

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN
GENÉTICA DE *Aspergillus niger* COMO HERRAMIENTA PARA SU
ESTUDIO MOLECULAR EN BIOTECNOLOGÍA”**

Presentada por:

JORGE LUIS LARA ZUÑIGA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2021

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

“OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN
GENÉTICA DE *Aspergillus niger* COMO HERRAMIENTA PARA SU
ESTUDIO MOLECULAR EN BIOTECNOLOGÍA”

Presentado por:

Jorge Luis Lara Zuñiga

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Rosa Amelia Espejo Joya
PRESIDENTA

Ph.D. Ana Akemi Kitazono Sugahara
MIEMBRO

Dr. Víctor Juan Meza Contreras
MIEMBRO

Ph.D. Gretty Katherina Villena Chávez
ASESORA

DEDICATORIA

A mi familia, por su apoyo incondicional.

A mi madre, que desde el cielo guía mi camino.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento eterno a Dios por haber estado junto a mí a lo largo de mi desarrollo profesional, guiándome y dándome fortaleza en los momentos más difíciles.

Agradezco profundamente a mis padres, Víctor y Flora, por su apoyo incondicional en todo momento, en especial a mi madre porque desde arriba estará guiando mi camino y dándome las fuerzas para seguir adelante.

Un agradecimiento especial, por la confianza, apoyo y consejos a mis profesores el Dr. Marcel Gutiérrez-Correa y la Dra. Gretty Villena Chávez. Por el aprendizaje y todo los conocimientos compartidos a lo largo de todo el tiempo de trabajo con ellos. Siempre lo tendré en mi recuerdo Dr. Marcel, un modelo a seguir por su dedicación y entrega a la ciencia.

A todos mi compañeros del LMB, por su amistad, confianza, apoyo y motivación para continuar con la tesis y mucho más.

FINANCIAMIENTO

EL presente trabajo de investigación se desarrolló en marco del financiamiento de Innóvate Perú a través del contrato 177-PIBA-2013.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. <i>Aspergillus niger</i>	4
2.1.2. Ciclo de vida de <i>Aspergillus niger</i>	4
2.2. Transformación genética	6
2.3. Transformación mediante protoplastos	6
2.4. Tratamiento lítico de la pared celular y estabilización de los protoplastos	8
2.5. Captación del ADN	9
2.6. Regeneración y selección de transformantes	9
2.7. Electroporación	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Materiales	12
3.2. Métodos	16
3.2.1. Generación de protoplastos a partir de conidias	16
3.2.2. Generación de protoplastos a partir de micelio	18
3.2.3. Curva de sobrevivencia a higromicina	19
3.2.4. Transformación de protoplastos mediante polietilenglicol	19
3.2.5. Selección de transformantes	20
3.2.6. Transformación por electroporación	20
3.2.7. Digestión del plásmido circular	21
3.2.8. Cultivo monospórico	22
3.2.9. Extracción de ADN de transformantes y secuenciamiento del gen <i>hph</i>	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Transformación mediante protoplastos	24
4.1.1. Formación de protoplastos a partir de conidias	25
4.1.3. Prueba de sensibilidad a higromicina	35
4.1.4. Transformación de protoplastos de micelio joven con el vector pBF101_ <i>hph</i>	36
4.1.5. Tamizaje de transformantes	39
4.1.6. Cultivo monospórico	40

4.2. Transformación por electroporación de esporas.....	41
V. CONCLUSIONES.....	43
VI. RECOMENDACIONES.....	44
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	45
VIII. ANEXOS.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de protoplastos regenerantes de conidias de <i>Aspergillus niger</i> después del tratamiento con enzimas líticas por 90 minutos.....	27
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de reproducción asexual de <i>Aspergillus</i>	5
Figura 2: Esquema general de un procedimiento de transformación de hongos mediada por protoplastos.....	7
Figura 3: Micrografía electrónica de Barrido (SEM) de la cepa <i>A. niger</i> ATCC 10864. En el recuadro pequeño se muestra esporas ornamentadas.	12
Figura 4: Estructura del plásmido pBF101_hph empleado en la transformación de la cepa <i>A. niger</i> ATCC 10864.	13
Figura 5: Electroforesis de productos de digestión del plásmido pB101_hph, MM: marcador de tamaño (pb) Lambda <i>Hind III</i> , 1: plásmido digerido con <i>EcoRI</i> , carril 2,3 y 4: plásmido digerido con <i>SacI</i>	22
Figura 6: Microfotografías de crecimiento y germinación de las conidias de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864 durante las 7 primeras horas.....	25
Figura 7: Cinética de crecimiento y germinación de las conidias de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864. Los resultados son el promedio de dos replicas.....	26
Figura 8: Formación de protoplastos después de la digestión enzimática a partir de conidias de 4 horas de precultivo de <i>A. niger</i> ATCC 10864.	27
Figura 9: Formación de protoplastos a partir de micelio de <i>A. niger</i> en función al tiempo de cultivo. Los resultados son el promedio de dos replicas.	28
Figura 10: Microfotografía de formación de protoplastos mediante tratamiento enzimático a partir de micelio joven (14 h) de <i>A. niger</i> ATCC 10864.	29
Figura 11: Eficiencia de la formación de protoplastos en función al peso húmedo de biomasa de <i>Aspergillus niger</i> empleada para para la digestión enzimática. Los resultados son el promedio de dos replicas.	30
Figura 12: Formación de protoplastos a partir de micelio de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864 en función al tiempo de digestión enzimática. Los resultados son el promedio de dos replicas.....	31
Figura 13: Formación de protoplastos de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864 en función al método de recuperación. Los resultados son el promedio de dos replicas.....	32
Figura 14: Microfotografía de protoplastos obtenidos a partir de micelio joven de <i>A.</i> <i>niger</i> ATCC 10864 y recuperados por filtración con Miracloth.	32

Figura 15: Crecimiento de una colonia a partir de un protoplasto de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en medio Czapek-Dox.	34
Figura 16: Crecimiento de una colonia a partir de un protoplasto de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en medio mínimo.	35
Figura 17: Prueba de sensibilidad de la cepa <i>A. niger</i> ATCC 10864 a diferentes concentraciones de higromicina. Los resultados son el promedio de dos replicas.	36
Figura 18: Número de transformantes de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864 por microgramo del vector pBF101_hph. Los resultados son el promedio de dos replicas.	38
Figura 19: Eficiencia de transformación de protoplastos de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864 en función a la técnica de cultivo para la selección de transformantes. Los resultados son el promedio de dos replicas.	39
Figura 20: Cultivos monospórico de colonias transformantes de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10846. A: medio PDA, B: medio mínimo.	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Método de Transformación de <i>E. coli</i>	55
Anexo 2: Análisis estadístico del crecimiento de esporas.....	55
Anexo 3: Resultado del secuenciamiento del gen hph de colonias transformadas.	56
Anexo 4: Flujograma del protocolo de transformación genética para <i>Aspergillus niger</i> mediado por polietilenglicol usando protoplastos de micelio joven.....	57

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron dos procedimientos de transformación genética en *Aspergillus niger*, un procedimiento empleando protoplastos para una transformación mediada por polietilenglicol y otra metodología usando electroporación de conidias. Para el método de electroporación no se consiguieron resultados satisfactorios con los tratamientos evaluados. Se probaron diferentes voltajes y tiempos de exposición, sin embargo no se obtuvo transformantes en ninguno de los casos, y debido a esto los esfuerzos se centraron en desarrollar una metodología basada en el uso de protoplastos. En este otro método alternativo se trabajó la formación de protoplastos a partir de un micelio joven. Se evaluaron diferentes factores como el tiempo de cultivo del micelio que fue establecido a 14 h, el tiempo de reacción enzimática que fue determinado a 90 min, así como las condiciones de recuperación y regeneración de protoplastos. Una vez definida la metodología de formación de protoplastos, se estableció un procedimiento para la transformación génica mediado por polietilenglicol usando el plásmido integrativo pBF101_hph. En esta segunda etapa, se verificó que el uso de la forma linealizada del vector mejora la eficiencia de transformación comparado al uso de la forma circular. Además, se evaluaron dos procedimientos de selección, sin y con sobrecapa de agar (directa e indirecta), de los transformantes en un medio de cultivo conteniendo higromicina, estableciendo que la selección directa reduce el número de falsos positivos. De esta forma, como resultado de la investigación realizada, se presenta una metodología adecuada para la transformación de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 10846 como una herramienta para su manipulación genética y para su estudio a nivel molecular.

Palabras clave: Transformación genética, protoplastos, electroporación, *Aspergillus niger*

ABSTRACT

In this study, two genetic transformation procedures were evaluated for *Aspergillus niger*, protoplast-mediated transformation (PMT) and electroporation transformation. In electroporation, satisfactory results were not achieved with the evaluated treatments. Different voltages and exposure times were tested, however, no transformant was obtained in any of the cases, and due to that, our efforts were focused on developing a methodology based on the use of protoplasts. In PMT, protoplast formation from young mycelium was evaluated. Different factors were studied, such as the mycelium culture time, which was optimal at 14 h; the enzymatic reaction time, which was better at 90 min, as well as the recovery and regeneration conditions of the protoplasts. Once the protoplast formation methodology was defined, a procedure for polyethylene glycol-mediated genetic transformation was established using the integrative plasmid pBF101_hph. In this second stage, we found that using the linearized form of the vector improved the transformation efficiency compared to the use of the circular form. In addition, two selection procedures (direct and indirect) using hygromycin in the culture medium were evaluated, establishing that direct selection reduces the number of false positives. As a result of our work, an adequate methodology to transform protoplasts from the *Aspergillus niger* ATCC 10846 strain was developed, which could be used for its genetic manipulation and molecular-level studies.

Keywords: Genetic transformation, protoplasts, electroporation, *Aspergillus niger*.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos son organismos que presentan características particulares en su organización celular y estilo de vida. El tamaño pequeño de su genoma y la baja frecuencia de ADN redundante son algunas de las particularidades que los hacen interesantes para estudios de su genética (Olmedo-Monfil, Cortés-Penagos, & Herrera-Estrella, 2004). Los hongos filamentosos son utilizados en una amplia gama de procesos industriales de alta importancia económica y biológica, incluyendo la producción de alimentos fermentados, metabolitos primarios como ácidos orgánicos y vitaminas, y metabolitos secundarios (Meyer, 2008). Por otra parte, estos microorganismos han sido empleados para la producción de proteínas homólogas y heterólogas debido a la secreción de un amplio espectro de enzimas extracelulares como celulasas (Wang & Xia, 2011). Dentro de los principales hongos filamentosos, *Aspergillus niger* resulta atractivo para la producción a gran escala de proteínas homólogas y heterólogas debido a su capacidad de secretar grandes cantidades de productos proteicos. Además de contar con procesos de fermentación bien establecidos y de ser considerado un microorganismo GRAS (Generalmente reconocidos como seguros) (Cairns, Nai, & Meyer, 2018).

A pesar de su importancia económica y científica, el entendimiento de la biología molecular de los hongos filamentosos es limitado (Olmedo-Monfil et al., 2004). Una mejor comprensión de los procesos metabólicos de *Aspergillus*, que incluye especies con un gran valor económico y medicinal, permitirá el control y tratamiento de cepas patógenas (Bennett, 2010) y al mejoramiento de otras de importancia en el sector industrial (El-Bondkly, 2006; Gunashree & Venkateswaran, 2010). La transformación genética es una herramienta interesante para estudiar el metabolismo y la expresión génica en diferentes organismos vivos, así como la regulación de dichos procesos.

Las especies del género *Aspergillus*, que se reproducen principalmente de forma asexual, son un modelo atractivo para la introducción de cambios genéticos específicos. Sin embargo las bajas eficiencias de transformación observadas en hongos filamentosos, que puede ser explicada por la rigidez de su pared celular, aún permanecen como un gran desafío. Particularmente, la presencia de un alto contenido de melanina en la pared celular de *Aspergillus niger* y la aglomeración de sus esporas al cultivarlas hacen que transformar esta especie sea una tarea ardua (D. Li, Tang, Lin, & Cai, 2017).

Un factor esencial en el avance de las técnicas del ADN recombinante ha sido el desarrollo de sistemas de transformación genética. Ello ha hecho posible la manipulación de genomas, asociando estudios *in vitro* con material genético purificado y análisis biológicos *in vivo*. La gran mayoría de enfoques de genética molecular para hongos filamentosos han progresado a partir del desarrollo de los protocolos de transformación para *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* a principios de 1980 (Fincham, 1989). Hipotéticamente todas las especies de hongos cultivables pueden ser transformados genéticamente, sin embargo la toma de ADN exógeno por dichos microorganismos se ve limitada por la obtención de frecuencias relativamente bajas de transformación (Olmedo-Monfil et al., 2004). Las diversas estrategias de transformación difieren sustancialmente acorde a la cepa receptora que se desea manipular, también depende del marcador de selección elegido y del tipo de ADN exógeno (Fincham, 1989; D. Li et al., 2017).

Actualmente se han desarrollado diferentes metodologías de transformación para organismos fúngicos, como la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*, la electroporación de conidias germinadas, biobalística y la transformación con acetato de litio (Ruiz-Díez, 2002). Sin embargo, la transformación genética de protoplastos aún se mantiene como una de las metodologías más prometedoras para obtener eficiencias importantes en la manipulación del genoma de hongos filamentosos.

En ese sentido se propuso estudiar dos métodos de transformación para la cepa *A. niger* ATCC 10846 con el objetivo de establecer un protocolo optimizado de transformación genética que permita obtener una adecuada eficiencia de transformantes. En primer lugar, para la formación de protoplastos se determinó la edad del cultivo, la cantidad de biomasa de partida y el tiempo de digestión enzimática. En segundo término, para la transformación mediada por protoplastos se estableció el tipo de plásmido, la técnica de selección de

transformantes y componentes del medio de transformación. Además se estableció las condiciones para la recuperación y regeneración de los protoplastos y el medio de selección de transformantes.

De igual forma, se evaluaron las condiciones óptimas para el método de transformación mediante electroporación, entre las cuales están la proporción plásmido/esporas, tiempo de precultivo de las esporas, voltaje y tiempo de choque eléctrico. La metodología propuesta en el presente trabajo de investigación contribuiría a la obtención de mejores eficiencias de transformación genética para *Aspergillus niger*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es uno de los organismos biotecnológicamente más importantes, la clasificación taxonómica de este hongo lo ubica como especie del género *Aspergillus*, de la familia Trichomaceae, del orden Eurotiales, del phylum Ascomycota y perteneciente al reino Fungi. El género *Aspergillus* incluye más de 185 especies similares a *A. niger* (Schuster, Dunn-Coleman, Frisvad, & Van Dijck, 2002). Las características del grupo de *Aspergillus niger* incluyen cabezas conidiales de tonos negros, globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidióforos son comúnmente lisos o en pocas especies ligeramente granulares. Los conidios son globosos o subglobosos, elípticos o achatados horizontalmente, lisos o casi lisos, espinosos o con estriaciones longitudinales marcadas (Cairns, Nai, & Meyer, 2018; Vinck et al., 2005).

