En ese artículo se reporta una zona de máxima sensibilidad a nistatina entre 5 y 7 horas de germinación, tras esto el micelio en crecimiento se muestra resistente al antibiótico. Se observó que a una misma dosis las esporas presentan un efecto de sensibilidad parecido, alcanzándose la máxima mortandad entre 3 y 5 horas de exposición. La diferencia en los tiempos de máxima sensibilidad pueden explicarse por una diferencia en los tiempos de germinación de *A. nidulans* y *A. niger* en medio mínimo. Al incrementarse el tiempo de preincubación se observó que la sensibilidad de las esporas a la nistatina tiende a disminuir. Estos resultados se muestran en concordancia con lo reportado por Ditchburn (1971) y este comportamiento se atribuye al hecho de que para resultar afectadas por la nistatina, las esporas necesitan estar metabólicamente activas y, a que, el micelio parece ser insensible a la presencia de la nistatina en el medio de cultivo, por lo que, la mayor sensibilidad al antibiótico se da en el momento en que las esporas en germinación crecen suficientemente rápido para resultar afectadas y a su vez, disminuye en el momento en que la cantidad de micelio insensible es ya importante. Debido a que la nistatina es un antimicótico que se une a la pared celular un exceso en la cantidad de nistatina en el cultivo resulta tóxico para las esporas auxótrofas, esto provocó que se eligiera la menor dosis para producir la mayor mortalidad. De acuerdo a lo anterior el tiempo de preincubación y la dosis elegidos para llevar a cabo el proceso de enriquecimiento, fueron 5 horas y 90 unidades de nistatina.

8.3 MUTACIONES INDUCIDAS

Del método de enriquecimiento por nistatina se obtuvieron 2 cepas con conidiosporas de color diferente al normal, SG5 (color carne) y SG6 (color verde oliva). Este fenotipo fue obtenido y reportado por Pontecorvo y col. (1953a) en *A. nidulans* y por Bos y col. (1988), en *A. niger*, Bos y col. (1988), reportan la obtención de mutantes con conidias de color carne, café y verde oliva, a partir del color negro original. Los genes mutantes responsables de estos cambios fueron localizados por análisis parasexual como pertenecientes al mismo grupo de unión I, esto permite su utilización como marcadores genéticos. Estas mutaciones son de especial interés en el análisis por cruce

parasexual debido a que facilitan la localización de las cepas haploides segregantes de una diploide debido a la aparición de sectores de color dentro de las cepas diploides de color negro (Pontecorvo y col., 1953a, Bos y col.; 1988). Por otro lado la presencia de estas mutaciones no permite llevar a cabo la selección de cepas heterocarióticas para llevar a cabo la cruce parasexual, debido a que las cepas son protótrofas.

Mediante el método de enriquecimiento por filtración se obtuvo una mutante auxótrofa a prolina. Se han localizado 5 genes responsables de la síntesis de prolina en *A. niger*, hasta la fecha (Swart y col. 1992). Estos genes se encuentran reunidos en los grupos de unión III y VI (Bos y col., 1993). De acuerdo con Swart y col. (1992) la ruta de síntesis de la prolina esta muy relacionada con la de arginina, por lo que las cepas auxótrofas con mutaciones en los genes *proB* y *proC* pueden desarrollarse si se agrega arginina al medio de cultivo. Dentro de los resultados de este trabajo se tiene el de que la cepa aislada como auxótrofa a prolina SG53 no se desarrolla en presencia de arginina, por lo que se puede afirmar que la mutación responsable de la auxotrofia no es ni *proB*, ni *proC*. Esta mutante fue llamada SG53 y como era derivada directamente de la cepa silvestre C28B25, sirvió para construir heterocariotes con las cepas AW96-4 y con AW99-iii previamente aislados por Loera (1994).

8.4 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE RESISTENCIA A 2DG DE LAS CEPAS MUTANTES OBTENIDAS.

