

### LOCALIZACION ESPACIO TEMPORAL DE MTD Y MPD Y LA AUSENCIA DEL CICLO DEL MANITOL EN *Aspergillus niger*.

**Aguilar Osorio, G.**, P. Van Kuyk, D. Blom, A. Vink, H. Wosten and R. de Vries. Facultad de Química, Conjunto E, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito de la Investigación Científica. Ciudad Universitaria, C.P. 04510. México, D.F., Tel. 56225306, Fax: 56225309. E-mail: gao@servidor.unam.mx

Palabras clave: *Aspergillus niger*, ciclo del manitol, MTD, MPD

**Introducción.** El manitol es el poliol más abundante en las esporas de *Aspergillus niger*<sup>1</sup>. El manitol desaparece durante las etapas tempranas de la germinación, presumiblemente debido a la acción de la manitol deshidrogenasa (MTD). La presencia del ciclo del manitol (Fig. 1) ha sido sugerida en varios hongos en los que el manitol es producido a partir de fructosa-6-fosfato por la manitol-1-fosfato deshidrogenasa (MPD)<sup>2</sup> y la manitol-1-fosfato fosfatasa y convertido nuevamente a fructosa-6-fosfato por MTD y una hexoquinasa. Se especula en torno al papel del ciclo del manitol como generador de NADPH. Esto se ha basado en la presencia de todas las enzimas de esta ruta en el micelio de algunos hongos<sup>3</sup>. Sin embargo, datos preliminares en *A. niger* no están de acuerdo con ese planteamiento. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es demostrar si en *Aspergillus niger* se presenta el ciclo del manitol como ha sido propuesto para otros hongos.

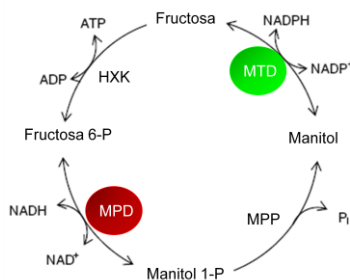


Figura 1. Representación esquemática del ciclo del manitol. HKX, hexoquinasa; MPD, Manitol fosfato deshidrogenasa; MPP, Manitol-1-fosfato fosfatasa; MTD, Manitol-1-fosfato deshidrogenasa.

**Metodología.** *Aspergillus niger* fue crecido en medio líquido, el micelio fue transferido a placas con medio mínimo con glucosa al 1% las cuales tenían una membrana porosa de policarbonato (MPC). La mitad de las placas fue cubierta por una segunda MPC para evitar la esporulación (V) mientras que la otra mitad de las placas no se cubrió (S). Se tomaron muestras cada 4 h durante 24h. Se aisló el ARN y se hibridizó con sondas para *mtdA*, *mpdA* y 18S. Para determinar con precisión la localización de la expresión de *mtdA* y *mpdA* en la colonia fúngica, se construyeron fusiones:

- 1) *mtdA*<sub>promotor</sub>-H2B-GFP-*trpC*<sub>terminador</sub>
- 2) *mpdA*<sub>promotor</sub>-H2B-dTomate-*trpC*<sub>terminador</sub>

Estas construcciones fueron introducidas en *A. niger* y analizadas por microscopía confocal.

**Resultados y discusión.** El gen *mpdA* se expresa constitutivamente, pero su expresión es mayor en el micelio esporulante (S) mientras que *mtdA* se expresó solo durante la esporulación. Por otro lado, de acuerdo a los datos las construcciones con proteínas fluorescentes, *mpdA* se expresa en las hifas vegetativas y en hifas aéreas que no han iniciado la esporulación (Fig. 2). En contraste, la expresión de *mtdA* se encontró en hifas aéreas en estado de desarrollo conidial tardío y en esporas, pero no en hifas vegetativas. Para determinar si los productos de los genes se localizan en diferentes partes de la colonia se determinaron las actividades enzimáticas de MTD y MPD en esporas y micelio de diferentes estados fisiológicos. MTD se encontró en las esporas con actividad residual en micelio esporulante. MPD fue solo encontrada en el micelio pero no en las esporas. La actividad fue mayor en el micelio esporulante que en el no-esporulante lo que confirma los resultados del análisis de expresión.

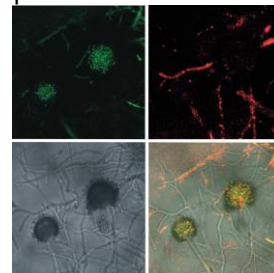


Figura 2. Micrografías de *A. niger* al microscopio confocal.

**Conclusiones.** La manitol deshidrogenasa está localizada en las conidias y conidióforos, mientras que la MPD está en la hifas vegetativas y se induce durante el desarrollo conidial. La localización espacio temporal de MTD y MPD demuestra porqué el ciclo del manitol en *Aspergillus niger* es inactivo.

**Agradecimientos.** Se agradece el apoyo de la DGAPA, UNAM

#### Bibliografía.

1. Witteveen, C. F. B., and Visser, J. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 57-62
2. Ruijter, G. J. G., Bax, M., Patel, H., Flitter, S. J., van de Vondervoort, P. J. I., vanKuyk, P. A., de Vries, R. P., and Visser, J. (2003) *Eukaryotic Cell* 2, 690-698
3. Solomon, P. S., Waters, O. D., and Oliver, R. P. (2007) *Trends Microbiol* 15, 257-262.