2.1.2. Ciclo de vida de *Aspergillus niger*

Los hongos filamentosos pertenecientes al género *Aspergillus* desarrollan un ciclo de vida relativamente simple, que va desde la germinación de esporas hasta el desarrollo micelar. Los hongos desarrollan estructuras denominadas conidióforos, los cuales poseen una vesícula aspergilar que a su vez da origen a una o múltiples hileras denominadas esterigmas o fiálides. A partir de las fiálides se forman las conidiosporas, las cuales al entrar en contacto con un medio favorable y germinar dan lugar al desarrollo de un micelio vegetativo el cual será parte de la fase sexuada originando finalmente un nuevo conidióforo y repitiéndose el ciclo (figura 1) (Svanström, 2013) .

Cada fiálide consiste de una célula con un núcleo que se fracciona en dos, el núcleo expuesto hacia la parte externa posteriormente dará lugar a la formación de una

conidiospora después de ser circundado del protoplasma y membrana celular. El otro núcleo próximo a la parte basal de la fiálide se dividirá nuevamente para formar una nueva espora y el proceso se repetirá en tanto las condiciones del medio sean las adecuadas para el hongo. Por consiguiente, las conidias más externas son más maduras comparadas a aquellas próximas a la fiálide de donde se originaron.

El micelio se origina a partir del crecimiento de ramificaciones microscopias denominada hifas, las cuales se estructuran para dar sostén al desarrollo y propagación de esporas. Las hifas aéreas se despliegan sobre el medio formando la estructura micelar a fin de obtener los nutrientes necesarios para las vías metabólicas y procesos fisiológicos del microorganismo.

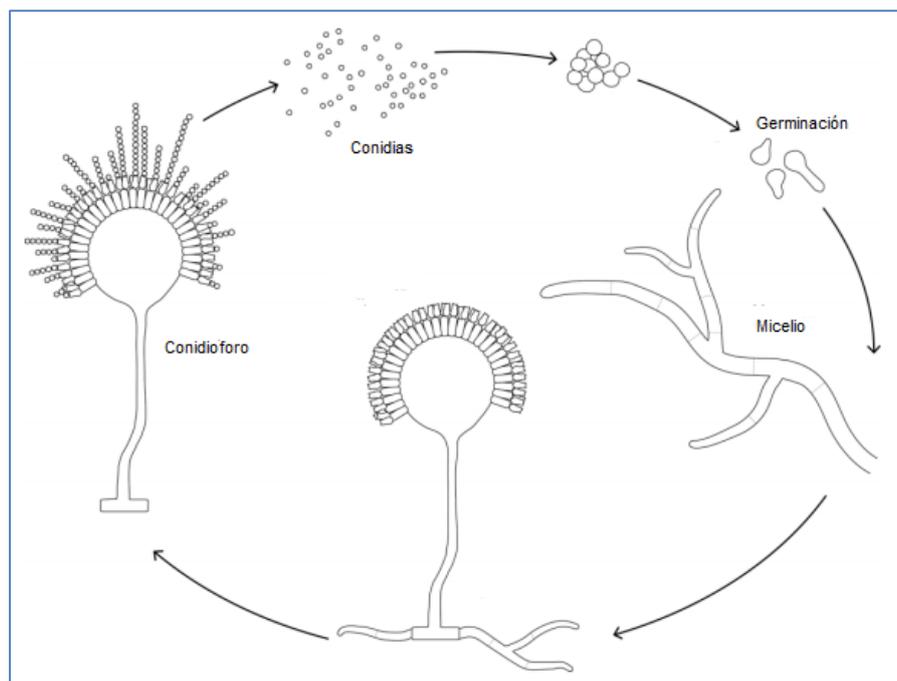


Figura 1: Ciclo de reproducción asexual de *Aspergillus*.
FUENTE: Svanström, 2013.

2.2. Transformación genética

La transformación genética consiste en la modificación del material genético de una célula a través de la introducción y expresión de un ADN foráneo. La inserción del material genético externo se da a través de la membrana y pueda ocurrir de forma natural en algunos organismos bacterianos, mientras que en otros la transformación tiene que ser inducida con técnicas de laboratorio. Existen dos componentes claves en los trabajos de transformación genética, por un lado está la técnica a emplear para la introducción del material genético y por otro el método adecuado para la selección de los transformantes. Un gran número de técnicas de transformación otorgan una importante cantidad de células transformadas, sin embargo la etapa de tamizaje post introducción del ADN exógeno es un factor limitante durante el proceso (D. Li, Tang, Lin, & Cai, 2017).

El progreso de los sistemas de transformación genética en hongos filamentosos permitiría transformar estos microorganismos con la finalidad de obtener cepas con mejores características para propósitos industriales, teniendo en cuenta la gran capacidad secretora y de elaboración de metabolitos importantes de estos organismos. Varias especies de organismos fúngicos hipotéticamente son aptas para ser transformadas. En los últimos años se han desarrollado y adaptados métodos de transformación génica más específicos para cada cepa de hongos, no obstante la rigidez e impermeabilidad de la pared celular de estos organismos permanecen como uno de los principales desafíos en los sistemas de transformación (Olmedo-Monfil, Cortés-Penagos, & Herrera-Estrella, 2004; Villena, Kitazono, & Hernández-Macedo, 2020).

2.3. Transformación mediante protoplastos

El uso de protoplastos de hongos filamentosos en procedimientos de transformación se mantiene como la alternativa más empleada en este tipo de técnicas de biología molecular. Los protoplastos son células que carecen de pared celular e inicialmente se emplearon en trabajos con levaduras (Hutchison & Hartwell, 1967). En los últimos años han cobrado importancia en el estudio de la estructura de la pared celular y en el proceso de síntesis de la misma en diferentes plantas, levaduras y hongos filamentosos (D. Li et al., 2017; Ortíz, 2013).

La técnica del uso de protoplastos se basa en la utilización de un conjunto de enzimas que permitan la degradación de los complejos componentes de la pared celular del hongo (Figura 2). Las características de las paredes celulares fúngicas varían entre distintas cepas e inclusive, los componentes de la pared celular de las esporas de una misma cepa pueden ser diferentes a la de la hifa (Martin, Nicolas, & Villanueva, 1973).

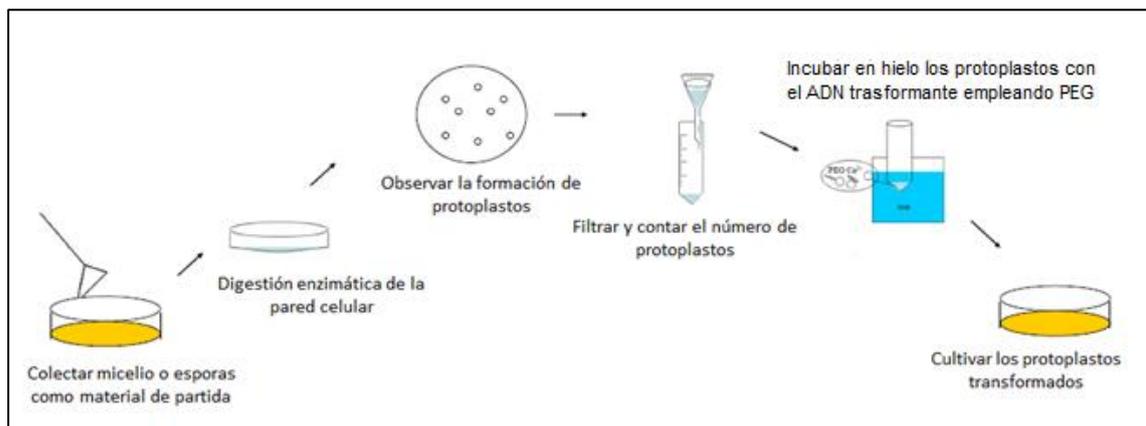


Figura 2: Esquema general de un procedimiento de transformación de hongos mediada por protoplastos.

FUENTE: Li et al. *Microb Cell Fact* (2017), DOI 10.1186/s12934-017-0785-7.

Los protoplastos pueden obtenerse de distintas etapas de crecimiento del hongo, por ejemplo en especies de *Neurospora* se han empleado macro y microconidias germinadas (Rossier, Pugin, & Turian, 1985), otra alternativa ha sido el uso de micelio joven (Buxton, Gwynne, & Davies, 1989). En algunos hongos de cuerpo fructífero como los Basidiomycetes se pueden emplear basidiosporas, micelio dicariótico o conidias para la generación de protoplastos. Sin embargo, la elección del tipo de célula de partida para la obtención de protoplastos dependerá de las características de cada cepa y del método que mejor resultados otorgue para ese organismo (D. Li et al., 2017).

2.4. Tratamiento lítico de la pared celular y estabilización de los protoplastos

La supresión de la pared celular fúngica, compuesta por glucano, manano y quitina, mediante digestión enzimática es el primer paso en cualquier procedimiento de transformación por protoplastos. La conformación de la pared celular de los hongos es variable en la división celular y a lo largo del desarrollo del organismo, desde la germinación de la espora, pasando por la expansión de las hifas y hasta el desarrollo del micelio. Además, las características de la pared celular difieren entre especies, por ello, generalmente se debe emplear un coctel enzimático para la etapa de digestión.

La elección de la enzima o el conjunto de enzimas para digerir las paredes celulares es un factor importante a considerar. Algunos procedimientos de transformación han empleado mezclas complejas de enzimas como las provenientes del estómago e intestino del caracol, o también la comercialmente conocida como zimolasa 100T obtenida de la bacteria *Arthrobacter luteus* (Ballance, Buxton, & Turner, 1983; Tilburn et al., 1983; Yelton, Hamer, & Timberlake, 1984). Generalmente los cocteles enzimáticos incluyen mezclas complejas de enzimas hidrolíticas entre las que destacan 1,3 - glucanasas y quitinasas (Binninger, Skrzynia, Pukkila, & Casselton, 1987), también se encuentran celulasas, pectinasas, xilanasas, L-glucoronidasa y proteasas; las cuales están disponibles comercialmente en preparaciones provenientes de *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *R. solani*, *Aspergillus niger*, *Basidiomycetes*, *Helix pomatia*, etc (Villena et al., 2020).

Una vez culminado el proceso de enzimolisis, el siguiente paso es la recuperación de los protoplastos. Para ello se debe emplear estabilizadores osmóticos como el cloruro de sodio, sulfato de magnesio, sorbitol o sacarosa para evitar el daño de las células. Concentraciones de sorbitol entre 0.8 a 1.2M se han empleado en el uso de tampones en preparación de protoplastos de *Asperigllus sp* y *Trichoderma sp*. (Azizi et al., 2013; Gruber, Visser, Kubicek, & de Graaff, 1990) e hipotéticamente podrían funcionar para otras especies (D. Li et al., 2017).

2.5. Captación del ADN

La introducción de ADN lineal o circular de doble cadena en las células de protoplastos se debe llevar a cabo en un medio con estabilizadores osmóticos e iones de calcio, estos últimos facilitarían la apertura de canales de la membrana celular (Villena et al., 2020). En la transformación de protoplastos, las concentraciones de cloruro de calcio más utilizadas son 0.01M o 0.05M. Además, se debe emplear un agente químico como el polietilenglicol (PEG) para promover la fusión, a través de conexiones moleculares, del material genético con los protoplastos. Comúnmente la cantidad de protoplastos de partida se utilizan a una densidad de 10^8 - 10^9 unidades por mL, mientras que la concentración de ADN es variable pero generalmente alrededor de 5 $\mu\text{g/mL}$. Con respecto al pH, no está bien definido si variaciones al rango de 6 a 8 tendría un efecto significativo al transformar protoplastos (Ruiz-Díez, 2002).

2.6. Regeneración y selección de transformantes

Una de las etapas más importantes al transformar protoplastos es la regeneración de los mismos. Algunos procedimientos de transformación precisan no ejercer ninguna presión de selección durante un periodo al transferir los protoplastos a un medio de regeneración. Eso daría el tiempo para la reconstitución de los componentes de la pared celular y para que sean capaces posteriormente de enfrentar un medio selectivo. También es importante remarcar que los medios de regeneración deben contener estabilizadores osmóticos para preservar la morfología de los protoplastos. La estabilidad de la presión osmótica es un punto importante a considerar a lo largo del proceso de transformación, desde la recuperación de los protoplastos formados hasta fase de regeneración.

2.7. Electroporación

La transformación genética mediante electroporación se basa en la permeabilización reversible de las membranas celulares inducidas por campos eléctricos de alta amplitud y corta duración. Las cargas eléctricas se acumulan en un condensador para producir un alto voltaje, luego las células son golpeadas por el voltaje de impulso, se permeabiliza la membrana y de esa forma el material genético puede ingresar dentro de las células. En la transformación de hongos por electroporación usualmente se emplea ondas cuadradas las cuales representan ondas de corriente alterna, donde el flujo de electrones se da a intervalos de tiempo regulares, que toman valores extremos sin pasar por valores intermedios (Genetics Conference, 2003; Ozeki et al., 1994).

Al exponer una célula a un campo eléctrico, la estructura de la membrana plasmática se altera con la subsecuente formación de microporos. Sin embargo, la alteración y la permeabilidad de la estructura de la membrana celular son reversibles en tanto se trabaje en determinados umbrales de intensidad de voltaje y tiempo de exposición de la muestra. Las moléculas de naturaleza lipídica y proteica de la membrana citoplasmática pueden reconstituirse después de ser expuestas a un campo eléctrico de intensidad tolerable, de lo contrario una exposición de intensidad irreversible conducirá a una regeneración sumamente tardía o a la muerte celular (Weaver, 2003).

La electroporación se ha utilizado como un método alternativo de transformación para células animales (Zerbib, Amalric, & Teissié, 1985), protoplastos de plantas (Ohshima, Gamborg, & Miller, 1972), bacterias (Calvin & Hanawalt, 1988) levaduras, y hongos filamentosos (Chakraborty, Patterson, & Kapoor, 1991). Para electroporar hongos filamentosos existen básicamente tres procedimientos dependiendo del tipo de célula que se emplee. El primer procedimiento consiste en la utilización de conidias las cuales son tratadas con un agente ablandador de la pared celular previo a la exposición al campo eléctrico (Chakraborty et al., 1991; Ozeki et al., 1994). El segundo método, previamente utilizado para *A. nidulans*, precisa el uso de conidias germinadas (Sánchez & Aguirre, 1996); mientras que un tercer método, alternativo al uso de conidias, es el que emplea la electroporación de protoplastos (Kothe & Free, 1995).

Los sistemas de electroporación deben desarrollarse en los parámetros más óptimos para cada cepa. En ese sentido, se han descrito procedimientos de electroporación para varias especies de hongos filamentosos incluyendo *Neurospora crassa*, *Penicillium urticae*, *Leptosphaeria maculans*, *Aspergillus oryzae* (Chakraborty et al., 1991), *Scedosporium prolificans* (Ruiz-Díez, 2002), *Aspergillus nidulans* (Sánchez & Aguirre, 1996), *Aspergillus niger* (Ozeki et al., 1994), *Wangiella dermatitidis*, *Aspergillus fumigatus* (Kwon-Chung, Goldman, Klein, & Szaniszló, 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Lugar de ejecución:

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Micología y Biotecnología (LMB) de la UNALM

Cepa: *Aspergillus niger* ATCC 10864

La cepa ATCC 10864 de *Aspergillus niger* (Figura 3) es un hongo filamentoso que desarrolla conidios negros ornamentados y produce una esporas asexuales haploides, se cree que su origen se dio en Budapest, Hungría (Paul et al., 2017). Esta cepa se halla en lugares con plantas en descomposición y en ambientes con temperaturas que oscilan entre 6 °C a 47 °C (Schuster et al., 2002), sin embargo la temperatura más adecuada para su desarrollo es entre 25 °C a 35 °C (Alborch, Bragulat, Abarca, & Cabañes, 2011), y con un rango de pH que va desde 1.4 a 9.8 (Paul et al., 2017). *A. niger* ATCC 10864 desarrolla hifas septadas con conidióforos alargados y paredes de textura lisa con un estructura vesicular de forma globosa o subglobosa (Abarca, Accensi, Cano, & Cabañes, 2004).