La resistencia a 2-desoxiglucosa (2DG) ha sido ampliamente estudiada en diferentes microorganismos como método para aislar mutantes con características especiales, principalmente como método para aislar cepas con desrepresión catabólica (Miller, 1981; Allen y col., 1989). Los mecanismos y efectos derivados de la resistencia a 2DG son diversos y dependen en gran medida de variables metabólicas complejas mas que de un solo factor de cambio. Se ha demostrado la existencia de 9 locii que intervienen en la obtención de cepas resistentes a 2DG en *N. crassa* (Allen y col., 1989). La mayoría de los mecanismos de resistencia a 2DG se basan en evitar la acumulación de la 2-Desoxiglucosa 6-fosfato (2DG6-P) en el interior de la célula. Se han reportado cuatro alternativas para esto: 1) Evitar el ingreso de 2DG al interior de la célula (Allen y col., 1989). 2) La fosforilación

ineficiente de la 2DG por la glucocinasa durante el ingreso a la célula (Mahlberg y col., 1985) 3) La defosforilación rápida y altamente eficiente de la 2DG6-P (Miller, 1981). y 4) La metabolización de la 2DG como ha sido reportado con anterioridad en algunas especies del genero *Aspergillus* (Miller, 1981).

Los experimentos realizados con las cepas resistentes a 2DG, indican que el efecto de la 2DG sobre estas cepas, es dependiente de las dosis, sugiriendo que la resistencia no se debe a que la 2DG no esté ingresando en la célula. Experimentos previos de Minjares (1992) demostraron que sus cepas aisladas no pueden crecer con 2DG como única fuente de carbono, esto además del efecto tóxico de la 2DG sobre las cepas, descarta su posible metabolización. Quedan por lo tanto dos posibles sistemas de resistencia a 2DG para las cepas (fosforilación ineficiente de la 2DG o desfosforilación rápida de la 2DG6-P).

Los datos de resistencia a 2DG de las cepas AW96-4 y AW99-iii fueron equivalentes a los reportados por Minjares (1992), esto indica que la mutación responsable de la resistencia a 2DG en estas cepas es estable, y por lo tanto útil para realizar el análisis genético. Los resultados obtenidos por las cepas aisladas en este trabajo, permitieron trabajar solamente con la cepa auxótrofa a prolina SG53, debido a que las cepas SG5 y SG6 resultaron resistentes a 2DG lo que indica cierto cambio en el trasfondo genético de la cepa. Esto, de acuerdo con Bos (1987), las inhabilita para ser utilizadas en un análisis genético.

8.5 NIVELES DE REPRESIÓN CATABOLICA DE LAS CEPAS MUTANTES.

En algunos estudios se ha relacionado la resistencia a 2DG con la desrepresión catabólica en la síntesis de amilasa y sacarasa en cepas de *N. crassa* (Allen y col, 1989). Además, la resistencia a 2DG ha sido utilizada para aislar cepas con desrepresión catabólica en la síntesis de amilasas y sacarosas. En estos estudios se reporta que una sola mutación afecta la regulación de la síntesis de varias enzimas hidrolíticas. Por lo tanto se intentó determinar si en alguna de las cepas mutantes era posible localizar un patrón de desrepresión para varias enzimas hidrolíticas.

Los mecanismos de regulación catabólica reportados para las diferentes especies del género *Aspergillus* son variadas, debido a que cada cepa que presente el fenómeno de desrepresión catabólica puede tener una mutación particular. Estas pueden incluir mutaciones de tipo *creA* que afectan la regulación de forma general y mutaciones en las cuales se modifica el gen que regula la expresión de una sola proteína en particular (MacKenzie y col., 1993).

Las cepas aisladas por Minjares (1992) retienen la desrepresión catabólica de las pectinasas como una característica fenotípica, y presentan un comportamiento de desrepresión similar para la amilasa. Estos resultados, coinciden con otros casos de aislamiento de cepas resistentes a 2DG, que resulta en la obtención de cepas que presentan desrepresión catabólica para diferentes enzimas hidrolíticas, tal como lo reportan Allen y col (1989), quienes observaron este fenómeno en amilasa y sacarasa al aislar cepas resistentes a 2DG en *N. crassa*.

Este comportamiento podría indicar tanto que una sola mutación es la responsable de ambos comportamientos, y esta mutación podría ser una mutación de tipo *creA* que pudiendo ser la misma para ambas cepas, sin descartar que podría tratarse de mutaciones diferentes en ambas cepas.

Mientras que la cepa SG53, muestra un comportamiento de represión en la síntesis de pectinasas similar al de la cepa silvestre, esto indica que no existen mutaciones que afecten la represión catabólica de esta cepa de manera sensible. Esto habilita a la cepa SG53 como una cepa útil para el estudio de la segregación mitótica de la represión catabólica de las cepas mutantes.

8.6 ANALISIS DE DOMINANCIA/RECESIVIDAD DEL CARACTER DE RESISTENCIA A 2DG EN HETEROCARIONES Y RESISTENCIA A 2DG EN LAS DIPLOIDES.

