

128
20j



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ALGUNAS CONSIDERACIONES FISIOLÓGICAS
ACERCA DEL EFECTO QUE TIENE EL pH EN LA
REGENERACION Y REVERSION DE CELULAS DE
Aspergillus sp. CARENTES DE PARED CELULAR.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
CARLOS LEONARDO PERAZA REYES



DIRECTOR DE TESIS: DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO.



MEXICO, D. F.

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Algunas consideraciones fisiológicas acerca del efecto que tiene el pH en la regeneración y reversión de células de Aspergillus sp. carentes de pared celular
realizado por Carlos Leonardo Peraza Reyes

con número de cuenta 8934884-4 **. pasante de la carrera de** Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Propietario

Dr. Wilhelm Hansberg Torres

Propietario

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Suplente

M. en C. Margarita Villegas Ríos

Suplente

Dra. Carmen Cano Canchola

SECRETARÍA DE CIENCIAS

U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología
M. en C. Alejandro Martínez Mena



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**Las plantas sufren como nosotros sufrimos
¿Por qué no sufrirían
si esta es la llave de unidad del mundo?**

**La flor sufre, tocada
por la mano inconsciente
Hay una ahogada queja
en su docilidad.**

**La piedra es sufrimiento
paralítico, eterno.**

**Nosotros - animales - no tenemos
ni siquiera el privilegio de sufrir.**

Carlos Drummond de Andrade

**Dedico el esfuerzo de este trabajo a mis padres Martha y Carlos
quienes con cariño y preocupación
se encargaron de mi formación**

A mi hermano Matias, por ser mi hermano

A mis abuelos tios y primos, por su cariño

A mis inseparables Vladimir, Rodolfo y Juan Manuel.

**El grito, el pico, el diente, los aullidos
la nada carnicera y su barullo
ante esta simple flor se desvanecen
...a Floria**

Gracias aroma
azul,
fogata
encelo.

Gracias pelo
cabello
mandarino.

Gracias pudor
turquesa
embujo
vela,
llamarada
quietud
azar
delirio.

Gracias a los racimos
a la tarde,
a la sed
al frevor
a las arrugas
al silencio
a los senos
a la noche
a la danza
a la lumbre
a la espesura.

Muchas gracias al humo
a los microbios,
al despertar
al cuerno
a la belleza,
a la esponja
a la duda
a la semilla,
a la sangre
a los toros

a la siesta.

Gracias por la ebriedad
por la vagancia,
por el aire
la piel
las almendras
por el absurdo de hoy
desazón
avidez
calma
alegria,
nostalgia
desamor
ceniza
llanto.

Gracias a lo que nace,
a lo que muere,
a las uñas
las alas
las hormigas,
los reflejos
el viento
la rompiente,
el olvido
los granos
la locura.

muchas gracias gusano.
Gracias huevo.
Gracias fango,
sonido
Gracias piedra.
Gracias Oliverio
Muchas gracias por todo
Muchas gracias.

Oliverio Gironde

Deseo agradecer también al Dr. Guillermo Aguilar el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo y la disposición que mostró para fomentar mis inquietudes científicas. Gracias por estos años de amistad.

Expreso mi gratitud a todos mis compañeros del laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología , quienes además de brindarme todo su apoyo y ayuda técnica, me acompañaron con su amistad y me contagiaron de su alegría.

Gracias a la maestra Margarita Villegas que con su dedicación y sabiduría incrementó en mí el amor al los hongos, y que tan amablemente revisó este trabajo.

Gracias a Dr. Joaquin Cifuentes que con sus conocimientos, enseñanzas y bromas logró ampliar mi visión biológica, y con su revisión, comentarios y correcciones, mi trabajo de tesis.

Deseo agradecer también a la Dra Carmen Cano todos sus comentarios y correcciones, y al Dr Wilhelm Hansberg su cuidadosa revisión y su colaboración en la discusión de este trabajo, que mejoraron considerablemente su contenido.

Quiero agradecer en especial a todos mis amigos, compañeros y profesores de la Facultad de Ciencias.

Agradezco a todas las personas del conjunto E de la Facultad de Química y del laboratorio de Genética Molecular y Evolución del Instituto de Ecología que ayudaron en el trabajo de laboratorio.

Paty, Jose Luis, Mariana, Toño, Ricardo, Lina y Agustín estarán siempre en mi recuerdo.

Agradezco también a mi hermano Matias sus bonitos y detallados dibujos, incluidos en esta tesis, y a Gala y a Floria por su apoyo en computación.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Guillermo Aguilar Osorio y con el apoyo del Subprograma 127 "Formación Básica en la Investigación" de la Facultad de Química y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), con el proyecto IN209194, de la UNAM.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCION	3
Panorama histórico	3
Posición taxonómica de los hongos	5
Biología de los hongos	8
El sistema micelial	8
Lisotrofia y metabolismo	9
Pared celular y crecimiento hifal	14
La pared celular	15
Crecimiento	18
Bases celulares del crecimiento	18
Protoplastos fúngicos	22
Aislamiento de protoplastos	22
Los protoplastos en la investigación genética	26
Los protoplastos en la bioquímica y fisiología celular	27
Regeneración de la pared celular y reversión de los protoplastos	28
El género <i>Aspergillus</i>	29
Taxonomía de Aspergilli	31
Aspergilli y el hombre	32
ANTECEDENTES	34
OBJETIVOS	41

MATERIALES Y METODOS	42
Microorganismo	42
Crecimiento del microorganismo en cultivo sumergido	42
Determinación de la biomasa microbiana	43
Determinación del número de células	43
Formación de protoplastos	43
Determinación del tiempo de cultivo del microorganismo	43
Formación de protoplastos	44
Recuperación de protoplastos	45
Regeneración del micelio	46
Análisis de caracter fisiológico	47
Análisis de las actividades enzimáticas	48
Análisis de los resultados	49
RESULTADOS Y DISCUSION	50
Formación y regeneración de protoplastos	50
Formación de protoplastos	50
Formación de protoplastos apicales	60
Regeneración y reversión celular	64
Análisis morfológico y fisiológico	66
CONCLUSIONES	78
APENDICE	79
Medios de cultivo utilizados	79
Medios de regeneración	80
Amortiguadores	81
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	82
BIBLIOGRAFIA	84

ABREVIATURAS

acGlcN	N-acetil-glucosamina
AE	Amortiguador de estabilización
AF	Amortiguador de fosfatos
Asn	Asparagina
DNS	Acido 3,5-dinitrosalicílico
EMA	Agar de extracto de malta
FP-180	Cepa de <i>Aspergillus</i> sp. FP-180
GEL	Glucosa, extracto de levadura
LP-10	Cepa regenerada en pectina pH 1.7 a partir de un protoplasto de <i>Aspergillus</i> FP-180
Man	Manosa
MM	Medio mínimo (basal)
MMP	Medio mínimo con Pectina
MMP-S	Medio mínimo con Pectina y Sorbitol
MMS	Medio mínimo con Sorbitol
PDA	Agar de papa y dextrosa
PS	Peso seco
RE	Retículo endoplasmático
REL	Retículo endoplasmático liso
RER	Retículo endoplasmático rugoso
UFC	Unidades formadoras de colonias
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América ¹
VSC	Centro suministrador de vesículas ¹

¹ Por sus siglas en inglés

RESUMEN

La pared celular es la estructura que confiere a los hongos la mayor parte de sus características. Los procesos de síntesis y extensión de la pared celular determinan el crecimiento de las hifas y, en consecuencia, la forma celular que adoptan los hongos. La pared celular es también la interfase entre el organismo y el medio externo y tiene un gran número de funciones vitales que modulan la actividad citoplasmática de las hifas. Los protoplastos son células carentes de pared celular; su capacidad para regenerarla y producir células funcionales proporciona un sistema en el cual es posible entender el papel que la pared celular tiene sobre la actividad fisiológica de la célula fúngica. Por otra parte, la actividad fisiológica de las células está modulada por factores externos tales como el pH. Al regenerar los protoplastos en condiciones de acidez extrema, se presenta un sistema en el que se ejerce una tensión fisiológica ante la cual la célula fúngica expresa selectivamente ciertos genes, como los de las pectinasas (creciendo en pectina a pH 2), o bien, como es el establecimiento y mantenimiento de determinados procesos morfogénicos, como las transiciones dimórficas. Se estableció un protocolo de formación y regeneración de protoplastos de *Aspergillus* mediante el cual fue posible regenerarlos en pectina bajo condiciones de acidez extrema. Se observó que la capacidad de regeneración de los protoplastos en pH ácido depende en gran medida de su naturaleza y constitución celular, siendo los provenientes de regiones apicales los que presentan el porcentaje de regeneración más elevado. Resulta interesante que se puedan generar cepas distintas a la original, tanto en su actividad fisiológica como en su morfología. No existe una evidencia clara del efecto que tienen la reparación celular y la regeneración de la pared celular sobre la constitución y actividad de las hifas regeneradas bajo tensión fisiológica. Sin embargo, la mayor parte de estos cambios está en relación con la presión selectiva que se ejerció en el sistema de regeneración, como la actividad pectino-enzimática y el crecimiento sobresaliente que presenta en valores de pH extremos.

INTRODUCCIÓN

La fisiología fúngica se interesa por entender los mecanismos celulares y bioquímicos responsables de los diversos aspectos del desarrollo y crecimiento de los hongos (Garraway y Evans, 1991).

Esta investigación generalmente se ha desarrollado en dos etapas. Un estudio descriptivo de los fenómenos de interés (formación y germinación de esporas, el crecimiento hifal, el desarrollo de estructuras sexuales y asexuales, etc.), que puede incluir información sobre cómo éstos pueden ser afectados por diversos estímulos (nutrientes, luz, temperatura, etc.), provee las bases para examinar los mecanismos fundamentales por los cuales estos fenómenos se llevan a cabo y de qué manera son regulados. Históricamente, estos dos aspectos se desarrollaron secuencialmente (Garraway y Evans, 1991).

PANORAMA HISTÓRICO

Los primeros registros de hongos son dispersos y difíciles de interpretar. Con seguridad algunos hongos fueron comidos por los griegos y los romanos, así como por otras civilizaciones contemporáneas. Para los escritores antiguos, los hongos se limitaban a las formas macroscópicas como los champiñones y, a pesar de que se conocían diversas enfermedades de plantas causadas por hongos, no fueron asociadas a ellos hasta entrado el siglo XVII (Martin, 1968).

Se tiene evidencia también de que hongos alucinógenos fueron empleados desde tiempos remotos por culturas asiáticas y mesoamericanas y pocas "plantas de los dioses" han recibido tanta veneración como la de los hongos sagrados de México y Centroamérica (Evans y Hofmann, 1982). Estas culturas seguramente tenían un gran conocimiento de los factores que afectaban su desarrollo; desgraciadamente el registro escrito que se tiene de estos conocimientos es escaso y es frecuente encontrar a la Europa de siglo XVI como el punto de partida en las investigaciones fisiológicas "descriptivas" acerca de hongos, siendo los micólogos orientados gastronómicamente los que generaron conocimientos sobre cómo algunos hongos crecen mejor en determinados substratos y bajo ciertas condiciones (Garraway y Evans, 1991).

La introducción del microscopio, seguido del perfeccionamiento de las lentes, fue un paso fundamental en la microbiología: Anton Van Leeuwenhoek, el primero que vió las bacterias, también observó células de levaduras. Las primeras ilustraciones de los hongos microscópicos fueron realizadas por Robert Hooke (1635-1703). Posteriormente fueron descritas diferentes estructuras de hongos, y publicaciones como la de Marcello Malpighi (1628-1694) dedicaron gran atención a la descripción de hongos conocidos ahora como *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Botrytis* (Casadesus *et al*, 1985).

El primer trabajo experimental significativo hecho con hongos fue el realizado por Antonio Micheli (1679-1737), padre de la micología, quien además de realizar las descripciones taxonómicas de *Aspergillus*, *Mucor*, *Botrytis* y otros hongos, demostró con experimentos muy elegantes y controlados, de campo y laboratorio, que los hongos se reproducen consistentemente por medio de esporas, así como que el crecimiento de diferentes especies de hongos varía dependiendo del tipo de sustrato y de las condiciones ambientales. Su trabajo contribuyó a la elucidación de la naturaleza real de las causas de enfermedades de plantas y animales y a la desmitificación de la generación espontánea (Garraway y Evans, 1991).

En el siglo XIX, el surgimiento de nuevas técnicas para propagar hongos en medios estériles, el adelanto en la teoría celular, la completa refutación de la teoría de la generación espontánea y la verificación de los "gérmenes" como causantes de las enfermedades de plantas y animales, facultaron el desarrollo de experimentos que se encaminaron al entendimiento de los efectos del medio externo y la nutrición sobre el desarrollo de los hongos, entendimiento que llevó a nuevas ideas sobre los mecanismos responsables de éste. Una contribución importante fue la de Louis Pasteur, quien, además de establecer la naturaleza viva de los hongos al desechar por completo la idea de la generación espontánea, demostró, a mediados del siglo XIX, que las levaduras (fermentos) eran responsables de los procesos de fermentación alcohólica, también probó que las fermentaciones no se llevaban a cabo si no se agregaba una fuente de Carbono y Nitrógeno, y que eran acompañadas por una pérdida de estos elementos en el medio y un subsecuente aumento de los mismos en la composición de las levaduras (Garraway y Evans, 1991).

POSICIÓN TAXONÓMICA DE LOS HONGOS

Desde el tiempo de Aristóteles (siglo IV a.C.) hasta mediados del siglo XIX, los organismos conocidos colectivamente con el nombre de "hongos" habían sido clasificados dentro del reino vegetal (Herrera y Ulloa, 1990).

Paralelamente al desarrollo de las ideas sobre su naturaleza, se especuló también sobre su posición natural, es decir, semejanzas y diferencias con otros organismos y clasificación como grupo. Esto ocurrió de manera importante a partir del renacimiento y, aunque en muchas ocasiones los diferentes grupos de hongos se clasificaron separadamente o como parte de otros grupos de organismos, el punto de vista que los consideraba como vegetales logró consenso. Ya Linneo en su *Philosophia Botanica* de 1751 había reconocido sólo dos reinos de seres vivos, y dentro del de las plantas había colocado a los hongos (Cifuentes, 1984).

Los hongos se clasifican como grupo (aunque dentro de los vegetales) con Persoon en 1801 y con Fries en 1821. Una vez que la naturaleza viva de los hongos queda establecida, y que las bases para la clasificación natural se asientan de acuerdo con la reciente Teoría Evolutiva de Darwin (1859), surge el problema del origen filogenético de los hongos. En un principio la idea de su afinidad vegetal se fortaleció y se sugirió un estrecho parentesco con las algas. Basándose en sus características heterótrofas se consideró la posibilidad de un ancestro protozoario primitivo; algunos otros sugirieron la posibilidad de un ancestro independiente de plantas y animales. Esta última idea, retomada por Zuck en 1953, planteó que las plantas, los hongos y los animales constituyen tres formas de nutrición diferenciadas en las primeras etapas evolutivas: la autotrofia, la lisotrofia (digestión extracelular y extracorporal) y la fagotrofia (digestión intracelular e intracorporal); por lo cual deberían existir cuando menos tres reinos: Phyta, Myketes y Zoa (Cifuentes, 1984).

Hacia mediados del siglo XIX, Haeckel había ya propuesto un tercer reino "Protista", para separar a la mayor parte de organismos unicelulares primitivos, dentro de ellos algunos hongos inferiores. En 1956, Copeland hace una reclasificación en la cual separa de este grupo a las bacterias e incorpora en su totalidad a organismos conocidos como hongos, denominando entonces "Protoctista" a este reino (Herrera y Ulloa, 1990).

Siempre ha existido una gran controversia por lo que "hongo" define. Por una parte, a los hongos se les ha reconocido por su capacidad para producir esporas, formar pared celular y carecer de clorofila; todo tipo de organismo con tales características ha formado parte del grupo. De esta manera, bacterias del grupo de los actinomicetos se consideraron como hongos, mas fueron separadas debido a su naturaleza procarionte (Gottlieb, 1973). También los mohos mucilaginosos (mixomicetos plasmodioforomicetos y acrasiomycetos) se incluyeron como tales, mas al observar la germinación de sus esporas se descubrió que en realidad son amebas fagotróficas que forman plasmodios de vida libre y se les definió como falsos hongos (Cifuentes, 1984). Excluyendo a estos grupos, todos los demás se caracterizan por su lisotrofia, en general inexistente en otros grupos eucariontes. Su tipo de crecimiento, su talo filamentoso y algunas otras estructuras comunes en estos grupos pueden ser consideradas como adaptaciones morfológicas al modo de nutrición por absorción; su origen está entonces relacionado directamente con la evolución de los tipos de nutrición. Con base en lo anterior, Withaker definió a los hongos en su propio reino "Fungi" y, desde este punto de vista, todos los hongos quedan relacionados por su tipo de nutrición lisotrófica. Sin embargo, esto no necesariamente significa que el grupo sea monofilético. Mientras algunos grupos de hongos cada día aparecen más estrechamente relacionados (Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota), otros se separan claramente (Hifochytridiomycota y Oomycota) y, aunque aún falta información sobre grupos menores o poco conocidos (Trichomycota o Labirintulomycota), puede plantearse que los hongos presentan varias líneas evolutivas con diferente origen que representan los ensayos que de organismos eucariontes degradadores aparecieron (Cifuentes, 1984; Garraway y Evans, 1991). A partir de los datos que confirman esta polifilia (evidencias moleculares y ultraestructurales como el tipo de pared celular, las vías metabólicas y los marcadores genéticos, etc.) se pueden considerar dos grupos "fungoides": el Fungi *sensu stricto* (Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota) y el Pseudofungi (Oomycetes, Hyphochytridiomycetes), que se puede excluir del reino Fungi y colocar en el reino Chromista. De esta manera cada uno de los grupos resulta monofilético (Cavalier-Smith, 1987) (Tabla 1).

Deuteromycetes

Existe un grupo de hongos conocido como Deuteromycetes u hongos imperfectos. En este grupo se han reunido todos los hongos que aparentemente carecen de un estado sexual y, por lo tanto, no tienen un lugar conveniente en el resto del sistema de clasificación fúngica, basado principalmente en el modo de reproducción sexual. Es posible que las especies agrupadas aquí nunca hayan desarrollado estadios sexuales (o teleomorfos) en sus ciclos de vida, o que los hayan perdido. Se piensa que la mayoría de los Deuteromycetes corresponden a las formas asexuales (o anamorfos) de hongos con reproducción sexual pertenecientes a Ascomycetes o a Basidiomycetes. Frecuentemente el estadio sexual (teleomorfo) es descubierto después y ambos estadios del hongo, anamorfo y teleomorfo (=holomorfo) son transferidos al grupo taxonómico al cual pertenece el teleomorfo. Esta transferencia es consistente con el concepto de que ambos estadios, anamorfo y teleomorfo, constituyen el ciclo de vida completo del holomorfo (Moore-Landecker, 1996).

Es evidente que bajo estas alternativas, los deuteromicetos representan un ensamble de hongos clasificados juntos por conveniencia y que, por lo tanto, carecen de cualquier origen común o relación monofilética. A pesar de esto, se puede afirmar la existencia de algunos grupos naturales, así como que la especiación puede ocurrir aun en ausencia de la reproducción sexual en los hongos. Este taxón es designado como Forma-División por su composición artificial (Kendrick y Murase, 1994; Moore-Landecker, 1996).

Tabla 1. Esquemas taxonómicos propuestos para los hongos

Ainsworth, Sparrow y Sussman, 1971 (Tomado de Casadesus <i>et al</i> , 1985)	Moore-Landecker, 1996
Subreino Hongos	Reino Protoctista
<i>División Myxomycota</i>	<i>División Plasmodiophoromycota</i>
<i>Clase Acrasiomycetes</i>	
<i>Clase Myxomycetes</i>	Reino Chromista
<i>Clase Plasmodiophoromycetes</i>	<i>División Hyphochytridiomycota</i>
<i>División Eumycota</i>	<i>División Oomycota</i>
<i>Subdivisión Mastigomycotina</i>	Reino Fungi
<i>Clase Chytridiomycetes</i>	<i>División Chytridiomycota</i>
<i>Clase Hyphochytridiomycetes</i>	<i>División Zygomycota</i>
<i>Clase Oomycetes</i>	<i>División Ascomycota</i>
<i>Subdivisión Zygomycotina</i>	<i>División Basidiomycota</i>
<i>Subdivisión Ascomycotina</i>	<i>División-Forma Deuteromycota</i>
<i>Subdivisión Basidiomycotina</i>	
<i>Subdivisión-Forma Deuteromycotina</i>	

BIOLOGÍA DE LOS HONGOS

“El éxito evolutivo de los hongos puede ser atribuido básicamente a la capacidad de extensión y de penetrabilidad del micelio” (Bartnicki-García, 1987).

EL SISTEMA MICELIAL

A lo largo de la mayor parte de su ciclo de vida, la mayoría de los hongos consta de hifas: células cilíndricas que se incrementan en longitud por crecimiento en uno de sus extremos. Puede considerarse que el ciclo de vida de un hongo comienza con la germinación de la espora. Esto ocurre generalmente con la aparición de un tubo germinal o hifa primaria que crece por extensión y dando lugar a ramificaciones. Así sucesivamente, se forma un complejo sistema radiante de hifas conocido como micelio (Carlile, 1995).

Los hongos viven en una gran variedad de materiales orgánicos; éstos pueden ser cuerpos vivos o muertos de plantas, animales u otros organismos, así como sus fragmentos, desechos o exudados. También pueden vivir en el suelo, que tiene una buena cantidad de materia orgánica. Para poder aprovechar los nutrientes presentes en los substratos, las hifas deben poder propagarse sobre ellos. Para esto, las partes viejas de las hifas se les adhieren y el alargamiento ocurre por el avance del ápice hifal; esta forma de crecimiento resulta muy efectiva ya que de ser intercalar conllevaría daños en las hifas por fricción y podría ser bloqueado por el choque del ápice con obstáculos. La propagación del micelio se lleva a cabo de manera eficiente gracias al desarrollo de sus complejos y variados patrones de ramificación del micelio (Carlile, 1995).

Los flujos protoplásmicos presentes en las hifas llevan materiales al ápice hifal y confieren los productos del metabolismo a una larga región de la hifa, sosteniendo el rápido avance apical aun en regiones carentes de nutrientes. Por otra parte, al ser la muerte celular local, limitada a zonas o módulos no funcionales del micelio, clonas de un mismo individuo genético pueden cubrir grandes superficies y vivir por mucho tiempo (Smith *et al*, 1992; Carlile, 1995).

Además de esta eficiente propagación, la producción de nuevos individuos puede darse por la fragmentación de las hifas o por el desarrollo de estructuras de propagación asexuales como los conidios. Los hongos ocasionalmente tienen la capacidad de producir esporas sexuales que eventualmente pueden colonizar nuevos lugares produciendo nuevos genetos. En hongos

"superiores" esto generalmente ocurre en estructuras multihifales (esporomas) que protegen el desarrollo de las esporas y facilitan su dispersión (Carlile, 1995).

El sistema micelial presenta características que pueden ser desventajas. Resulta una estructura muy costosa en términos de sus requerimientos nutricionales ya que conforme crece, grandes cantidades de Carbono y Nitrógeno son abandonadas en sus partes viejas; además, el ápice hifal resulta una estructura vulnerable, constantemente expuesta a daño físico. Se ha visto que una forma alterna altamente eficiente es la de las levaduras ya que la mayor economía en los materiales de la superficie se logra con células esféricas. Éstas se reproducen por gemación, proceso en el que la célula madre no muere y la aparición de una yema toma un tiempo corto por lo que está menos expuesta a daño físico que el ápice hifal. Las levaduras confieren ventajas cuando no hay necesidad de penetrar o extenderse sobre sustratos densos. Existen diversas especies fúngicas que son capaces de transformarse de una morfología a otra (dimórficas) en respuesta a estímulos ambientales (Carlile, 1995; Gow, 1995a).

LISOTROFÍA Y METABOLISMO

Los hongos están en contacto directo con los nutrientes del medio que los rodea. Las moléculas pequeñas que están disueltas en la película de agua que rodea a las hifas pueden ser absorbidas directamente por éstas. Los polímeros largos (la celulosa, la pectina, el almidón, etc.) deben sufrir primero una digestión preliminar (Fig. 1). Para que un hongo pueda utilizar un sustrato debe ser capaz de sintetizar y secretar las enzimas necesarias para su hidrólisis, debe poseer los mecanismos para transportarlo a su interior y la maquinaria metabólica para convertir sus moléculas en energía celular y en materiales para su crecimiento y desarrollo (Garraway y Evans, 1991; Moore-Landecker, 1996).

Enzimas extracelulares

Las moléculas que son muy grandes para ser absorbidas directamente por los hongos son atacadas por enzimas extracelulares que fragmentan los sustratos en subunidades cada vez más pequeñas que pueden ser absorbidas por el hongo. Las enzimas digestivas son altamente específicas y son capaces de controlar la hidrólisis de moléculas particulares. La digestión completa de polímeros grandes es un proceso progresivo que implica diferentes enzimas, hasta que

finalmente una molécula simple (soluble) es liberada (Archer y Wood, 1995; Moore-Landecker, 1996). Debido a la gran diversidad de enzimas que los hongos pueden sintetizar, existe una enorme cantidad de sustancias orgánicas que los hongos pueden utilizar como fuente de energía (Archer y Wood, 1995).