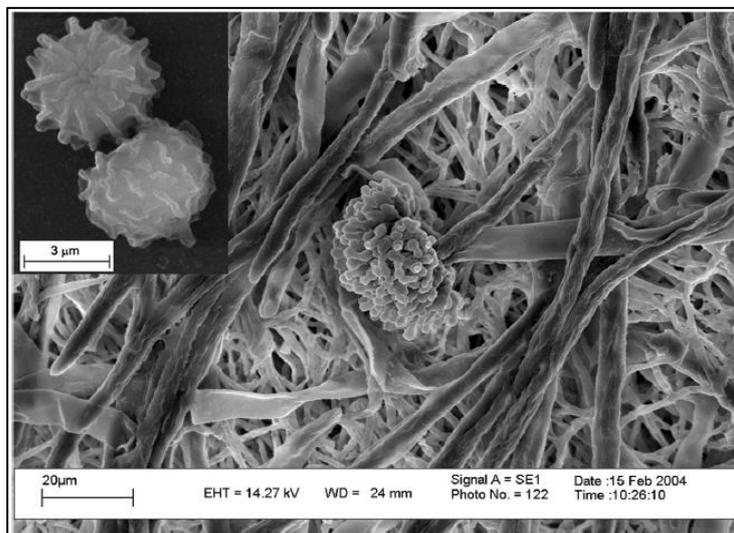


Figura 3: Micrografía electrónica de Barrido (SEM) de la cepa *A. niger* ATCC 10864. En el recuadro pequeño se muestra esporas ornamentadas.

FUENTE: Paul et al., 2017, DOI: 10.1186/s40793-017-0254-2.

Vector de transformación: Plásmido pBF101_hph

El plásmido pBF101_hph tiene en su construcción al gen hph codificante para una quinasa que confiere resistencia a higromicina (Staben et al., 1989). También contiene el gen BSD, codificante para la blasticidina S desaminasa, que otorga resistencia contra el antibiótico blasticidina S (Kimura, Kamakura, Zhou Tao, Kaneko, & Yamaguchi, 1994), además el gen posee en sus extremos puntos de corte para la enzima de restricción *EcoRI*. El plásmido comprende también un punto de corte para la enzima *SacI* en la región Ttrp (Figura 4).

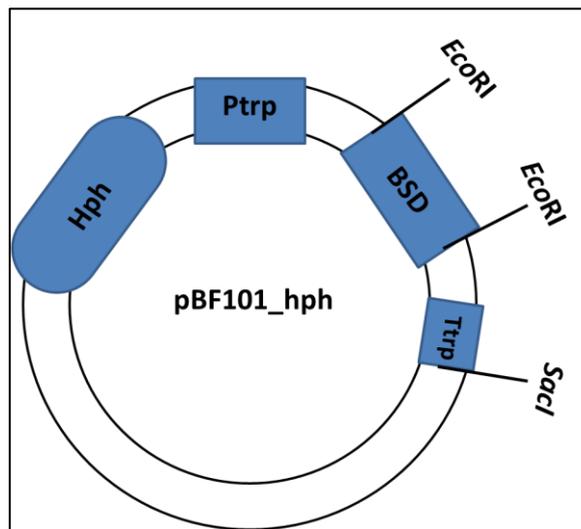


Figura 4: Estructura del plásmido pBF101_hph empleado en la transformación de la cepa *A. niger* ATCC 10864.

Materiales de uso rutinario

- Algodón
- Gorra.
- Guantes.
- Mascarilla.
- Matraces de 125, 250 y 500 mL.
- Microtubos de 1.5 y 2.0 mL.
- Papel filtro de paso rápido.
- Pipetas graduadas.
- Placas de vidrio de 10 cm x 15 cm.
- Probetas.
- Puntas de micropipeta de 1-10 μ L, 10-200 μ L, 100-1000 μ L.
- Tubos de ensayo 25 x 250 mm.
- Vasos de precipitado.

Medios de cultivo

- Agar blando (Agar 0.9%, glucosa, extracto de levadura, peptona, sacarosa)
- Agar Czapek (Agar, sacarosa, nitrato de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de potasio, sulfato de hierro)
- Agar duro (Agar 1.6%, glucosa, extracto de levadura, peptona, sacarosa)
- Agar PD (Agar-papa dextrosa)
- Agar LB (Agar Luria-Bertani)
- Caldo LB (Caldo Luria-Bertani)
- Caldo Czapek

Soluciones

- Alcohol al 70% y al 96%.
- Buffer isosmótico (1.2M MgSO₄, buffer fosfato 0.1M pH 5.8)
- Buffer de transformación (25% w/v de PEG-4000, 0.01M CaCl₂, 0.01M Tris-HCl, pH 7,5)
- Buffer de resuspensión (1M Sorbitol, 0.01M Tris-HCl, 0.01M CaCl₂, pH 7.4)
- Buffer YED (Extracto de levadura 1% y glucosa 1%) con 0.02M HEPES (ajustado a pH 8.0 con 0.1M Tris)
- Buffer de electroporación (0.01M Tris-HCl, pH 7.5, 0.27M sacarosa, 0.001M acetato de litio)
- Higromicina (50-300 mg/mL)
- Ampicilina (50-100 mg/mL)
- BSA (Albúmina de suero bovino)

Reactivos de biología molecular

- Agarosa.
- Agua libre de nucleasas.
- Buffer de corrida de ADN para electroforesis.
- Dinucleotidos trifosfatos (dNTPS).
- Marcador de corrida.

Equipos

- Agitador mecánico orbital.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Balanza de platillo.
- Cámara digital
- Cámara de flujo laminar.
- Cámara y peines de electroforesis.
- Congeladora de -20 °C.
- Congeladora de -80 °C.
- Equipo de Baño María.
- Espectrofotómetro.

- Horno de secado.
- Horno microondas.
- Incubadora de 28 °C.
- Microcentrífuga.
- Micropipetas.
- Potenciómetro.
- Refrigeradora.
- Agitador.
- Termociclador
- Transiluminador.
- Vórtex.

3.2. Métodos

3.2.1. Generación de protoplastos a partir de conidias

3.2.1.1. Determinación del tiempo de germinación de conidias de *A. niger*

En primer lugar se evaluó la germinación de las conidias de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 10864. Se resuspendieron esporas de 72 h de crecimiento en agar PDA con una solución estéril de tween 80 (0.1%, v/v). El número de esporas en la suspensión se cuantificó en una cámara de Neubauer y se llevó hasta una concentración de 2×10^6 esporas/ml. Se inoculó 1 mL de la suspensión de esporas en un matraz de 125 mL conteniendo 20 mL de medio Czapek (Sigma) con tween 80 al 0.2% (v/v). Se tomó alícuotas de 500 μ L en intervalos de 2 h desde las 0 h hasta completar las 8 h, para realizar el conteo en cámara de Neubauer y monitorear el crecimiento o el aumento en diámetro de las esporas.

3.2.1.2. Formación de protoplastos a partir de conidias

Se incorporaron esporas de *A. niger* en PDA y se incubaron a 28 °C. Se cosecharon esporas de 72 h, para usarlas en la formación de protoplastos. Se inocularon 1×10^8 esporas totales en 100 mL de medio Czapek y el cultivo se incubó a 28 °C y a 175 rpm por 4 h. Seguidamente se centrifugó a 4000 rpm por 10 min y el pellet se resuspendió en 10 mL del buffer isosmótico. Después se trasladó la suspensión a un matraz Erlenmeyer para la digestión enzimática. Posteriormente se agregaron 100 mg de Lysing enzyme (Sigma) y se incubó por 60 o 90 min a 30 °C. La mezcla se centrifugó a 4000 rpm por 10 min y fue lavada dos veces con buffer de resuspensión. Finalmente el pellet fue resuspendido en 460 μ L de buffer de resuspensión y se realizó un conteo estimado de la cantidad de protoplastos/ml obtenidos para realizar diluciones y sembrarlos.

Los protoplastos fueron sembrados en placas Petri con medio Czapek previamente solidificado con agar 1.6%. En ese medio se colocaron 100 μ L de la suspensión de protoplastos y con una sobrecapa de medio con agar blando al 0.9% se homogenizó. Se dejó secar por unos minutos y luego se incubó a 28 °C. Se evaluó la placa a las 24, 48 y 72 h.

Por otro lado se realizó la prueba de agua para determinar la eficacia del método de formación de protoplastos. Esta prueba se realizó con la finalidad de comprobar la obtención real de protoplastos; es decir, al poner en contacto a los protoplastos con agua estos no crecerían en ningún medio de cultivo. De lo contrario, el crecimiento que se evidenciaría sería producto de esporas y no de protoplastos. Para evaluar ello, se tomaron 100 μ L de la suspensión y se realizaron diluciones 1/10 en 900 μ L de agua destilada estéril. Luego se tomó una alícuota de 250 μ L y se sembró en placas con medio de cultivo utilizando dos capas de siembra como se describió anteriormente. Se cultivaron las siembras, se realizó el conteo de colonias y se evaluó la eficiencia en la obtención de protoplastos.

3.2.2. Generación de protoplastos a partir de micelio

Se inoculó esporas de *A. niger* en medio PDA y se incubaron a 28 °C. Se cosecharon esporas de 72 h para usarlas en la formación de protoplastos. En diferentes matraces, se inocularon 5×10^8 esporas totales en 100 mL de medio Czapek y se incubaron a 28 °C, 175 rpm por 12, 14 y 16 h. Posteriormente con la ayuda de un embudo y un filtro Miracloth, se filtró el micelio y fue lavado con MgSO_4 0.6M y se pesó aproximadamente $3,5 \text{ g} \pm 0,5$ de micelio en un tubo de 15 mL estéril. Luego se agregó buffer isosmótico (5 mL de buffer por cada gramo de micelio) y se trasladó la suspensión a un matraz Erlenmeyer autoclavado. Posteriormente se agregó 100 mg de Lysing enzyme (Sigma) y se incubó en hielo por 5 min, luego se agregó albúmina de suero bovino (3 mg por cada gramo de micelio). Finalmente se incubó a 30 °C por 60, 90 y 120 min a 100 rpm. Luego del proceso de digestión enzimática, se filtró la solución de digestión con o sin el filtro Miracloth en un tubo Corning. Se agregó un volumen igual de buffer isosmótico, se mezcló cuidadosamente por inversión y después se centrifugó a 4000 rpm por 15-20 min y se resuspendió en buffer de resuspensión.

Se lavaron cuidadosamente los protoplastos y se volvieron a centrifugar por 15-20 min a 4000 rpm, este procedimiento se realizó dos veces. Luego se resuspendieron en un volumen de 1- 1.5 mL y se realizó un conteo de la cantidad de protoplastos/mL obtenidos para posteriormente realizar diluciones, sembrarlos y evaluar la regeneración en dos medios de cultivo. Los protoplastos fueron sembrados en una placa Petri con medio Czapek o medio Mínimo solidificado conteniendo agar al 1.6%. En ese medio se colocó 100 μL de la suspensión de protoplastos y con una sobrecapa de medio con agar blando al 0.9% se homogenizó. Se dejó secar por unos minutos y luego se incubó a 28 °C y se evaluó el crecimiento a las 24, 48 y 72 h. Por otro lado, al igual que el trabajo con conidias germinadas, se realizó la prueba de agua para determinar la eficiencia de formación de protoplastos. Se tomaron 100 μL de la suspensión y se realizó diluciones 1/10 en 900 μL de agua destilada estéril. Luego se tomó una alícuota de 250 μL y se sembró en placas con medio de cultivo

3.2.3. Curva de sobrevivencia a higromicina

Se realizó una curva de sensibilidad a higromicina con los protoplastos obtenidos, a fin de determinar la dosis adecuada para la selección de transformantes. Se trabajó a concentraciones de 100, 150, 200, 250, 300 y 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina. Los protoplastos fueron sembrados siguiendo la metodología descrita anteriormente, con la diferencia que la higromicina fue incorporada en el medio de siembra tanto en la capa inferior (agar duro) como en la capa superior (agar blando).

3.2.4. Transformación de protoplastos mediante polietilenglicol

Para la transformación se usó el plásmido pBF101_hph que contiene un cassette de resistencia a higromicina. Se utilizaron 1×10^7 protoplastos (lavados previamente dos veces con buffer de resuspensión) y se incubaron con 8 μg de ADN plasmídico lineal o circular (El ADN debe estar contenido en 20 μL de TE o buffer de resuspensión). Los protoplastos y el ADN fueron mezclados en un tubo estéril de 15 mL e incubados en hielo por 20 min. Después se agregaron 1.25 mL de Buffer PEG al 60%, se mezcló suavemente y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 5 mL de buffer de resuspensión y se mezcló lentamente por inversión. Luego se centrifugó a 4000 rpm por 10-15 min a 4 °C y se resuspendió el pellet en 1 mL de buffer de resuspensión. Se plaquéo entre 50-200 μL en medio selectivo y se incubó a 28 °C. Se evaluaron dos técnicas de selección, una técnica de selección directa y una de selección indirecta descritas en la siguiente sección. Las placas sembradas fueron monitoreadas los días posteriores hasta observar colonias transformantes. Las colonias crecidas nuevamente fueron transferidas a un medio selectivo para evaluar su crecimiento frente a la higromicina y reasegurar que sean colonias transformadas.

3.2.5. Selección de transformantes

3.2.5.1. Selección directa

Esta técnica consiste en sembrar a los protoplastos transformados directamente sobre un medio selectivo con higromicina (300 µg/mL). El antibiótico debe encontrarse tanto en la capa superior (agar blando) como en la capa inferior (agar duro) de la siembra.

3.2.5.2. Selección indirecta

Este procedimiento consiste en sembrar los protoplastos transformados en un medio no selectivo. Es decir, una vez terminada la incubación con el ADN, los transformantes son sembrados en un medio sin antibiótico. Después de un tiempo de incubación (al día siguiente), se agrega una sobrecapa de medio con higromicina sobre la siembra, eso servirá como tamiz para seleccionar a los transformantes.

3.2.6. Transformación por electroporación

3.2.6.1. Generación de conidias electrocompetentes

Se siguió el protocolo descrito por Sánchez y Aguirre (Sánchez & Aguirre, 1996) realizando algunas modificaciones. A partir de un cultivo de 72 h, se resuspendieron conidias con tween 80 (0.1%, v/v) y se lavaron 5 veces con 10 mL de agua destilada estéril. Se inocularon 1×10^9 conidias en 100 ml de caldo Czapek y se incubaron por 4 h a 28 °C y 175 rpm. Luego se recuperaron por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos y se resuspendieron en 100 mL de agua destilada helada. Después se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 6 mL de buffer YED helado y se incubó por 1 h a 30 °C con agitación de 100 rpm. Las conidias fueron centrifugadas y resuspendidas en 625 µL de buffer de electroporación manteniéndolas en hielo.