Este análisis se realizó para de terminar la relación de dominancia/recesividad de la mutación de resistencia a 2DG con respecto a la cepa silvestre y a las cepas AW96-4 con AW99-iii.

La tendencia de la resistencia en los heterocariones H1 (SG53XAW96-4) y H3 (SG53XAW99-iii), sugiere que las mutaciones podrían ser dominante en el primer caso y recesiva en el segundo. Basados en el conocimiento actual de los medios de resistencia a 2DG en hongos, la mutación dominante podría ser atribuida a la presencia de una desfosforilasa más activa que podría protegerla de la 2DG cuando este sola, pero al compartir el citoplasma con otro núcleo que sintetic

una cinasa normal, la 2-desoxiglucosa 6 fosfato, podría acumularse en menor medida teniendo por lo tanto un efecto tóxico menor que en la cepa sensible. En el caso de la mutación recesiva, puede ser atribuida a una glucocinasa que fosforile de manera defectuosa la 2DG. Sin embargo determinar cual es la mutación responsable de la resistencia a 2DG de cada una de estas cepas requerirá estudios posteriores y es un objetivo que quedó fuera de los alcances de esta tesis.

Es claro que la mutación responsable de la resistencia a 2DG es diferente en AW96-4 y AW9-iii, como lo confirma la complementación de esta mutación en el heterocarión H4 que resulto sensible a 2DG. Por otra parte, los resultados obtenidos en la cepa H4, coinciden con lo reportado por Moore (1971), quien obtuvo una cepa heterocariótica de *Coprinus lagopus*, proveniente de dos cepas resistentes a 2DG, incapaz de crecer sobre medio con 2DG. En el estudio citado (Moore y col., 1971) atribuyeron este comportamiento a la complementación de mutaciones alélicas, situadas en loci genéticos diferentes.

Las cepas heterocariotes, tienden a formar cepas diploides de manera aleatoria por la fusión de los núcleos presentes en la hifa del heterocarión. Para poder aislar un diploide se requiere separar las esporas del micelio heterocarión y sembrar en medio mínimo donde solo crecerán las esporas diploides que por complementación son auxótrofas.

Las cepas aisladas por este método dieron colonias capaces de crecer en medio mínimo, con esporas más grandes por lo que se consideró que eran cepas diploides.

El único cambio que se presentó entre las cepas heterocarióticas, y las cepas diploides con respecto a la resistencia 2DG fue la pérdida de la resistencia a 2DG por la cepa D3, confirmando la idea de que el fenotipo DG^R está asociado a una mutación recesiva. Se propone que la mutación es debida a un transportador ineficiente de la 2DG (posiblemente asociado a una fosforilación ineficiente de la 2DG), al sintetizarse el transportador normal codificado en el núcleo de SG53, la 2DG pudo ingresar en niveles normales y por lo tanto el micelio perdió su resistencia.

8.9 REPRESIÓN CATABÓLICA EN LAS CEPAS PARENTALES Y DIPLOIDES AISLADAS:

Dado que se encontró que la resistencia a 2DG podría tener que ver con la desrepresión catabólica para varias de las enzimas hidrolíticas de las cepas aisladas se procedió a determinar la represión catabólica de cada una de las cepas diploides de *Aspergillus niger* aisladas en ese trabajo.

En teoría, el análisis de las mutaciones regulatorias en diploides permite distinguir entre un mecanismo de control positivo y negativo. El primer paso en el análisis es aislar mutantes de la cepa silvestre que sinteticen productos de genes regulados de manera desreprimida. Se construyen cepas diploides de los genes reguladores, y estas células diploides se examinan usualmente por ensayos enzimáticos de uno de los productos del gen para ver si el fenotipo desreprimido o el reprimido es dominante. Si el gen mutante regulatorio afecta a la cepa diploide entonces puede ser asumido que codifica para un producto difusible (Beckwith y col. 1974).

En un sistema de control negativo, se asume que la síntesis de tipo silvestre de una proteína represora podría ser dominante sobre la pérdida de un represor asumido, y por ende será **dominante el fenotipo reprimido**. En un sistema de control positivo, una mutación en el gen regulador que elimine la necesidad de inducción, resultaría en un activador que puede encender el operador en cuestión bajo todas las condiciones, y el **fenotipo desreprimido sería dominante** (Mackenzie y col. 1993; Beckwith y col. 1974).