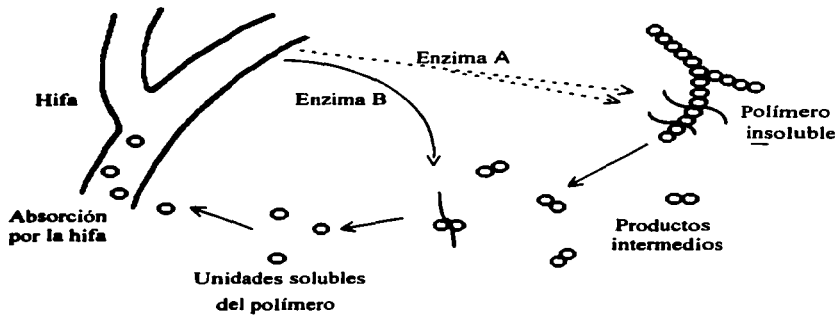


Figura 1. Digestión y absorción de nutrientes por los hongos
(Tomado de Moore-Landecker, 1996)

Secreción enzimática

Las proteínas extracelulares son sintetizadas preferentemente por ribosomas unidos a membrana, mientras que las citoplásmicas son hechas por ribosomas libres. La traducción de ARN mensajero (ARNm) a proteínas ocurre simultáneamente con la translocación de éstas al lumen del retículo endoplasmático rugoso (RER), asegurando que la proteína no se sintetice sin envoltura. Es aquí donde comienza la glicosilación de la proteína (Darnell *et al*, 1990; Ruiz-Herrera, 1992; Archer y Wood, 1995). Para alcanzar su destino final, deben seguir siendo transportadas a través de diferentes compartimentos del sistema endomembranoso, cada uno con diferente función.

La ruta más simple que siguen las proteínas extracelulares es la siguiente:

RER -- REL -- Complejo de Golgi² -- Vesículas secretorias -- Medio extracelular

Regulación metabólica

Los hongos responden a estímulos ambientales controlando la expresión génica y la **secreción de enzimas particulares**. Se ha demostrado, en estudios de producción de enzimas, que **existen varios mecanismos para su regulación**. En éstos se incluye la inducción de enzimas, en donde la presencia de un sustrato adecuado que puede ser metabolizado, activa o incrementa considerablemente la producción de enzimas; por ejemplo, la celobiosa, dímero que forma parte de la celulosa, actúa como inductor de celulasas. En algunos casos la substancia inductora no es necesariamente metabolizable (Archer y Wood, 1995).

La producción de enzimas puede también ser reprimida por crecer en presencia de compuestos que son los productos finales del metabolismo; por ejemplo, cuando los hongos celulolíticos crecen en presencia de compuestos como glucosa, ésta reprime la producción de celulasas. También hay sistemas constitutivos, es decir, sistemas en los cuales las enzimas siempre están presentes en las células, a diferencia de los sistemas que requieren necesariamente de un inductor; puede haber mecanismos de regulación en la actividad enzimática que consisten en la inhibición por retroalimentación, en donde el producto final de una vía metabólica regula la actividad de una enzima “temprana” de esta vía. Por ejemplo, la glucosa inhibe la actividad de la endoglucanasa (Archer y Wood, 1995).

Éstos son los principales mecanismos que conservan los recursos celulares y que incrementan la eficiencia energética de la célula, permitiendo una respuesta relativamente rápida a cambios en la composición de nutrientes del medio (Archer y Wood, 1995).

² Únicamente los Oomycetes tienen un complejo de Golgi “bien desarrollado”, el resto de los hongos carecen del ordenamiento tradicional en dictiosomas de las cisternas del típico complejo de Golgi y sólo tienen algunas cisternas individuales o pobremente asociadas. Los hongos carecen de un sistema de Golgi (estructuralmente), mas tienen elementos análogos que desempeñan las funciones de éste (Ruiz-Herrera, 1992, Markham, 1995).

Pectinas y xilanos: Enzimas pectinolíticas y xilanolíticas

Las paredes celulares de las plantas superiores contienen cierto número de polisacáridos. Mientras que las fibras estructurales de la pared celular vegetal están formadas por celulosa, la matriz está formada por otros dos grupos de polisacáridos de composición más variable y compleja que la celulosa: pectinas y hemicelulosas (Alberts *et al*, 1989; Darnell *et al*, 1990).

El tercer polisacárido más importante de las paredes celulares en las plantas es la pectina; éste es un heteropolisacárido ramificado formado por residuos de ácido galacturónico con una alta carga negativa. Las cadenas laterales pueden estar formadas por moléculas como galactosa, xilosa, fucosa o arabinosa. La pectina es particularmente abundante en la lámina media, la capa entre las paredes celulares de células adyacentes; es por ello que al someter tejidos vegetales a enzimas pectinolíticas generalmente ocurre la separación de las células con sus paredes celulares (Alberts *et al*, 1989; Darnell *et al*, 1990).

Las enzimas pectinolíticas o pectinasas están presentes en hongos. Tienen un papel fundamental en la degradación de frutos y vegetales, son fundamentales en los procesos de patogénesis en plantas (Aguilar y Huitrón, 1990; Fogarty, 1994) y han sido encontradas de manera importante en hongos micorrícicos, señalando un importante papel en los procesos de reconocimiento e invasión de hongos endomicorrícicos (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1995).

Las enzimas pectinolíticas incluyen a las pectinesterasas, que remueven los residuos metoxilo de la pectina, y un amplio intervalo de enzimas despolimerizantes de la pectina. Estas enzimas despolimerizantes son clasificadas de acuerdo con los siguientes criterios (Fogarty, 1994):

- Si el sustrato de mayor afinidad es pectina, ácido péctico o ácido oligogalacturónico.
- Si el mecanismo de acción es por una ruptura transeliminativa o por hidrólisis.
- Si la degradación es aleatoria (endo) o en los extremos de las moléculas (exo).

Adicionalmente a su importancia en la naturaleza, estas enzimas tienen un gran valor comercial en la industria alimenticia. Son de gran importancia en el procesamiento de vegetales y frutas al incrementar la eficiencia en extracciones de jugos y aceites (como el de olivo), en reducir la viscosidad de los concentrados y en la solubilización y modificación de los compuestos derivados de la pectina ya que facilitan los procesos de filtración o clarificación de extractos de frutas (vinos, jugos, etc.) (Berka *et al*, 1992; Fogarty, 1994).

Las hemicelulosas son un grupo de heteropolisacáridos formados por un esqueleto lineal compuesto por un tipo de pentosa, unidas por enlaces β 1-4 altamente ramificado; sus ramificaciones están formadas por azúcares diferentes a los presentes en el esqueleto. Dentro de este grupo de polisacáridos los más comunes son los xilanos, cuyo esqueleto lineal está formado por residuos de D-xilosa con cadenas laterales de arabinosa y otros azúcares. Estos polisacáridos ayudan a unir las fibrillas de celulosa entre sí, con la pectina y con otros elementos de la matriz (Alberts *et al*, 1989; Darnell *et al*, 1990; Lehninger, 1991).

El xilano, como componente de las paredes celulares vegetales, es uno de los principales componentes de la biomasa ligninocelulósica. Puede llegar a representar el 40% del peso seco de los productos de desecho agrícola. Claramente, las enzimas implicadas en la hidrólisis de estos materiales resultan de gran interés (Berka *et al*, 1992; Fogarty, 1994).

Las hemicelulasas son mezclas de enzimas que degradan en general materiales ligninocelulósicos. La degradación del xilano es debida a las actividades de xilanasas y β -xilosidasas. La mayoría de los microorganismos xilanolíticos producen xilanasas concomitantemente con celulasas. Para algunos tratamientos industriales (tratamiento de pulpas de celulosa) se requieren las preparaciones de estas enzimas con una mínima actividad de celulasas, como son las producidas por *Aspergillus* (Berka *et al*, 1992).

PARED CELULAR Y CRECIMIENTO HIFAL

“La pared celular es la estructura que confiere a los hongos la mayor parte de sus características únicas” (Bartnicki-García, 1987).

La pared celular resulta indispensable para contener la presión de turgencia, permite al protoplasto generar una alta concentración de metabolitos intracelulares y aumentar sus tasas metabólicas y de crecimiento. Este incremento en el potencial de crecimiento probablemente fue la razón primordial del éxito evolutivo de los organismos con pared celular (plantas, hongos y bacterias). Se considera que la evolución de los organismos cuya alimentación está basada en la absorción no hubiera sido posible sin la aparición de esta estructura (Bartnicki-García, 1987).

Por otra parte, la pared celular permite a las células asumir una gran variedad de formas que se ajustan a los nichos ecológicos que los hongos pueden colonizar. Es determinante en la dispersión, invasión y adaptación a los hospederos y en el entrecruzamiento de las hifas. Como la parte más externa de la envoltura celular, la pared celular provee la interfase entre el organismo y el medio externo y tiene un gran número de funciones vitales aportando información al protoplasto con respecto al exterior. Se sabe que de alguna manera controla la división nuclear, permite a la célula regular su tasa de crecimiento, provee un amplio repertorio de respuestas sensoriales que determinan la direccionalidad del crecimiento o el "comportamiento" de determinadas estructuras, así como de enzimas relacionadas con la permeabilidad de la célula, la degradación de substratos, etc. (Peberdy, 1979, 1990; Khun y Trinci, 1990; Ruiz-Herrera, 1992).

En términos generales, las formas celulares presentes en los hongos pueden ser entendidas en términos de la modulación de dos patrones básicos de extensión de la pared: el desarrollo hifal, básicamente generado por una versión polarizada del crecimiento de extensión de la pared, y el crecimiento levaduriforme, como una versión de crecimiento isodiamétrico de extensión de la pared. Se puede comprender el crecimiento de los hongos al entender el proceso de síntesis y extensión de la pared celular (Bartnicki-García y Lipmann, 1969; Bartnicki-García, 1987).

LA PARED CELULAR

La mayor parte de los componentes de las paredes celulares son polisacáridos que comprenden aproximadamente el 80% de su peso seco. Hay también proteínas que se encuentran en proporciones que van del 3 al 20%, así como lípidos, pigmentos y sales inorgánicas en proporciones menores (Ruiz-Herrera, 1992).

Se han reconocido dos tipos de componentes de la pared celular de acuerdo con su función: estructurales (fibrilares o del esqueleto) y cementantes (de la matriz) (Peberdy, 1990; Ruiz-Herrera, 1992) (Tabla 2).

Tabla 2. Componentes de las paredes celulares de los hongos
(Tomado de Ruiz-Herrera, 1992)

Tipo de componente	Ejemplos específicos
Fibrilar	Quitina, celulosa, β -glucana.
Matricial	β -glucana, α -glucana, quitosana, glicoproteínas, lípidos, sales inorgánicas, pigmentos.

La quitina es un polisacárido no ramificado formado por N-acetil-glucosamina, unida por enlaces β -1,4, que forma cadenas denominadas glucosaminoglucanos; éstas se unen por puentes de Hidrógeno formando microfibrillas.

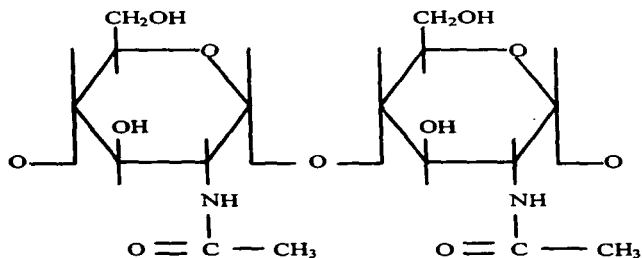


Figura 2. Una porción de una molécula de quitina
(Tomado de Moore-Landecker 1996)

El ordenamiento característico de las microfibrillas presentes en los seres vivos (α -quitina) consiste en el agrupamiento de tres cadenas de glucosaminoglucanos de forma antiparalela (Ruiz-Herrera, 1992; Ruiz-Herrera *et al*, 1992; Sentandreu *et al*, 1994). Estas microfibrillas son muy resistentes a las fuerzas de tensión por lo que la quitina ha sido considerada el componente ultraestructural más importante de la pared celular (aun cuando no es el más abundante) (Ruiz-Herrera, 1992).

Los glucanos son polisacáridos compuestos por glucosa. Dentro de este grupo están la celulosa que presenta enlaces β -1,4 y las glucanas. La β -glucana presenta enlaces β -1,3 y β -1,6 en proporción variable y la α -glucana tiene enlaces α -1,3. La pared celular también está compuesta por mananas, formadas principalmente por manosa y por algunos polisacáridos característicos de ciertos grupos fungales, como la quitosana (un análogo desacetilado de quitina) y por algunos polisacáridos de galactosamina, glucopiranososa, ácido glucurónico, etc. (Ruiz-Herrera, 1992; Sentandreu *et al*, 1994).

Salomón Bartnicki-García (1968) describió que las paredes de los hongos pueden ser agrupadas en 8 quimiotipos de acuerdo con su composición de polisacáridos. Estos quimiotipos revelan relaciones filogenéticas que han sido consistentes con un gran número de marcadores filogenéticos en demostrar el origen polifilético de los hongos (Ruiz-Herrera, 1992) (Tabla 3).

Tabla 3. Quimiotipos de las paredes celulares de los hongos
(Tomado de Bartnicki-García, 1968)

Quimiotipo	Grupo taxonómico
I Celulosa-glucógeno	Acrasiales
II Celulosa-glucana	Oomycetes
III Celulosa-quitina	Hyphochytridiomycetes
IV Quitosana-quitina	Zygomycetes
V Quitina-glucana	Chytridiomycetes
	Eucomycetes
	Homobasidiomycetes
	Deuteromycetes
VI Manana-glucana	Hemiascomycetes
VII Manana-quitina	Heterobasidiomycetes
VIII Poligalactosamina-galactana	Trichomycetes

Las proteínas son componentes importantes de la pared celular, las formas glicosiladas son las más abundantes. Estas glicoproteínas están formadas por un segmento proteínico unido covalentemente a cadenas de carbohidratos formadas principalmente por manosa (razón por la cual también han sido denominadas manoproteínas) aunque también pueden estar presentes otros azúcares y grupos fosfodiéster (Ruiz-Herrera, 1992; Sentandreu *et al*, 1994).

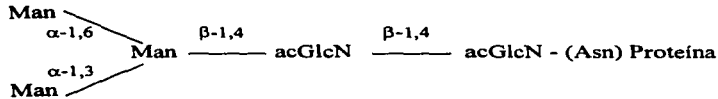


Figura 3. Estructura básica de las glicoproteínas (Tomado de Ruiz-Herrera 1992)

Diversas técnicas citoquímicas y de microscopía han demostrado que la estructura de la pared celular puede describirse como un sistema de dos fases, en donde sus superficies interna y externa muestran diferencias fundamentales. La superficie interna de la pared celular se caracteriza por su apariencia fibrilar; se ha demostrado que está formada por los polisacáridos estructurales que son los materiales más resistentes. Estos polisacáridos son altamente insolubles y forman una red microfibrilar que confiere a la pared celular la rigidez necesaria para soportar fuerzas de tensión altas (Peberdy, 1990; Ruiz-Herrera, 1992).

El esqueleto fibrilar se encuentra inmerso en una matriz de glicoproteínas, lípidos y polisacáridos no fibrilares que resultan evidentes en la superficie externa de la pared celular. Esta matriz amorfa se encarga de organizar y mantener la estructura básica, de dar resistencia a fuerzas de compresión y protección a las fibras de ataques químicos. En esta fase reside un gran número de procesos fisiológicos (Ruiz-Herrera, 1992).

Esta descripción corresponde al modelo típico de especies filamentosas como *Aspergillus*; sin embargo, la composición o estructura de la pared puede variar en complejidad en otros hongos. También hay diferencias en las paredes celulares presentes en distintas estructuras vegetativas y de reproducción, así como a lo largo de la superficie celular de las hifas. Los ejemplos mejor conocidos son los que se refieren a las diferencias entre las regiones apical y subapical de la hifa que, si bien pueden entenderse con base en el proceso de expansión y crecimiento de la pared celular, no deben ser relacionadas estrictamente con las regiones de crecimiento de las hifas. Se ha

esclarecido la existencia de 4 zonas: la apical propiamente dicha (domo apical), la subapical no extensible (50µm desde el ápice), una zona subapical de crecimiento en grosor de la pared³ y, por detrás de ésta, una región madura que ya no se incrementa⁴ (Burnett, 1979; Peberdy, 1990; Ruiz-Herrera, 1992).

CRECIMIENTO

"El origen del reino fúngico puede hallarse en el momento en que determinados eucariontes con pared primitiva, los progenitores de los hongos, descubrieron el crecimiento apical" (Bartnicki-García, 1987).

El proceso de extensión de la pared celular, entendido como el proceso de adición de materiales de pared a las regiones en expansión de la célula y no a una pared preexistente, ocurre en el ápice y es el principal mecanismo de crecimiento de los hongos. El fenómeno de crecimiento intercalar o difuso, en donde la extensión es el resultado de la expansión de todas las regiones de la superficie de la célula, es sumamente raro y está restringido únicamente al alargamiento de los estípites de ciertos macromicetos (Wessels *et al*, 1990; Ruiz-Herrera, 1992). Los hongos deben su forma a la pared celular, que a su vez adquiere una determinada morfología no por sus características químicas en sí, sino por su patrón de síntesis (Burnett, 1979; Ruiz-Herrera, 1992).

BASES CELULARES DEL CRECIMIENTO

La expansión de la pared celular fúngica puede considerarse como la última manifestación de un mecanismo celular que trae consigo el crecimiento polarizado. Las enzimas responsables de sintetizar la pared deben ser depositadas en el lugar de síntesis (el ápice o la yema). Se ha observado que su transporte ocurre en vesículas asociadas al sistema de membranas y que la fusión de éstas con el plasmalema provee la membrana necesaria para su expansión y la maquinaria

³ Al crecimiento en grosor de la pared celular de los hongos se le ha llamado crecimiento secundario, como una analogía con el crecimiento secundario de la pared celular vegetal. En consecuencia, a la pared celular que resulta de este proceso se le ha llamado pared celular secundaria (Burnett, 1979; Ruiz-Herrera, 1992).

⁴ Se ha demostrado que en los períodos de agotamiento de recursos esta región de las hifas puede proveer de nutrientes al microorganismo al ocurrir autólisis de sus componentes (Burnett, 1979; Ruiz-Herrera, 1992).

enzimática para la síntesis de la pared; el problema del crecimiento polarizado puede ser reducido a una exocitocis vesicular localizada. Existen varias características estructurales de las células fúngicas que son importantes para el crecimiento, mas podemos considerar como principales participantes a las vesículas, al citoesqueleto, y a la pared celular (Bracker *et al.*, 1976; Bartnicki-García *et al.*, 1990; Ruiz-Herrera, 1992; Gow, 1995).

Las glicoproteínas que construyen la pared celular son sintetizadas dentro de la célula, en términos generales, de la misma manera que el resto de las proteínas de las células eucariontes y no organizan una estructura coherente hasta que son externalizadas (Ruiz-Herrera, 1992).

Aparato vesicular

A partir de una serie de estudios celulares y bioquímicos, ha quedado claro que las vesículas son las responsables del crecimiento de la pared celular. Se demostró que la mayor concentración de éstas se localiza hacia la región apical, en lo que se ha denominado el aparato vesicular y se ha sugerido que pueden provenir del aparato de Golgi o bien, directamente del RER localizado en la región subapical (Grove y Bracker, 1970; Ruiz-Herrera y Bartnicki-García, 1974; Bartnicki-García *et al.*, 1990; Fèvre *et al.*, 1990; Gow *et al.*, 1992; Ruiz-Herrera, 1992).

Las vesículas se han clasificado en dos grupos: microvesículas (30-100nm.) y macrovesículas (100-400nm). Aunque muchas de las macrovesículas pueden ser producto de la fusión de las microvesículas, en general se ha considerado que las primeras están relacionadas con la construcción de los elementos fibrilares, mientras que las segundas lo están con los procesos de secreción y reparto de los componentes de la matriz amorfa (Bartnicki-García, 1987; Ruiz-Herrera, 1992).

El modelo más estudiado es el de las microvesículas relacionadas con la síntesis de quitina, conocidas como quitosomas. Se ha demostrado que su contenido corresponde a la forma inactiva (zimógeno) de la sintetasa de quitina y que son capaces de construir microfibrillas de quitina *in vitro*. Para que se presente esta actividad, el zimógeno debe ser activado por una proteasa externa al quitosoma; *in vivo*, ésta parece localizarse en la superficie celular, por lo que esta zimogenidad presumiblemente ha evolucionado como una forma efectiva en que se prevee la actividad prematura de la enzima antes de que llegue a la superficie celular (Ruiz-Herrera y Bartnicki García, 1974; Bracker *et al.*, 1976; Bartnicki-García *et al.*, 1979; Ruiz Herrera, 1992; Ruiz Herrera *et al.*, 1992).

Deposición y ensamblaje

Numerosas evidencias indican que el arreglo de los elementos en la pared es consecuencia de un proceso de autoensamblaje regulado muy delicadamente; no hay enzimas relacionadas con este proceso. En la pared celular nascente las cadenas de glucosaminoglucanos se encuentran libres, formando una estructura laxa entre la cual se deposita la α -glucana que permanece de manera soluble. La distensión de esta estructura permite la continuación de la fibrogénesis y la deposición de más materiales. Conforme esto ocurre, la formación de enlaces entre las cadenas de glucosaminoglucanos y las glucanas tiene lugar; las glucanas, ahora como cadenas insolubles en agua, pueden asociarse entre sí por puentes de Hidrógeno y formar fibrillas de tres cadenas. Éstas promueven y determinan la unión de las cadenas de glucosaminoglucanos (también por puentes de Hidrógeno) presente en las fibras de la α -quitina. Este proceso ocurre del ápice hacia las regiones subapicales, conformando una estructura cada vez más rígida, y puede ser el responsable del alargamiento de los estípites de los esporomas. El papel de las enzimas autolíticas presentes en la pared celular no es claro (Burnett, 1979; Wessels *et al*, 1990; Ruiz-Herrera, 1992; Ruiz-Herrera *et al*, 1992).

Procesos de polarización y dirección

Actualmente existen evidencias que indican que el citoesqueleto y las corrientes iónicas son los mecanismos que imponen polaridad a la célula y dirigen la migración de las vesículas a zonas específicas de la superficie celular. Se ha sugerido una estrecha relación entre los componentes del citoesqueleto y la migración de las vesículas (Ruiz-Herrera, 1992; Gow, 1995; Heath, 1995).

Un posible mecanismo de la actuación del citoesqueleto en el crecimiento es que en vez de estar encargado del movimiento individual de las vesículas, lo esté de un organelo responsable de su formación (Ruiz-Herrera, 1992). Bartnicki-García y sus colaboradores desarrollaron un modelo matemático para explicar la morfología fúngica que implica un centro suministrador de vesículas (VSC) moviéndose a lo largo de la hifa. Un “organelo”, el *Spitzenkörper*, puede ser un buen candidato para ser desplazado y adecuadamente dirigido por el citoesqueleto. Éste debe actuar como un depósito en el cual las vesículas son colectadas y como la fuente de vesículas que irán a fusionarse a la superficie celular durante el proceso de alargamiento celular. Se ha sugerido que el VSC debe coleccionar las vesículas en el ápice hifal antes de descargarlas y distribuirlas en la superficie celular (Bartnicki-García *et al*, 1990; Bartnicki-García y Gierz, 1995).

Spitzenkörper

Se ha detectado la presencia de un cuerpo esférico denso en el ápice de las hifas de los hongos ascomicetos y basidiomicetos al que se ha llamado *Spitzenkörper* (cuerpo apical, en alemán) (Ruiz-Herrera, 1992). Los hongos zigomicetos y oomicetos tienen una acumulación apical de vesículas⁵, pero no un *spitzenkörper* observable. Grove y Bracker (1970) cuestionaron el que este corpúsculo sea equivalente a la acumulación de vesículas del aparato vesicular y lo consideraron como una pequeña región especializada en el centro de las vesículas de los hongos septados. Se ha observado que la localización del *spitzenkörper* determina la forma de las hifas, sus cambios de dirección y sus ramificaciones. La tasa de crecimiento de las hifas no es constante, sino que ocurre en pulsos de amplitud definible, relacionados con la frecuencia de aparición y migración del *spitzenkörper* y de cuerpos apicales satélites asociados a él. Estos descubrimientos demuestran su importancia en la expansión localizada de la pared celular y como un organelo dinámico en la morfogénesis fúngica (López-Franco *et al*, 1994, 1994a; Bartnicki-García *et al*, 1995; Bracker, 1995; Gow, 1995).

⁵El aparato vesicular de los zigomicetos se acumula como una banda creciente cercana a la pared apical y el de los oomicetos se encuentra disperso sin presentar ninguna región especializada.

PROTOPLASTOS FÚNGICOS

La remoción de la pared celular fúngica resulta en la liberación de protoplastos: entidades esféricas, discretas, altamente sensibles a la osmolaridad del medio. Estas células han sido importantes en el desarrollo de la micología en las últimas décadas (Peberdy y Ferenczy, 1985; Peberdy, 1990).