3.2.6.2. Electroporación de esporas y regeneración de transformantes

Para la electroporación, se agregó 1 µg del plásmido pBF101_hph en 50 µL de la suspensión de conidias electrocompetentes y se completó con agua destilada estéril a un volumen final de 60 µL. Luego se incubó la mezcla en hielo por 15 minutos y después se transfirió a una cubeta fría de electroporación de 0.2 cm. Se introdujo la cubeta en el electroporador Eppendorf Eporator evitando que las paredes externas de la cubeta se humedecieran. Para la electroporación se evaluó el voltaje en un rango de 920 a 1000 V y la longitud de pulso de 3.2 a 5.6 ms.

Después de la electroporación, se agregó inmediatamente a la cubeta 1 mL de buffer YED helado y luego se llevó la suspensión a un tubo de 15 mL estéril. Se mantuvo la mezcla en hielo por 15 min y luego se incubó a 30 °C por 90 min. Luego se sembraron 250 µL de las conidias electroporadas en placas Petri con medio selectivo conteniendo higromicina a 300 µg/mL y se dejó incubar a 28 °C por 48 h.

3.2.7. Digestión del plásmido circular

Se hizo una digestión del plásmido con las enzimas *SacI* y *EcoRI* (Figura 5). La enzima *SacI* corta en un solo punto del plásmido a nivel del terminador *Ttrp*, haciendo que pase de una forma circular a una lineal. La enzima *EcoRI* corta al plásmido en los extremos del gen *BSD* generando dos fragmentos. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y una purificación del plásmido digerido, para ello se siguió el método descrito por Grey y Brendel (1992). Se empleó el marcador de peso molecular Lambda DNA/*HindIII*, ADN proveniente del fago λ digerido con la enzima *HindIII*, que al ser corrido en gel de agarosa genera bandas de referencia de diferentes pesos moleculares.

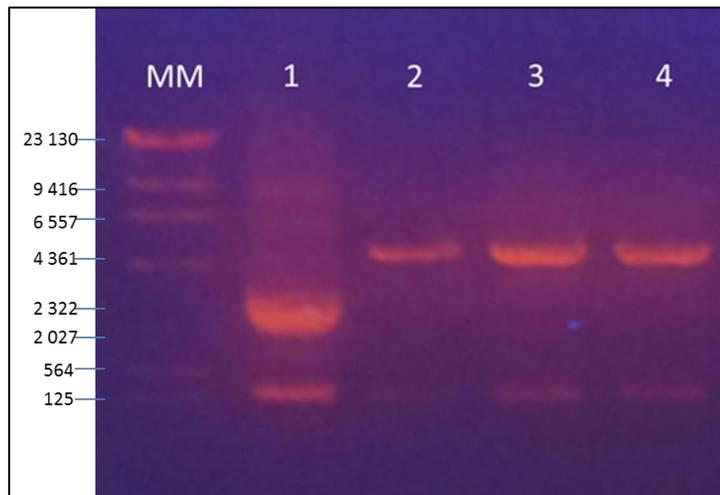


Figura 5: Electroforesis de productos de digestión del plásmido pB101_hph, MM: marcador de tamaño (pb) Lambda Hind III, 1: plásmido digerido con EcoRI, carril 2,3 y 4: plásmido digerido con SacI.

3.2.8. Cultivo monospórico

Se realizaron cultivos monospóricos de 10 colonias transformadas elegidas al azar, para ello se utilizó una suspensión de esporas de cada cepa y con una asa de kőlle se trazaron estrías en la superficie de una placa Petri con medio de cultivo solidificado. Con la ayuda de un estereoscopio y de un bisturí se seleccionó una sola espora y fue transferida a otra placa con PDA. Se evaluó durante una semana las características morfológicas de crecimiento de cada cepa.

3.2.9. Extracción de ADN de transformantes y secuenciamiento del gen hph

Se realizó la extracción del ADN de los transformantes se utilizó el Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), utilizando además una cepa control (no transformada) en el proceso. La calidad del material extraído fue visualizada en un gel de agarosa al 1%.

Se amplificó el gen hph mediante PCR a partir del ADN extraído de tres transformantes seleccionados al azar utilizando los cebadores hph_F (GAAGATCTTCGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAACACATCAAT) y hph_R (CGGGATCCCGGTCGGCATCTACTCTATT) con el objetivo de confirmar la inserción del vector pBF101_hph en los protoplastos. La amplificación se realizó con Taq DNA polimerasa (Kapa Taq PCR) en un termociclador S1000TM-BIORAD. El protocolo consistió de un paso de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguido por 38 ciclos a 95 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min y con una extensión final a 72 °C por 6 min. Los productos de PCR de 1440 pb se revelaron en un gel de agarosa al 1% y se purificaron con Wizard[®] SV Gel y PCR Clean up System (Promega). Cada producto purificado se envió a MacroGen-Korea para su secuenciamiento.

El análisis de los productos secuenciados se realizó con los programas bioinformáticos BioEdit 7.0.9 y Sequencher v.4.8 (Genes Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) para limpiar y corregir cualquier error en el formato de las secuencias antes de ser alineadas. Las secuencias se alinearon con el programa ClustalX 2.0.11. Una vez alineadas, las secuencias se analizaron con la base de datos del NCBI (The National Center for Biotechnology Information U. S., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hongos filamentosos son microorganismos de gran utilidad por su capacidad para la generación de diversos productos de importancia industrial. Entre ellos destaca *Aspergillus niger*, un hongo que elabora productos relevantes en la industria alimentaria y farmacéutica (Cairns et al., 2018). La búsqueda de herramientas moleculares que permitan mejorar la eficiencia de producción de enzimas o metabolitos secundarios de hongos como *A. niger* es uno de los principales desafíos que han surgido en los últimos años (D. Li et al., 2017). En ese sentido, varios esfuerzos se han centrado en el desarrollo de sistemas de transformación genética para hongos filamentosos con el objetivo de editar el material genético y hacerlos factorías celulares más eficientes. Sin embargo, el procedimiento que se utilice para transformar un determinado hongo filamentoso puede ser un punto crítico al modificar su ADN y comúnmente es necesario desarrollar un protocolo dirigido para cada organismo. En esta tesis se trabajó en un procedimiento para transformar la cepa *A. niger* ATCC 10864 mediante protoplastos de micelio joven con el plásmido pBF101_hph otorgándole resistencia a la higromicina B.

4.1. Transformación mediante protoplastos

La transformación genética mediada por protoplastos es uno de los sistemas de transformación más ampliamente utilizados para hongos filamentosos. Es un método que requiere de diversos pasos y cada uno de ellos debe ser optimizado. El primer paso es determinar de qué tipo de célula de partida se obtendrán los protoplastos. Ante ello, se evaluó la formación de protoplastos a partir de conidias y de micelio joven, con la finalidad de determinar cuál material biológico daría una mayor generación de protoplastos.

4.1.1. Formación de protoplastos a partir de conidias

4.1.1.1. Cinética de germinación de conidias de *A. niger*

Algunos estudios han mostrado que antes de la emergencia del tubo germinativo las conidiosporas forman protoplastos más fácilmente que un micelio maduro (D. Li et al., 2017; Sánchez & Aguirre, 1996)(Sánchez & Aguirre, 1996). Las paredes celulares de las conidiosporas son más susceptibles comparadas a las de un micelio y eso facilitaría la formación de protoplastos (Martin et al., 1973). En ese sentido, se evaluó la cinética de germinación de las esporas de la cepa *A. niger* ATCC 10864 en diferentes intervalos de tiempo (Figura 6). Se realizó la prueba estadística de Bonferroni, para determinar si existían diferencias significativas entre los diámetros de las esporas medidas a diferentes tiempos. Según esta prueba estadística, se encontró que a partir de las 4 h el diámetro de las conidias se incrementó significativamente con respecto al tiempo de 0 h y 2 h (Figura 7). Además, entre las 5 h y 6 h se observó el surgimiento del tubo germinativo en algunas conidias, mientras que a partir de las 7 h el tamaño del tubo germinativo era dos a tres veces mayor que el tamaño inicial de la espora.

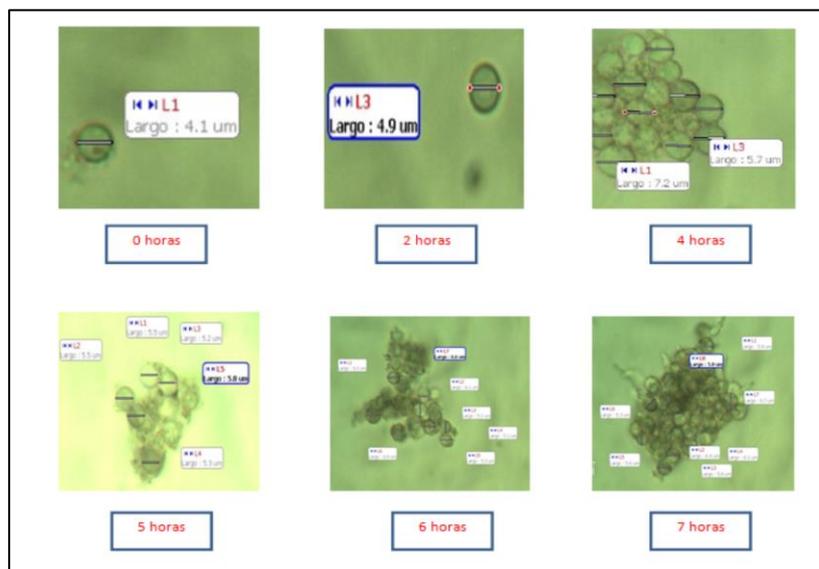


Figura 6: Microfotografías de crecimiento y germinación de las conidias de *Aspergillus niger* ATCC 10864 durante las 7 primeras horas.

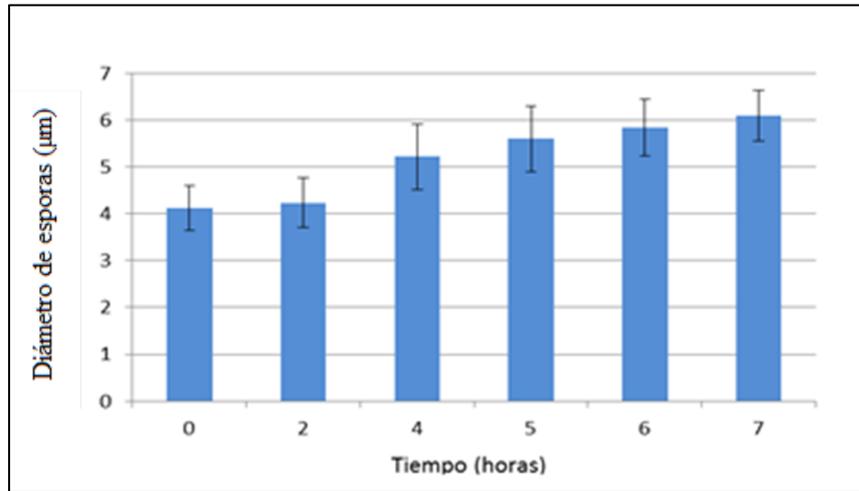


Figura 7: Cinética de crecimiento y germinación de las conidias de *Aspergillus niger* ATCC 10864. Los resultados son el promedio de dos replicas.

4.1.1.2. Obtención de protoplastos a partir de conidias.

Los resultados de la cinética de germinación de las esporas de *A. niger* permitieron elegir el tiempo de 4 h de precultivo de conidias, en el cual el diámetro era significativamente mayor al tiempo inicial y el tubo germinativo estaba próximo a emerger. Sin embargo, cuando se procedió a desarrollar un protocolo tentativo para la producción de protoplastos a partir de conidias, se identificaron algunas dificultades en el proceso. En principio la aglomeración de esporas fue uno de los primeros retos que se enfrentó, ya que el agrupamiento de conidias no permitiría una adecuada acción de la enzima. Ante ello, se decidió agregar tween 80 al medio de cultivo líquido para facilitar la dispersión de las esporas, no obstante la acumulación persistía.

La recuperación de protoplastos del resto de conidias y material celular después de la digestión enzimática fue otro de los desafíos que se afrontó (Figura 8). La separación por centrifugación diferencial no permitió aislar adecuadamente los protoplastos de la mezcla de enzimólisis, lo que resultaba en el arrastre de esporas no digeridas que finalmente terminaban creciendo en los medios de cultivo. Ese inconveniente se evidenció en la prueba de agua como se detalla a continuación.

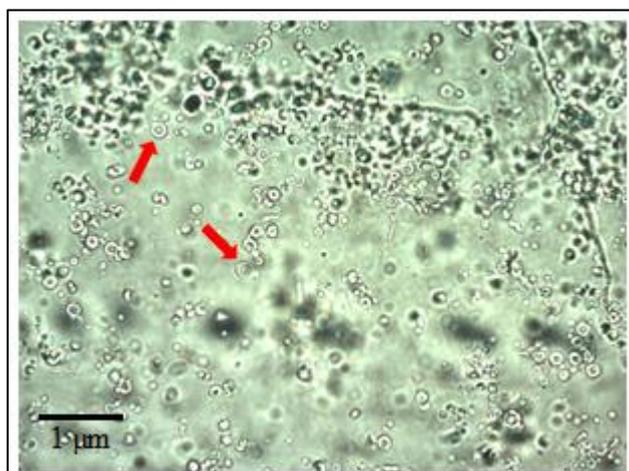


Figura 8: Formación de protoplastos después de la digestión enzimática a partir de conidias de 4 horas de precultivo de *A. niger* ATCC 10864.

En la Tabla 1 se muestran los resultados del conteo de colonias regeneradas de *Aspergillus niger* ATCC 10864 obtenidas a partir de conidias y los resultados de la prueba de agua. Se observó que luego de 90 min de incubación enzimática, el número de colonias o protoplastos regenerados fue de 28 unidades más que el número de colonias de la prueba del agua. Esta diferencia probablemente indique que hubo formación de protoplastos, sin embargo; en otros ensayos el número de colonias en la prueba de agua resultaba mayor al del tratamiento con la enzima, lo que resultaba un número negativo al momento de hacer la corrección en el conteo de regenerantes. Para el tiempo de 60 min el número de colonias en promedio fue menor al de 90 min (51 colonias a una dilución de 10^{-4} y 4 colonias a una dilución 10^{-5}) y al igual que en el tratamiento de 90 min, hubo presencia de colonias en la prueba con agua.

Tabla 1: Número de protoplastos regenerantes de conidias de *Aspergillus niger* después del tratamiento con enzimas líticas por 90 minutos.

Muestra	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}	Dilución 10^{-5}	% Eficiencia de formación de protoplastos (UFC/conidia)
Tratamiento enzimático	Incontable	80 UFC \pm 5.5	17 UFC \pm 2.5	0.0028
Prueba de agua	Incontable	52 UFC \pm 3.5	8 UFC \pm 3.0	

Los resultados mostrados, son el promedio de dos replicas. *El porcentaje fue determinado restando el número de colonias de la prueba de agua al número de colonias del tratamiento. Este resultado se dividió entre la concentración inicial de conidias (1×10^8 esporas totales) UFC: Unidades formadoras de colonia.