Es importante anotar que en el cambio del cultivo en placa al cultivo en líquido, la cepa SG53 presentó diferencias importantes en la regulación de síntesis de amilasa y pectinasa con respecto a la cepa silvestre, y que las cepas mutantes presentaron diferencias importante entre sí en cuanto a la represión catabólica. Tanto las diferencias presentes en la cepa SG53 como las presentes en las cepas mutantes pueden ser atribuidas al cambio en el sistema de producción a medio líquido, este resultado está de acuerdo con lo hallado por Romero y col. (1993) y Minjares (1992), quienes indicaron que las cepas mutantes aisladas por Minjares (1992) mostraban diferentes niveles de producción y represión al cambiar el sistema de producción de sólido a líquido y viceversa.

Los niveles de represión catabólica para pectinasas de las cepas mutantes correspondieron con lo reportado por Minjares (1992) para cultivo líquido, por lo que se le dio validez a los resultados obtenidos. En base a lo anterior y de acuerdo a los resultados encontrados en este estudio se

proponen a continuación algunos modelos de mutación en las cepas mutantes, aisladas por Minjares (1992), que podrían explicar los fenotipos encontrados en las diploides.

Para la regulación de pectinasas se propone que, la desrepresión catabólica de la cepa D1 (SG53XAW96-4) podría explicarse por la presencia de una mutación en la síntesis del represor. El represor normal de SG53 podría complementar esa deficiencia y la cepa diploide presentaría un patrón de represión normal, pero la cepa D1 no presenta ese comportamiento por lo que una explicación alternativa sería una mutación que impida la unión del represor sobre el gen operador en el núcleo de AW96-4, que impediría la acción del represor normal de SG53. El caso D3 (SG53XAW99-iii) podría ser análogo. Mientras que el comportamiento de la cepa D4, la cual tiene un fenotipo cat^s podría explicarse por la complementación y recombinación de mutaciones análogas.

En el caso de la regulación de la invertasa llama la atención la mayor producción de la cepa SG53, y la baja producción de las cepas mutantes. El modelo de regulación que se propone para las cepas D1 y D3, en este caso es la presencia de un activador más eficiente en la cepa SG53 y la ausencia de este en las cepas AW96-6 y AW99-iii, lo que explicaría la baja producción en estas cepas. Al unirse el activador de la cepa SG53 con las zonas disponibles de AW96-4 y AW99-iii en las cepas diploides D1 y D3, se activaría la síntesis de la invertasa en ambos genes. La cepa D4 presenta un comportamiento explicable por la complementación de la deficiencia en el activador de ambas cepas y la ausencia del represor de manera análoga a lo sucedido con las pectinasas.

La regulación de amilasas presenta un perfil muy complejo y difícil de explicar mediante un modelo análogo a los anteriores. También es difícil explicar el bajo nivel de producción de amilasa de las cepas diploides en comparación de las cepas haploides, ya que ninguno de estos comportamientos corresponde con alguno de los comportamientos predichos por los modelos clásicos de regulación.

Resumiendo, la represión de hidrolasas no sigue un patrón general, no existe un patrón de regulación uniforme para la producción de estas enzimas. Esto podría indicar que las mutaciones responsables de la desrepresión catabólica son diferentes para cada una de las cepas y para cada enzima, que por lo tanto, responden de manera diferente a cada una de las señales de regulación de síntesis de enzimas.

8.10 ANALISIS DE LA SEGREGACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS EN LAS CEPAS SEGREGANTES A PARTIR DE LAS CEPAS DIPLOIDES D1, D3 Y D4.

La obtención de las cepas segregantes a partir de las cepas diploides de *Aspergillus niger*, permite realizar la última parte del análisis por cruce parasexual en este tipo de microorganismos, la segregación de los caracteres fenotípicos que actúan como marcadores genéticos permite establecer o descartar la unión de algunos de ellos. En este caso se logró la haploidización de las cepas diploides por medio de la utilización de dosis subletales de *para*-fluorofenilalanina, tal como lo indicó Lhoas, (1967). La *p*-fluorofenilalanina, de acuerdo a Lhoas (1967) produce interferencias en la mitosis que producen pérdidas de cromosomas; las cepas aneuploides continúan perdiendo cromosomas y alcanzan rápidamente el estado haploide normal. Además, este antimetabolito no produce efectos en la velocidad de crecimiento de las cepas haploides, mientras que aminora el crecimiento de las diploides, lo que permite llevar a cabo la selección de las cepas haploidizadas. En contraste, Bos y col (1988), afirman que la utilización de *p*-fluorofenilalanina produce sectores poco vigorosos, de esporulación pobre, a pesar de usar una dosis relativamente baja. En este estudio se observó que las cepas se comportaron de manera análoga a lo reportado por Lhoas (1967), ya que durante la obtención de haploides se obtuvieron sectores de crecimiento vigoroso, y con esporulación normal, los cuales fueron tomados como haploides, de acuerdo con Lhoas. La diferencia en el comportamiento de las cepas reportado por ambos autores es posiblemente debida a las diferencias inherentes a cada cepa, lo que también explicaría la discrepancia entre el trabajo de Bos y col. (1988) y lo encontrado en este trabajo.