En un principio, el interés por obtener protoplastos surgió como una necesidad de mejorar los procedimientos para obtener organelos celulares en levaduras. Debido a que los tratamientos requeridos para desintegrar la pared celular son sumamente drásticos, conllevan daños en los organelos celulares por lo que los protoplastos fueron de gran valor en estudios de biosíntesis. Esta práctica continúa y, con el desarrollo que se obtuvo, pudo ser extendida a hongos filamentosos (Peberdy, 1979; Peberdy y Ferenczy, 1985). Subsecuentemente los protoplastos se volvieron estructuras de interés por sí mismas y fueron objeto de muchos estudios de fisiología celular, dirigidos sobre todo, al proceso de regeneración celular y al de reversión a las formas celulares normales. Son una herramienta importante en diversos estudios de biología celular, bioquímica, genética, etc. (Peberdy 1979, Collings *et al*, 1988).

AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS

Una gran parte del éxito de los protoplastos en los estudios mencionados se ha debido al extenso trabajo de aislamiento y cultivo de protoplastos. En general, se han desarrollado dos métodos para obtener protoplastos (Peberdy, 1979).

Procedimientos no enzimáticos para la obtención de protoplastos

En general, los sistemas no enzimáticos han sido utilizados en investigaciones bioquímicas en donde se requieren protoplastos a gran escala y el uso de sistemas enzimáticos resulta costoso, o bien, para estudiar problemas biológicos específicos (Peberdy, 1979; Nolan, 1985).

Diversas sustancias químicas han sido utilizadas para la obtención de protoplastos. Por ejemplo, se han obtenido a partir de levaduras después de ser cultivadas en presencia de 2-desoxi-D-glucosa y altas concentraciones de sulfato de magnesio (Peberdy, 1979; Davis, 1985).

Un proceso altamente especializado de liberación de protoplastos se ha observado en hongos patógenos de insectos. Los conidios de los hongos Entomophthorales producen tubos germinales que liberan su contenido citoplasmático en forma de protoplasto. Se observó que se mantienen en el hospedero desde el momento de la invasión hasta poco antes de la muerte del insecto y se ha propuesto que este patrón de comportamiento es parte del ciclo de vida de estos hongos en su insecto hospedero (Peberdy, 1979; Nolan, 1985).

Procedimientos enzimáticos

Los métodos no enzimáticos no han sido utilizados de manera extensa debido a que se trata de métodos específicos para organismos en particular, o bien, a que los tratamientos químicos empleados pueden inducir cambios metabólicos en los protoplastos. La mayoría de los trabajos en protoplastos han incluido el uso de enzimas micolíticas (Peberdy, 1985).

Se han obtenido protoplastos de hongos pertenecientes a todos los grupos taxonómicos mayores, su formación depende de la degradación parcial o total de la pared hifal por las enzimas líticas adecuadas. En un principio fueron utilizadas preparaciones a base de jugo digestivo de caracol (*Helix pomatia*), posteriormente, con el desarrollo de investigaciones en microbiología, se introdujo el uso de diversas enzimas de origen microbiano (Peberdy, 1976).

Debido a la diversidad en la composición de las paredes celulares de los hongos de diferentes grupos taxonómicos (Tabla 3) no existe un complejo enzimático que sea efectivo para todos los hongos, pero frecuentemente contienen quitinasas, proteasas y glucanasas. Para el desarrollo de un sistema lítico adecuado se debe tomar en cuenta la composición de la pared celular (Peberdy, 1976, 1979, 1985; Rokem *et al*, 1986; Sanadhu *et al*, 1989; Hashiba, 1992).

-Enzimas micolíticas

Muchos grupos que trabajan con hongos filamentosos han considerado que la manera más efectiva de obtener protoplastos, es mediante la producción de complejos enzimáticos, a partir de microorganismos (con capacidad micolítica), en sus propios laboratorios (Peberdy, 1979, 1985). Recientemente se han desarrollado complejos comerciales de enzimas micolíticas que son producidos por una gran diversidad de microorganismos.

El jugo gástrico del caracol *Helix pomatia* o las enzimas aisladas de él, son comúnmente utilizados. Las bacterias de los géneros *Arthrobacter* y *Bacillus* y las myxobacterias del género *Cytophaga* son efectivas para degradar las paredes celulares cuyo componente fundamental es la glucana, mientras que los actinomicetos *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Oerskovia*, son capaces de degradar las paredes celulares de los grupos muy diversos que van de Oomycetes a hongos quitinosos incluyendo levaduras (Peberdy, 1979, 1985).

Los hongos filamentosos también han sido utilizados como productores de enzimas. Los géneros *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Aspergillus* y *Penicillium* son los más comunes. *Trichoderma* es uno de los más importantes ya que es capaz de degradar las paredes celulares de un gran número de hongos (Peberdy, 1985; Sandhu *et al*, 1989; Hashiba, 1992). Un hongo en particular puede ser la fuente de sus propias enzimas líticas. La presencia de enzimas autolíticas se ha demostrado en diversos hongos (cuando cesa el crecimiento y comienza la autólisis celular) (Polacheck y Rosenberger, 1978; Burnett, 1979; Peberdy, 1985; Wessels *et al*, 1990; Ruiz-Herrera, 1992).

Factores que afectan el aislamiento de protoplastos

-Estabilizador osmótico

Al remover la pared celular resulta indispensable proveer un soporte osmótico al protoplasto; para ello se han utilizado sales inorgánicas, azúcares y azúcar alcoholes. En términos generales, las sales inorgánicas son más efectivas con hongos filamentosos mientras que los azúcares y azúcar alcoholes, lo son con levaduras. Las virtudes de los estabilizadores osmóticos son entendidas sólo "empíricamente"; sin embargo, es claro que sus características y la concentración en que se empleen, van a influenciar el rendimiento en la formación de los protoplastos y su estabilidad (Peberdy, 1976, 1979; Davis, 1985).

Los estabilizadores osmóticos más utilizados son el KCl, el MgSO₄, el NaCl, la sacarosa y el manitol. Las concentraciones en las cuales se han empleado van de 0.4 M a 1.4 M y entre 0.4 - 0.8 M es, en general, donde mejores resultados se han obtenido (Davis, 1985; Hashiba, 1992).

El estabilizador osmótico utilizado cambia la densidad relativa de los protoplastos. Por ejemplo, los protoplastos de *Schizophyllum comune* sedimentan bajo gravedad en NaCl, KCl, manitol y sorbitol; en sacarosa se mantienen en suspensión y con MgSO₄ (además de que el micelio se fragmenta en demasía) los protoplastos flotan (aun después de ser sometidos a centrifugación) (Peberdy, 1976, 1979; Davis, 1985). El estabilizador osmótico también puede tener un efecto estimulador o inhibidor de la actividad enzimática (Peberdy, 1976; Davis, 1985).

-Microorganismo

La estructura y el arreglo de las hifas repercuten de manera importante en la aislamiento y en la naturaleza de los protoplastos (Davis, 1985). Los protoplastos fúngicos son muy heterogéneos con respecto a su morfología, a su estado fisiológico y bioquímico (Peberdy, 1979).

Se ha sugerido que en tiempos cortos de digestión los ápices hifales se hinchan y los primeros protoplastos pueden emerger a través de poros de la pared hifal; estos protoplastos generalmente no son vacuolados, muchos carecen de núcleo y tienen un tamaño menor. Conforme los protoplastos se van liberando de la hifa, en dirección apical-distal, se observa un incremento en su vacuolización y en su tamaño, hasta que los protoplastos liberados de las regiones distales carecen de los organelos celulares y/o de los requerimientos bioquímicos para su viabilidad (Peberdy, 1979a; Davis, 1985).

En este sentido, el estado fisiológico del cultivo es un factor crucial en la formación de los protoplastos. La edad y naturaleza del cultivo determinan el estado de la pared celular y pueden alterar su susceptibilidad a lisis. Se obtienen mejores rendimientos de protoplastos al utilizar micelio en la fase exponencial de crecimiento que de micelio de cultivos viejos con paredes engrosadas. La susceptibilidad del micelio crecido en medios definidos es mayor que la de medios complejos (Peberdy, 1979; Davis, 1985).

El pH y la temperatura son dos factores importantes en la digestión de las paredes celulares; pueden alterar la disposición celular de los protoplastos y la estabilidad de sus membranas. También se relacionan estrechamente con la actividad de las enzimas del sistema lítico y con los estabilizadores osmóticos. El amortiguador en el medio de incubación también puede afectar el aislamiento de los protoplastos (Davis, 1985; Hashiba, 1992).

LOS PROTOPLASTOS EN LA INVESTIGACIÓN GENÉTICA

Los protoplastos fúngicos han sido utilizados exitosamente en estudios de genética fúngica. La tecnología de recombinación del ADN ha revolucionado el entendimiento de la estructura de los genes, su replicación, expresión, mutación y fundamentalmente su función. El potencial que brindan los protoplastos, como una herramienta en los estudios genéticos en hongos, incluye el mapeo genético y el mejoramiento de cepas por la fusión de células somáticas, el aislamiento de ácidos nucleicos para los análisis de secuenciación y clonación, así como recipientes para la transformación y la transducción (Bennett, 1985).

Fusión de protoplastos en hongos

Las técnicas de fusión de protoplastos se han utilizado para sobrepasar muchas de las barreras naturales que evitan el entrecruzamiento entre los hongos. Se han realizado fusiones de protoplastos en muchos hongos deuteromicetos carentes de ciclos sexuales, en ascomicetos donde el ciclo sexual es difícil o imposible de demostrar y en hongos simbióticos, tales como los micorrízicos, que en laboratorio no esporulan ni completan su ciclo sexual. La fusión de protoplastos ha permitido el intercambio genético en estos hongos, haciendo posible el desarrollo de estudios de genética básica y la posibilidad de mejorar cepas sobrepasando las barreras de incompatibilidad intraespecífica (Brikett y Hamlyn, 1985; Croft, 1985; Barrett *et al*, 1989; Pe'er y Chet, 1990; Gadau y Lingg, 1992) y dando lugar a híbridos fungales (Peberdy, 1979; Anné y Peberdy, 1985; Gadau y Lingg, 1992).

Estas técnicas han sido de gran importancia para transferir elementos genéticos citoplasmáticos tales como los plásmidos, las mitocondrias o los núcleos celulares, permitiendo así estudios de genética mitocondrial o bien la manipulación y transformación genética (Ferenczy, 1985; Sivan *et al*, 1990; Vágvölgyi y Ferenczy, 1991; Gadau y Lingg, 1992).

Transformación en hongos mediada por ADN

Los hongos tienen paredes celulares rígidas que constituyen una barrera para la entrada de toda macromolécula, tal como el ADN exógeno. Por lo tanto, la mayoría de los protocolos para transformar células que implican la adición e incorporación de ADN al genoma fúngico requieren la generación de protoplastos (Peberdy, 1979; Goosen *et al*, 1992; Upshall, 1992).

LOS PROTOPLASTOS EN LA BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGIA CELULAR

La pared celular representa una barrera física en los hongos; muchos de los problemas en estudios fisiológicos y bioquímicos son debidos a la dificultad de poder preparar sistemas libres de células. En términos de biología celular, las preparaciones de protoplastos han proporcionado un gran número de ventajas, siendo reconocidos como sistemas de células que son una fuente de materiales para la preparación de fracciones subcelulares (Isaac, 1985).

Por otra parte, se asume que los protoplastos son entidades metabólicamente activas con propiedades bioquímicas y fisiológicas semejantes a las de la célula intacta, por lo cual, brindan un sistema de unidades viables representativas del citoplasma del micelio (Peberdy, 1979; Isaac, 1985).

Estas unidades representan una fracción de la hifa y en conjunto son un sistema heterogéneo que refleja la diferenciación hifal. Es posible separar las fracciones de los protoplastos que representen predominantemente las regiones apical, subapical y distal del citoplasma de las hifas (Peberdy, 1979a; Isaac, 1985).

Los protoplastos han sido empleados en estudios bioquímicos y de ultraestructura de las membranas plasmáticas, pues se ha demostrado que éstas se mantienen bioquímicamente intactas después de la ruptura y degradación de la pared celular. En este sentido, también han brindado información sobre la actividad de las enzimas asociadas a las membranas y a las fracciones subcelulares, las propiedades de permeabilidad, los sistemas de transporte y las tasas respiratorias. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la preparación de los protoplastos tendrá efectos muy marcados en la fisiología de los hongos, resultando en la disgregación de algunas funciones normalmente integradas (Isaac, 1985).

REGENERACIÓN DE LA PARED CELULAR Y REVERSIÓN DE PROTOPLASTOS

A la secuencia de eventos que llevan del protoplasto a la célula normal capaz de reproducirse se le ha referido en la literatura tanto como regeneración de protoplastos como reversión de protoplastos. La regeneración de la pared celular es un evento clave ya que sin ella el proceso de citocinesis no sería posible. El término "reversión" puede también ser utilizado en un sentido más riguroso para designar sólo la serie de eventos de todo el proceso de reparación (de la regeneración del protoplasto) que se caracterizan por la renovación del control del ciclo celular, llevando a la restauración del estado normal de la célula. En esta terminología "regeneración del protoplasto" incluirá dos procesos claves, la regeneración propiamente de la pared celular y la reversión del protoplasto "con pared" (Necas y Svoboda, 1985).

El proceso de regeneración de la pared celular y la subsecuente reversión celular han sido los aspectos más extensamente estudiados en los protoplastos fúngicos (Peberdy, 1979).

La investigación de la regeneración de los protoplastos provee información en diversos aspectos. Permite la evaluación de la capacidad de regeneración de la célula. Representa un sistema modelo que ha permitido el entendimiento de varios procesos celulares, bioquímicos y genéticos en hongos tales como:

-Los procesos de biogénesis de la pared celular: la localización de los lugares de síntesis y de transporte de los polímeros de la pared celular, el papel de la membrana celular en este proceso; el control de la organización supramolecular y el papel del autoensamblaje en los procesos morfogenéticos; el conocimiento de las relaciones ultraestructurales entre los elementos fibrilares y matriciales y la cinética de su depositación.

-El papel de la pared celular en la morfogénesis de la célula: la determinación de la forma celular, el control del dimorfismo y de los procesos sexuales y el control de la citocinesis.

-Problemas asociados con el control del ciclo celular: la secuencia de eventos, en espacio y tiempo, del ciclo celular y su control.

También ha sido importante al investigar la función del citoesqueleto, la estructura dinámica del plasmalema y las relaciones cuantitativas entre organelos intracelulares y mutantes morfológicas (Peberdy, 1979a; Necas y Svoboda, 1985).

EL GÉNERO *Aspergillus*

Los hongos del género *Aspergillus* son actualmente conocidos como una de las formas de vida más abundantes y ampliamente distribuidas del planeta. Son saprófitos comunes en el suelo, en vegetales en pudrición y son agentes fundamentales en la descomposición y reintegración de materia orgánica al medio. Muchas especies son parásitas de plantas y animales. Fueron de los primeros organismos en ser cultivados en medios artificiales y estudiados con fines biológicos. Adicionalmente a su papel en la naturaleza, su versatilidad metabólica tiene consecuencias, tanto positivas como negativas, en el espacio humano (Bennett y Klich, 1992; Klich *et al.*, 1992; Samson, 1994).

El ciclo de vida de *Aspergilli* comprende dos etapas. Una definida por la producción asexual de esporas y otra que engloba los eventos de su reproducción sexual (Figura 4). La fase asexual puede también ser llamada conidiación, ya que comprende los eventos que llevan a la formación de estructuras diferenciadas que portan las esporas, producidas por un proceso mitótico, que se conocen como conidios (*conidia*) (Yager, 1992).

La fase sexual tiene como resultado la formación de un cleistotecio: una estructura esférica cerrada, formada por una red de hifas no esporógenas dentro de la cual se desarrollan esporas derivadas de un proceso meiótico. La reproducción sexual comienza cuando la plasmogamia toma lugar, resultando en la aparición de una hifa dicarionte diferenciada. Los dos núcleos de esta célula sufren divisiones sincrónicas para dar lugar a una serie de hifas dicariontes llamadas ascógenas. A partir del ápice de cada una de estas hifas aparece un asca una vez que dos de sus núcleos se fusionan; inmediatamente después ocurre la meiosis y dentro de cada asca aparecen cuatro núcleos haploides. Éstos se dividen por mitosis y los ocho núcleos resultantes son incorporados en ocho ascosporas inmaduras. Una división mitótica más da como resultado las ascosporas maduras binucleadas. No todos los hongos del género *Aspergillus* tienen la capacidad de reproducirse sexualmente (Moore-Landecker, 1996; Yager, 1992).

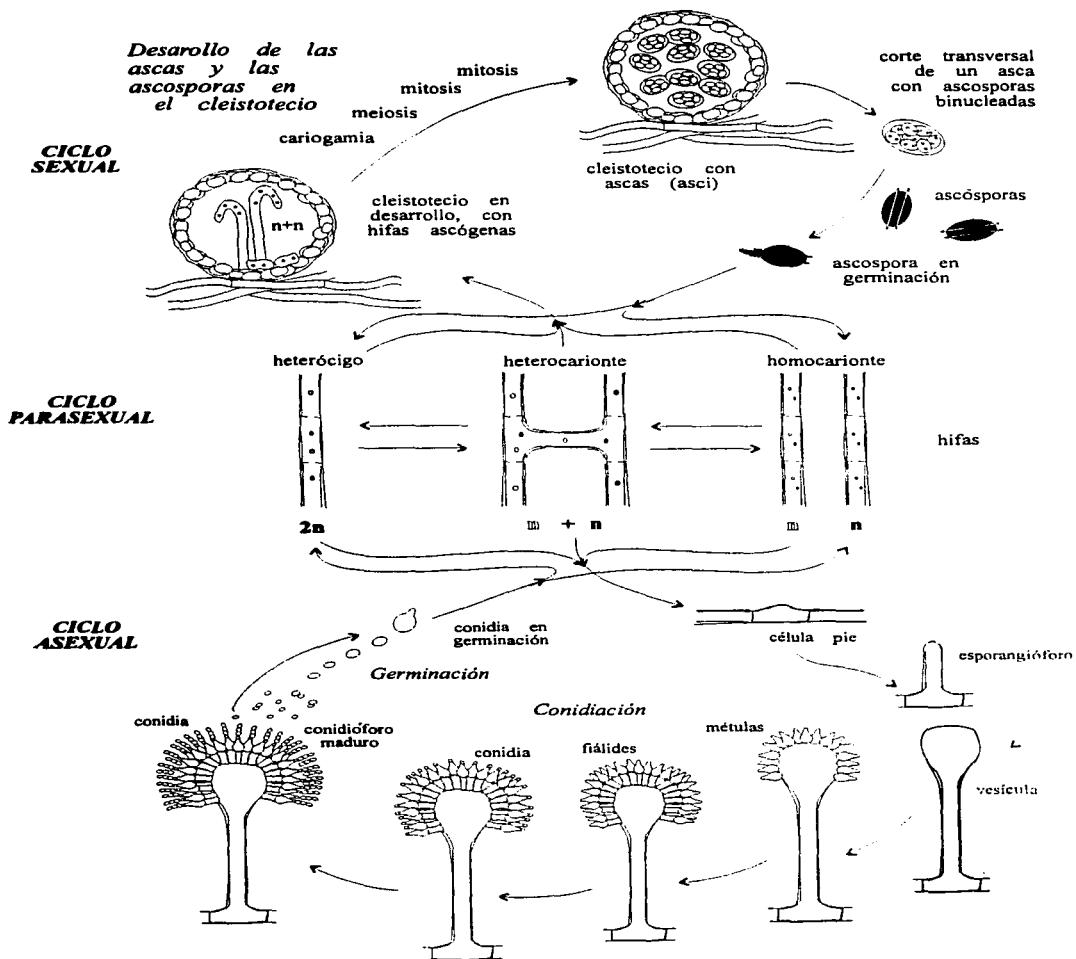


Figura 4. CICLO DE VIDA DE *Aspergillus nidulans*
 (Modificado de Timberlake y Marshall, 1988)

TAXONOMÍA DE ASPERGILLI

La primera descripción del género data de 1727, cuando Micheli aportó una diagnosis e ilustraciones que claramente representan sus características. El conidióforo que caracteriza al género consiste en una hifa larga que culmina en un estructura globosa portadora de esporas; Micheli, clérigo florentino, encontró semejanza con el *aspergillum* (*aspersorio*) instrumento metálico utilizado por los sacerdotes para rociar agua bendita, de ahí su nombre (Bennett y Klich, 1992; Samson, 1994).

El género *Aspergillus* pertenece a los Deuteromycetes (Fungi Imperfecti), Hyphomycetes, y es caracterizado por el *aspergillum* (conidióforo) (Figura 5). Los estados teleomórficos corresponden a hongos Ascomycetes, cuyas ascosporas son formadas en cleistotecios (Plectomycetidae) (Samson, 1992, 1994).

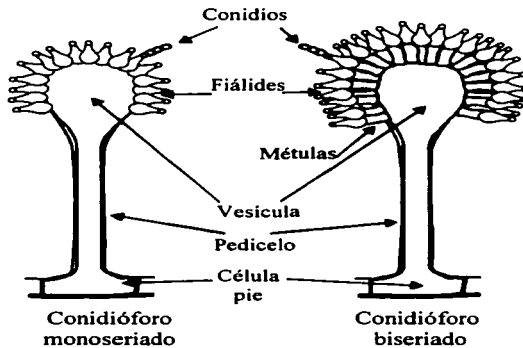


Figura 5. Estructuras del conidióforo de *Aspergillus* (Tomado de Samson, 1992)

El soporte en la identificación de los hongos de este género es principalmente morfológico; el análisis de los conidióforos, las características de los conidios y del micelio vegetativo (forma, tamaño, color, etc.) y la presencia de esporomas, pueden ayudar a definir las especies. Además de las características convencionales se han desarrollado nuevas aproximaciones (análisis utilizando métodos moleculares, los perfiles de las enzimas y de los metabolitos secundarios y ensayos inmunológicos) que han sido congruentes con caracteres morfológicos y son de potencial taxonómico para la identificación de los *Aspergilli* (Samson, 1992, 1994).

En 1965, Raper y Fennell establecieron una clasificación infragenérica para los hongos del género *Aspergillus* en la que los conceptos genéricos y específicos quedaron circunscritos. Gams y sus colaboradores en 1985, reemplazaron la estructura de grupos de esta clasificación por una seccional acorde al Código Internacional de Nomenclatura Botánica (Raper y Fennell, 1965; Samson, 1992) (Tabla 4).

Tabla 4. Nomenclatura de taxa infragenéricos del género *Aspergillus*. De acuerdo con Gams et al, 1985* (Tomado de Samson, 1992)

Subgénero <i>Aspergillus</i>		Subgénero <i>Nidulates</i>	
Sección <i>Aspergillus</i>	(grupo <i>A. glaucus</i>)*	Sección <i>Nidulates</i>	(grupo <i>A. nidulans</i>)
Sección <i>Restricti</i>	(grupo <i>A. restrictus</i>)	Sección <i>Versicolores</i>	(grupo <i>A. versicolor</i>)
Subgénero <i>Fumigati</i>		Sección <i>Usti</i>	(grupo <i>A. ustus</i>)
Sección <i>Fumigati</i>	(grupo <i>A. fumigatus</i>)	Sección <i>Terrei</i>	(grupo <i>A. terreus</i>)
Sección <i>Cervini</i>	(grupo <i>A. cervinus</i>)	Sección <i>Flavipedes</i>	(grupo <i>A. flavipes</i>)
Subgénero <i>Ornati</i>	(grupo <i>A. ornatus</i>)	Subgénero <i>Circumdati</i>	
Subgénero <i>Clavati</i>		Sección <i>Wentii</i>	(grupo <i>A. wentii</i>)
Sección <i>Clavati</i>	(grupo <i>A. clavatus</i>)	Sección <i>Flavi</i>	(grupo <i>A. flavus</i>)
		Sección <i>Nigri</i>	(grupo <i>A. niger</i>)
		Sección <i>Circumdati</i>	(grupo <i>A. ochraceus</i>)
		Sección <i>Candidi</i>	(grupo <i>A. candidus</i>)
		Sección <i>Cremei</i>	(grupo <i>A. cremeus</i>)
		Sección <i>Sparsi</i>	(grupo <i>A. sparsus</i>)

* Los nombres de los grupos utilizados por Raper y Fennell (1965) se muestran entre paréntesis

ASPERGILLI Y EL HOMBRE

Muchos hongos, incluidos los Aspergilli, son capaces de explotar ampliamente los recursos presentes en el entorno humano. Esto resulta en una estrecha relación de grandes poblaciones de hongos con diversas actividades humanas (Cotty *et al*, 1994).

La fermentación es uno de los métodos de preservación de alimentos más antiguos. El origen de estos procesos y el ejemplo tal vez más evidente se remonta a las culturas asiáticas que han utilizado muchos Aspergilli en la fermentación de alimentos desde tiempos remotos. El koji,

que es un cultivo sólido de mohos-koji (*Aspergillus oryzae*, *A. soyae* y *A. awamori*) que crece en una mezcla de arroz y trigo o trigo y soya, es utilizado como el agente en la elaboración de alimentos fermentados como el sake, miso, shoyu (salsa de soya), etc. (Hara, *et al*, 1992; Cook y Campbell-Platt, 1994; Samson, 1994). También han sido fundamentales en los alimentos y bebidas fermentados tradicionales elaborados por diversos grupos étnicos de muchas partes del mundo, particularmente en el sudeste de Asia, en el Lejano y Medio Oriente, en Africa, así como en México y otras partes de América (Herrera y Ulloa, 1990; Cook y Campbell-Platt, 1994).