4.1.2. Formación de protoplastos a partir de micelio

4.1.2.1. Tiempo de cultivo del micelio

La metodología alternativa a la producción de protoplastos a partir de conidias es la que emplea micelio como material de partida, por ello se condujo un procedimiento para generar protoplastos a partir de biomasa miceliar de *A. niger* ATCC 10864. El desarrollo de hongos filamentosos y los componentes de la pared celular están influenciados por varios factores físico-químicos y además por la edad del cultivo (Wu & Chou, 2019). Se evaluó el tiempo de cultivo de las esporas para la generación de la biomasa, ya que el tiempo de madurez del micelio es un factor importante en la formación de protoplastos (Martinez-Espinoza Alfredo, 1985). Si el crecimiento es muy prolongado la acumulación excesiva de hifas dificultaría la digestión enzimática, también si las hifas son muy jóvenes o hay esporas que aún no han germinado la formación de protoplastos sería limitada (Fincham, 1989; Gallmetzer, Burgstaller, & Schinner, 1999). En ese contexto, se trabajaron tres tiempos de incubación del micelio para evaluar si el tiempo de crecimiento afectaba la producción de protoplastos. Según los resultados mostrados en la Figura 9, una incubación de 14 h permitió obtener una mayor eficiencia de formación de protoplastos comparado a las eficiencias obtenidas de cultivo de 12 h y 16 h. A las 14 h se obtuvo 4.66×10^7 protoplastos siendo 22% mayor a la cantidad obtenida a las 12 h y 2.7 veces mayor a las colonias obtenidas a 16 h. Cabe resaltar que el tiempo de incubación para la formación de protoplastos varía dependiendo de la especie con la que se trabaje (D. Li et al., 2017), algunas cepas necesitaran una tiempo de incubación mayor o menor que el que se ha establecido para *A. niger* ATCC 10846.

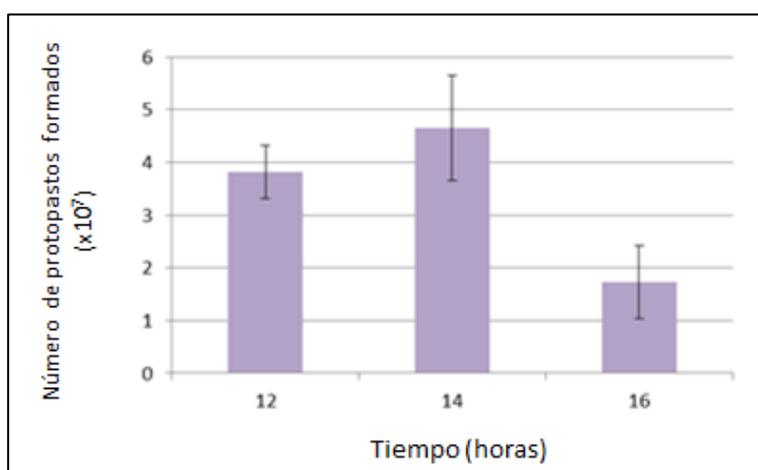


Figura 9: Formación de protoplastos a partir de micelio de *A. niger* en función al tiempo de cultivo. Los resultados son el promedio de dos replicas.

Para algunos hongos, hay un mejor aislamiento de protoplastos cuando se encuentran en etapa de micelio joven o de crecimiento en fase exponencial (Wubie et al., 2014). Sin embargo, para otras especies como *Blakeslea trispora* o *Pleurotus pulmonarius* y *Pleurotus florida*; cultivos más viejos de 48 h o hasta 60 h pueden otorgar una mejor eficiencia en la obtención de protoplastos (Eyini, Rajkumar, & Balaji, 2006; Y. Li, Yuan, & Du, 2008). Para la cepa *A. niger* ATCC 10864 el óptimo tiempo de cultivo para formar protoplastos fue de 14 h (Figura 10). Una explicación del por qué en algunas especies funciona mejor un tiempo de cultivo relativamente menor es que los micelios jóvenes son más susceptibles a la digestión enzimática, por el contrario, a medida que el micelio crece la pared celular se vuelve más resistente a la digestión (Dhar & Kaur, 2009; Shabana & Charudattan, 1997).

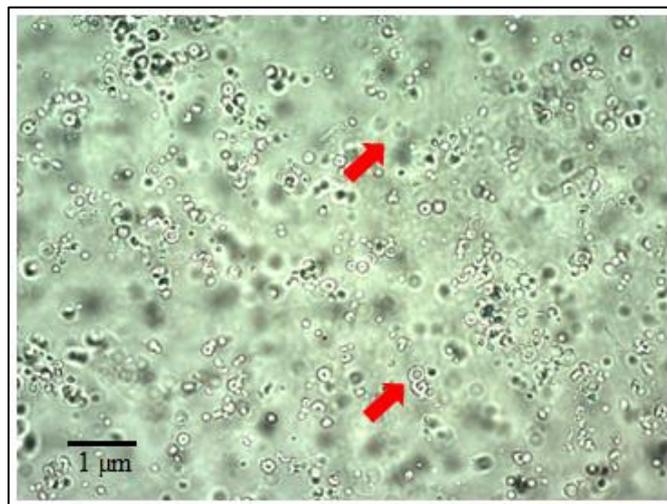


Figura 10: Microfotografía de formación de protoplastos mediante tratamiento enzimático a partir de micelio joven (14 h) de *A. niger* ATCC 10864.

4.1.2.2. Evaluación de la cantidad de biomasa miceliar

También se evaluó si la cantidad de biomasa micelial empleada en la enzimólisis podría influir en la eficiencia de formación de protoplastos. Por ello, se trabajó con dos cantidades de biomasa micelial húmeda, 3.5 g y 4.5 g. Según los resultados mostrados en la Figura 11, con una biomasa de 3.5 g se obtuvieron en promedio 2.14×10^5 colonias/g de peso húmedo, lo que resultó mayor a la cantidad de protoplastos obtenidos con una biomasa de 4.5g (1.4×10^5 colonias/g de peso húmedo).

En un método de transformación para *Aspergillus nidulans* se empleó 0.6 mg de biomasa micelar para la digestión enzimática con eficiencias de transformación fluctuantes entre 2 a más de 1000 transformantes en función de la cantidad y tipo de vector empleado. Por otro lado, un trabajo de transformación para especies *Pleurotus florida* y *Pleurotus pulmonarius* se empleó 100 mg de biomasa para producir protoplastos con eficiencias de 5.4×10^7 y 5.8×10^7 protoplastos para cada organismo respectivamente (Eyini et al., 2006).

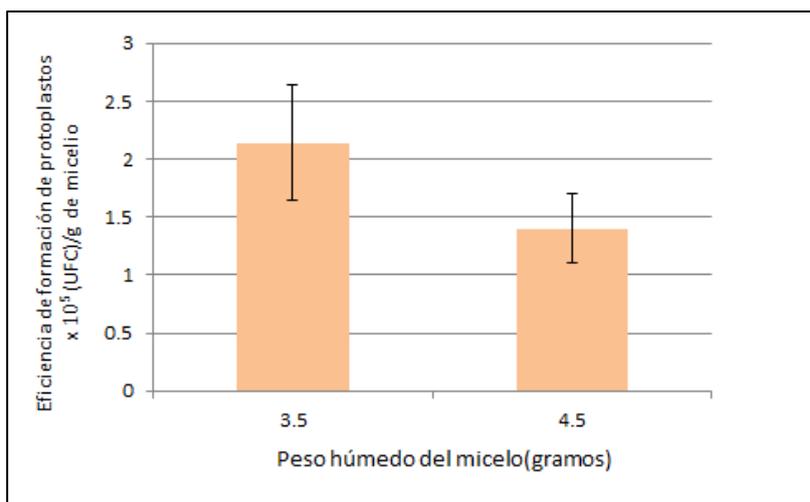


Figura 11: Eficiencia de la formación de protoplastos en función al peso húmedo de biomasa de *Aspergillus niger* empleada para para la digestión enzimática. Los resultados son el promedio de dos replicas.

4.1.2.3. Tiempo de digestión enzimática con micelio de 14 h.

El tiempo de enzimolisis es uno de los parámetros claves al formar protoplastos. Se decidió emplear 100 mg de coctel de enzimas líticas y se evaluó la digestión enzimática a tres tiempos, 60 min, 90 min y 120 min. En la Figura 12 se observa que con 90 min de incubación se obtuvo la mayor cantidad de colonias regeneradas respecto a los otros tiempos evaluados. El tiempo de digestión óptimo para algunas especies de hongos como *Metarhizium anisopliae* (Dhar & Kaur, 2009) o del genero *Pleurotus* (Eyini et al., 2006) puede ser un poco más prolongado, siendo entre 3 h y 4 h. El trabajo con otras especies puede inclusive demandar aún más tiempo, como el caso de *Nodulisporium sylviforme* (Zhao, Zhou, Ping, & Ge, 2004) que requiere 9 h o *Blakeslea trispora* (Y. Li et al., 2008) con un tiempo óptimo de incubación enzimática de 16 h. En nuestro estudio se encontró un menor tiempo de incubación (90 min) que otorga una mejor eficiencia de formación de protoplastos de *A. niger*, lo cual concuerda con un tiempo optimo previamente reportado

en un sistema de transformación para *A. nidulans* (Koukaki, Giannoutsou, Karagouni, & Diallinas, 2003).

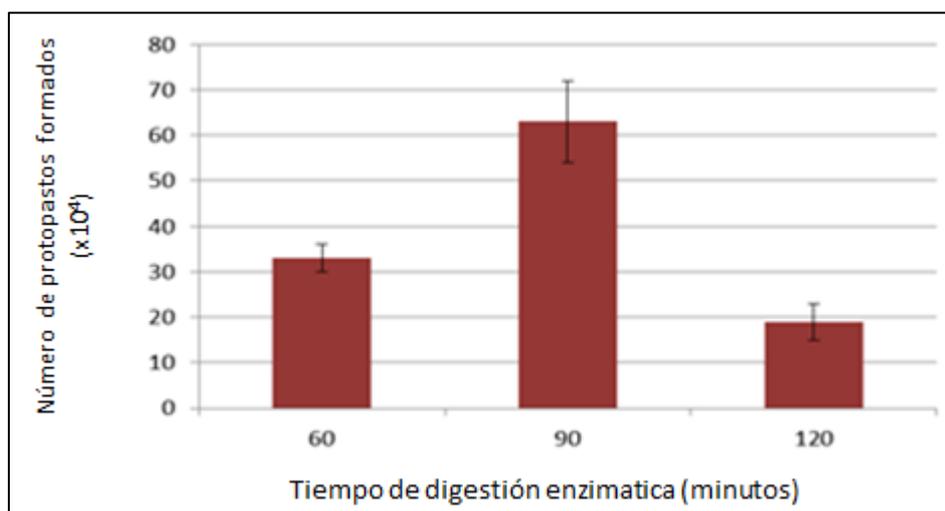


Figura 12: Formación de protoplastos a partir de micelio de *Aspergillus niger* ATCC 10864 en función al tiempo de digestión enzimática. Los resultados son el promedio de dos replicas.

Dependiendo de la especie que se desee transformar, la extensión del tiempo de digestión enzimática puede ayudar a incrementar la eficiencia de formación de protoplastos. Sin embargo una incubación muy prolongada disminuirá la frecuencia de formación y regeneración de protoplastos, y eso puede deberse a la rotura de los mismos o a una digestión excesiva lo que resulta en la desaparición de cebadores regenerativos de la pared celular y/o una disminución en su actividad (Zhao et al., 2004).

4.1.2.4. Recuperación de protoplastos

Uno de los desafíos que se tuvo que superar al desarrollar un procedimiento de transformación para *A. niger*, fue la separación de los protoplastos del micelio no digerido y resto celular. En primera instancia se trabajó la recuperación de los protoplastos mediante centrifugación diferencial, sin embargo ese método no permitía una adecuada recuperación de los mismos. En ocasiones los protoplastos formaban un pequeño sobrenadante y otras veces precipitaban junto con el resto celular. Ante ello, se decidió evaluar el uso del filtro Miracloth como se había reportado anteriormente en un protocolo de transformación para algunas especies de *Aspergillus* (Punt & van den Hondel, 1992) y también para otras especies de hongos como *Pseudogymnoascus verrucosus* (Díaz et al., 2019).

En los resultados que se muestran en la Figura 13 se compara el número de colonias regenerantes obtenidos con y sin el uso del filtro Miracloth. Se observa que usando Miracloth para la filtración de protoplastos se obtiene más de 6 veces el número de colonias regenerantes que cuando se prescinde del mismo. El filtro sirve como tamiz y, a través de sus poros, facilita el paso de los protoplastos reteniendo el micelio no digerido ayudando a obtener una mejor recuperación (Figura 14). Es fundamental rescatar los protoplastos de la solución de digestión sin restos celulares, a fin de evitar el arrastre de contaminantes al momento de la incubación con el ADN en la etapa de transformación (Azizi et al., 2013; Case et al., 1979).

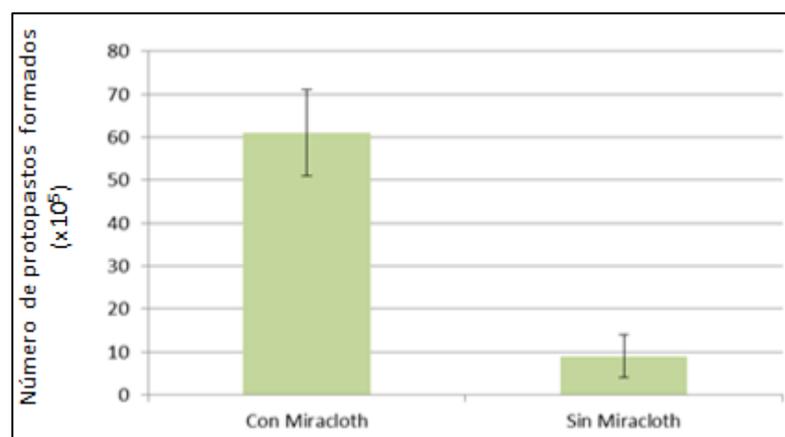


Figura 13: Formación de protoplastos de *Aspergillus niger* ATCC 10864 en función al método de recuperación. Los resultados son el promedio de dos replicas.

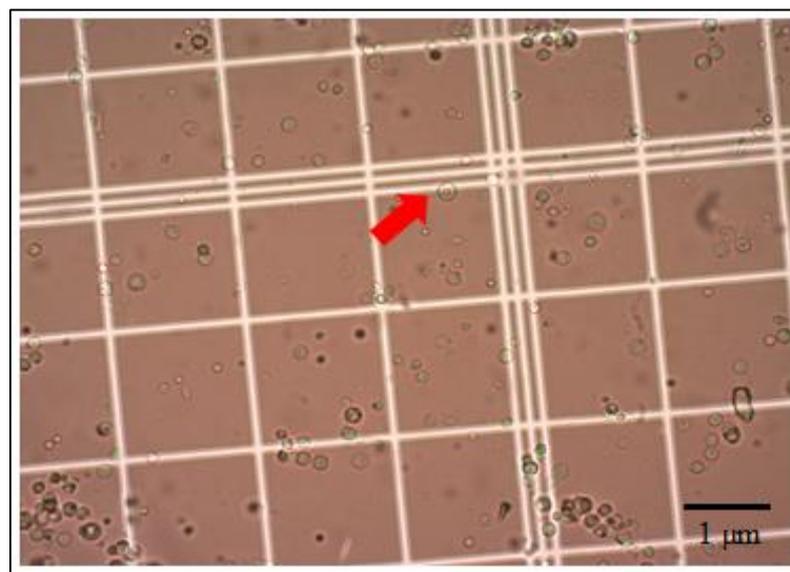


Figura 14: Microfotografía de protoplastos obtenidos a partir de micelio joven de *A. niger* ATCC 10864 y recuperados por filtración con Miracloth.