El patrón de segregación observado para la arginina resultó no corresponder con lo esperado, ya que no se pudieron localizar más que dos segregantes auxótrofos a arginina, ambas derivadas de la diploide D3. La explicación de este comportamiento podría ser la estrecha relación que existe entre las rutas metabólicas de la arginina y la prolina, lo que derivaría en una alimentación cruzada de ambos metabolitos (Swart y col., 1992). La abundante presencia de cepas segregantes resistentes a 2DG con o sin represión catabólica indica que las mutaciones responsables de estas características son diferentes en todas las mutantes. Además al analizar los resultados que se obtuvieron en la haploidización, se observa que excepto para la arginina los porcentajes de segregación de todos los

caracteres están dentro de los valores reportados por Pontecorvo y col. (1953a y 1959) para ser considerados como mutaciones no ligadas. Esto significa que cada una de estas mutaciones se encuentra en cromosomas diferentes, y que son independientes una de otra en todos los casos

Se encontraron cepas segregantes con doble auxotrofia entre las segregantes de D3, además de cepas con auxotrofias a prolina, tanto reprimidas como desreprimidas, resistentes y sensibles a 2DG, así como con mezclas de estos caracteres. Esta variedad de cepas puede ser de utilidad en estudios futuros sobre los mecanismos de regulación de la síntesis de hidrolasas.

8.11 ANALISIS DE LOS NIVELES DE REPRESIÓN CATABÓLICA DE LAS CEPAS SEGREGANTES OBTENIDAS.

La represión catabólica en cada una de las cepas segregantes obtenidas se determinó solamente con respecto a la síntesis de pectinasas debido a la gran cantidad de cepas a las que debían analizarse los niveles de desrepresión. Para la presentación de resultados se tomó el promedio de los grupos de cepas tomando en cuenta la combinación del fenotipo de resistencia a 2DG y represión catabólica.

Al analizar los resultados de la producción de pectinasas por cada uno de los grupos de segregantes se observa que es posible formar 2 grupos finales en todas las tablas las cepas reprimidas (cat^s) y las cepas desreprimida (cat^R), sin tomar en cuenta si el grupo es resistente o sensible a 2DG esto indica que la mutación de resistencia y la de desrepresión catabólica segregaron de manera independiente. Además aproximadamente el 50% de las cepas haploides obtenidas de cada una de las cepas diploides, esta reprimida. Este tipo de segregación de acuerdo con Bos y col (1988 y 1993) corresponde a una mutación de tipo puntual, indicando que los cambios en los patrones de represión de las cepas mutantes obtenidas por Antier y col. (1993a), son debidas a una serie de mutaciones puntuales que podrían ser diferentes para cada una de ellas., y sobre todo, que la característica fenotípica de resistencia a 2DG parece no afectar o modificar la represión catabólica.

En conclusión, la obtención de cepas sobreproductoras de pectinasas reportada por Antier y col. (1993a) como asociada a mutaciones de resistencia a 2DG, merece un comentario, los datos de

este trabajo apoyan la hipótesis de mutaciones múltiples que son responsables en forma independiente de los fenotipos DG^R (resistente a 2DG) y cat^R (desreprimida en presencia de glucosa).

Sin embargo aún no se puede explicar por qué es relativamente frecuente encontrar este doble fenotipo después de una mutación aleatoria. Quizás el fenotipo cat^R esta asociado a la desrepresión de diversos sistemas enzimáticos en forma inespecífica, lo cual se confirmó en parte por el aumento en la actividad de amilasa y pectinasas en las cepas AW96-4 y AW99-iii, comparadas con el fenotipo de la cepa silvestre (C28B25). Esto estaría de acuerdo con el protocolo de selección indicado por Antier y col. (1993b) quienes primero aislaron las cepas por fenotipo DG^R y de ellas se aislaron las sobreproductoras de pectinasas, por medio de la observación del tamaño de los halos de hidrólisis. También estaría de acuerdo con la observación de Antier y col. (1993a), quienes no encontraron correlación evidente entre el grado de resistencia a 2DG y el nivel de producción de pectinasas pues incluso encontraron una revertante (AW96-3) que se volvió DG^S pero que conservó el fenotipo cat^R . También está de acuerdo con el resultado principal de Loera (1994), quien aisló el dicarion D4 con fenotipo DG^S y cat^R por medio de la cruce de la cepa AW96-4 ($DG^R cat^R$) y AW99-iii ($DG^R cat^R$), apoyando la independencia de estos fenotipos.