Son de importancia en la elaboración de bebidas y están presentes en la microbiota superficial de muchos quesos, jamones, salchichas y otros embutidos, así como en otros alimentos fermentados derivados de pescados u otros animales (Cook y Campbell-Platt, 1994).

Los Aspergilli tienen un impacto importante en la agricultura, constituyen el grupo de hongos más característico de alimentos, granos y semillas almacenados. Son importantes no sólo por el efecto que tienen en la calidad de estos alimentos y granos, sino también debido a que muchas de estas especies producen metabolitos tóxicos, mientras que otras son patógenas de animales (incluido el hombre) (Cotty *et al*, 1994; Lacey, 1994).

El género *Aspergillus* ha provisto una gama diversa de metabolitos secundarios. Muchos de ellos presentan actividad biológica incluyendo la toxicidad para mamíferos. Los más importantes en términos de su impacto en el ser humano son las Aflatoxinas (*Aspergillus flavus* toxinas); causan una variedad de afecciones en el desarrollo de animales, en el sistema inmune y en órganos vitales; son agentes mutagénicos-carcinogénicos muy potentes y pueden transmitirse con escasa modificación química por la leche o al ingerir alimentos contaminados (Cotty *et al*, 1994; Moss, 1994).

La acumulación de ácidos orgánicos en grandes cantidades es una de las características particulares de Aspergilli. Este fenómeno ha atraído la atención de numerosos investigadores. El ácido cítrico producido por *A. niger* y otras especies de *Aspergillus* es de gran importancia en la industria alimenticia y farmacéutica (Harvey y McNeil, 1994; Kubicek *et al*, 1994).

Las especies de Aspergilli poseen la capacidad de producir una gran cantidad de enzimas. Éstas tienen diversas aplicaciones, como en el procesamiento de almidón y de materiales lignocelulósicos, en la elaboración de quesos y cervezas, en la clarificación y modificación de jugos y de vinos, en el acondicionamiento de pastas y la preservación de alimentos, etc. (Oxenboll, 1994).

ANTECEDENTES

La invasión de los sustratos por los hongos ocurre por una combinación de la presión mecánica y la hidrólisis enzimática. Al extender el ápice, las hifas pueden penetrar los sustratos al mismo tiempo que secretan las enzimas capaces de digerir los polímeros que los componen (Wessels, 1993; Archer y Wood, 1995). La presión de turgencia que generan las hifas provee la fuerza necesaria para dirigir este crecimiento (Wessels, 1993; Money e Hill, 1997).

El proceso de crecimiento apical de las hifas requiere una expansión controlada de la pared celular que está relacionada con su actividad citoplasmática. El citoplasma juega un papel fundamental en generar el crecimiento hifal y no se debe separar de aquél que tiene la pared celular. Es necesario que el citoplasma esté continuamente informado del estado físico de la pared que lo rodea y que su actividad sea modulada en función de éste (Wessels, 1993).

Existe una constante interacción entre la presión de turgencia y los procesos de biogénesis de la pared celular. La presión de turgencia regula la secreción de las enzimas que controlan las propiedades mecánicas de la pared celular (las glucanasas), así como la actividad de los canales de Calcio que controlan su extensión, regulando la tasa de fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática del ápice hifal (Wessels, 1993; Money e Hill, 1997).

Las hifas se enfrentan a obstáculos con diferente resistencia mecánica; la continua modificación de la rigidez de su pared celular permite que el hongo se adapte a las demandas que éstos ofrecen. Las enzimas capaces de degradar los sustratos reducen la tensión de estas barreras (Money e Hill, 1997), por lo que es probable que la síntesis y/o secreción de este tipo de enzimas esté modulada por la pared celular.

Por otra parte, las enzimas líticas no son secretadas únicamente con fines de asimilación. La naturaleza individual de las hifas requiere que su superficie se encuentre en una interacción constante con el medio que le rodea. La versatilidad estructural de las proteínas las hace un buen candidato para desarrollar una multitud de interacciones de las hifas con sus alrededores. Existe evidencia de que las proteínas secretadas, unidas a la pared celular, cumplen tales funciones (Wessels, 1993).

Existen numerosos reportes de enzimas asociadas a la superficie celular y, aunque no existe evidencia clara de su localización, se ha propuesto que se encuentran directamente unidas a la pared celular. Se piensa que son las encargadas de degradar los compuestos incapaces de atravesar la barrera de permeabilidad de las célula, generando productos de bajo peso molecular que sirven como inductores o como fuente de energía para promover el crecimiento y la producción de otras enzimas líticas (Peberdy, 1990; Ruiz-Herrera, 1992).

El ápice hifal en crecimiento no sólo es el lugar de síntesis de la pared celular, también es el sitio con mayor exocitosis de vesículas. Éstas pueden contener en su membrana enzimas destinadas al plasmalema (como las ATPasas y las sintetasas de polisacáridos) y, en su lumen, a los componentes de la pared, enzimas que la modifiquen y enzimas líticas de secreción. Numerosas evidencias citológicas indican que los procesos de extensión de la pared y de exocitosis están estrechamente relacionados (Wösten *et al*, 1991; Wessels, 1993).

La obtención de protoplastos de hongos filamentosos ha provisto un nuevo enfoque para el estudio de las propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas altamente integradas de las hifas fúngicas (Isaac, 1985). La formación de una nueva pared celular es un paso crucial en la regeneración de los protoplastos, necesaria para el restablecimiento de la forma celular del hongo. El proceso de regeneración resulta un modelo morfogenético interesante que provee un sistema experimental en el que se pueden entender problemas asociados al ciclo celular y a varios aspectos de biogénesis de la pared celular, incluyendo el papel de ésta, así como el del ensamblaje de los elementos que la componen, en procesos morfogenéticos (Necas y Svoboda, 1985; Peberdy, 1990).

La formación de los protoplastos conlleva una serie de alteraciones estructurales y funcionales que pueden ser cambios en la distribución y ultraestructura de los organelos, en la estructura de la membrana plasmática y del citoesqueleto, así como la pérdida de substancias presentes en el espacio periplasmático. Se ha demostrado que los protoplastos fúngicos, siempre y cuando contengan núcleo, son capaces de reparar estas alteraciones *ad integrum* y de regenerar la pared celular faltante como una estructura bioactiva, produciendo una célula completa y funcional. Sin embargo, no todos los protoplastos de la población ven concluida su reparación debido, aparentemente, a que algunas etapas del proceso de regeneración no se completan (Necas y Svoboda, 1985).

Uno de los principales problemas en términos de morfogénesis de la pared celular es la determinación de la forma final de la pared celular regenerada. Muchos estudios han demostrado que, por lo menos en las etapas tempranas, la síntesis de la pared celular es desequilibrada y por lo tanto, diferente del proceso que ocurre en células normales. Bajo condiciones normales de biogénesis, nuevos componentes estructurales son agregados a la pared celular existente, ésta provee información acerca de la localización precisa de las moléculas recién insertadas y de su orientación espacial. La pared celular existente opera aquí como un sistema de información epigenético. En células, cuya superficie carece de todos los remanentes de la pared celular original, la regeneración ocurre por completo *de novo*. La única información que determina la estructura supramolecular es aquella inherente a los polímeros secretados. El autoensamblaje resulta en la formación de una pared celular significativa que está bajo un estricto control genético, suficiente para contener la presión de turgencia del protoplasto, pero menos operante que la normal (Necas y Svoboda, 1985; Peberdy, 1990).

Las condiciones ambientales también son de gran importancia. El proceso de síntesis de los polisacáridos estructurales, el proceso de ensamblaje en microfibrillas y la subsecuente organización de los materiales de la pared celular dependen en gran medida de factores externos como el pH. La actividad de las enzimas responsables de la síntesis de los polisacáridos tiene un intervalo de pH óptimo. (Ruiz-Herrera, 1992). El proceso de autoensamblaje de los materiales de la pared celular depende de una modificación de los polímeros secretados; ésta tiene lugar básicamente por la formación de enlaces covalentes entre los diferentes polímeros estructurales y por la aparición de puentes de Hidrógeno entre las cadenas homólogas que los componen. Este proceso puede ser alterado por las condiciones microambientales (Burnett, 1979; Wessels *et al*, 1990; Ruiz-Herrera, 1992). En la pared celular de las plantas han sido diseñados modelos en los que se describe el ordenamiento de los polímeros de la matriz que unidos por enlaces covalentes forman una red, asociada a las fibras de celulosa por enlaces de Hidrógeno; cuando estos enlaces son afectados, las microfibrillas pueden rotar o deslizarse. En este sentido, es sabido que diferentes iones alteran las propiedades mecánicas de las paredes celulares vegetales y sobre todo, los iones H⁺ inducen su ablandamiento. En la región apical de las paredes celulares fúngicas (*Mucor*) se ha descrito un fenómeno similar que se puede explicar de acuerdo con el sistema de la pared vegetal. A lo largo de las hifas existe un gradiente de pH que ha sido extensamente asociado a los fenómenos de polarización responsables del crecimiento hifal (Ruiz-Herrera, 1992).

Los seres vivos están en equilibrio constante con el medio que los rodea; para mantenerlo, deben ajustarse a los cambios físicos que ocurren en su entorno; esto se logra mediante adaptaciones fisiológicas y moleculares. Al enfrentarse a ambientes extremos pueden ocurrir cambios en el comportamiento o en la morfología de los organismos, así como el ajuste de sus vías metabólicas o una completa reorientación de la expresión genética (Newbury y Peberdy, 1996; Park *et al.*, 1996).

Los hongos frecuentemente se encuentran en contacto con soluciones acuosas y el pH de éstas afecta su desarrollo (Park *et al.*, 1996). Las especies del género *Aspergillus* son capaces de crecer en un intervalo amplio de pH, *Aspergillus niger* puede crecer dentro de un intervalo de pH 1.5 - 9.8, *Aspergillus repens* (*Eurotium repens*) entre 1.8 y 8.5, y *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) entre 2.5 y 9 (Caddick *et al.*, 1986; Kozakiewicz y Smith, 1994). Estos organismos tienen mecanismos de control homeostático muy eficientes; así, la mayoría de las enzimas intracelulares que se requieren deben actuar sólo en un intervalo de pH muy estrecho; sin embargo, las enzimas extracelulares y permeasas no están protegidas de valores extremos de pH. Resulta clara la necesidad de un sistema regulatorio que asegure que estas enzimas sean sintetizadas sólo en intervalos de pH en los cuales puedan actuar efectivamente. En *Aspergillus nidulans* los niveles de un número de enzimas que son por lo menos parcialmente extracelulares, así como de ciertas permeasas, son controlados por el pH del medio externo. Por ejemplo, en intervalos de pH ácido, los niveles de la fosfatasa ácida son elevados y los de la fosfatasa alcalina son bajos, mientras que a pH alcalino ocurre lo contrario. La regulación de la expresión de los genes de estas enzimas es una respuesta a los cambios de pH del medio ambiente (Caddick *et al.*, 1986; Denison *et al.*, 1995). También el sistema regulatorio por pH afecta la síntesis de otras moléculas localizadas extracelularmente; éstas pueden ser producto del metabolismo secundario, por ejemplo: la producción de penicilina en *A. nidulans* está regulada por el pH del medio (Shah *et al.*, 1991).

Por otra parte, los mecanismos celulares que controlan el pH están estrechamente ligados a las respuestas celulares a los estímulos externos. El pH citoplasmático puede tener un papel muy importante en las vías de transducción de señales en células eucariontes, particularmente aquellas implicadas en la diferenciación celular y el metabolismo (Gadd, 1995). Los procesos morfogenéticos y las alteraciones en la forma de las células requieren de la integración de muchas

funciones celulares y ocurren en respuesta a señales del medio ambiente; se ha descrito la presencia de genes regulados por pH necesarios para el establecimiento y mantenimiento del crecimiento apical hifal, así como para los procesos morfogénicos de hongos dimórficos (Saporito *et al*, 1995).

Se ha demostrado la presencia de exopectinasas de naturaleza constitutiva en hongos del género *Aspergillus* (Aguilar y Huitrón, 1990). La secreción de enzimas de este tipo está relacionada con la fase de crecimiento activo del hongo. Estas pectinasas pueden encontrarse unidas al micelio y a los conidios de *Aspergillus* y se sugiere que están asociadas a la superficie de su pared celular. Es probable que desempeñen un papel importante en la generación de inductores para las demás enzimas del complejo pectinolítico de *Aspergillus*, que es capaz de producir enzimas pectinolíticas inducibles (exo y endopectinasas) en una gran variedad de substratos derivados de la pectina (Aguilar y Huitrón, 1990, 1993; Aguilar *et al*, 1991).

La producción de las enzimas del sistema pectinolítico de *Aspergillus* resulta altamente sensible al pH del medio de cultivo. Las enzimas endo y exopectinolíticas pueden ser producidas en valores de pH tan ácidos como 2.5, condiciones en las cuales, la mayoría de las cepas tienen un incremento considerable en su actividad pectinolítica (Aguilar *et al*, 1991). Sin embargo, no todos los *Aspergilli* responden de la misma manera a las condiciones ácidas del medio, un número alto de cepas reducen su crecimiento mientras que otras lo incrementan; lo mismo puede ocurrir con su actividad enzimática (Delgado, 1997).

Aguilar y sus colaboradores (1991) encontraron que las actividades exo y endopectinolíticas de *Aspergillus* CH-Y-1043 muestran sus niveles más altos a pH 2.5, aun cuando el crecimiento del microorganismo en esta condición resulta de aproximadamente el 50% del que se obtiene en valores de pH más neutros. Este efecto es más evidente con la actividad endopectinolítica, en donde a pH 2.5 se obtienen valores 5 veces mayores que a pH 3.5. A pH 4.2 y 5.2 a su vez, la actividad es menos del 1% del valor que se obtiene a pH 3.5. Se determinó que la ausencia de esta actividad se debe a una síntesis limitada de enzimas y no a una pérdida de sus actividades o a una acumulación intracelular de ellas; tampoco es debida a represión catabólica.

Delgado (1997), al estudiar el efecto que tiene el pH en la secreción de las enzimas pectinolíticas, encontró que el fenómeno descrito por Aguilar y colaboradores (1991) se presenta en varias cepas de *Aspergilli*, siendo *Aspergillus* FP-180 la cepa que tiene una respuesta más sobresaliente¹ ante el pH ácido. Existe un grupo de cepas, como *Aspergillus awamori*, en el que el fenómeno entre la relación de crecimiento y actividad a pH ácido se invierte.

Aspergillus FP-180 se seleccionó para realizar el estudio de regeneración en condiciones de tensión por pH ácido. Ésta se obtuvo a partir de una fruta en pudrición y presenta una morfología semejante a la de las especies comprendidas en la sección Flavipedes del subgénero Nidulates (Grupo *A. flavipes* Thom y Raper 1926): estípites hialinos, vesículas ovaladas o subglobosas en cabezas conidiales biseriadas (métulas presentes), masas conidiales de color blanco a avellana. La especie tipo de esta sección, *A. flavipes* presenta estadio teleomorfo (*Fennellia flavipes*) y son características en ella las células de Hülle u otras células de pared engrosada; sin embargo, no se han encontrado estadios teleomórficos de todas las especies de esta sección (Raper y Fennell 1965; Samson, 1992). Tampoco se ha observado estadio teleomórfico en *Aspergillus* sp. FP-180.

Al estudiar la regeneración de la pared celular en condiciones de tensión por pH ácido, se puede obtener información en diversos sentidos. En primer lugar, este sistema de regeneración celular, al mismo tiempo que ejerce una tensión fisiológica por pH ácido a la célula, representa una condición ante la cual la célula fúngica expresa selectivamente ciertos genes, como es el caso de las pectinasas a pH 2, o bien, como es el establecimiento y mantenimiento de determinados procesos morfogénéticos. Al evaluar cómo el proceso de regeneración celular en tales condiciones determina el estado final de las células regeneradas, se puede generar información de cómo están organizados los eventos que determinan este proceso (como la construcción de la pared celular y la secreción de enzimas) y de cómo éstos interactúan en las células fúngicas. El sistema pectinolítico de *Aspergillus* está modulado por el pH del medio extracelular, es determinante para generar los recursos citoplasmáticos que originan el crecimiento y presumiblemente está relacionado con la pared celular. Resulta de interés evaluarlo después de la regeneración ya que representa un modelo que refleja el estado fisiológico en general de las células.

¹ De las cepas que presentan una relación de crecimiento menor entre los valores de pH 2.5/3.5 y una relación de actividad mayor en los mismos valores, *Aspergillus* FP-180 es la que tiene una actividad pectinolítica mayor a pH 2.5

Ahora bien, se presenta un modelo que nos permite evaluar en condiciones extremas hasta qué grado la pared celular puede seguir siendo regenerada y las alteraciones en la célula, que se producen en la formación de los protoplastos, pueden seguir siendo reparadas para dar lugar a células funcionales capaces de restablecer el ciclo celular. Por otra parte, la regeneración de los protoplastos representa un proceso morfogénico que, si bien difícilmente ocurre *per se* en la naturaleza, resulta en un modelo interesante para evaluar cómo se determina la forma y estructura final de las células.

Por otra parte, es claro que en un micelio activo es vital una interacción eficiente entre los organelos. Para ello, debe implementarse un alto grado de organización espacial de sus componentes citoplasmáticos. Esta organización debe estar presente a lo largo de todo el micelio; sin embargo, resulta más evidente y esencial en los ápices hifales. Aquí, el complejo apical se puede identificar como una región altamente organizada con una ultraestructura diferente al resto de la hifa (Markham, 1995). Así, además de los elementos ubicuos, los elementos celulares responsables del proceso que conlleva el crecimiento polarizado pueden encontrarse bien representados en fracciones de células cuyo contenido citoplasmático proviene de las regiones apicales (Ruiz-Herrera, 1992). Es importante tomar en cuenta esta organización celular en un estudio en el que se pretende explicar procesos celulares de hongos.

Por último, con esta aproximación se genera información en otros sentidos: sobre el entendimiento de la regulación y disposición del sistema pectinolítico, sobre los procesos de síntesis y secreción de las pectinasas, así como sobre el de un mejor conocimiento del modelo que brindan los protoplastos en la investigación fisiológica y genética y para el mejoramiento en la productividad en hongos con potencial industrial.

OBJETIVOS

-Establecer un sistema de formación, recuperación y regeneración de protoplastos (células carentes de pared celular) para hongos del género *Aspergillus*.

-Establecer un sistema eficiente de formación de protoplastos de *Aspergillus* spp.

-Establecer un sistema eficiente de recuperación y purificación de protoplastos de *Aspergillus* spp.

-Desarrollar un sistema de regeneración para protoplastos de *Aspergillus* spp.

-Establecer un sistema de formación de protoplastos provenientes de las regiones apicales de las hifas de *Aspergillus* sp.

-Evaluar la capacidad de regeneración celular de protoplastos de *Aspergillus* sp. en un medio rico y en uno mínimo con pectina como única fuente de carbono.

-Evaluar la regeneración celular de los protoplastos de *Aspergillus* sp. en condiciones de tensión por pH ácido.

-Evaluar la capacidad de reparación celular y de regeneración de la pared celular de los protoplastos de *Aspergillus* sp. en condiciones de tensión por pH ácido.

-Valorar la capacidad de regeneración de los protoplastos provenientes de las diferentes partes de las hifas de *Aspergillus* sp.

-Valorar morfológicamente la regeneración celular de protoplastos *Aspergillus* sp. en condiciones de acidez extrema.

-Conocer los efectos que la acidez extrema tiene en la regeneración de protoplastos de *Aspergillus* sp. Estimar cómo la reparación celular y la construcción de una nueva pared celular repercuten en el estado fisiológico de la célula fúngica usando el sistema pectinolítico como modelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMO

Las cepas utilizadas fueron *Aspergillus* sp FP-180, *Aspergillus awamori* NRRL 3112 (USDA Agriculture Research Service Culture Collection. Peoria, Illinois, USA), *Aspergillus niger* NRRL 334, *Aspergillus oryzae* NRRL 692 y *Aspergillus fumigatus* (Fac. Química, UNAM, México). Las cepas *A. awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus* se emplearon para determinar el tiempo de crecimiento del microorganismo en la formación de los protoplastos. Para establecer el protocolo de formación y regeneración de los protoplastos se emplearon las cepas *A. awamori* y *Aspergillus* FP-180; mientras que para el estudio de reversión celular en condiciones de tensión por pH ácido se trabajó en particular con la cepa *Aspergillus* FP-180. Esta cepa fue aislada por el Dr. Guillermo Aguilar a partir de una fruta podrida y presenta una morfología semejante a la de las especies comprendidas en la sección Flavipedes del subgénero Nidulates (Grupo *A. flavipes* Thom y Raper 1926).

CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO EN CULTIVO SUMERGIDO

Matraces Erlenmeyer de 500ml conteniendo 200ml de medio de cultivo líquido fueron inoculados con una suspensión de esporas, para dar una concentración final de 1×10^6 esporas/ml de medio.

El crecimiento del hongo se llevó a cabo en cultivo sumergido, en una incubadora con una agitación recíprocante de 100 golpes¹ por minuto con 1 pulgada de desplazamiento, a una temperatura de 37°C.

Para obtener el inóculo, el hongo fue crecido en matraces Erlenmeyer de 250ml con 50ml de medio de cultivo con agar (sólido) que se incubaron a 37°C por 3-7 días (o hasta que esporuló el microorganismo). De este matraz, se hizo una suspensión de esporas en 10ml de agua estéril.

¹ En un sistema recíprocante, un golpe es equivalente a un ciclo o a una revolución de un sistema orbital.

DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA MICROBIANA

La biomasa se determinó por peso seco: un volumen conocido del cultivo en el cual se desarrolló el organismo fue filtrado con vacío utilizando membranas Millipore de $0.45\mu\text{m}$ previamente pesadas; éstas fueron secadas en un horno de microondas a una temperatura de 150°C por intervalos de 1min c/u hasta obtener un peso constante.

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS

La determinación del número de células (esporas, protoplastos) en suspensión se realizó mediante el recuento directo de la población celular utilizando una cámara de Neubauer (o hemocitómetro) Brigh-Line, en un microscopio óptico de campo claro a un aumento de 400x.

FORMACIÓN DE PROTOPLASTOS

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO DEL MICROORGANISMO

Micelio

El tiempo de cosecha del micelio, para la formación de protoplastos, se determinó mediante una cinética de crecimiento de la cepa seleccionada. Ésta se llevó a cabo en cultivo sumergido con 200ml de medio con glucosa al 1% y de extracto de levadura al 0.3% (Medio GEL), a pH 6. Se tomaron muestras de la fermentación cada 6hr, durante 48hr.

Esporas en germinación

Para la germinación de las esporas se determinó el tiempo necesario para el desarrollo de túbulos germinales carentes de pared celular secundaria. Se realizó una cinética de crecimiento como la antes descrita y se tomaron muestras de la fermentación a diferentes intervalos de tiempo; el tiempo óptimo de germinación fue elucidado mediante el análisis de la longitud de los tubos germinales en el sistema de crecimiento, realizado por observación directa al microscopio y de fotomicrografías de estas muestras.

FORMACIÓN DE PROTOPLASTOS

La formación de protoplastos se desarrolló en condiciones de esterilidad total en los experimentos en que se examinó la regeneración celular.

Obtención de protoplastos de micelio

Para la obtención de micelio se llevó a cabo el crecimiento del hongo en cultivo sumergido en medio GEL, durante 12hr.

Para la formación de protoplastos, el micelio obtenido fue lavado hasta eliminar las proteínas extracelulares secretadas por el hongo, los restos de medio de cultivo y las esporas formadas, para lo cual se realizaron lavados del micelio con agua, con amortiguador de fosfatos pH 6 (AF) y con amortiguador de estabilización (AE), ($\pm 4^{\circ}\text{C}$).

El micelio lavado se resuspendió en amortiguador de estabilización (AE) y se llevó a una concentración de 12mg (PS)/ ml de suspensión.

Las enzimas utilizadas para la lisis de la pared celular fueron:

Quitinasa de *Streptomyces griseus* (Sigma Chemical Co. USA)

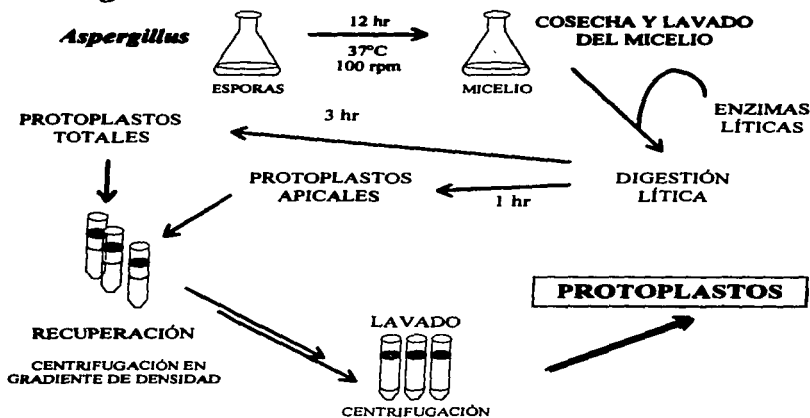
Hemicelulasa de *Aspergillus niger* (Sigma Chemical Co. USA)

β -Glucuronidasa de *Helix pomatia* (Sigma Chemical Co. USA)

Enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* (Sigma Chemical Co. USA)

El sistema de digestión fue incubado a 37°C con agitación recíprocante de 100 golpes por minuto con 1 pulgada de desplazamiento. La incubación con el sistema de digestión fue de 3hr, y para la obtención de protoplastos del ápice hifal fue de 1hr.