4.1.2.5. Regeneración de protoplastos

La etapa de reconstrucción de la pared celular y la recuperación de la actividad de protoplastos es otro paso clave al obtener protoplastos viables y con capacidad de regeneración. Los cambios osmóticos pueden afectar considerablemente la estructura de los protoplastos y desencadenar estrés celular, en ese sentido se recomienda el empleo de estabilizadores osmóticos como la sacarosa o sales como el KCl en los medios de siembra (Azizi et al., 2013; Case et al., 1979; Gruber et al., 1990; Kirimura, Yaguchi, & Usami, 1986). En nuestro estudio empleamos el sorbitol a una concentración de 1.2M como estabilizador osmótico en los medios de regeneración. El sorbitol es un polialcohol que se obtiene mediante hidrogenación catalítica de la glucosa y ha sido ampliamente utilizado como un agente osmótico en sistemas de transformación para diferentes especies de hongos. De forma similar que otros parámetros como la edad del cultivo o el tiempo de gestión, las óptimas condiciones de presión osmótica y agente osmótico difieren en función a la cepa que se desee transformar. Por ejemplo la sacarosa (Kim et al., 2000), el cloruro de potasio (Dhar & Kaur, 2009; Eyini et al., 2006), cloruro de sodio (Y. Li et al., 2008), manitol (Wu & Chou, 2019) son algunos estabilizadores osmóticos que se han evaluado al transformar distintas cepas fúngicas.

La selección del medio de cultivo para la siembra de protoplastos también puede influir en la frecuencia de regeneración y recuperación de los mismos. En esta tesis se evaluó la regeneración de protoplastos en dos medios de cultivo con el fin de elegir el que mejor otorgue una mejor reconstitución de protoplastos de la cepa *A. niger* ATTC10864. El primer medio evaluado fue el Czapek-Dox, un medio de cultivo sólido selectivo para el crecimiento de bacterias y hongos saprófitos (Desireé et al., 2013). Dentro de los componentes de este medio de cultivo esta la sacarosa, como fuente de carbono, también el nitrato de sodio que proporciona la fuente de nitrógeno inorgánico. Este medio contiene además fosfato dipotásico que ayuda a regular la osmolaridad, parámetro fundamental al cultivar protoplastos, también están presente sales como el cloruro de potasio, sulfato de magnesio y ferroso; minerales importantes para el desarrollo de organismos sapótrifos. Al evaluar el crecimiento de las protoplastos de *A. niger* ATCC 10864 en este medio, se observó que las colonias crecían de manera difundida en la placa, mezclándose entre ellas y dificultando el aislamiento de las mismas. El crecimiento disperso en medio Czapek-

Dox (figura 15) de otras cepas de *A. niger*, como las productoras de ocratoxina A que afectan los granos de café verde, ha sido reportado anteriormente (Luna, Yasmín, & Ángel, 2010). En un sistema de transformación adaptado para *Nodulisporium sylviforme* se evaluaron diferentes medios de cultivo, entre ellos Czapek-Dox, el cual resulto ser el medio menos eficiente para la regeneración de protoplastos de dicha cepa (Zhao et al., 2004).

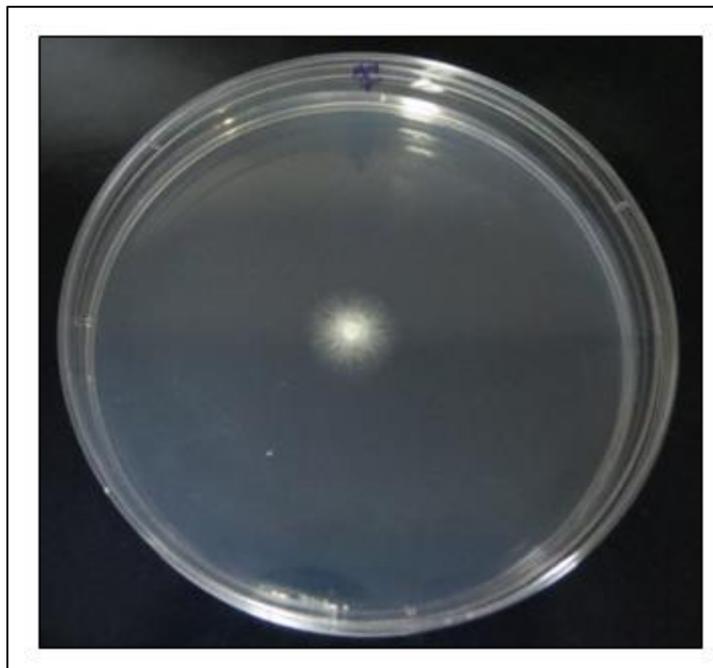


Figura 15: Crecimiento de una colonia a partir de un protoplasto de *A. niger* ATCC 10864 en medio Czapek-Dox.

El otro medio evaluado en este trabajo fue el medio mínimo, el cual contuvo en sus componentes a la glucosa, sales de nitratos y elementos traza, suplementado con sorbitol como regulador osmótico. Este tipo de medio contiene la menor cantidad de nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos y generalmente prescinde del empleo de aminoácidos en su composición. El medio mínimo se ha empleado en algunos métodos de formación de protoplastos para algunas especies de hongos como del genero *Pleurotus* (Eyini et al., 2006) y para *Metarhizium anisopliae* (Dhar & Kaur, 2009), adaptado a la necesidades de cada cepa. En este estudio, los protoplastos de *A. niger* ATCC 10864 cultivados en medio mínimo presentaron un crecimiento radial y más compacto comparado al crecimiento de las colonias en el medio Czapek-Dox, lo que evita que se mezclen facilitando el conteo y aislamiento de las mismas (Figura 16).

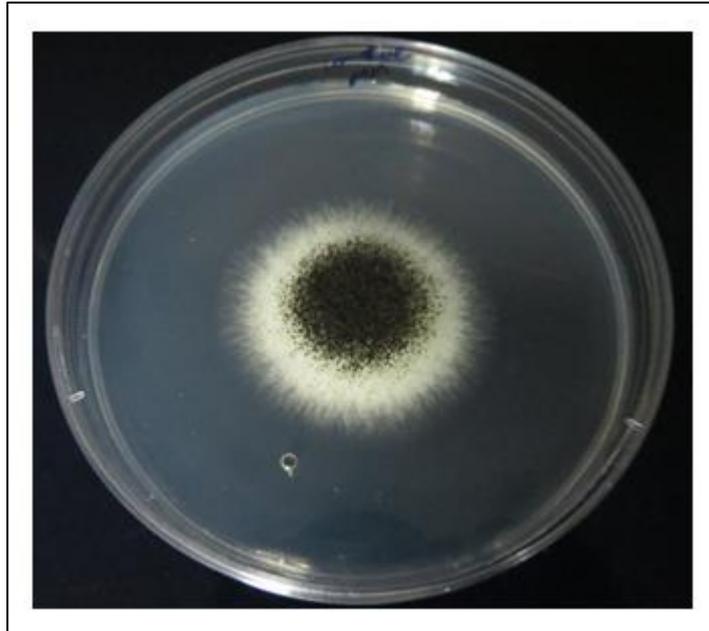


Figura 16: Crecimiento de una colonia a partir de un protoplasto de *A. niger* ATCC 10864 en medio mínimo.

4.1.3. Prueba de sensibilidad a higromicina

En los sistemas de transformación mediados por protoplastos se han empleado diferentes tipos de marcadores para la selección de transformantes como *hygB* (Mach, Schindler, & Kubicek, 1994; Meyer, Mueller, Strowig, & Stahl, 2003), *argB* (Hahm & Batt, 1988; Penttilä, Nevalainen, Rättö, Salminen, & Knowles, 1987), *qa-2⁺* (Case et al., 1979) y *Sh ble* (D. Li et al., 2017). En esta tesis se empleó el plásmido pBF101_hph conteniendo el gen *hph* que codifica para una quinasa que inactiva a la higromicina. La inactivación del antibiótico se da a través de la fosforilación del hidroxilo en la posición cuatro del anillo ciclitol. En tal sentido, los protoplastos transformados con el plásmido portarían el gen *hph* el cual les permitirá crecer en un medio de cultivo conteniendo higromicina B como agente de selección.

A fin de determinar la cantidad de antibiótico para la selección de transformantes, se realizó un ensayo de sensibilidad a seis concentraciones diferentes de higromicina B. En la Figura 17 se puede observar que a 250 $\mu\text{g/mL}$ desciende drásticamente el número de colonias en el medio de cultivo con el antibiótico, y que a partir de una concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ no se observó el desarrollo de colonias. Por lo tanto, para la prueba de

transformación se consideró trabajar con una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ para seleccionar colonias transformadas. En función a la cepa y técnica de transformación que se emplee la concentración de higromicina puede variar, por ejemplo 25 $\mu\text{g/mL}$ para *A. bisporus*, 100 $\mu\text{g/mL}$ para *C. gloeosporioides*, 200 $\mu\text{g/mL}$, para *N. crassa* (De Groot, Bundock, Hooykaas, Beijersbergen, & Chapman, 1998), 100 $\mu\text{g/mL}$ para *T. reesei* (Mach et al., 1994) y 75 $\mu\text{g/mL}$ o 100 $\mu\text{g/mL}$ para *Aspergillus giganteus* (Meyer et al., 2003).

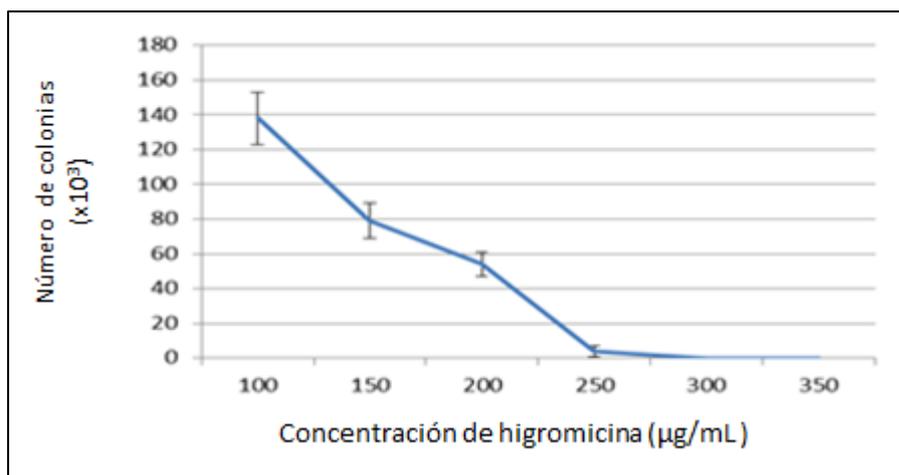


Figura 17: Prueba de sensibilidad de la cepa *A. niger* ATCC 10864 a diferentes concentraciones de higromicina. Los resultados son el promedio de dos replicas.

4.1.4. Transformación de protoplastos de micelio joven con el vector pBF101_hph

Una vez determinada las condiciones de formación, regeneración y tamizaje de protoplastos, se decidió conducir la etapa de transformación mediada por polietilenglicol. El medio en el cual se incuban los protoplastos y el ADN exógeno debe cumplir ciertas condiciones con la finalidad de proporcionar un entorno adecuado para la transformación. En tal sentido, a menudo se emplea, por ejemplo, iones de calcio los cuales hipotéticamente promoverían la apertura de los canales en la citomembrana y en consecuencia favorecer la entrada del material genético (D. Li et al., 2017). En nuestro protocolo se empleó un buffer de resuspensión el cual contuvo CaCl_2 0.01M, además de sorbitol 1.2M para garantizar la estabilidad de la osmolaridad de la solución y preservar la morfología de los protoplastos.

Otro de los agentes químicos usados en transformación con protoplastos es el polietilenglicol (PEG). El PEG es un poliéter que ha sido empleado para promover la fusión de protoplastos vegetales (Kao & Michayluk, 1974), además se ha postulado que podría alterar las cargas en la superficie a nivel de membrana celular e inducir su permeabilidad para facilitar el ingreso del ADN exógeno (Fincham, 1989). Sin embargo, la función del PEG en la transformación de hongos filamentosos aún no está bien establecida, por ejemplo Kuwano et al. ha propuesto que el rol del PEG no está directamente relacionado a facilitar la entrada del ADN desde el exterior de la célula, sino en promover la descarga del material genético en el citoplasma de los protoplastos después de su ingreso (Kuwano, Shirataki, & Itoh, 2008). Algunos sistemas de transformación utilizan PEG-3000 (D. Li et al., 2017), donde el número 3000 hace referencia a su peso molecular (3 KDa), no obstante para otras especies resulta más adecuado el uso de un PEG de mayor peso molecular como PEG-4000 o PEG-8000 (Kawai, Hashimoto, & Murata, 2010). En nuestro trabajo empleamos PEG-4000 tomando como referencia otros sistemas de transformación que han trabajado con ese peso molecular para el género *Aspergillus* (Kuwano et al., 2008; Meyer et al., 2003).

En los sistemas de transformación que emplean PEG, uno de los puntos de consideración es el hecho de decidir trabajar con un plásmido circular o lineal. Algunos protocolos recomiendan el empleo de ADN lineal para aumentar la eficiencia de transformación, sin embargo; no siempre el uso de una forma linealizada es garantía de una mayor eficiencia, y en gran medida, dependerá de la especie fúngica y del método de transformación que se utilice. En tal sentido, evaluamos la eficiencia de transformación para nuestro sistema empleando la forma linealizada y circular del plásmido pBF101_hph. Se partió con un inóculo de 1×10^7 protoplastos totales y se usó 8 µg del vector. En la Figura 18 se aprecia que se obtuvo una mayor eficiencia de transformación cuando se utilizó el plásmido en su forma linealizada comparado al uso de la forma circular. Esto es consistente con lo reportado por algunos sistemas de transformación para especies como *Verticillium dahliae* (Rehman, Su, Guo, Qi, & Cheng, 2016) y *Saccharomyces cerevisiae* (Singh, Bicker, & Dumas, 1982; Suzuki, Imai, Yamashita, & Fukui, 1983). Con la forma lineal del plásmido se obtuvo 108 transformantes totales con una eficiencia de transformación de 13.5 transformantes por microgramo de ADN plasmídico, siendo un valor menor al reportado por Meyer et al., en la transformación para *Aspergillus giganteus* que fue de 55 transformantes pero empleando una mayor cantidad de protoplastos de partida y 10 µg de

ADN (Meyer et al., 2003). Koukaki et al. reporto obtención de hasta 123 transformantes empleando un plásmido integrativo y más de 1000 utilizando un vector replicativo al transformar protoplastos de *Aspergillus nidulans* (Koukaki et al., 2003).