Uno de los aspectos interesantes de este trabajo es la observación de que las cepas AW96-4 y AW99-iii no solo aumentaron la producción de pectinasas, también aumentaron en forma importante la producción de amilasas y redujeron la de sacarasa. Esta observación abre la posibilidad de mutaciones que coordinen forma combinada a la producción de bloques de hidrolasas. Este problema sería objeto de futuras investigaciones y podría abordarse mediante la caracterización más detallada de las segregantes aisladas en este trabajo.

9 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se llega a las siguientes conclusiones. La presencia de segregantes con la característica de represión-resistencia a 2DG y sensibilidad-desrepresión, indica:

1) La mutación responsable de la desrepresión catabólica y la mutación responsable de la resistencia a 2DG, son diferentes.

2) Estas mutaciones se encuentran en diferentes cromosomas.

3) Las mutaciones responsables de la resistencia a 2DG y la desrepresión catabólica, parecen ser diferentes en cada una de las mutantes analizadas.

10 BIBLIOGRAFIA:

Acuña-Argüelles, M.E.; Gutierrez-Rojas, M. Viniestra-González, G. y Favela-Torres, E. (1995) Production and Properties of Three Pectinolytic Activities Produced by *Aspergillus niger* in Submerged and Solid State Fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43(5): 808-814.

Aquiáhuatl, M. A.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Trejo, M. R. (1987) Solid State Fermentations in Conversion of Agroindustrial Raw Materials En Proceedings of the Seminar ORSTOM-Raimbault, M. (Edit.), Montpellier, France: 13-26

Alabi, R. O.; Naqui, S. H. Z. (1977). Production of Cellulolytic and Pectolytic Enzymes by *Cercospora arachidicola*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 68(2): 296-298.

Allen, K. E.; MacNally, M. T.; Lowendorf, H. S.; Slayman, C. W.; Free, S. J. (1989) Deoxiglucose-Resistance Mutants of *Neurospora crassa*: Isolation, Mapping and Biochemical Characterisation. *J. Bacteriol.* 171 (1): 53-58.

Antier, P.; Minjares, A.; Viniestra, G. (1993a). Pectinase-Hyperproducing Mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for Solid State Fermentation on Coffee Pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 15:254-260.

Antier, P.; Minjares, A.; Roussos, S.; Viniestra, G. (1993b). New Approach for Selecting Pectinase-Producing Mutants of *Aspergillus niger* Well Adapted to Solid State Fermentation. *Biotech. Adv.* 11:429-440.

Badui Dergal, S. (1988). Diccionario de tecnología de Alimentos. Alhambra Mexicana. México. p. 192

Ball, C.(1983). The Filamentous Fungi. En: *Genetics and Breeding of Industrial Microorganisms*. Ball, C.(Ed.) CRC Press, INC. Boca Raton, Florida. pp 159-188.

Bailey, M. J.; Pessa, E. (1990). Strain and Process for Production of Polygalacturonase. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 266-271.

Bekwith, J.; Rossow, P. (1974). Analysis of Genetic Regulatory Mechanisms. *Ann. Rev. Genet.* 8: 1-13.

Berka, R. M.; Barnett, C. C.; Bodie, E. A.; Crabb, W. D.; Dunncoleman, N. S.; Kodama, K. H.; Rey, M. W.; Sweeney, D.; Wilson, L. J.; Ward, M. (1992). The Filamentous Fungus *Aspergillus niger* Var. *awamori* as Host for the Expression and Secretion of Fungal and Non-Fungal Heterologous Proteins. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society.* 203,Iss Apr.: 121-124.

Bos, C. J. (1987) Induction and Isolation of Mutants in Fungi at Low Mutagen Doses. *Curr. Genet.* 12: 471-474.

Bos, C. J.; Debets J. M.; Swart, K.; Huybers, A.; Kobus, G.; Slakhorst, S. M.; (1988) Genetic Analysis and the Construction of a Master Strain for Assignment to Six Linkage Group in *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.* 14: 437-443.