Figura 6. FORMACIÓN DE PROTOPLASTOS
Aspergillus



Obtención de protoplastos de esporas en germinación

Para la formación de protoplastos apicales se emplearon esporas en germinación además de micelio. Éstas se hicieron germinar en un cultivo sumergido de la manera antes descrita. Se colectaron y lavaron por centrifugación; el sobrenadante fue decantado y las esporas germinadas se resuspendieron en amortiguador de fosfatos (AF) y al final con amortiguador de estabilización (AE). Se realizó un total de 4 lavados. La digestión enzimática se realizó de la manera descrita para micelio.

RECUPERACIÓN DE LOS PROTOPLASTOS

Se utilizaron dos sistemas para la recuperación de los protoplastos.

Uno de ellos consistió en la recuperación de protoplastos después de filtrarlos para eliminar los restos celulares y lavarlos por centrifugación para eliminar las enzimas líticas. El segundo, la recuperación por centrifugación de densidad diferencial, resultó más eficiente cuando se requirió de protoplastos libres de esporas.

Recuperación por filtración-centrifugación

La filtración se realizó haciendo pasar la suspensión de protoplastos por gasa en un embudo. La suspensión de protoplastos fue centrifugada con una fuerza de $420 \times g$ por 5min; se desechó el sobrenadante y el paquete de protoplastos fue resuspendido con 5ml de AE fresco. Se realizaron tres lavados por centrifugación. El botón final, resuspendido en AE, resultó en los protoplastos listos para ser utilizados.

Recuperación por centrifugación de densidad diferencial

Para remover conidios y restos de pared celular, la suspensión de protoplastos fue colocada cuidadosamente sobre una solución de sacarosa al 30% (p/v) en tubos de centrifuga; éstos fueron centrifugados en un rotor de columpio a baja velocidad. Los protoplastos fueron removidos de la interfase entre el AE y la solución de sacarosa y resuspendidos en AE fresco 0.8M de KCl. El sistema lítico enzimático fue eliminado después de centrifugar la suspensión y los protoplastos fueron resuspendidos en 5ml de AE fresco.

La viabilidad de los protoplastos se determinó con los ensayos de regeneración.

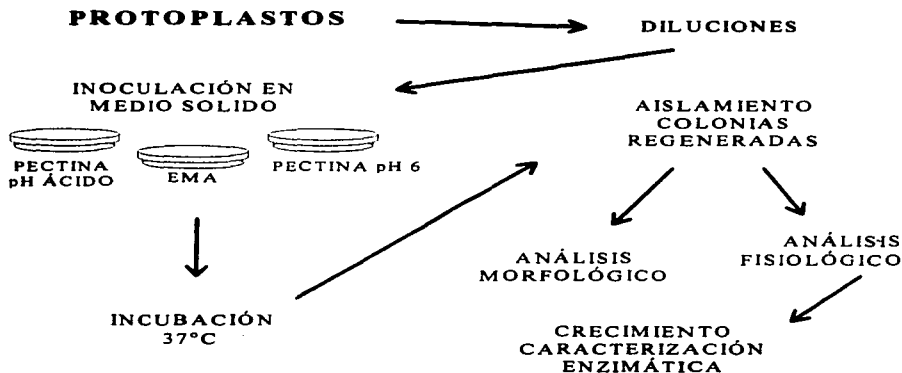
REGENERACIÓN DE MICELIO

Los ensayos de regeneración fueron realizados inmediatamente después de recuperar los protoplastos. El número de protoplastos en suspensión fue determinado en una cámara de Neubauer. Se realizaron diluciones con AE para obtener de 20 a 300 protoplastos / ml. Muestras de 1 a 3ml fueron inoculadas en placas de agar con el medio de regeneración seleccionado. Las placas fueron incubadas durante 3-7 días a 37°C.

La regeneración de protoplastos en condiciones de tensión por pH ácido se realizó en medio mínimo con pectina al 1% (MMP) a pH 1.2, 1.5, 1.7 y 2. El mismo medio a pH 6, así como un medio rico (extracto de malta EMA), fueron empleados como controles de la reversión celular sin tensión por pH ácido.

En cuanto aparecieron las colonias regeneradas y estando aún definidas, se realizaron los aislamientos para los análisis fisiológicos. También se realizaron conteos de las colonias regeneradas en los diferentes medios para el análisis de viabilidad y reversión de los protoplastos.

Figura 7. REGENERACIÓN Y REVERSIÓN CELULAR



ANÁLISIS DE CARÁCTER FISIOLÓGICO

Se realizó un aislamiento de las colonias más representativas, en base a su tamaño, del total de colonias regeneradas; adicionalmente se aislaron las colonias que presentaron diferencias fenológicas.

Células fisiológicamente activas (esporas en germinación) y esporas en latencia fueron propagadas en los mismos medios como control de la actividad fisiológica de la cepa madre íntegra.

Las colonias se mantuvieron en el medio de presión selectiva usado en la regeneración y fueron analizadas una generación después de su reversión celular. Esto se logró aislando las colonias en el medio de regeneración con pectina a pH 3.5 para que las colonias esporularan. Las esporas fueron utilizadas inmediatamente como inóculo de las fermentaciones en cultivo sumergido; éstas se llevaron a cabo en MMP, y en medio mínimo con pectina y sorbitol (MMP-S) al 1%, ambos a pH 2.

En los medios MMP, MMP-S y mínimo con sorbitol (MMS) a pH 2 y 6, se realizaron cinéticas de crecimiento de estas cepas y en ellas se determinó su crecimiento y sus actividades exo y endopectinolítica. También se evaluaron su crecimiento y su actividad enzimática en xilanos, como una fuente de carbono diferente a la empleada en la regeneración.

ANÁLISIS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Actividad exopectinolítica

La actividad exopectinolítica fue determinada cuantificando los azúcares reductores producidos a partir de pectina utilizada como sustrato por las enzimas presentes en el filtrado extracelular.

La mezcla de reacción fue la siguiente: 0.5ml de pectina cítrica (de 8.6% de metoxilación) al 1% (p/v), pH 5; 0.4ml de amortiguador de acetatos 0.17N, pH 5, y 0.1ml del filtrado enzimático problema. Esta mezcla fue incubada a 45°C por 20 minutos, después de los cuales 2ml de reactivo de DNS fueron adicionados. Se realizaron muestras control para cada muestra problema en las que el filtrado enzimático se adicionó después de la incubación. Todas las muestras fueron sometidas a baño en ebullición, fueron diluidas con agua destilada y centrifugadas para eliminar la pectina restante; el porcentaje de transmitancia fue determinado a 540nm.

El número de grupos reductores se expresa como ácido galacturónico liberado a partir de la solución de pectina. Una unidad de actividad exopectinolítica quedó definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1µmol de ácido galacturónico en las condiciones de ensayo.

Actividad endopectinolítica

La actividad endopectinolítica fue determinada mediante la reducción en la viscosidad de una solución de pectina por las enzimas del filtrado enzimático. Para ello se emplearon viscosímetros de Cannon-Fenske del N° 200.

En este sistema, la mezcla de reacción fue la formada por 10ml de pectina (8.6% de metoxilación) al 1% (p/v) en amortiguador de acetatos 0.2N pH 4.2 con 3% (p/v) de NaCl. A ésta se agregaron 0.5ml del filtrado enzimático y la fluidez relativa fue determinada de inmediato con el viscosímetro inmerso en un baño a una temperatura constante de 30°C. El viscosímetro fue calibrado con agua destilada y con el sustrato.

Una unidad de actividad endopectinólítica fue definida como la cantidad de enzima que reduce en un 50% la viscosidad de la solución de pectina en 10min.

Actividad xilanólítica

La actividad xilanólítica fue determinada también cuantificando por el método de DNS los azúcares reductores producidos a partir de xilanos por las enzimas presentes en el filtrado extracelular. La mezcla de reacción fue la siguiente: 0.5ml de xilanos (avena) al 1% (p/v), pH 5; 0.4ml de amortiguador de acetatos 0.17N, pH 5, y 0.1ml del filtrado enzimático problema. Esta mezcla fue incubada a 50°C por 30 minutos, después de los cuales se adicionó 1ml de DNS. Se realizaron muestras control para cada muestra problema en las que el filtrado enzimático se adicionó después de la incubación. Todas las muestras fueron sometidas a baño en ebullición por 5 minutos, después de los cuales el porcentaje de transmitancia fue determinado a 540nm.

El número de grupos reductores se expresa como xilosa liberada a partir de la solución de xilanos. Una unidad de actividad xilanólítica quedó definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1µmol de xilosa en las condiciones de ensayo.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se realizaron réplicas de los mismos experimentos que indican que los resultados son reproducibles. Los datos que se presentan corresponden a experimentos representativos, salvo en los casos indicados, en donde los datos presentados corresponden al valor de la media \pm la desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se dividen en dos grupos para su análisis y discusión. El primero de ellos contiene los resultados obtenidos al establecer el protocolo de formación y regeneración de protoplastos. La segunda parte incluye la información acerca del proceso de regeneración y reversión celular propiamente, así como el análisis fisiológico que se realizó después de tales eventos.

FORMACIÓN Y REGENERACIÓN DE PROTOPLASTOS

Para evaluar el efecto del pH en la regeneración de las células carentes de pared celular, se analizó la capacidad de regeneración de los protoplastos de dos sistemas: de una población heterogénea de protoplastos de micelio y de una población homogénea de protoplastos obtenidos de las regiones apicales de las hifas. Para ello fue necesario formar protoplastos empleando conidios en germinación y/o micelio en la fase exponencial de crecimiento.

FORMACIÓN DE PROTOPLASTOS

Para determinar el tiempo de cultivo del micelio para la formación de los protoplastos se comparó la cinética de crecimiento de 4 cepas de *Aspergilli*, que son reconocidas como importantes productores de enzimas (Berka *et al*, 1992; Oxenbøll, 1994; Samson 1994) y que tienen una actividad pectinolítica elevada (Delgado, 1997). La cinética de crecimiento de estas cepas fue comparada con la de la cepa *Aspergillus* FP-180 descrita por Delgado (*op cit*).

Se ha demostrado que el rendimiento en la obtención de protoplastos es mejor cuando se emplea un micelio en la fase exponencial de crecimiento. Las paredes celulares de los cultivos en las etapas temprana y media de esta fase resultan más susceptibles a lisarse que las paredes derivadas de los cultivos del hongo en la fase estacionaria (Peberdy, 1979; Davis, 1985). Por lo tanto, se empleó micelio en la etapa media de la fase exponencial de crecimiento.

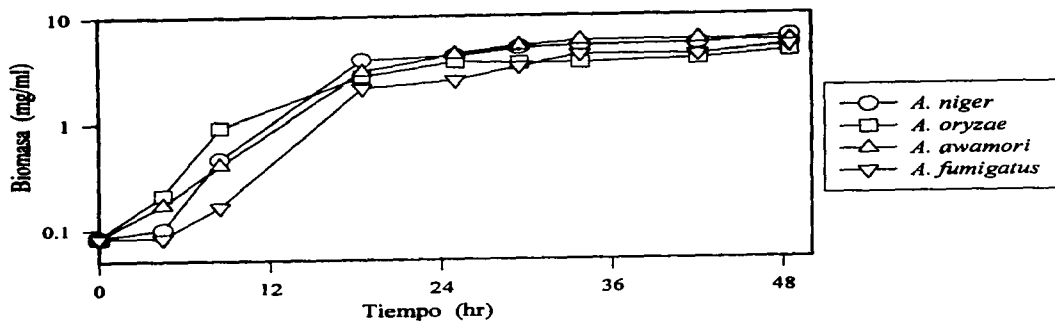


Figura 8. Cinética de crecimiento de las cepas de *Aspergillus* en glucosa con extracto de levadura (GEL)

Se analizaron las curvas de crecimiento de los hongos (Figura 8) y, en base a éstas, se determinó el tiempo de cultivo del micelio necesario para la formación de los protoplastos. La media de la fase exponencial del crecimiento resultó de 12hr para las cepas probadas y coincidió con la de *Aspergillus* FP-180.

Se determinaron las condiciones ideales para la formación de los protoplastos, evaluando los factores que afectan su liberación.

Tomando en consideración la composición de las paredes celulares de los hongos cuyo componente fundamental es la quitina, así como las características particulares de las paredes celulares de los hongos del género *Aspergillus*, se determinó la composición del complejo enzimático necesaria para la degradación de la pared celular.

Un complejo enzimático utilizado frecuentemente en la degradación de las paredes celulares de los hongos es el producido por *Trichoderma harzianum*. Éste ha mostrado ser eficiente ante una gran variedad de hongos, dentro de éstos los *Aspergilli* (Peberdy, 1979, 1985;

Collings *et al*, 1988; Hashiba, 1992). Existen actualmente preparaciones comerciales de las enzimas líticas producidas por *T. harzianum* en los cuales se han caracterizado las actividades enzimáticas. Se seleccionó un complejo enzimático de *T. harzianum* que contiene glucanasas, proteasas y quitinasas activas.

En las paredes celulares de varios hongos se ha identificado un gran número de heteropolisacáridos que contienen ácido D-glucurónico. Este componente es característico de las hemicelulosas de las paredes celulares vegetales y ha sido encontrado en las paredes celulares de los hongos del género *Aspergillus*; el polisacárido del que forma parte no ha sido identificado (Ruiz-Herrera, 1992). Las hemicelulasas se han empleado con éxito para la formación de protoplastos de los Ascomycetes (Hashiba, 1992). Por otra parte, el complejo enzimático que más frecuentemente se ha utilizado para degradar las paredes celulares fúngicas es el jugo digestivo del caracol *Helix pomatia*; en él se han detectado más de 30 enzimas. La β -glucuronidasa es una de las más eficaces, se ha usado para formar protoplastos de *Aspergillus parasiticus* y se ha demostrado que al emplearla conjuntamente con una quitinasa, incrementa considerablemente la liberación de los protoplastos de los hongos *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* y *A. niger* (Peberdy, 1979, 1985; Davis, 1985; Hashiba, 1992). Con estos antecedentes se seleccionó una hemicelulasa producida por *Aspergillus niger* y una β -glucuronidasa producida por *Helix pomatia*.

La liberación de los protoplastos es dependiente de la degradación de la quitina. Collings y sus colaboradores (1988) demostraron que el número de protoplastos de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* es mayor al emplear las enzimas líticas de *T. harzianum* en combinación con una quitinasa, que al emplearlas solas. Los actinomicetos del género *Streptomyces* son productores importantes de enzimas micolíticas, muchas de las cuales han sido empleadas para formar protoplastos de diversos *Aspergilli*. Se seleccionó una quitinasa de *Streptomyces griseus* que ha probado ser efectiva sobre las paredes celulares de *Aspergillus niger* (Peberdy, 1985; Hashiba, 1992) y se evaluó si al adicionarla al complejo enzimático, formado por las enzimas líticas de *T. harzianum*, la hemicelulasa y la β -glucuronidasa, se incrementa la formación de los protoplastos de *Aspergillus awamori* (Fig 9).

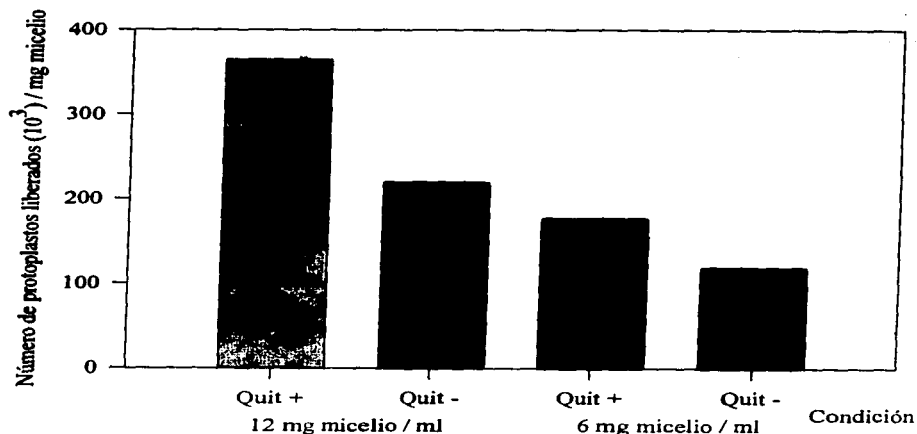


Figura 9. Efecto de la adición de una quitinasa de *Streptomyces griseus* sobre dos concentraciones de micelio en la formación de protoplastos de *Aspergillus awamori*

Se observó que al agregar $3\mu\text{g}$ de quitinasa por cada miligramo de micelio (PS), el número de protoplastos que se liberaron fue mayor. Este incremento fue de un 66% cuando se empleó 12mg (PS) de micelio por ml de solución a digerir, y de un 49% cuando la concentración del micelio fue de 6mg/ml. Es importante mencionar que este efecto se evaluó antes de optimizar la concentración del KCl en el amortiguador de estabilización (AE) y se empleó en una concentración 1.0M. Estos resultados coinciden con los presentados por Collings y sus colaboradores (1988) para otras cepas de *Aspergilli* y resaltan la importancia de la quitina en la pared celular fúngica. Como la concentración del micelio ejerce un efecto importante en la formación de protoplastos, se realizó un análisis de tal efecto (ver texto adelante).

La composición final que se utilizó en el sistema lítico enzimático fue la siguiente:

50mg de Enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*

1mg de Quitinasa de *Streptomyces griseus*

1mg de Hemicelulasa de *Aspergillus niger*

11,500U de β -Glucuronidasa de *Helix pomatia*

Estas cantidades se emplearon en una suspensión de 25ml con 12mg de micelio (PS) por ml.

El tiempo de digestión necesario para la formación de las células carentes de pared celular, fue determinado mediante la observación directa al microscopio. Se realizó la cinética del proceso de formación de protoplastos tomando muestras del sistema de digestión cada 30min y analizándolas al microscopio.

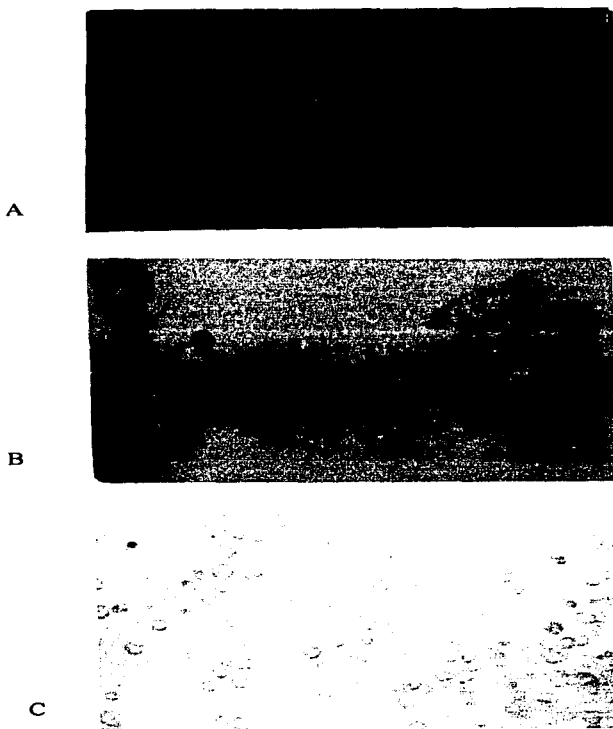


Figura 10. Sistema de formación de protoplastos de *Aspergillus awamori*. Micelio intacto (A), formación de los protoplastos apicales después de 60min de digestión (B) y digestión de la pared celular después de 180min (C).

Después de 60 minutos de digestión (Fig 10 B) se observó la formación de los primeros protoplastos, provenientes de las regiones apicales de las hifas. Este proceso continuó hasta los 180min, cuando la degradación de la pared celular fue casi total (Fig 10 C), dando lugar a células esféricas que contienen la mayor parte del citoplasma hifal.

La concentración del micelio que se emplea en la suspensión a digerir es un factor determinante para la formación de los protoplastos. Este efecto fue evaluado de manera que la relación entre la cantidad de la enzima y del substrato permaneció constante, y el número final de protoplastos se expresó en función de cada mg de micelio (Fig 11). Para ello se empleó AE con KCl 0.8M

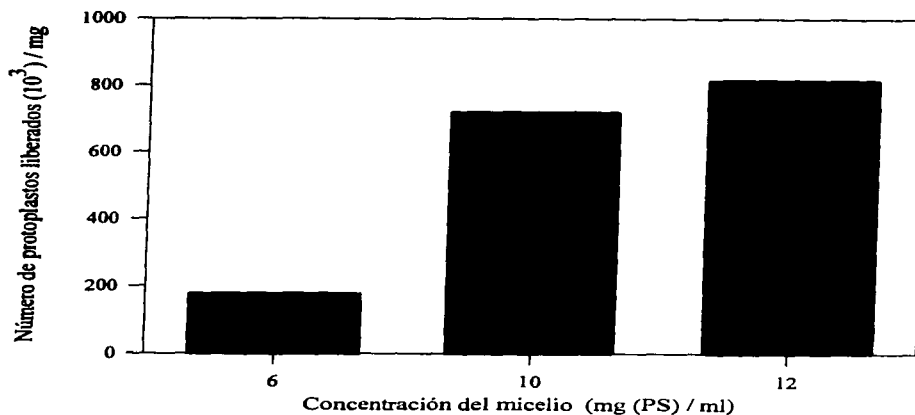


Figura 11. Efecto de la concentración del micelio en la formación de protoplastos de *Aspergillus awamori*

La concentración de 12mg de micelio (PS)/ ml de suspensión mostró una liberación de protoplastos mayor que las de 6 y 10mg/ml también probadas. El rendimiento de los protoplastos obtenidos fue cuatro veces mayor al emplear una concentración al doble de micelio. Esto indica que la interacción entre las enzimas y el sustrato se favorece conforme el volumen disminuye lo cual puede ser debido al incremento de la frecuencia de encuentro entre la enzima y el sustrato. Collings y sus colaboradores (1988) han encontrado el mismo efecto con las cepas *A. niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium ochrochloron* y *Geosmithia emersonii*. Se ha reportado que la concentración óptima del micelio para la formación de los protoplastos de *Aspergillus* es de 30 - 40mg/ml; sin embargo, en estas condiciones es difícil separar los protoplastos de las grandes cantidades de micelio que quedan sin digerir (Collings *et al*, 1988).

Es de gran importancia para la obtención de los protoplastos la naturaleza y la concentración del estabilizador osmótico. El cloruro de Potasio (KCl) ha sido el estabilizador osmótico que más exitosamente se ha empleado en un gran número de cepas representativas de *Aspergillus* (Davis, 1985; Hashiba, 1992). Para determinar la concentración en la cual este estabilizador proporcione un soporte osmótico eficiente a los protoplastos, se determinó su efecto tanto en la formación de protoplastos (Figura 12), como en la recuperación subsecuente (Fig. 13).

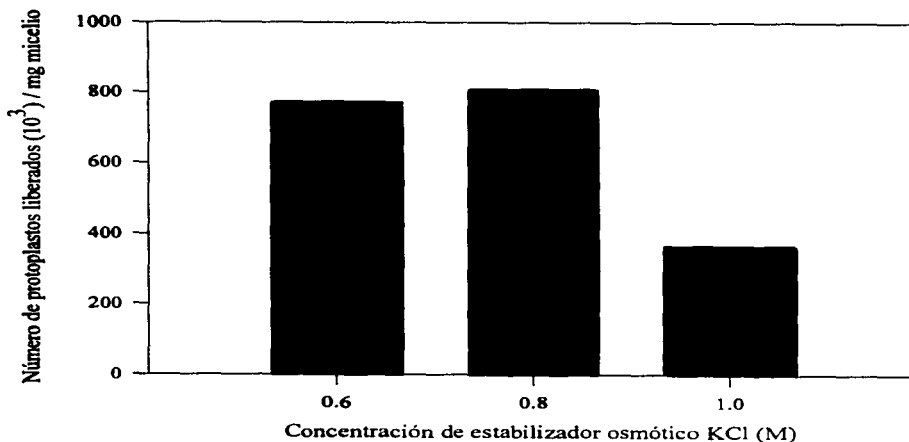


Figura 12. Efecto de la concentración del KCl como estabilizador osmótico en la formación de protoplastos de *Aspergillus awamori*

El rendimiento en la recuperación de los protoplastos no sólo depende de la concentración del estabilizador osmótico, sino también de la fuerza de la centrifugación a la que se realiza el lavado; por esto, esta evaluación se realizó tomando en cuenta ambos factores (Fig. 13). Se observó que para eliminar el sistema lítico enzimático se requieren tres cambios de AE.