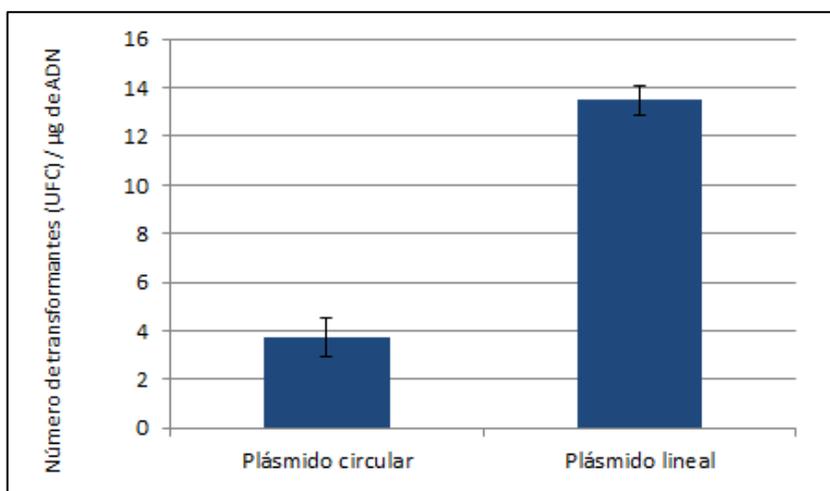


Figura 18: Número de transformantes de *Aspergillus niger* ATCC 10864 por microgramo del vector pBF101_hph. Los resultados son el promedio de dos replicas.

Contrariamente, existen otros reportes donde el uso de un ADN circular otorga una eficiencia de transformación superior al uso de un ADN lineal, como en el caso de *Pseudogymnoascus verrucosus* (Díaz et al., 2019) y *Trichoderma spp.* (Herrera-Estrella, Goldman, & Montagu, 1990). También es importante remarcar que para algunas especies se obtienen resultados similares empleando un plásmido circular o lineal, como ha sido reportado para *Moniliophthora perniciosa* (Lopes, De Queiroz, Lima, Silva, & De Araújo, 2008). Se ha discutido que la baja eficiencia al usar plásmidos lineales en sistemas de transformación mediado por PEG podría deberse a la degradación por exonucleasas que experimentan los vectores en el interior de la célula (Lopes et al., 2008). En función de la necesidad de que el vector deba ser cortado para su integración o no al genoma del hongo, se reflejará que tan útil será usar una u otra forma del plásmido en los sistemas de transformación, teniendo además en cuenta la especie fúngica.

4.1.5. Tamizaje de transformantes

El método de cultivo para selección de transformantes puede influir en la eficiencia de transformación de especies fúngicas. Evaluamos dos métodos de cultivo para el tamizaje de protoplastos de *A. niger* ATCC 10864 transformados con el plásmido pBF101_hph. El primer método evaluado fue la selección directa, el cual permite sembrar los protoplastos directamente en un medio conteniendo un antibiótico selectivo. El otro método evaluado fue la selección indirecta, en este caso, los protoplastos son sembrados directamente en un medio no selectivo, y al día siguiente son cubiertos con una sobre capa de medio, de una concentración menor de agar, conteniendo el antibiótico para la selección de transformantes.

Los resultados presentados en la Figura 19 indican que ambas técnicas de cultivo mostraron resultados similares al momento de la selección de transformantes, remarcando que la selección directa mostro una mayor eficiencia entre los dos métodos. El objetivo de utilizar un método de cultivo con dos capas de agar distintas (Kirimura et al., 1986) (método indirecto) es facilitar la regeneración de la pared celular de los protoplastos previo a someterlos a un medio selectivo (Meza, et al 1995). Por otro lado, la finalidad de emplear una selección directa es tener un tamizaje inicial para evitar el crecimiento de falsos positivos, sin embargo; esta forma de selección puede eliminar células transformadas en las cuales el gen marcador no este expresado en altos niveles en un corto tiempo (Fincham, 1989; D. Li et al., 2017; Punt & van den Hondel, 1992).

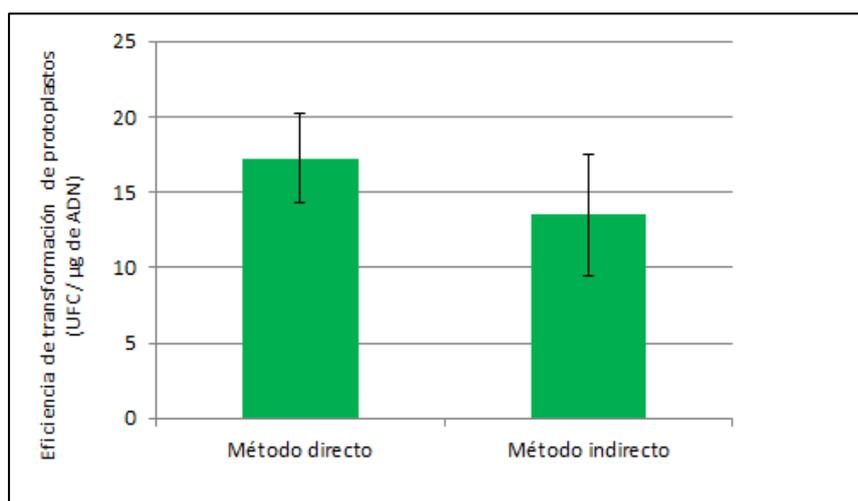


Figura 19: Eficiencia de transformación de protoplastos de *Aspergillus niger* ATCC 10864 en función a la técnica de cultivo para la selección de transformantes. Los resultados son el promedio de dos replicas.

Con el método indirecto se seleccionaron inicialmente 138 transformantes hipotéticos, de los cuales, solo 52 fueron estables después de varias etapas de sembrado en placas con y sin higromicina, obteniendo una eficiencia de 17.3 transformantes por microgramo de plásmido. Con el método directo, se seleccionaron 71 colonias virtualmente transformadas, de las cuales 54 fueron estables, consiguiendo una eficiencia de 13.5 transformantes por microgramo de plásmido. En ese contexto, el método directo permitió reducir el número de falsos positivos y hacer menos laborioso el aislamiento de colonias transformadas estables.

4.1.6. Cultivo monospórico

Con la finalidad de evaluar las repercusiones a nivel morfológico de la transformación de protoplastos de *A. Niger* ATCC 10864, se estudió las características de crecimiento de 10 cepas transformadas elegidas al azar mediante cultivo monospórico en dos medios diferentes (PDA y medio mínimo). El empleo de cultivos monospórico tiene por objeto la obtención de cultivos generados a partir de una spora simple (Choi, Hyde, & Ho, 1999). Trabajar con cultivos monospóricos permite la obtención de colonias puras para la identificación de especies y estudiar sus caracteres morfológicos o fisiológicos (Hilje-Rodríguez & Molina-Bravo, 2020).

En la Figura 20 se puede observar el crecimiento de una de las diez cepas que fueron cultivadas en PDA y en medio mínimo. Las colonias que crecieron en PDA siguieron el mismo patrón, esporularon de forma homogénea y en menor tiempo, desarrollándose de forma compacta. Mientras que las colonias cultivadas en medio mínimo crecieron de forma globosa y ramificada, presentando un micelio aéreo más notorio y de aspecto algodonoso. Una de las colonias crecidas en medio mínimo no esporuló, probablemente producto de la alteración en el genoma causado por el plásmido introducido, las otras nueve tuvieron características macroscópicas similares.

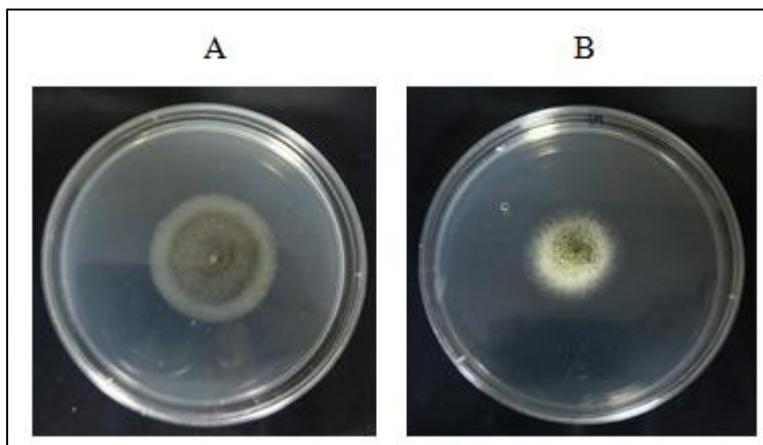


Figura 20: Cultivos monospóricos de colonias transformantes de *Aspergillus niger* ATCC 10846. A: medio PDA, B: medio mínimo.

Finalmente, se realizó la extracción del ADN de tres colonias transformantes y se amplificó por PCR el fragmento que contiene al gen de resistencia a higromicina. Se secuenciaron los amplicones y los resultados fueron analizados con la herramienta BLAST, tras ello se pudo confirmar que los fragmentos obtenidos por PCR correspondían al gen *hph* del plásmido pBF101_*hph*. De esta forma, se ha podido desarrollar un sistema de transformación genética empleando polietilenglicol para la cepa *Aspergillus niger* ATCC 10846 con el uso de protoplastos a partir de micelio joven.

4.2. Transformación por electroporación de esporas

La electroporación es un tipo de sistema de transformación genética para hongos filamentosos el cual se basa en la exposición de células a un campo eléctrico con la finalidad de permeabilizar la membrana celular y facilitar el ingreso del material genético exógeno (Chakraborty & Kapoor, 1990). Dentro de los factores que podrían condicionar los sistemas de electroporación están la intensidad del campo eléctrico, la capacidad eléctrica y la duración del pulso (Potter, 1988; Weaver, 2000).

En esta tesis se pretendió estandarizar un sistema de electroporación para *A. niger*, se evaluaron diferentes tipos de voltaje y tiempos de exposición como se indicó en la sección de Métodos. Sin embargo, en ninguno de los casos se obtuvo colonias transformadas en el

medio de selección, debido a estos resultados los esfuerzos se centraron en optimizar un sistema de transformación génica mediado por polietilenglicol empleando protoplastos como se ha detallado.

Los procedimientos de electroporación han sido aplicados para diferentes tipos celulares y puede ser prometedora para establecer sistemas de transformación para especies fúngicas no exploradas aún. En comparación al método que emplea protoplastos, la electroporación resultaría ser una herramienta relativamente más simple y útil, sin embargo la eficiencia del procedimiento dependerá de la especie fúngica para cual sea aplicada y de establecer parámetros de exposición al campo eléctrico adecuados para la muestra biológica (D. Li et al., 2017).

V. CONCLUSIONES

- Es posible transformar genéticamente la cepa *Aspergillus niger* ATCC 10846 mediante el uso de protoplastos de micelio joven en una reacción mediada por polietilenglicol con una eficiencia de transformación de 108 transformantes/ 8µg de ADN (13.5 transformantes / µg ADN)
- Se consiguió obtener protoplastos de la cepa *A. niger* ATCC 10864 a partir de un micelio joven de 14 h, a partir de 3.5 g de biomasa y un tiempo óptimo de incubación enzimática de 90 min.
- El empleo del filtro Miracloth mejora notablemente la recuperación y purificación de los protoplastos después del proceso de digestión enzimática.
- El uso de la forma linealizada del vector transformante mejora notablemente la eficiencia de transformación para la cepa *A. niger* ATCC 10864 comparado al uso de la forma circular.
- Los métodos de tamizaje directo e indirecto para seleccionar protoplastos transformados otorgan resultados similares en cuanto a transformantes estables, sin embargo; el método indirecto genera una mayor cantidad de falsos positivos.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda probar estabilizadores osmóticos diferentes al sorbitol, con el objetivo de evaluar la mejora en la eficiencia de transformación para la cepa *A. niger* ATCC 10864.
- Se recomienda evaluar el efecto de otros parámetros físico-químicos, como la temperatura y pH, en el sistema de transformación mediado por protoplastos presentado en esta tesis para estimar el mejoramiento en su eficiencia.
- Es recomendable evaluar otros sistemas de transformación como biobalística o transformación mediado por *Agrobacterium* para la cepa *A. niger* ATCC 10864 y comparar sus eficiencias con las obtenidas en esta tesis.
- Se debe enfocar los esfuerzos en el estudio de las estructuras complejas de la pared celular y contenido de pigmentos como melanina, de hongos como *A. niger* para desarrollar métodos de transformación mucho más eficientes u optimizar los actuales.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J., & Cabañes, F. J. (2004, agosto). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. Antonie Van Leeuwenhoek.
<https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024907.85688.05>
- Alborch, L., Bragulat, M. R., Abarca, M. L., & Cabañes, F. J. (2011). Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* on maize kernels. *International Journal of Food Microbiology*, 147(1), 53-57.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.005>
- Azizi, M., Yakhchali, B., Ghamarian, A., Enayati, S., Khodabandeh, M., & Khalaj, V. (2013). Cloning and Expression of Gumboro VP2 Antigen in *Aspergillus niger*. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 5(1), 35-41.
- Ballance, D. J., Buxton, F. P., & Turner, G. (1983). Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 112(1), 284-289.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(83\)91828-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91828-4)
- Binniger, D. M., Skrzynia, C., Pukkila, P. J., & Casselton, L. A. (1987). DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *The EMBO journal*, 6(4), 835-840. <https://doi.org/10.1007/BF00312864>
- Buxton, F. P., Gwynne, D. I., & Davies, R. W. (1989). Cloning of a new bidirectionally selectable marker for *Aspergillus* strains. *Gene*, 84(2), 329-334.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90507-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90507-6)

- Cairns, T. C., Nai, C., & Meyer, V. (2018). How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biology and Biotechnology*, 5. <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>
- Calvin, N. M., & Hanawalt, P. C. (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *Journal of Bacteriology*, 170(6), 2796-2801. <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2796-2801.1988>
- Case, M. E., Schweizer, M., Kushner, S. R., Giles, N. H., Kushnert, S. R., & Giles, N. H. (1979). Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5259-5263. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5259>
- Chakraborty, B. N., & Kapoor, M. (1990, noviembre 25). Transformation of filamentous fungi by electroporation. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6737>
- Chakraborty, B. N., Patterson, N. A., & Kapoor, M. (1991). An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 37(11), 858-863. <https://doi.org/10.1139/m91-147>
- Choi, Y. W., Hyde, K. D., & Ho, W. W. H. (1999). Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity*, 3, 29-38.
- De Groot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J., Beijersbergen, A. G. M., & Chapman, J. W. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 16(9), 839-842. <https://doi.org/10.1038/nbt0998-839>
- Desireé, M., Medina, D., Gallegos Morales, G., Daniel Hernández Castillo, F., María, Y., Fuente, O., & Olivas, A. F. (2013). *Actinomicetos antagónicos contra hongos fitopatógenos de importancia agrícola*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (Vol. 4).