Bos, C. J.; Debets J. M.; Kobus, G.; Slakhorst, S. M.; Swart, K. (1989) Adenine and Pyrimidine Genes of *Aspergillus niger* and Evidence for a Seventh Linkage Group. *Curr. Genet.* 16: 307-310.

Bos, C. J.; Debets J. M.; Nachtegaal, H.; Slakhorst, S. M.; Swart, K. (1992) Isolation of Auxotrophic Mutants of *Aspergillus niger* by Filtration Enrichment and Lytic Enzymes. *Curr. Genet.* 21: 117-120.

Bos, C. J.; Slakhorst, S. M.; Debets J. M.; Swart, K. (1993) Linkage Group Analysis in *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 742-745.

Charley, H. (1987). *Tecnología de alimentos*. Ed. Limusa. México. pp 643-645, 728-737.

Chopra, S.; Mehta, P. (1985) Influence of Various Nitrogen and Carbon Sources on the Production of Pectinolytic-Cellulolytic and Proteolytic Enzymes by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* 30: 117-125.

Debets J. M.; Swart, K.; Bos, C. J. (1990) Genetic Analysis of *Aspergillus niger*: Isolation of Chlorate Resistance Mutants, their Use in Mitotic Mapping and Evidence for an Eight Linkage Group. *Mol. Gen. Genet.* 22: 453-458.

Debets, F. (1990). Genetic analysis of *Aspergillus niger*.

Ditchburn, P. ; McDonald, K. D. (1971) The Differential Effects of Nystatine on Growth of Auxotrophic Strains of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology.* 67: 299-306.

Dowser, C. E. A.; Kelly, J. M. (1991). Analysis of the *creA* Gene, a Regulator of Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 5701-5709.

Grajek, W.; P. Gervais (1987). Influence of Water Activity on the Enzyme Biosynthesis and Enzyme Activities Produced by *Trichoderma viride* TS in Solid State Fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.* 9: 658-662.

Gunasekaran, P. (1995). *Laboratory Manual in Microbiology*. Ed. New Age International. Madras, India. pp 78-81.

Hastie, A. C. (1970) Benlate-Induced Instability of *Aspergillus* Diploids. *Nature.* 226:771.

Hesseltine, C. W. (1972). Solid State Fermentation. *Biotechnol & Bioengineering.* 13:517-532.

Kulmburg, P.; Sequeval, D.; Lenouvel, F.; Mathieu, M.; Felenbok, B. (1992) Identification of the Promoter Region Involved in the Autoregulation of the Transcriptional Activator ALCR in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cellular Biology*. 12 (5): 1932-1939.

Lhoas, P. (1971) Mitotic Haploidization by Treatment of *Aspergillus niger* Diploids with para-fluorophenylalanine. *Nature*. 190:744.

Lhoas, P. (1967). Genetic Analysis by Means of the Parasexual Cycle in *Aspergillus niger*. *Genet. Res. Camb.* 10: 45-61.

Loera-Corral, O. (1994). Caracterización de Mutantes de *Aspergillus niger* Sobreproductores de Pectinasas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D. F.

May, C. D. (1990). Industrial Pectins: Sources, Production and Applications. *Carbohydrate Polymers*. 12: 79-99.

Mahlberg, D.; Höfer, M.; Täuber, A. (1985) Sugar Transport and Hexose-ATP-Kinase Activity in a 2-Deoxy-D-glucose Tolerant Mutant of the Yeast *Rhodotorula glutinis*. *Journal of General Microbiology*. 131: 479-485.

McGuire, R. G.; Rodriguez-Palenzuela, P.; Collmer, A.; Burr, T. J. (1991). Polygalacturonase Production by *Agrobacterium tumefaciens* Biovar 3. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(3): 660-664.

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426-428.

Minjares, C. A. S. (1992). Obtención de Mutantes de *Aspergillus niger* C28B25 Hiperproductores de Pectinasas por Fermentación en Medio Sólido de la Pulpa de Café. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México, D. F.

Moo-Young, M.; A. R. Moreira & R.P. Tengerdy (1983). Principles of Solid-Substrate Fermentation. En: *The Filamentous Fungi*. Vol. IV *Fungal Technology*. Esis, E.; E. Smith; D. R. Berry & B. Kristiansen, (Ed.), Arnold, London. pp 117-143.