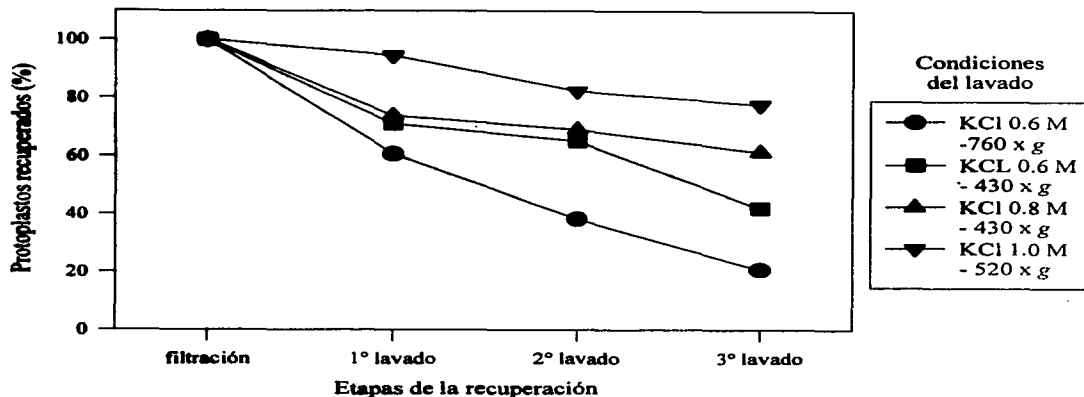


Figura 13. Determinación de las condiciones de lavado en la recuperación de los protoplastos de *Aspergillus awamori*. Concentración del estabilizador osmótico (KCl) y fuerza de centrifugación (x g)

La concentración de 0.8M resultó la más favorable en la formación de protoplastos (Figura 12). Al emplear la concentración de 1.0M ocurrió un decremento importante en la formación de los protoplastos; esto se pudo deber a que KCl, en tales concentraciones, tuvo un efecto inhibitor de la actividad de las enzimas líticas.

El rendimiento de recuperación de los sistemas probados (Figura 13) muestra el decaimiento en el porcentaje de protoplastos que se recuperaron después de cada etapa del sistema. En este análisis se pretendieron evaluar los factores que intervienen en el lavado de los protoplastos. Por ello, el número de protoplastos que se obtuvo después la filtración fue

considerado como 100%. La condición que mostró una eficiencia mayor en la recuperación de protoplastos fue en la que se empleó el estabilizador osmótico en una concentración 1.0M y la centrifugación se realizó con una fuerza de 520 x g. En esta condición, el porcentaje de recuperación de protoplastos tras el lavado por centrifugación fue cercano a 80%. La concentración 0.8M de KCl, al centrifugar el sistema con una fuerza de 430 x g. mostró una eficiencia buena en relación a las demás condiciones probadas.

Es importante tomar en cuenta el efecto que tiene la concentración del KCl en la formación de los protoplastos (Figura 12); al emplear una concentración de KCl 0.8M., la liberación de los protoplastos fue mayor, en más del doble, que la de 1.0M, por lo que al evaluar ambas condiciones en el procedimiento total (formación-recuperación), resultó más eficiente emplear en todo el procedimiento AE con KCl 0.8M, aun cuando en la recuperación de los protoplastos el rendimiento fue mayor al emplear la concentración 1.0M.

Una vez que se estableció este protocolo con *Aspergillus awamori* NRRL 3112, se probó con la cepa *Aspergillus* sp FP-180. El mismo procedimiento resultó eficiente con esta cepa (Tabla 5). Se comparó el número de protoplastos obtenidos con ambas cepas después de cada etapa del sistema y el porcentaje de recuperación que representa. El número de protoplastos obtenido después de la digestión enzimática se consideró como 100%.

Tabla 5. Comparación de la formación de protoplastos en la cepas *Aspergillus awamori* y *Aspergillus* sp. FP-180.

Procedimiento	Numero de protoplastos ¹ (%)	
	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Aspergillus</i> sp. FP-180
Digestión	119.7 (100)	174.0 (100)
Filtración	106.0 (88.6)	126.0 (72.5)
1ª Centrifugación	76.0 (63.5)	100.6 (57.8)
3ª Centrifugación	65.0 (54.3)	72.2 (41.5)

¹ Número de protoplastos (10⁶). El número mostrado aquí es el total de protoplastos obtenidos al emplear el protocolo descrito con 300mg de micelio en 25ml de suspensión.

El número de protoplastos que se obtuvo mediante este procedimiento fue del mismo orden de magnitud que los reportados por otros protocolos descritos para *Aspergillus*.

En este sentido, es difícil realizar una comparación precisa debido a que los parámetros de comparación en la mayoría de los casos no se expresan de la misma manera o son ambiguos. Sin embargo, se pueden hacer algunas inferencias que confronten la eficiencia de este protocolo.

Marmolejo (1994) desarrolló un protocolo de formación de protoplastos para la cepa *A. nidulans* CLK1 en el cual, a partir de 1 g (peso húmedo) de micelio logra obtener cerca de 17 millones de protoplastos. En nuestro trabajo se logró obtener entre 65 y 72 millones de protoplastos a partir de 300 mg (PS) de micelio que, considerando el contenido de agua de la célula, puede ser equiparable a 1 g (peso húmedo). Esta diferencia se debe a que en el protocolo de Marmolejo únicamente se emplean las enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* y en una concentración menor.

Collings, Davis y Mills (1988) han evaluado los factores que afectan la liberación de los protoplastos de algunos hongos, de entre ellos *A. niger* y *A. fumigatus*; en sus resultados presentan rendimientos finales de 2.42 y 5.3×10^5 protoplastos / mg de micelio, respectivamente. Estos valores son del mismo orden de magnitud que los presentados en este trabajo: 2.2×10^5 protoplastos / mg de micelio (PS) para *A. awamori* y 2.4×10^5 para *Aspergillus* sp. FP-180. El número de protoplastos que se obtiene a partir de las cepas *A. niger* y *A. awamori* (que pertenecen a la misma sección (Nigri) del subgénero *Circumdatti*) es muy parecido. Por otra parte, estos autores emplean en el sistema enzimático Novozima 234 un complejo de enzimas líticas de *T. harzianum* cuya composición y actividad puede ser diferente al de las enzimas que se emplearon en este protocolo. Los mismos autores reportan que al agregar una quitinasa, el número de protoplastos que se obtiene a partir de *A. niger* se incrementa cuatro veces y al doble con *A. fumigatus*; sin embargo, estos resultados se obtienen usando NaCl como estabilizador osmótico; cuando emplean KCl como estabilizador osmótico, observan un decremento del 75 y 50%, respectivamente, de sus valores.

Se seleccionó un medio rico para regenerar los protoplastos. Éste consistió en EMA en AF con la misma concentración de KCl que se empleó en el sistema de formación de protoplastos. En este medio se logró regenerar el 80% de los protoplastos de *Aspergillus awamori*.

Al establecer el sistema de regeneración en MMP fue necesario cambiar el estabilizador osmótico debido a que la concentración alta de sales y los valores de pH ácidos precipitan el soporte osmótico. Existe una gama de estabilizadores osmóticos eficientes para los protoplastos como los azúcares y azúcares alcoholes. Se seleccionó el sorbitol, que es un estabilizador osmótico no metabolizable por *Aspergillus* y que ha sido eficiente con los protoplastos de varias especies de hongos filamentosos (Davis, 1985; Hashiba, 1992). La cepa de *Aspergillus* sp. FP-180 fue incapaz de crecer en MM (sólido y líquido) con sorbitol como única fuente de Carbono a pH 2 y 2.5, y en valores de pH cercanos a la neutralidad (pH 6), su crecimiento fue escaso.

FORMACIÓN DE PROTOPLASTOS APICALES

El sistema de formación de protoplastos descrito generó protoplastos de las diferentes regiones que existen a lo largo de las hifas. Esto representa una población de protoplastos muy variada en términos de su composición y actividad bioquímica. Esta heterogenidad se ve reflejada en la frecuencia de regeneración de los protoplastos que, además de ser muy variable, ocurre asincrónicamente (Peberdy, 1979a). La obtención de los protoplastos de una región específica de las hifas resulta en un sistema más homogéneo en términos de composición y de estructura.

En los ápices hifales de un micelio en crecimiento, se encuentra la actividad metabólica y fisiológica más intensa. El complejo apical se puede identificar como una región altamente organizada en donde se encuentran los elementos que determinan el crecimiento de los hongos y la síntesis de la pared celular (Markham, 1995; Ruiz-Herrera, 1992).

Con base en estudios realizados en *Aspergillus nidulans*, se ha sugerido que los protoplastos liberados en la primera hora de la digestión provienen del ápice hifal. La proporción de protoplastos sin núcleo en esta preparación es alta. Tomando en consideración el volumen de la región apical carente de núcleo (volumen comprendido en los 17.5µm por detrás del ápice hifal) y el volumen promedio de los protoplastos, se estima que pueden formarse alrededor de 10 protoplastos de esta región. Empleando KCl como estabilizador osmótico, cerca del 50% de la población contiene un núcleo. Al emplear períodos de digestión más largos, se liberan los protoplastos de las regiones distales de las hifas y es posible que muchos de ellos carezcan de los requerimientos bioquímicos y de los organelos necesarios para la regeneración y la reversión celular (Peberdy, 1979a; Davis, 1985).

Para obtener los protoplastos apicales se probaron dos sistemas de formación con base en el protocolo para los protoplastos del sistema micelial completo. El primero de ellos consistió en emplear esporas en germinación y el segundo consistió en degradar sólo parcialmente las paredes celulares del micelio en la fase exponencial de crecimiento.

Esporas en germinación

Se determinó el tiempo necesario para el desarrollo de los túbulos germinales carentes de pared celular secundaria. El análisis de la longitud de los tubos germinales en el sistema de crecimiento se realizó por observación directa al microscopio y por fotomicrografías. Se obtuvo el tiempo óptimo de germinación cuando la mayoría de las esporas germinadas presentó túbulos de 50-100µm y resultó ser de 8hr.

Conforme transcurre el crecimiento de *Aspergillus* en cultivo sumergido, inmediatamente después de la germinación, se observa el arreglo característico de agregados del micelio en medio líquido. Este ordenamiento consiste en una agregación de las esporas, en la cual los tubos germinales se desarrollan hacia la periferia de la estructura. Para obtener los protoplastos apicales se intentó evitar la formación de los agregados (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos empleados para evitar los agregados de las esporas en *Aspergillus* sp. FP - 180

Medio de crecimiento	Agitación en el crecimiento ¹	Concentración Triton-X-100 ²	Formación de "agregados"	Esporas libres (%)
GEL pH 6	100	0	+	< 0.1
GEL pH 6	150	0	+	< 0.1
GEL pH 6	175	0	+	< 0.1
GEL pH 6	150	0.05	+	0.2
GEL pH 6	150	0.1	+	1
GEL pH 4.5	150	0	+	0.35
GEL pH 4.5	150	0.05	+	1.7
GEL pH 4.5	150	0.1	+	1.7
GEL pH 4.5	150	0.2	+	0.6

¹ Golpes por minuto con 1 pulgada de desplazamiento

² En % (p/v)

Se alteraron las condiciones de incubación: se incrementó la agitación del medio y se cambió su fuerza iónica, modificando su pH y adicionando detergentes iónicos

El detergente (Tritón-X-100) logró incrementar el número de esporas libres en el medio; sin embargo, aun en esta condición, la mayoría de las esporas y de las esporas en germinación siguió formando agregados. Con los tratamientos dados no se logró evitar la formación de los agregados. En ellos, los tubos germinales se dirigen hacia la periferia de la estructura y quedan en su mayoría expuestos; por otra parte, los tratamientos de digestión de la pared celular son capaces de disgregar estas estructuras por lo que, aun cuando esto no se logró antes de la digestión, se utilizó el sistema de esporas en germinación para formar los protoplastos apicales. Es importante mencionar que después de 8 horas de crecimiento existe un alto porcentaje de esporas sin germinar.

Formación de protoplastos apicales

Debido a que el tamaño y la forma de los protoplastos que se liberaron fueron muy cercanos al los de los conidios de *Aspergillus*, utilizando el sistema de recuperación de filtración-centrifugación existe la posibilidad de encontrar conidios en la suspensión final de los protoplastos, especialmente cuando en el sistema de formación de protoplastos empleado existe un alto número de conidios sin germinar. Por ello, los protoplastos se recuperaron empleando un sistema de densidad diferencial.

El número de conidios sin germinar en el sistema de esporas en germinación es considerablemente mayor que el del micelio en la etapa exponencial de crecimiento; por ello, ambos sistemas fueron comparados. Al mismo tiempo se definió la concentración de sacarosa necesaria para retener eficientemente los protoplastos en la centrifugación de densidad diferencial (Tabla 7).

Se determinó el número de protoplastos viables y de esporas presentes en la suspensión final después de la recuperación, mediante ensayos de regeneración en MMP a pH 6. Empleando el mismo sistema de formación y recuperación (sacarosa al 25%) de protoplastos, a partir de micelio en etapa exponencial de crecimiento (12hr) se logró obtener 203 protoplastos capaces de regenerar en MMP pH 6 por cada mg (PS) de micelio sometido a digestión; al emplear esporas en germinación (8hr) se logró obtener 198 / mg (PS). El número de protoplastos que se pudo obtener por estos procedimientos fue similar; sin embargo, el porcentaje de esporas en las UFC presentes en la suspensión final fue en general mayor al emplear esporas en germinación (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de los sistemas de recuperación de protoplastos obtenidos a partir de esporas en germinación (8hr) y de micelio (12hr)

Tiempo de cultivo del microorganismo (hr)	Concentración de sacarosa en la recuperación (% (p/v))	UFC ¹ en MMP pH 6	
		Protoplastos ² (%)	Esporas ³ (%)
8	35	82.7	17.3
8	30	84.1	15.9
8	25	89.4	10.6
12	25	96.5	3.5
12	20	79.7	20.3

¹ Unidades Formadoras de Colonias (UFC). El total de las colonias desarrolladas representa el 100%.

² Porcentaje de las UFC que representan los protoplastos capaces de regenerar.

³ Porcentaje de las UFC que representan las esporas capaces de crecer.

Los resultados mostraron que la recuperación con una concentración de sacarosa al 25% (p/v) resultó más eficiente que cualquier otra condición probada para obtener protoplastos provenientes del micelio en crecimiento exponencial (Tabla 7). Por otra parte, se determinó el porcentaje de esporas capaces de crecer en MMP a pH 2 presentes después de la recuperación con este sistema y se encontró que del total de las colonias formadas (UFC), sólo el 4% proviene de esporas (conidios). Este bajo porcentaje es similar al encontrado en MMP pH 6 e indica que es mejor emplear el micelio de la fase exponencial de crecimiento para obtener los protoplastos apicales y que éstos se deben recuperar y purificar por centrifugación de densidad diferencial en sacarosa al 25%.

Como se esperaba, al someter el micelio a una hora de digestión, la degradación de éste fue sólo parcial; esto se vió reflejado en el número de protoplastos que se obtuvieron por cada mg de micelio sometido a digestión. Se logró obtener 2,050 protoplastos (apicales) por mg (PS) de micelio a digerir tras 1hr de digestión, mientras que después de 3hr el número ascendió a 10,404 (sistema completo).

REGENERACIÓN Y REVERSIÓN CELULAR

Se logró regenerar protoplastos de *Aspergillus* FP-180, tanto apicales como de un sistema completo, en medio mínimo con pectina. La capacidad de regeneración de los protoplastos depende de su naturaleza (Figura 14).

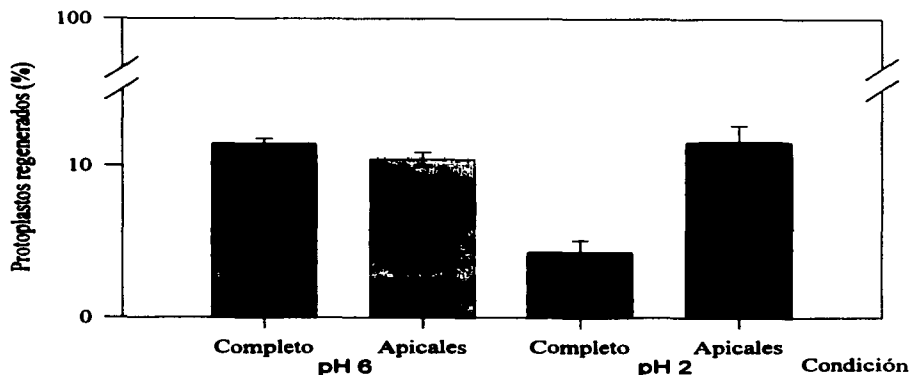


Figura 14. Comparación de la capacidad de regeneración de los protoplastos de *Aspergillus* sp. FP-180 provenientes del ápice hifal (Apicales) y de un sistema micelial completo (Completo), en pectina a pH 6 y pH 2.

Al regenerarlos a pH 6, se observó que el porcentaje de regeneración en ambos sistemas es similar, cercano al 10%. Lo contrario ocurrió con los protoplastos que son capaces de regenerar a pH 2: el número de protoplastos capaces de regenerar fue más del doble cuando provinieron de las regiones apicales de las hifas que cuando provienen del sistema íntegro. El porcentaje de protoplastos apicales capaz de regenerar en MMP a pH 6 fue del mismo orden que a pH 2. Esto probablemente refleja la constitución celular de los protoplastos ya que provienen del sitio en el que se encuentra la actividad metabólica más intensa, con una ultraestructura diferente al resto de la hifa (Markham, 1995). Considerando las estimaciones de Isaac (Peberdy, 1979a), cerca del 50% de los protoplastos provenientes de las regiones apicales carecen de núcleo. Resulta interesante observar que, de los protoplastos restantes (con por lo menos un núcleo) cerca del 20% tuvo la capacidad de regenerar a pH 2.

La regeneración de los protoplastos fue escasa o inexistente en valores de pH menores a 2. A pH 1.7 se logró regenerar una colonia de *Aspergillus*, proveniente de un sistema íntegro de protoplastos, colonia que representa el 0.5% del total de protoplastos inoculados en tal medio. En valores de pH menores a 1.7 no se logró regenerar ningún protoplasto. El pH mínimo de regeneración en MMP de 1.7 coincidió con el pH mínimo al cual la cepa *Aspergillus* FP-180 fue capaz de crecer.

Los protoplastos fueron capaces de regenerarse como células funcionales en un medio mínimo con pectina como única fuente de Carbono. Los protoplastos son capaces de utilizar la pectina, o los productos de su degradación presentes en el medio, sin la necesidad de las enzimas exopectinolíticas presentes en la superficie del micelio ya que éstas se pierden al degradar su pared. Se ha propuesto que las enzimas presentes en la superficie de la célula son las encargadas de degradar los compuestos grandes, generando moléculas utilizables que sirven como inductores o como fuente de energía para promover el crecimiento y la producción de otras enzimas líticas. La capacidad de regeneración de las células de *Aspergillus* desprovistas de los elementos de su superficie celular en el medio de regeneración provee información de que las enzimas asociadas a la superficie pueden ser dispensables, por lo menos en este medio mínimo y para el sistema pectinolítico. Es probable que los niveles constitutivos de exopectinasa que se secretan en la fase de crecimiento activo del hongo se mantengan en los protoplastos.

Los protoplastos tuvieron la capacidad de regenerar su pared celular y de reparar sus alteraciones celulares en condiciones de acidez extrema para restablecer su ciclo de vida. Esto indica que la maquinaria enzimática y celular necesaria para la construcción de una pared nueva, así como para la regeneración de hifas, es activa en tales condiciones. El proceso de ensamblaje (¿autoensamblaje?) de materiales de la pared celular pudo llevarse a cabo en tales condiciones. El medio mínimo con pectina a pH 2 representa un sistema selectivo en el cual sólo se expresan algunos genes; la capacidad de regeneración de las células no se perdió en tales condiciones. Sin embargo, el porcentaje de células que retienen esta capacidad fue bajo (Figura 14).

ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y FISIOLÓGICO

Se realizaron experimentos control en los cuales las hifas y los conidios fueron sometidos a las condiciones de formación y regeneración de los protoplastos, salvo la digestión. Se realizó un aislamiento de algunas cepas representativas de la población de colonias regeneradas y de colonias empleadas como controles. Las colonias se aislaron en MMP ácido (pH 3.5) de manera que se mantuvo la presión de selección ejercida en la regeneración. El análisis fisiológico se desarrolló con un inóculo proveniente de la primera generación después de la regeneración de los protoplastos.

Análisis morfológico

Se realizó un análisis morfológico de las colonias regeneradas. Todas las colonias provenientes de protoplastos regenerados a pH 2 y 6 presentaron la misma morfología que la cepa *Aspergillus* sp. FP-180.

En MMP a pH 6, se desarrollan colonias planas con escaso micelio aéreo y con conidios blancos que presentan halos concéntricos que culminan en un halo con una coloración más oscura. El micelio dentro del agar presenta una coloración café clara (Fig 15 E). A pH 2, la formación de conidios es escasa, por lo que el color que predomina en las colonias es el café, con áreas blancas hacia el centro de la colonia. El diámetro de las colonias es considerablemente menor al de las formadas a pH 6 (Fig 15 A). En un medio rico, EMA, las colonias son semejantes a las desarrolladas en MMP pH 6; sin embargo, aquí se desarrollan depresiones en la colonia con un arreglo radial. El micelio del substrato presenta una tonalidad más oscura que en MMP y culmina en un halo negro al borde de la colonia.

La colonia regenerada en MMP pH 1.7 (LP-10) presentó una morfología diferente a la cepa original (FP-180). En primer lugar, en el medio de regeneración MMP pH 2 (Fig 15 B), desarrolla colonias de tamaño mayor que las desarrolladas por la cepa FP-180. Éstas presentan una textura algodonosa dada por el micelio aéreo que es de color blanco, la esporulación es escasa. Esta cepa fue capaz de crecer en MMP a pH 1.2, desarrollando colonias semejantes a la descrita a pH 2 pero de menor tamaño (Fig 15 D). En MMP a pH 6, LP-10 también desarrolló colonias con diferente morfología; éstas fueron semejantes a las formadas por la cepa FP-180.

Medio mínimo con Pectina y sorbitol pH 2.5

A

B



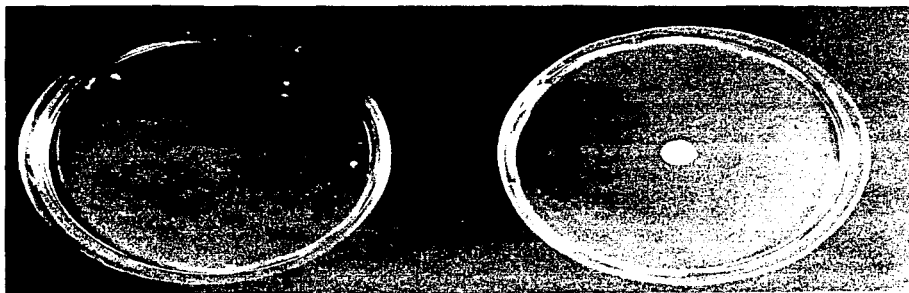
Aspergillus FP-180

LP-10

Medio mínimo con Pectina y sorbitol pH 1.5

C

D



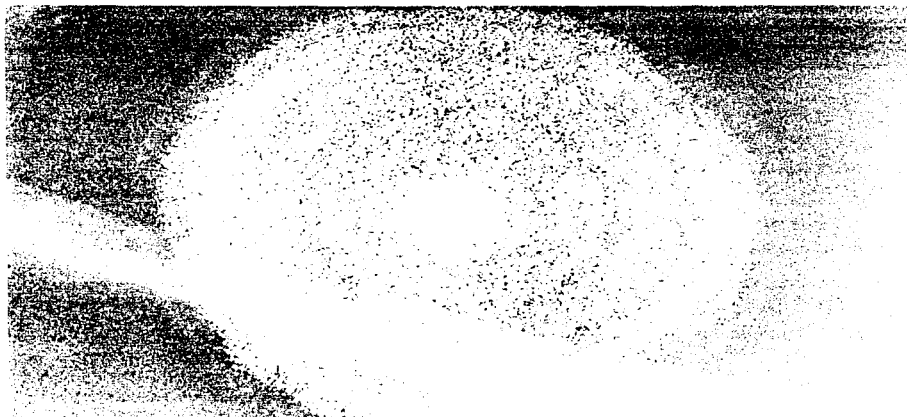
Aspergillus FP-180

LP-10

Figura 15. Morfología macroscópica de las cepas de *Aspergillus* FP-180 (A, C y E), y LP-10 (B, D y F) creciendo en pectina y sorbitol (MMP-S) a pH 2.5 (A y B), pH 1.5 (C y D) y pH 6 (E y F, pág. siguiente)

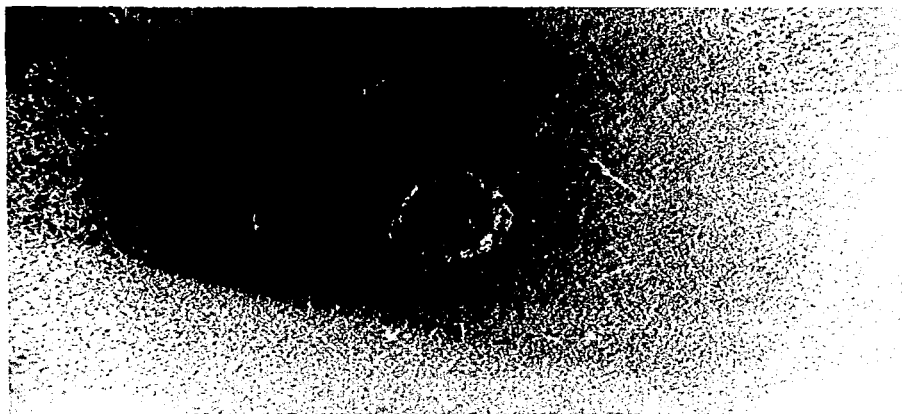
Medio mínimo con Pectina y sorbitol pH 6

Fig. 15 E



Aspergillus FP-180

Fig. 15 F



FP-180

Sin embargo, la pigmentación de la colonia se invirtió: café al centro (conidios maduros) con una pigmentación más clara hacia la periferia (Fig 15 F). El micelio se desarrolla en el agar de manera semejante que la cepa FP-180. En EMA se observa una morfología semejante a la descrita por la cepa FP-180, mas con una pigmentación café. La tonalidad café de la colonia es menos intensa y el halo exterior es de menor tamaño que en MMP pH 6. La pigmentación del micelio en el agar nuevamente se invierte, siendo el centro de la colonia la región más oscura.