- Herrera-Estrella, A., Goldman, G. H., & Montagu, M. Van. (1990). High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Molecular Microbiology*, 4(5), 839-843. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00654.x>
- Hilje-Rodríguez, I., & Molina-Bravo, R. (2020). Inoculation and co-inoculation of two monosporic fungi onto surface-sterile blackberry fruits for quantification experiments. *MethodsX*, 7, 101092. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101092>
- Hutchison, H. T., & Hartwell, L. H. (1967). Macromolecule synthesis in yeast spheroplasts. *Journal of bacteriology*, 94(5), 1697-1705. <https://doi.org/10.1128/jb.94.5.1697-1705.1967>
- Kao, K. N., & Michayluk, M. R. (1974). A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta*, 115(4), 355-367. <https://doi.org/10.1007/BF00388618>
- Kawai, S., Hashimoto, W., & Murata, K. (2010). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered bugs*. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.6.13257>
- Kim, B. K., Kang, J. H., Jin, M., Kim, H. W., Shim, M. J., & Choi, E. C. (2000). Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. *Life Sciences*, 66(14), 1359-1367. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00444-6](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00444-6)
- Kimura, M., Kamakura, T., Zhou Tao, Q., Kaneko, I., & Yamaguchi, I. (1994). Cloning of the blasticidin S deaminase gene (BSD) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *MGG Molecular & General Genetics*, 242(2), 121-129. <https://doi.org/10.1007/BF00391004>
- Kirimura, K., Yaguchi, T., & Usami, S. (1986). Intraspecific protoplast fusion of citric acid-producing strains of *Aspergillus niger*. *Journal of Fermentation Technology*, 64(6), 473-479. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(86\)90069-5](https://doi.org/10.1016/0385-6380(86)90069-5)

- Kothe, G. O., & Free, S. J. (1995). Protocol for the Electroporation of *Neurospora* Spheroplasts. *Fungal genetics newsletter*, 43, 31-32.
- Koukaki, M., Giannoutsou, E., Karagouni, A., & Diallinas, G. (2003). A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 687-695. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00208-2)
- Kuwano, T., Shirataki, C., & Itoh, Y. (2008). Comparison between polyethylene glycol- and polyethylenimine-mediated transformation of *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00294-008-0204-z>
- Kwon-Chung, K. J., Goldman, W. E., Klein, B., & Szaniszló, P. J. (1998). Fate of transforming DNA in pathogenic fungi. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 3, 38-44.
- Li, D., Tang, Y., Lin, J., & Cai, W. (2017). Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*.
- Li, Y., Yuan, Q., & Du, X. (2008). Protoplast from β -carotene-producing fungus *Blakeslea trispora*: Preparation, regeneration and validation. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25(6), 1416-1421. <https://doi.org/10.1007/s11814-008-0232-x>
- Lopes, F. J. F., De Queiroz, M. V., Lima, J. O., Silva, V. A. O., & De Araújo, E. F. (2008). Restriction enzyme improves the efficiency of genetic transformations in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in *Theobroma cacao*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(1), 27-34. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000100004>
- Luna, M., Yasmín, L., & Ángel, T. (2010). Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado. *Revista Mexicana de Micología*, 32, 63-68.

- Mach, R. L., Schindler, M., & Kubicek, C. P. (1994). Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. *Current Genetics*, 25(6), 567-570. <https://doi.org/10.1007/BF00351679>
- Martin, J. F., Nicolas, G., & Villanueva, J. R. (1973). Chemical changes in the cell walls of conidia of *Penicillium notatum* during germination. *Canadian Journal of Microbiology*, 19(7), 789-796. <https://doi.org/10.1139/m73-128>
- Martinez-Espinoza Alfredo, S. D. (1985). Aislamiento y regeneración de protoplastos de *Rhynchosporium secalis* causante de la escaldadura de la cebada | *Scientia Fungorum*.
- Meyer, V., Mueller, D., Strowig, T., & Stahl, U. (2003). Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Current Genetics*, 43(5), 371-377. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0406-3>
- Meza, V., Moreno, P., Tengerdy, R. P., & Gutierrez-Correa, M. (1995). Transfer of a benomyl resistance marker by heat-inactivated *Trichoderma reesei* protoplasts. *Biotechnology Letters*, 17(8), 827-832. <https://doi.org/10.1007/BF00129012>
- Ohyama, K., Gamborg, O. L., & Miller, R. A. (1972). Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts. *Canadian Journal of Botany*, 50(10), 2077-2080. <https://doi.org/10.1139/b72-267>
- Olmedo-Monfil, V., Cortés-Penagos, C., & Herrera-Estrella, A. (2004). Three Decades of Fungal Transformation: Key Concepts and Applications. En *Recombinant Gene Expression* (Vol. 267, pp. 297-314). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-774-2:297>
- Ortíz, D. I. M. (2013). *Desarrollo de un nuevo método de transformación genética en el reino fungi*. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Ozeki, K., Kyoya (Fujii), F., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M., & Nunokawa, Y. (1994). Transformation of intact aspergillus niger by electroporation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(12), 2224-2227. <https://doi.org/10.1080/bbb.58.2224>
- Paul, S., Ludeña, Y., Villena, G. K., Yu, F., Sherman, D. H., & Gutiérrez-Correa, M. (2017). High-quality draft genome sequence of a biofilm forming lignocellulolytic *Aspergillus niger* strain ATCC 10864. *Standards in Genomic Sciences*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0254-2>
- Penttilä, M., Nevalainen, H., Rättö, M., Salminen, E., & Knowles, J. (1987). A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61(2), 155-164. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90110-7)
- Potter, H. (1988, noviembre 1). Electroporation in biology: Methods, applications, and instrumentation. *Analytical Biochemistry*. Anal Biochem. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90035-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90035-8)
- Punt, P. J., & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1992). Transformation of filamentous fungi based on hygromycin b and phleomycin resistance markers. *Methods in Enzymology*, 216(C), 447-457. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)16041-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)16041-H)
- Rehman, L., Su, X., Guo, H., Qi, X., & Cheng, H. (2016). Protoplast transformation as a potential platform for exploring gene function in *Verticillium dahliae*. *BMC Biotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0287-4>
- Rossier, C., Pugin, A., & Turian, G. (1985). Genetic analysis of transformation in a microconidiating strain of *Neurospora crassa*. *Current Genetics*, 10(4), 313-320. <https://doi.org/10.1007/BF00365627>
- Ruiz-Díez, B. (2002). A Review: Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01516.x>

- Sánchez, O., & Aguirre, J. (1996). Efficient Transformation of *Aspergillus nidulans* by Electroporation of Germinated Conidia. *Fungal genetics newsletter*, 43(1), 48-51. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1317>
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., & Van Dijck, P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* - A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4-5), 426-435. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>
- Shabana, Y. M., & Charudattan, R. (1997). Preparation and Regeneration of Mycelial Protoplasts of *Alternaria eichhomiae*. *Journal of Phytopathology*, 145(8-9), 335-338. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1997.tb00410.x>
- Singh, H., Bicker, J. J., & Dumas, L. B. (1982). Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with single-stranded circular DNA vectors. *Gene*, 20(3), 441-449. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90213-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90213-X)
- Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M., Kinsey, J., & Selker, E. (1989). Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genetics Reports*, 36(1), 79. <https://doi.org/10.4148/1941-4765.1519>
- Suzuki, K., Imai, Y., Yamashita, I., & Fukui, S. (1983). In vivo ligation of linear DNA molecules to circular forms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 155(2), 747-754. <https://doi.org/10.1128/jb.155.2.747-754.1983>
- Svanström, Å. (2013). *Trehalose Metabolism and Stress Resistance in Aspergillus niger*. *Acta Universitatis agriculturae Sueciae*.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., & Davies, R. W. (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26(2-3), 205-221. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90191-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90191-9)

- Villena, G., Kitazono, A., & Hernández-Macedo, M. (2020). *Fungal Biotechnology and Bioengineering*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41870-0_14
- Vinck, A., Terlouw, M., Pestman, W. R., Martens, E. P., Ram, A. F., Van Den Hondel, C. A. M. J. J., & Wösten, H. A. B. (2005). Hyphal differentiation in the exploring mycelium of *Aspergillus niger*. *Molecular Microbiology*, *58*(3), 693-699. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04869.x>
- Weaver, J. C. (2000). Electroporation of cells and tissues. *IEEE Transactions on Plasma Science*, *28*(1), 24-33. <https://doi.org/10.1109/27.842820>
- Weaver, J. C. (2003). Electroporation of Biological Membranes from Multicellular to Nano Scales. En *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* (Vol. 10, pp. 754-768). <https://doi.org/10.1109/TDEI.2003.1237325>
- Wu, J. De, & Chou, J. C. (2019). Optimization of Protoplast Preparation and Regeneration of a Medicinal Fungus *Antrodia cinnamomea*. *Mycobiology*, *47*(4), 483-493. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1687252>
- Wubie, A. J., Hu, Y., Li, W., Huang, J., Guo, Z., Xu, S., & Zhou, T. (2014). Factors analysis in protoplast isolation and regeneration from a chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY*, *16*, 89-96. Recuperado de <http://www.fspublishers.org>
- Yelton, M. M., Hamer, J. E., & Timberlake, W. E. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(5), 1470-1474.
- Zerbib, D., Amalric, F., & Teissié, J. (1985). Electric field mediated transformation: Isolation and characterization of a TK+ subclone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *129*(3), 611-618. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)91935-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)91935-7)

Zhao, K., Zhou, D., Ping, W., & Ge, J. (2004). *Study on the Preparation and Regeneration of Protoplast from Taxol-producing Fungus Nodulisporium sylviforme*. *Nature and Science* (Vol. 2). Recuperado de <http://www.sciencepub.net>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Método de Transformación de *E. coli*.

Se mezcló 1 uL del plásmido (50 ng/μL) con 40 μL de células competentes, después se incubó en hielo por 20 minutos. Luego se sometió a un shock por calor a 42 °C por 50 seg y posteriormente se colocó en hielo por 2 min. Seguidamente se agregó 900 μL de caldo y se llevó a agitación a 37 °C a 150 rpm. Luego se sembró en agar LB con ampicilina (100 μg/mL) por 18 a 24 h. La extracción del plásmido se realizó con un kit de extracción de PROMEGA.

Anexo 2: Análisis estadístico del crecimiento de esporas.

Las desviaciones estándar del tamaño del diámetro de las esporas en los intervalos de tiempo con repeticiones fueron calculadas con el programa Excel. Adicionalmente se realizó una prueba estadística de Bonferroni considerando un grado de significancia de 95%, para determinar diferencias significativas entre los intervalos de tiempo evaluados. Según esta prueba, se encontró que a partir de las 4 h el diámetro de las conidias incremento significativamente con respecto a los tiempos iniciales de evaluación.

. oneway var2 Tiempo, bonferroni

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	6.615499	5	1.3230998	41.96	0.0001
Within groups	.189199973	6	.031533329		
Total	6.80469897	11	.618608997		

Bartlett's test for equal variances: chi2(5) = 3.4003 Prob>chi2 = 0.639

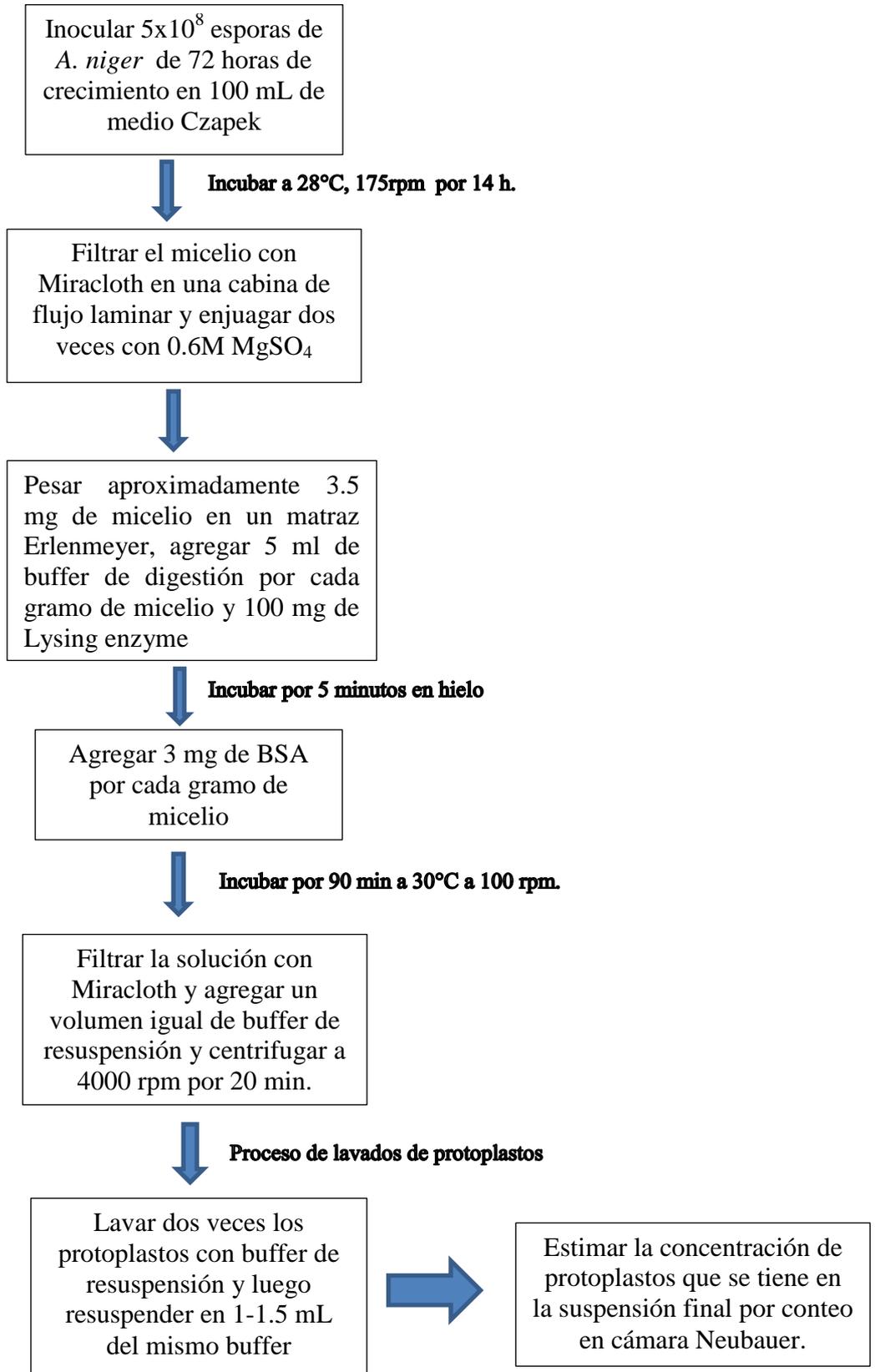
Comparison of var2 by Tiempo (Bonferroni)					
Row Mean- Col Mean	0	2	4	5	6
2	.17 1.000				
4	1.105 0.012	.935 0.028			
5	1.485 0.002	1.315 0.005	.38 1.000		
6	1.72 0.001	1.55 0.002	.615 0.201	.235 1.000	
7	1.94 0.001	1.77 0.001	.835 0.050	.455 0.642	.22 1.000

Anexo 3: Resultado del secuenciamiento del gen hph de colonias transformadas.

Nombre del Gen	Identificación NCBI	% Cobertura	% Identidad	Accesión
Higromicina-B 4-O-quinasa	Synthetic construct clone pLH334 hygromycin B resistance protein (hph) gene, complete cds	100	100	MK773641

Anexo 4: Flujo de trabajo del protocolo de transformación genética para *Aspergillus niger* mediado por polietilenglicol usando protoplastos de micelio joven.

Formación de protoplastos



Transformación de protoplastos