Moore, D.; Stewart, G. R. (1971) Mutants of *Coprinus cinereus* Selected for Resistance to 2-deoxy-D-glucose. *Genet. Research*. 18:341-352.

Moore, D. (1981). Effects of Hexose Analogues on Fungi: Mechanisms of Inhibition and of Resistance. *New phytol.* 87: 487-515.

Nasser, W.; Reverchon, S.; Condemine, G.; Robert-Baudouy, J. (1994) Specific Interactions of *Erwinia chrysanthemi* KdgR Repressor with Different Operators of genes Involved in Pectinolysis. *Journal of Mol. Biol.* 236: 427-440.

- Pandey, A. (1992). Recent Process Developments in Solid State Fermentation. **Process Biochemistry**. 27: 109-117.
- Pontecorvo, G.; Kafer, E. (1959). Genetic Analysis Based in Mitotic Recombination. **Adv. Genet.** 10:71-104.
- Pontecorvo, G.; Roper, J. A.; Hemmons, L. M.; McDonald, M. K. D.; Bufton, A. W. J. (1953a). The Genetics of *Aspergillus nidulans*. **Adv. Genet.** 5:141-238.
- Pontecorvo, G.; Roper, J. A.; Forbes, E. (1953b). Genetic Recombination without Sexual Reproduction in *Aspergillus niger*. **J. Gen. Microbiol.** 8:198-210.
- Romero, S.; Acuña, M. E.; Viniestra, G. (1993). Efecto de la Actividad de Agua sobre la Producción de Pectinasas por Mutantes de *Aspergillus niger* en Fermentación Sólida y Líquida. **Biotecnología (Méx)**. 3(1-2): FS65-FS69.
- Runlin, M.; Reese, J. C.; Black, W. C.; Brumel-Cox, P. (1990). Detection of Polygalacturonase and Pectinesterase from salivary Secrets of Living Green Bugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphidiae). **J. Insect Physiol.** 36(7): 507-512.
- Schneider, R. P.; Wiley, W. R. (1971) Regulation of Sugar Transport in *Neurospora crassa*. **Journal of Bacteriology**. 106(2): 487-492.
- Shankaranand V.; M. V. Ramesh & B.K. Lonsane (1992). Idiosyncrasies of Solid State Fermentation Systems in the Biosynthesis of Metabolites by Some Bacterial and Fungal Cultures. **Process biochemistry**. 25:33-36.
- Solis-Pereyra, S.; Favela-Torres, E.; Gutierrez-Rojas, M.; Roussos, S.; Saucedo-Castañeda, G.; Gunasekaran, P.; Viniestra-González, G. (1996) Production of Pectinases by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation at High Initial Glucose Concentrations. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 12: 257-260.
- Swart, K.; Peter, J. I.; Vondevoort, Cor F. B. and Jaap Visser (1990) Genetic Localisation of a Series of Genes Affecting Glucose Oxidase Levels in *Aspergillus niger*. **Curr. Genet.** 18: 435-439.
- Swart, K.; Alfons, J. M.; Debets J. M.; Kobus, G.; Bos, C. J. (1992) Arginine and Proline Genes of *Aspergillus niger*. **Antonie Van Leeuwenhoek** . 61: 259-264.
- Tengerdy, R. D (1985). Solid Substrate Fermentation. **Elsevier Science Publishers**. 200: 96-99.
- Tuttobello, R. & P. Mill (1961). The Pectic Enzymes of *Aspergillus niger*. **Biochemical Journal**. 79:51-57.

Tsuyumu, S. (1977). Inducer of Pectic Acid Lyase in *Erwinia carotova*. *Nature*. 269(25): 237-238.

Van der Veen, P.; Ruijter, J. G. G.; Visser, J. (1995) An extreme *creA* Mutation in *Aspergillus nidulans* has Severe Effects on D-Glucose Utilization. *Microbiology*. 141: 2301-2306.

Viniegra-González, G (1988). Perspectives and Limitations of Solid-State Fermentation in Mexico. In: Rimbault, M. (Ed.). *Solid-State Fermentation in Bioconversion of Agroindustrial Raw Materials*. ORSTOM, Montpellier, France. pp 67-72.

Ward, O. P. (1985). Hidrolytic Enzymes. In Blanch, H. W.; Drew, S.; Wang, D. I. (Eds) *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press. New York. 3: 819-835.

Zimmermann, F. K.; Scheel, I. (1977) *Mol. Gen. Genet.* 154: 75-82. en Trumbly, R. J. (1992) Glucose Repression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 6(1): 15-21.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**