Microscópicamente se comparó la morfología de la cepa FP-180 con la de la cepa LP-10.

A pH 6 ambas presentaron una morfología semejante, micelio ramificado con cabezas conidiales biseriadas, con 2-3 fiálides originándose a partir de cada métula y esporas (conidios) globosas.

En MMP a pH 2 hay diferencias morfológicas evidentes entre las dos cepas (Fig 16)

Aspergillus sp FP-180 en MMP pH 2.5

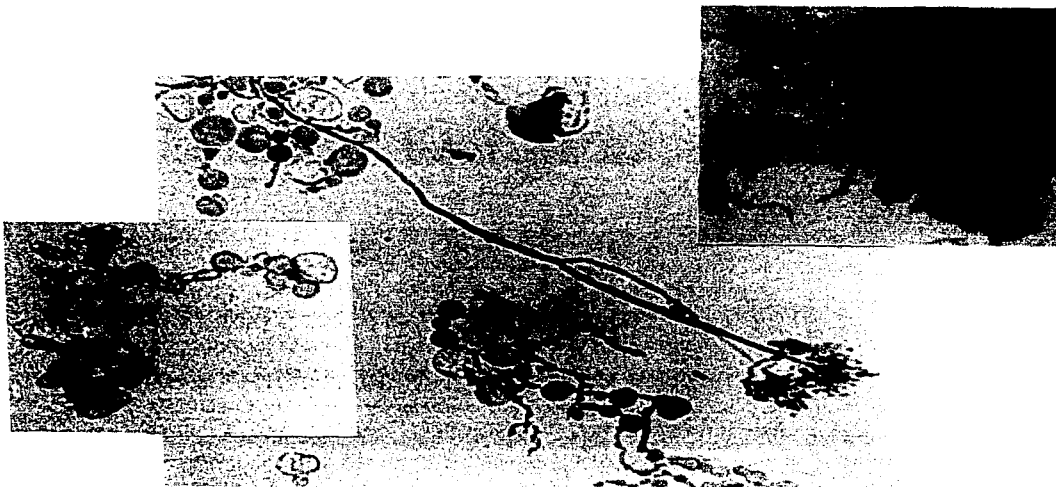


Figura 16. Morfología microscópica de las cepas *Aspergillus* FP-180 (A) y LP-10 (B, pág. siguiente) creciendo en pectina y sorbitol (MMP-S) a pH 2.5.

Fig. 16 B

LP-10 en MMP pH 2.5



La cepa FP-180 desarrolla un micelio incipiente (pseudomicelio), con hifas muy pequeñas y escasamente ramificadas; son abundantes vesículas y estructuras libres con forma esférica que semejan células levaduriformes (de mayor tamaño). Sin embargo, es posible observar cabezas conidiales bien desarrolladas (Fig 16 A). A diferencia de esta morfología, la cepa LP-10 desarrolla un micelio más evidente, las hifas son largas y altamente ramificadas; es posible observar vesículas, éstas forman parte de las hifas y pueden dar lugar a ramificaciones. No se observan las estructuras esféricas de la cepa FP-180. Los conidióforos formados aquí presentan alteraciones morfológicas, es posible observar métulas alargadas, en ocasiones ramificadas, a partir de las cuales se desarrollan una o varias fiáldes (que también pueden ser más largas) con escasos conidios (Fig 16 B). También es posible observar cabezas conidiales en las que las métulas se desarrollan a partir de una vesícula conidial reducida o directamente del pedicelo del conidióforo (semejando esporangios de *Penicillium*), así como cabezas conidiales normales.

Las diferencias morfológicas que presenta la cepa LP-10 se mantuvieron aún después de varias generaciones (resiembras), y en valores de pH cercanos a la neutralidad o en medios de cultivo ricos (PDA, EMA).

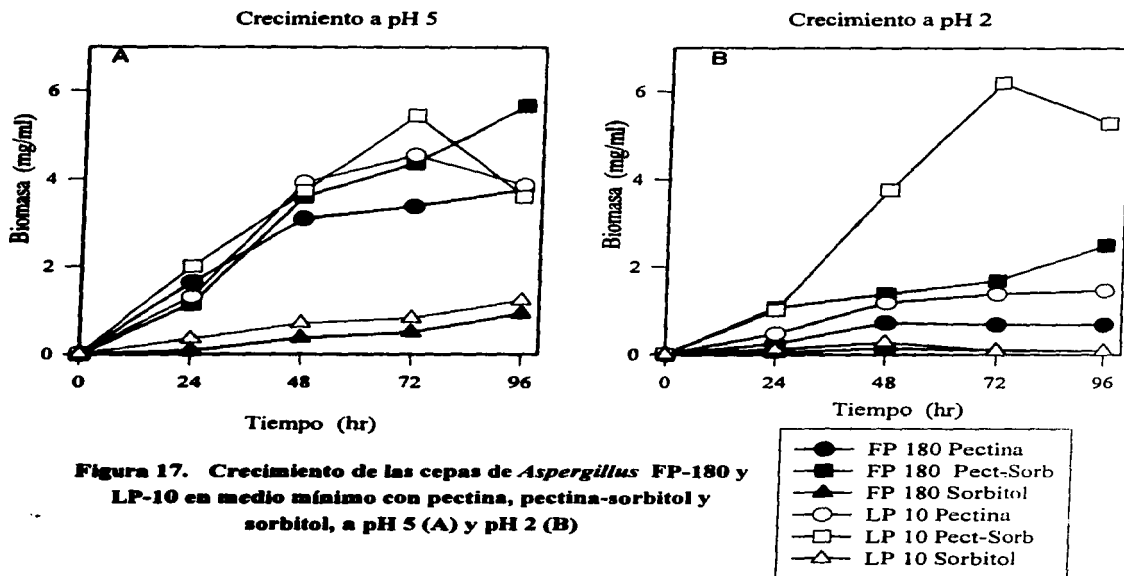
Análisis fisiológico

Adicionalmente a las diferencias morfológicas que presentó la cepa LP-10 con respecto a *Aspergillus* FP-180, se observaron diferencias en su capacidad de crecer en el medio de regeneración en valores de pH extremos (en placa). En primer lugar la cepa LP-10 desarrolla colonias de tamaño considerablemente mayor en un intervalo de valores de pH 1.7 a 2.5 (Fig 15 A-D). La diferencia de crecimiento entre estas cepas disminuye en ausencia de sorbitol; sin embargo, si está presente, la diferencia de crecimiento se mantiene aún después de varias resiembras de la cepa LP-10.

En valores de pH menores a 1.7 la cepa FP-180 fue incapaz de crecer (Fig 15 C), mientras que LP-10 desarrolló colonias aún a pH 1.2. Este comportamiento se observó siempre y cuando se mantuviera el sorbitol en el medio, y se perdió después de tres resiembras (generaciones) de la cepa.

Se analizaron y compararon las actividades fisiológicas (la actividad enzimática y el crecimiento) de las cepas *Aspergillus* FP-180 y LP-10 en el sistema pectinolítico, y fueron comparadas con las del sistema xilanolítico de ambas cepas: sistema que no está relacionado con el sistema de presión selectiva al que se sometió al protoplasto en su regeneración.

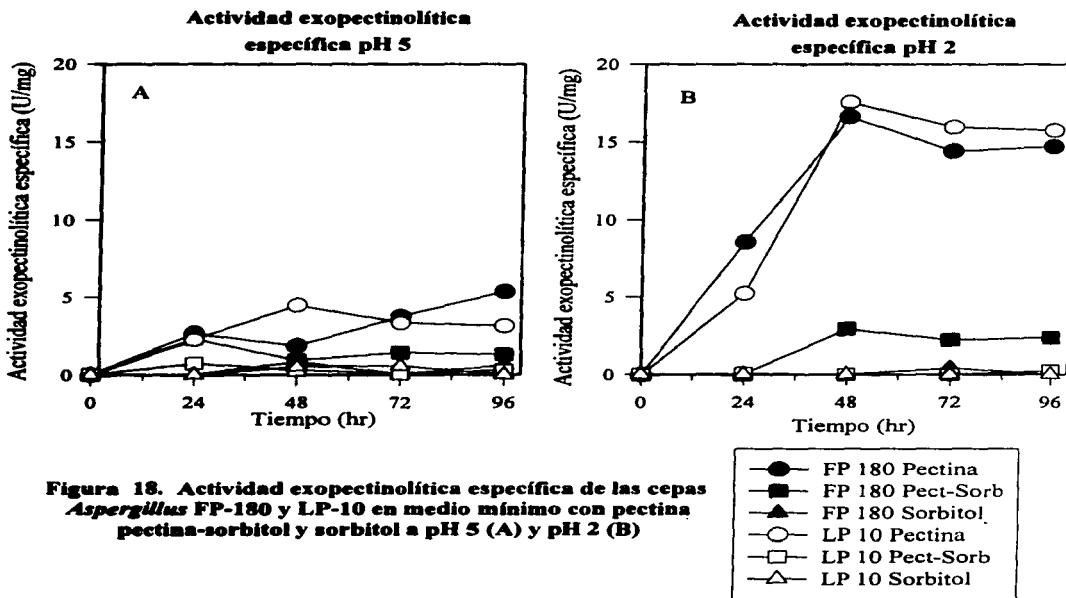
Se comparó el crecimiento de las cepas LP-10 y FP-180 en MMP (Pectina), MMS (Sorbitol) y MMP-S (Pectina y Sorbitol) a pH 2 y 5 (Figura 17).



Fue sobresaliente el crecimiento de la cepa LP-10 en MMP-S a pH 2 (Fig 17-B), siendo su valor máximo (72 hr) cerca de tres veces mayor que el de la cepa FP-180 en las mismas condiciones. El crecimiento de la cepa LP-10 en pectina en ausencia de sorbitol (MMP) se reduce más de tres veces. Sin embargo, sigue siendo mayor que el de la cepa FP-180, que también es afectada por la ausencia de sorbitol. Es importante observar que a pH 2 ninguna de las dos cepas fue capaz de crecer en sorbitol como única fuente de Carbono.

A pH 5 ambas cepas crecieron igual (Fig 17-A). El perfil de crecimiento de LP10 en MMP-S es el mismo que a pH 2, la etapa de decaimiento del crecimiento ocurre después de 72 hr. El crecimiento de la cepa FP-180 es mayor, tanto en MMP como en MMP-S, que a pH 2. Ambas cepas presentaron un crecimiento escaso en sorbitol como única fuente de Carbono.

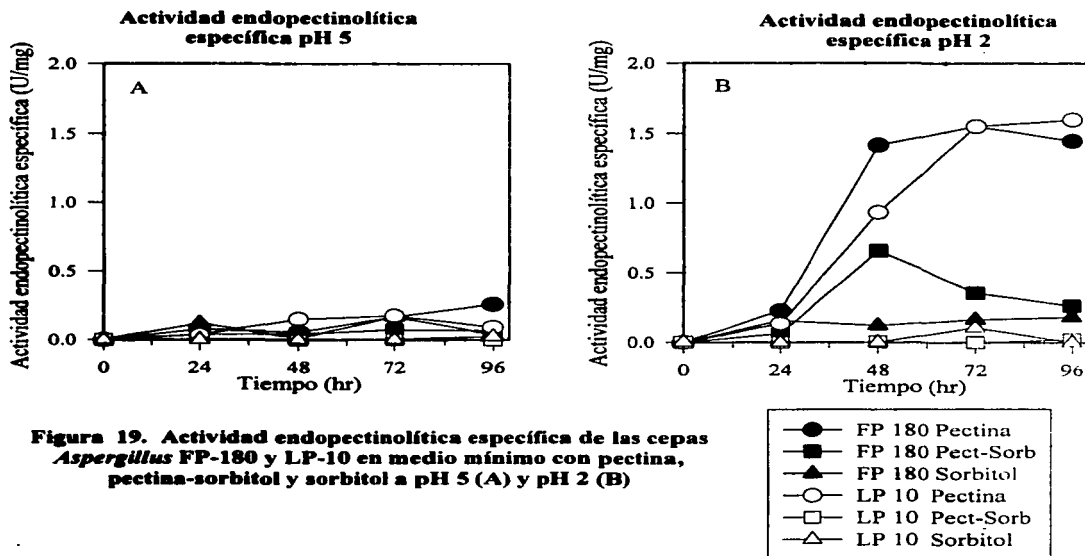
Se evaluó la actividad pectinolítica (exo y endodegradativa) de ambas cepas en las mismas condiciones (Figuras 18 y 19 respectivamente).



Los valores de actividad exopectinolítica específica (Unidades de actividad / mg de micelio (PS)) de ambas cepas creciendo en pectina como única fuente de Carbono fueron muy cercanos entre sí, tanto a pH 5 como a pH 2 (Figura 18). Es notable que la cepa LP-10 en MMP-S a pH 2 (siendo la condición que mayor crecimiento presenta) no tiene actividad exopectinolítica (Figura 18 B). Este fenómeno no se observó con la cepa FP-180, donde si bien la actividad pectinolítica en MMP-S es menor a la producida en MMP, está presente y es mayor que la producida a pH 5.

A pH 5 los niveles de actividad exopeptinólítica de ambas cepas fueron menores que a pH 2 (Fig 18-A). La cepa LP-10 nuevamente carece de actividad exopeptinólítica en MMP-S, a pesar de que su crecimiento es elevado. La cepa FP-180 en cambio sí presenta actividad exopeptinólítica en este medio y nuevamente es menor a la obtenida en ausencia de sorbitol. En ambos casos (pH 2 y 5) la actividad exopeptinólítica de las cepas, en sorbitol como única fuente de Carbono, es escasa, limitada probablemente a los niveles basales de actividad de esta enzima constitutiva, como se ha propuesto por Aguilar y Huitrón, (1990) para *Aspergillus* sp. CH-Y-1043.

El patrón de actividad exopeptinólítica de ambas cepas es muy parecido al que tiene su actividad endopeptinólítica (Fig 19).



En MMP, ambas cepas tienen niveles de actividad endopeptinólítica específica muy cercanos (Fig 19). Nuevamente la cepa LP-10 en la condición que más crece, MMP-S, tanto a pH 2 como a pH 5, no tiene actividad peptinólítica, en este caso endodegradativa. Por su parte, la cepa

FP-180 se comporta igual en sus niveles de actividad endo y exopectinolíticas en MMP-S. Ambas cepas carecen de actividad endopectinolítica en sorbitol como única fuente de Carbono (pH 2 y 5).

Con el objetivo de evaluar los cambios en un sistema enzimático que no se requirió en el sistema de presión selectiva al que se sometió al protoplasto en su regeneración, se compararon parámetros del desarrollo de ambas cepas en xilanos como fuente de Carbono (Fig 20).

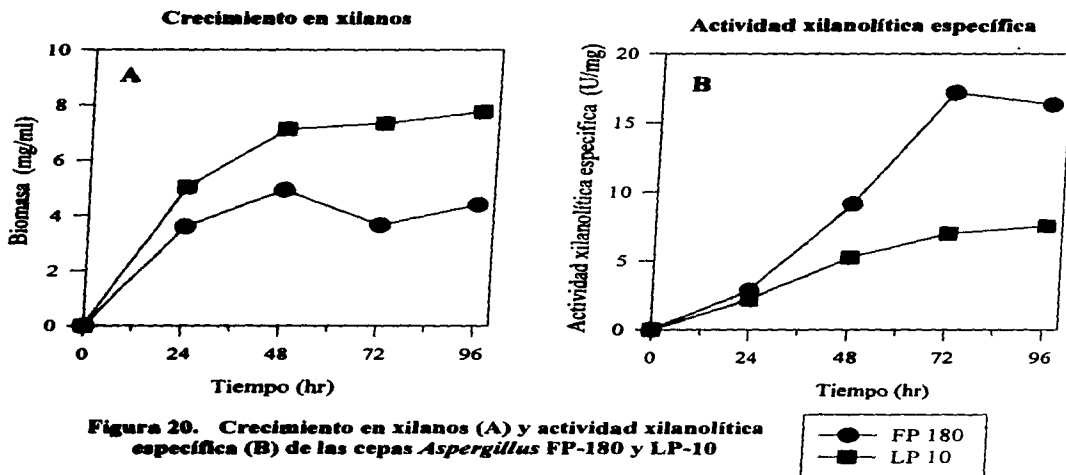


Figura 20. Crecimiento en xilanos (A) y actividad xilanolítica específica (B) de las cepas *Aspergillus* FP-180 y LP-10

En primer lugar se observa que al crecer ambas cepas en xilanos como única fuente de Carbono (pH 4), la cepa LP-10 presenta un crecimiento cerca de dos veces mayor que el de la cepa FP-180 (Figura 20-A). Al igual que con el sistema pectinolítico, el crecimiento no refleja lo que ocurre con el sistema enzimático. La actividad xilanolítica es mayor para la cepa FP-180 (Fig 20-B), aun cuando su crecimiento es menor.

El crecimiento y las actividades pectinolíticas de la cepa LP-10 se evaluaron después de propagar 5 generaciones (resiembras) de esta cepa en medios ricos (PDA) a pH 6. El mismo patrón de crecimiento y actividad fue observado. Al igual que la morfología, las diferencias fisiológicas con la cepa FP-180 se mantienen. Esto indica que los resultados obtenidos de la actividad fisiológica no sólo son reproducibles, sino que se mantienen de manera estable.

Los cambios que se observan en la cepa LP-10, al parecer, son de naturaleza diversa. En primer lugar, muchos de ellos están en relación con el sistema de presión selectiva al que se sometió al protoplasto en su regeneración. Se presentan diferencias en los patrones morfogenéticos que desarrolla la cepa en las condiciones de tensión por pH y diferencias en los perfiles de actividad enzimática. Las diferencias en la construcción del micelio pueden estar en relación con la capacidad de crecimiento que presenta la cepa regenerada en tales condiciones. Este punto de vista está apoyado por la evidencia de que en las condiciones de mayor crecimiento (pectina-sorbitol) no se observa actividad pectinolítica (Fig 18 y 19).

No se determinó la desaparición del sorbitol del medio de cultivo. La ausencia de crecimiento en sorbitol como única fuente de Carbono y la ausencia de actividad pectinolítica indican que es indispensable la presencia de ambos azúcares para que el crecimiento tan sobresaliente de la cepa LP-10 se presente. Se ha demostrado, en hifas de *A. niger*, que la presencia de sorbitol puede disminuir la producción de pectinasas hasta en un 80% y se ha propuesto que actúa como un represor catabólico de pectinasas (Acuña-Argüelles *et al*, 1994). Este fenómeno puede ser el responsable de la ausencia de actividad pectinolítica de la cepa LP-10; sin embargo, en caso de que el sorbitol estuviera siendo utilizado como fuente de Carbono, no explica porqué sólo se utiliza cuando la pectina se encuentra presente en el medio. El crecimiento de la cepa FP-180 en MMP-S pH 2 también es elevado. Sin embargo, no es tan sobresaliente como en la cepa LP-10, y la cepa FP-180 no carece de actividad pectinolítica.

Ya que la pigmentación de los hongos está determinada por elementos (melaninas) de la pared, el cambio en la pigmentación representa una evidencia de las diferencias en las paredes celulares de la cepa LP-10 con respecto a la FP-180. Por otra parte, al observar las diferentes morfologías que adoptan las células de ambas cepas en MMP-S en valores de pH ácido, es de esperarse que, por lo menos aquí, se presenten diferencias en los patrones de síntesis de la pared celular.

La mayor parte de los cambios están en relación con el sistema de presión selectiva que se ejerce en el medio de cultivo; sin embargo, las diferencias en la actividad xilanolítica sugieren que el cambio en la constitución celular de esta cepa puede deberse al desequilibrio generalizado al que se sometió a la(s) célula(s) fúngica(s) de la(s) cual(es) provino esta colonia.

Por último, la evidencia de que estos cambios se presenten consistentemente en la cepa, aun después de eliminar la tensión fisiológica o la presión de selección, sugiere que por lo menos parte de la alteración de las cepas es a nivel genético y es estable.

Es muy importante considerar que la colonia en que se presentan los cambios fenológicos representa un porcentaje muy bajo de la población de las colonias regeneradas.

Este estudio representa la primera aproximación para tratar de explicar mediante el análisis de la actividad enzimática el efecto que la construcción de la pared celular y la reparación del protoplasto tienen sobre las células regeneradas. Por ello, los resultados que se obtuvieron son poco concluyentes. Sin embargo, se presenta información importante acerca de la capacidad de regeneración de los protoplastos, así como de aspectos relacionados a la pared celular y al sistema pectinolítico de *Aspergillus*.

CONCLUSIONES

Se logró establecer un método para la formación de protoplastos y de protoplastos apicales de *Aspergillus* con una eficiencia elevada. También se logró establecer dos sistemas de recuperación de protoplastos, uno altamente eficiente en el número de protoplastos que se recuperan y el otro con un nivel de pureza elevado con respecto al número de esporas restantes tras la recuperación.

Mediante estos sistemas se obtuvieron rendimientos máximos de 54.32% en la recuperación de los protoplastos (con respecto al número de protoplastos obtenidos después de la digestión), llegando a obtener un total de 2.4×10^5 protoplastos / mg. (PS) de micelio sometido a digestión. Por otra parte se logró obtener eficientemente protoplastos apicales, así como niveles de pureza en los cuales sólo un máximo de 3.5% de las UFC en los sistemas de regeneración provienen de *comidia*.

Se lograron regenerar protoplastos de *Aspergillus* FP-180, tanto apicales como de un sistema completo de protoplastos, en medio mínimo con pectina.

Es posible regenerar protoplastos de *Aspergillus* en condiciones de alta acidez.

La capacidad de regeneración de los protoplastos de *Aspergillus* en condiciones de acidez extrema es mayor para los protoplastos provenientes del ápice hifal.

En cuanto al número de protoplastos que tienen la capacidad de regenerar en un medio mínimo con pectina, hay poco efecto del pH (6 y 2) sobre la regeneración de los protoplastos provenientes del ápice hifal. El porcentaje de regeneración es menor en valores de pH ácido cuando los protoplastos provienen de toda la hifa.

Se pueden presentar cambios en la regeneración celular generando diferencias en la fenología y fisiología de las cepas regeneradas. Estos cambios pueden estar en relación a la tensión fisiológica que se ejerció en el sistema de regeneración.

La frecuencia en que se presentan estas alteraciones es baja; sin embargo, estas alteraciones pueden estar en función de la estrecha relación que existe entre la construcción de la pared celular y la determinación del estado celular funcional de las hifas. No existe evidencia clara en cuanto al efecto que tiene la regeneración del protoplasto en condiciones de tensión sobre el estado fisiológico final de la cepa regenerada.

APÉNDICE

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS¹

AGAR - PAPA DEXTROSA (PDA)

-Extracto de papa-dextrosa con agar (PDA)	39g/l
-Agar purificado (o bacteriológico)	0.5% (p/v)
-H ₂ O destilada	

AGAR - EXTRACTO DE MALTA (EMA)

-Extracto comercial de malta con agar (EMA)	33.6g/l
-Agar purificado (o bacteriológico)	0.5% (p/v)
-H ₂ O destilada	
ó	
-Extracto de malta	20g/l
-Agar purificado (o bacteriológico)	20g/l

MEDIO GLUCOSA - EXTRACTO DE LEVADURA (GEL)²

Glucosa	1.0% (p/v)
Extracto de levadura	0.3%

Se esterilizan glucosa y extracto de levadura por separado y el pH final se obtiene ajustando el pH del extracto de levadura.

¹ Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 15psi (1 psi = 6.89kPa) durante 16 minutos.

² En los casos indicados se emplearon las sales del medio mínimo (basal) en GEL

ESTR
TERR
LA
DIBUJADA

MEDIO MÍNIMO (MEDIO BASAL) (MM³)

-KH₂PO₄	0.2% (p/v)
-K₂HPO₄	0.2%
-(NH₄)₂SO₄	0.2%
-Fuente de Carbono³	1.0%

Se esterilizan fuente de Carbono y sales por separado. El pH final se obtiene ajustando el pH de las sales. En los casos en que MM* fue preparado para cultivo en placa (medio sólido), agar purificado o bacteriológico al 2.0% (p/v) fue adicionado.

MEDIOS DE REGENERACIÓN

AGAR - EXTRACTO DE MALTA (EMA)

El medio EMA antes descrito fue empleado en la regeneración de protoplastos.

El medio de regeneración se elaboró empleando amortiguador de estabilización (AE) 0.6 - 1.0M KCl pH 6, como disolvente.

MEDIO MÍNIMO (MEDIO BASAL) (MM³)

El medio MM descrito fue empleado en la regeneración de protoplastos.

El medio de regeneración se elaboró empleando Amortiguador de estabilización (AE) 0.6- 1.0M Sorbitol, o KCl pH 6, como disolvente.

El pH final del medio de regeneración se ajustó en la solución de sales y al adicionar ácido tartárico.

³ Pectina (MMP), sorbitol (MMS), glucosa (MMG), pectina y sorbitol (MMP-S), etc

AMORTIGUADORES

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (AF)

Solución Stock 10x

-KH ₂ PO ₄	2.0g
-Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	11.5g
-H ₂ O destilada	Aforar a 1l

El pH se la solución final diluida 1x resulta: pH ≈ 7.3

Se ajusta el pH de la solución de trabajo, antes de aforar al volumen final, con H₂SO₄ - NaOH. El pH de la solución de trabajo se ajusto a pH 6.0.

La concentración final de la solución de trabajo 1x del amortiguador de fosfatos resulta:

4.3mM Na ₂ HPO ₄
1.4mM KH ₂ PO ₄

AMORTIGUADOR DE ESTABILIZACIÓN (AE)

El amortiguador de estabilización consistió en AF suplementado con un estabilizador osmótico. KCl y sorbitol fueron empleados como estabilizadores. El pH fue ajustado a pH 6 con H₂SO₄ - NaOH. Las concentraciones a las que se emplearon fueron:

-KCl	0.6M, 0.8M, 1.0M
-Sorbitol	0.6M, 0,72M, 0,9M 1.0M

AMORTIGUADOR DE ACETATOS

Se utilizaron dos amortiguadores de acetatos, el primero de ellos a una concentración 0.17N a pH 5, y el segundo 0.2N pH 4.2. Ambos se elaboraron a partir de ácido acético (CH₃COOH) 2N, el pH final se ajustó con NaOH y se aforó con H₂O destilada. Al amortiguador de acetatos 0.2N pH 4.2 se adicionaron 30g/l de NaCl.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Esquemas taxonómicos propuestos para los hongos.	7
Tabla 2. Componentes de las paredes celulares de los hongos.	15
Tabla 3. Quimiotipos de las paredes celulares de los hongos.	16
Tabla 4. Nomenclatura de taxa infragenéricos del género <i>Aspergillus</i> .	32
Tabla 5. Comparación de la formación de protoplastos en las cepas <i>Aspergillus awamori</i> y <i>Aspergillus</i> sp. FP-180.	58
Tabla 6. Tratamientos empleados para evitar los agregados de las esporas de <i>Aspergillus</i> sp. FP - 180.	61
Tabla 7. Comparación de los sistemas de recuperación de protoplastos obtenidos a partir de esporas en germinación (8hr) y de micelio (12 hr).	63

FIGURAS

Figura 1. Digestión y absorción de nutrientes por los hongos.	10
Figura 2. Una porción de una molécula de quitina.	15
Figura 3. Estructura básica de las glicoproteínas.	17
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i> .	30
Figura 5. Estructuras del conidióforo de <i>Aspergillus</i> .	31
Figura 6. Formación de protoplastos.	45
Figura 7. Regeneración y reversión celular.	47
Figura 8. Cinética de crecimiento de cepas de <i>Aspergillus</i> en glucosa con extracto de levadura (GEL).	51
Figura 9. Efecto de la adición de una quitinasa de <i>Streptomyces griseus</i> sobre dos concentraciones de micelio en la formación de protoplastos de <i>Aspergillus awamori</i> .	53

Figura 10. Sistema de formación de protoplastos de <i>Aspergillus awamori</i> micelio intacto, formación de los protoplastos apicales después de 60 minutos de digestión y digestión de la pared celular después de 180 minutos.	54
Figura 11. Efecto de la concentración del micelio en la formación de protoplastos de <i>Aspergillus awamori</i> .	55
Figura 12. Efecto de la concentración del KCl como estabilizador osmótico en la formación de protoplastos de <i>Aspergillus awamori</i> .	56
Figura 13. Determinación de las condiciones del lavado en la recuperación de protoplastos de <i>Aspergillus awamori</i> . Concentración del estabilizador osmótico (KCl) y fuerza de centrifugación (x g).	57
Figura 14. Comparación de la capacidad de regeneración de los protoplastos de <i>Aspergillus</i> sp. FP-180 provenientes del ápice hifal y de un sistema micelial completo, en pectina a pH 6 y pH 2.	64
Figura 15. Morfología macroscópica de las cepas de <i>Aspergillus</i> FP-180 y LP-10 creciendo en pectina y sorbitol (MMP-S) a pH 2.5, pH 1.5 y pH 6.	67, 68
Figura 16. Morfología microscópica de las cepas <i>Aspergillus</i> FP-180 y LP-10 creciendo en pectina y sorbitol (MMP-S) a pH 2.5.	69,70
Figura 17. Crecimiento de las cepas de <i>Aspergillus</i> FP-180 y LP-10 en medio mínimo con pectina, pectina-sorbitol y sorbitol, a pH 5 y pH 2.	72
Figura 18. Actividad exopectinolítica específica de las cepas <i>Aspergillus</i> FP-180 y LP-10 en medio mínimo con pectina, pectina-sorbitol y sorbitol a pH 5 y pH 2.	73
Figura 19. Actividad endopectinolítica específica de las cepas <i>Aspergillus</i> FP-180 y LP-10 en medio mínimo con pectina, pectina-sorbitol y sorbitol a pH 5 y pH 2.	74
Figura 20. Crecimiento en xilanos y actividad xilanolítica específica de las cepas <i>Aspergillus</i> FP-180 y LP-10.	75

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña-Argüelles, M., M. Gutiérrez-Rojas, G. Viniegra-González y E. Favela-Torres. 1994. Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 16(1): 23-28.
- Aguilar, G. y C. Huitrón. 1990. Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotechnol. Lett.* 12(9): 655-660.
- Aguilar, G. y C. Huitrón. 1993. Conidial and mycelial-bound exo-pectinase of *Aspergillus* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 108: 127-132.
- Aguilar, G., B.A. Trejo, J.M. García y C. Huitrón. 1991. Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can. J. Microbiol.* 37: 912-917.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson. 1989. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. Nueva York. 1219 pp.
- Anné, J. y J.F. Peberdy. 1985. Protoplast fusion and interespecies hybridization in *Penicillium*. En: Peberdy, J.F. y L. Ferenczy (Eds). *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 73-85.
- Archer, D.B. y D.A. Wood. 1995. Fungal exoenzymes. En: Gow, N.A.R. y G.M. Gadd (Eds). *The growing fungus*. Chapman & Hall. Londres. pp 135-162.
- Barrett, V., P.A. Lemke y R.K. Dixon. 1989. Protoplast formation from selected species of ectomycorrhizal fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 381-387
- Bartalski-García, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 87.

- Bartaicki-García, S.** 1987. The cell wall: a crucial structure in fungal evolution. En: Rayner, A.D.M., C.M. Brasier y D. Moore (Eds). *Evolutionary biology of the fungi*. Cambridge University Press. Cambridge. pp 389-403.
- Bartaicki-García, S. y G. Gierz.** 1995. The shape of fungal hyphae. *Memorias del Simposio Internacional Diferenciación y comportamiento en modelos fúngicos*. CINVESTAV-Irapuato. pp 15.
- Bartaicki-García, S. y E. Lippman.** 1969. Fungal morphogenesis: Cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science*. 165: 302-304.
- Bartaicki-García, S., J. Ruiz-Herrera y C.E. Bracker.** 1979. Chitosomes and chitin synthesis. En: Burnett, J.H. y A.P.J. Trinci (Eds). *Fungal Walls and hyphal growth*. Cambridge University Press. Cambridge. pp 149-168.
- Bartaicki-García, S., F. Hergert, y G. Gierz.** 1990. A novel computer model for generating cell shape: Application to fungal morphogenesis. En: Kuhn, P.J., A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey y L.G. Copping (Eds). *Biochemistry of cell walls and membranes in Fungi*. Springer-Verlag. Berlín. pp 43-60.
- Bartaicki-García, S., D. D. Bartaicki, G. Gierz, R.M. López-Franco y C.E. Bracker.** 1995. Evidence that Spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: A test of the hyphoid model. *Exp. Mycol.* 19: 153-159.
- Bennett, J.W.** 1985. Protoplasts and secondary metabolism. En: Peberdy, J.F. y L. Ferenczy (Eds). *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics*. Marcel Dekker. Nueva York. pp 189-203
- Bennett, J.W. y M.A. Klich (Eds).** 1992. *Aspergillus. Biology and industrial applications*. Butterworth-Heinemann. 416 pp.
- Berka, R.M., N. Dunn-Coleman y M. Ward.** 1992. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. En: Bennett, J.W. y M.A. Klich (Eds). *Aspergillus. Biology and industrial applications*. Butterworth-Heinemann. pp 355-390.

- Bracker, C.E.** 1995. Dynamics of hyphal tip growth: Spitzenkörper, satellites, pulsed growth, and determination of the cell shape. *Memorias del Simposio Internacional Diferenciación y comportamiento en modelos fúngicos*. CINVESTAV-Irapuato. pp 1.
- Bracker, C.E., J. Ruiz-Herrera y S. Bartnicki-García.** 1976. Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73(12): 4570-4574.
- Brikett, J.A. y P.F. Hamlyn.** 1985. Protoplast fusion and genetic analysis in *Cephalosporium*. En: Peberdy, J.F. y L. Ferenczy (Eds). *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 207-224.
- Burnett, J.H.** 1979. Aspects of structure and growth of hyphal walls. En: Burnett, J.H. y A.P.J. Trinci (Eds). *Fungal Walls and hyphal growth*. Cambridge University Press. Cambridge. pp 1-25.
- Caddick, M. X., A.G. Brownlee y H.N. Arst, Jr.** 1986. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 203: 346-353.
- Carlile, M.J.** 1995. The success of the hypha and mycelium. En: Gow, N.A.R. y G.M. Gadd (Eds). *The growing fungus*. Chapman & Hall. Londres. pp 3-19.
- Casadesus, L., T. Rojas, A.L. Brizuela y A.Y. Sánchez.** 1985. *Micología*. Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana. 692 pp.
- Cavalier-Smith, T.** 1987. The origin of the fungi and pseudofungi. En: Rayner, A.D.M., C.M. Brasier y D. Moore (Eds). *Evolutionary biology of the fungi*. Cambridge University Press. Cambridge. pp 339-353.
- Cifuentes, J.** 1984. Los hongos: ¿plantas o animales?. *Ciencias*. 5: 10-15
- Collings, A., B. Davis y J. Mills.** 1988. Factors affecting protoplast release from some mesophilic, thermophilic and thermotolerant species of filamentous fungi using Novozym 234. *Microbios*. 53: 197-210.

- Cook, P.E. y G. Campbell-Platt.** 1994. *Aspergillus* and fermented foods. En: Powell, K.A., J.F. Peberdy y A. Renwick. *The genus Aspergillus. From Taxonomy and Genetics to Industrial Application.* Plenum Press. Nueva York. pp 171-188.
- Cotty, P.J., P. Bayman, D.S. Egel y K.E. Elias.** 1994. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. En: Powell, K.A., J.F. Peberdy y A. Renwick. *The genus Aspergillus. From Taxonomy and Genetics to Industrial Application.* Plenum Press. Nueva York. pp 1-28.
- Croft, J.H.** 1985. Protoplast fusion and incompatibility in *Aspergillus*. En: Peberdy, J.F. y L. Ferenczy (Eds). *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics.* Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 73-85.
- Darnell, E., H. Lodish y D. Baltimore.** 1990. *Molecular Cell Biology.* Scientific American Books. Nueva York. 1104 pp.
- Davis, B.** 1985. Factors influencing protoplast isolation. En: Peberdy, J.F. y L. Ferenczy (Eds). *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics.* Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 45-71.
- Delgado, L.** 1997. *Efecto del pH e inhibidores de la glicosilación sobre la secreción de pectinasas de Aspergillus MGM-180.* Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Denison, S.H., M. Orejas y H.N. Arst, Jr.** 1995. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* 207(48): 28519-28522.
- Evans, R. y A. Hofmann.** 1982. *Plantas de los dioses. Orígenes del uso de los alucinógenos.* Fondo de Cultura Económica. México. 192 pp.
- Ferenczy, L.** 1985. Transfer of cytoplasmic genetic elements by protoplasts fusion. En: Peberdy, J.F. y L. Ferenczy (Eds). *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics.* Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 307-322.
- Fèvre, M., V. Girard, y P. Nodet.** 1990. Cellulose and β -glucan synthesis in *Saprolegnia*. En: Kuhn, P.J., A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey y L.G. Copping (Eds). *Biochemistry of cell walls and membranes in Fungi.* Springer-Verlag. Berlín. pp 97-107.

- Fogarty, W.M.** 1994. Enzymes of the genus *Aspergillus*. En: Smith, J.E. (Ed). *Aspergillus*. Plenum Press. Nueva York. pp 177-218.
- Gadau, M.E. y A.J. Lingg.** 1992. Protoplast fusion in fungi. En: Arora, K.K., K.G. Mukerji, y R.P. Elander (Eds). *Hanbook of Applied Mycology*. Vol 4. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 101-128.
- Gadd, G.M.** 1995. Signal transduction in fungi. En: Gow, N.A.R. y G.M. Gadd (Eds). *The growing fungus*. Chapman & Hall. Londres. pp 183-210.
- Garraway, M.O. y R.C. Evans.** 1991. *Fungal Nutrition and Physiology*. Krieger Publishing Company Malabar. Florida. 397 pp
- Gianinazzi-Pearson, V. y G. Gianinazzi.** 1995. Proteins and protein activities in endomycorrhizal symbioses. En: Varma, A. y B. Hock (Eds). *Micorrhiza. Structure, Function, Molecular Biology & Biotechnology*. Springer Verlag. pp 251-266.
- Goosen, T., C.J. Bos y H. van den Broek.** 1992. Transformation and gene manipulation in filamentous fungi: An overview. En: Arora, K.K., K.G. Mukerji, y R.P. Elander (Eds). *Hanbook of Applied Mycology*. Vol 4. Marcel Dekker. Nueva York. pp 151-195.
- Gottlieb, D.** 1973. General consideration and implications of the Actinomycetales. En: Sykes, G. y F.A. Skinner (Eds). *Actinomycetales: Characteristics and practical importance*. Academic Press Inc. Londres. pp 1-10
- Gow, N.A.R.** 1995. Tip growth and polarity. En: Gow, N.A.R. y G.M. Gadd (Eds). *The growing fungus*. Chapman & Hall. Londres. pp 277-300.
- Gow, N.A.R.** 1995a. Yeast-hyphal dimorphism. En: Gow, N.A.R. y G.M. Gadd (Eds). *The growing fungus*. Chapman & Hall. Londres. pp 403-422.
- Gow, N.A.R., P.F.P. Miller y G.W. Gooday.** 1992. Life at the apex: Growth of the hyphal tip. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 56: 217-219.

- Grove, S.N. y C.E. Bracker.** 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: Vesicles and Spitzenkörper. *J. Bacteriol.* 104(2): 989-1009
- Hara, S., K. Kitamoto y K. Gomi.** 1992. Nueva developments in fermented beverages and foods with *Aspergillus*. En: Bennett, J.W. y M.A. Klich (Eds). *Aspergillus. Biology and industrial applications*. Butterworth-Heinemann. pp 133-153.
- Harvey, L.M. y B. McNeil.** 1994. Liquid fermentation systems and product recovery of *Aspergillus*. En: Smith, J.E. (Ed). *Aspergillus*. Plenum Press. Nueva York. pp 141-176.
- Hashiba, T.** 1992. Isolation of fungal protoplasts. En: Arora, K.K., K.G. Mukerji, y R.P. Elander (Eds). *Hanbook of Applied Mycology*. Vol 4. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 129-149.
- Heath, I.B.** 1995. The cytoskeleton. En: Gow, N.A.R. y G.M. Gadd (Eds). *The growing fungus*. Chapman & Hall. Londres. pp 99-134.
- Herrera, T. y M. Ulloa.** 1990. *El reino de los hongos. Micología básica aplicada*. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura Económica. México D.F. 553 pp.
- Isaac, S.** 1985. Metabolic Properties of Protoplasts. En: Peberdy, J.F. y L. Ferenczy (Eds). *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 171-188.
- Kendrick, W.B. y G. Murase.** 1994. Can we recognize monophyletic groups among Hyphomycetes?. En: Hawksworth, D.L. (Ed). *Ascomycete Systematics: Problems and Perspectives in the Nineties*. Plenum Press. Nueva York. pp 101-108.
- Klich, M.A., L.H. Tiffany y G. Knaphus** 1992. Ecology of the Aspergilli of soils and litter. En: Bennett, J.W. y M.A. Klich (Eds). *Aspergillus. Biology and industrial applications*. Butterworth-Heinemann. pp 329-353.
- Kozakiewicz, Z. y D. Smith.** 1994. Physiology of *Aspergillus*. En: Smith, J.E. (Ed). *Aspergillus*. Plenum Press. Nueva York. pp 23-40.

- Kubicek, C.P., C.F.B. Witteveen, y J. Visser.** 1994. Regulation of organic acid product by *Aspergill*. En: Powell, K.A., J.F. Peberdy y A. Renwick. *The genus Aspergillus. From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*. Plenum Press. Nueva York. pp 135-148.
- Kuhn, P.J. y A.P.J. Trinci.** 1990. Cell walls and membranes in fungi - An introduction. En: Kuhn, P.J., A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey y L.G. Copping (Eds). *Biochemistry of cell walls and membranes in Fungi*. Springer-Verlag. Berlín. pp 1-4.
- Lacely, J.** 1994. Aspergilli in feeds and seeds. En: Powell, K.A., J.F. Peberdy y A. Renwick. *The genus Aspergillus. From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*. Plenum Press. Nueva York. pp 73-92.
- Lehninger, A.L.** 1991. *Bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona. 1117 pp.
- López-Franco, R.M., C.E. Bracker, y S. Bartnicki-García.** 1994. Crecimiento apical en pulsos y dinámica del Spitzenkörper. *Memorias del V Congreso Nacional de Micología*. Guanajuato. 135a.
- López-Franco, R.M., S. Bartnicki-García, y C.E. Bracker.** 1994. Pulsed growth of fungal hyphal tips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 12228-12232.
- Markham, P.** 1995. Organelles of filamentous fungi. En: Gow, N.A.R. y G.M. Gadd (Eds). *The growing fungus*. Chapman & Hall. Londres. pp 75-98.
- Marmolejo, A.** 1994. *Formación de protoplastos en la mutante CLK1 de Aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martin, G.W.** 1968. The origin and status of fungi. En: Ainsworth, G.C. y A.S. Sussman (Eds). *The fungi. An Advanced Treatise*. Vol III. Academic Press. Nueva York. pp 635-646.
- Money N.P. y T.W. Hill.** 1997. Correlation between endoglucanase secretion and cell wall strength in oomycete hyphae: implications for growth and morphogenesis. *Mycologia*. 89(5): 777-785.
- Moore-Landecker, E.** 1996. *Fundamentals of the fungi*. Prentice Hall. Nueva Jersey. 561 pp.

- Moss, M.O.** 1994. Biosynthesis of *Aspergillus* Toxins-Non-Aflatoxins. En: Powell, K.A., J.F. Peberdy y A. Renwick. *The genus Aspergillus. From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*. Plenum Press. Nueva York. pp 29-50.
- Necas, O. y A. Svoboda.** 1985. Cell wall regeneration and protoplast reversion. En: Peberdy, J.F. y L. Ferenczy (Eds). *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 115- 133.
- Newbury, J. y J.F. Peberdy.** 1996. Characterization of the heat shock response in protoplasts of *Aspergillus nidulans*. *Mycol. Res.* 100(11): 1325-1332.
- Nolan, R.A.** 1985. Protoplasts from Entomophthorales. En: Peberdy, J.F. y L. Ferenczy (Eds). *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 87-112.
- Oxenbell, K.** 1994. *Aspergillus* Enzymes and Industrial Uses. En: Powell, K.A., J.F. Peberdy y A. Renwick. *The genus Aspergillus. From Taxonomy and Genetics to Industrial Application*. Plenum Press. Nueva York. pp 147-154.
- Park, J.C., H. Matsuoka, K. Takatori y H. Kurata.** 1996. Adaptation of *Aspergillus niger* to acidic conditions and its relationship to salt stress and miconazole. *Mycol. Res.* 100(7): 869-874.
- Peberdy, J.F.** 1976. Isolation and properties of protoplasts from filamentous fungi. En: Peberdy, J.F., A.H. Rose, H.J. Rogers y E.C. Cocking.(Eds). *Microbial and plant protoplasts*. Academic Press Inc. Londres. pp 39-50.
- Peberdy, J.F.** 1979. Fungal protoplast: Isolation, reversion and fusion. *Ann. rev. microbiol.* 33: 21-39.
- Peberdy, J.F.** 1979a. Wall biogenesis by protoplasts. En: Burnett, J.H. y A.P.J. Trinci (Eds). *Fungal Walls and hyphal growth*. Cambridge University Press. Cambridge. pp 49-70.
- Peberdy, J.F.** 1985. Mycolytic enzymes. En: Peberdy, J.F. y L. Ferenczy (Eds). *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp 31-44.

- Peberdy, J.F.** 1990. Fungal cell walls - A review. En: Kuhn, P.J., A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey y L.G. Copping (Eds). *Biochemistry of cell walls and membranes in Fungi*. Springer-Verlag. Berlin. pp 5-30.
- Peberdy, J.F. y L. Ferenczy.** 1985. *Fungal protoplasts. Applications in biochemistry and genetics*. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. 355 pp.
- Pe'er, S. y I. Chet.** 1990. *Trichoderma* protoplast fusion: a tool for improving biocontrol agents. *Can. J. Microbiol.* 36: 6-9.
- Polacheck, I. y R.F Rosenberger.** 1978. Distribution of autolysins in hyphae of *Aspergillus nidulans*: evidence for a lipid-mediated attachment to hyphal walls. *J. Bacteriol.* Vol 135 N° 3: 741-747.
- Raper, K.B. y D.I. Fennell.** 1965. *The genus Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
- Ruiz-Herrera, J.** 1992. *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. CRC Press, Inc. 248 pp.
- Ruiz-Herrera, J. y S. Bartnicki-García.** 1974. Synthesis of cell wall microfibrils in vitro by a "soluble" chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *Science*. Vol 186: 357-359.
- Ruiz-Herrera, J., R. Sentandreu y J.P. Martínez.** 1992. Chitin biosynthesis in fungi. En: Arora, K.K., K.G. Mukerji, y R.P. Elander (Eds). *Handbook of Applied Mycology*. Vol 4. Marcel Dekker. Nueva York, Inc. pp 281-312.
- Rokem, J.S., D. Klein, H. Toder y E.Zomer.** 1986. Degradation of fungal cell walls taking into consideration the polysaccharide composition. *Enzyme. Microb. Technol.* Vol 8-oct: 588-592.
- Samson, R.A.** 1992. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. En: Bennett, J.W. y M.A. Klich (Eds). *Aspergillus. Biology and industrial applications*. Butterworth-Heinemann. pp 355-390.
- Samson, R.A.** 1994. Taxonomy-Current concepts of *Aspergillus* systematics. En: Smith, J.E. (Ed). *Aspergillus*. Plenum Press. Nueva York. pp 1-22.

- Sandhu, D.K., V. Wadhwa, y P.S. Bagga.** 1989. Use of lytic enzymes for protoplast production in *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzime. Microb. Technol.* 11: 21-25.
- Saporito-Irwin, S.M., C.E. Birse, P.S. Sypherd y W.A. Fonzi.** 1995. PHR1, a pH regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15(2): 601-613.
- Sentandreu, R., S. Mormeneo y J. Ruiz-Herrera.** 1994. Biogenesis of the fungal cell wall. En: Wessels, J.G.H. y F.Meinhardt (Eds). *The mycota I. Growth, differentiation and sexuality.* Springer-Verlag. Berlin. pp 111-124.
- Shah, A.J., J. Tilburn, M.W. Adlard y H.N. Arst, Jr.** 1991. pH Regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 109-212.
- Sivan, A., G.E. Harman y T.E. Stasz.** 1990. Transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(8): 2404-2409.
- Smith, M.L., J.N. Bruhn y J.B. Anderson.** 1992. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature.* 356: 428-431.
- Timerlake, W.E. y M. A. Marshall.** 1988. Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *Trends. Genet.* 4(6): 162-169.
- Upshall, A.** 1992. The application of molecular genetic methods to filamentous fungi. En: Arora, K.K., K.G. Mukerji, y R.P. Elander (Eds). *Handbook of Applied Mycology.* Vol 4. Marcel Dekker. Nueva York, Inc. pp 81-99.
- Vágvölgyi, C y L. Ferenczy.** 1991. Isolation of nuclei from *Aspergillus nidulans* protoplasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 82: 247-252.
- Wessels, J.G.H.** 1993. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New phytol.* 123: 397- 413.

-Wessels, J.G.H., P.C. Mol, J.H. Sietsma y C.A. Vermeulen. 1990. Wall structure, wall growth and fungal cell morphogenesis. En: Kuhn, P.J., A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey y L.G. Copping (Eds). *Biochemistry of cell walls and membranes in Fungi*. Springer-Verlag. Berlín. pp 81-95.

-Wösten, H.A.B., S.M. Moukha, J.H. Sietsma y J.G.H. Wessels. 1991. Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* 137:2017-2023.

-Yager, L.N. 1992. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. En: Bennet, J.W. y M.A. Klich (Eds). *Aspergillus. Biology and industrial applications*. Butterworth-Heinemann. pp 19-41.