

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS PAREDES CELULARES DE LAS ESPORAS DE LAS MUTANTES
S-347 Y S-377 DE *Phycomyces blakesleeanus*

por Enrique Ramírez Chávez^{*},^{**} y
Arturo Flores-Carreón^{*},^{***}

CELL WALL COMPOSITION OF SPORES FROM *Phycomyces blakesleeanus* MUTANTS S-347
AND S-377

SUMMARY

The chemical composition of the cell wall spores of *Phycomyces blakesleeanus*, mutants S-347 and S-377 with spontaneous germination was studied. The most prominent materials found were polysaccharides, 21-25% of dry weight. Analysis of these polysaccharides revealed mainly the presence of glucose, fucose and mannose; glucose was 68 and 52% of the total carbohydrate in S-347 and S-377 mutants, respectively. The content of protein was 16.1 and 16%, and the content of aminosugars was 19.8 and 16%, for S-347 and S-377, respectively. There are quantitative differences between cell walls of spores from *Phycomyces blakesleeanus* wild type and mutants with spontaneous germination.

RESUMEN

Se estudió la composición química de las paredes celulares de las esporas de las mutantes de germinación espontánea S-347 y S-377 de *Phycomyces blakesleeanus*. Se encontró que el componente mayoritario de las paredes celulares son los polisacáridos, con

* Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. Apartado Postal 187, Guanajuato, Gto. CP 36000. México.

** Becario del CONACyT.

*** Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV, IPN. Apartado Postal 14-740, México, D.F. 07000. México.

21 al 25% del peso seco. El análisis de los azúcares neutros de los polisacáridos reveló la presencia de glucosa, fucosa y manosa. La glucosa comprende el 68 y el 52% del carbohidrato total en las mutantes S-347 y S-377, respectivamente. El contenido de proteínas de las mutantes S-347 y S-377 fue de 16.1 y 16%, y el de aminoazúcares de 19.8 y 16%, respectivamente. Existen diferencias cuantitativas entre las paredes celulares de las esporas de las mutantes y de la cepa silvestre de *Phycomyces blakesleeanus*.

INTRODUCCIÓN

Phycomyces blakesleeanus es un hongo saprobio que pertenece a la clase de los cigomicetos, que se caracteriza fundamentalmente porque forma esporangióforos que llegan a alcanzar varios centímetros de longitud (Bergman *et al.*, 1969). La presencia de ciclos sexual y asexual bien definidos y el conocimiento de su sistema genético lo hacen un modelo atractivo para realizar estudios de diferenciación celular (Cerdá-Olmedo, 1975; Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987). El ciclo asexual se inicia con la germinación de las esporas, las cuales dan lugar a un micelio altamente ramificado, y posteriormente se forman las estructuras de reproducción asexual denominadas esporangióforos, que contienen en su parte apical un esporangio en donde están contenidas las esporas que continuarán el ciclo. Las esporas son células de propagación y resistencia, inmóviles, no flageladas, de forma elíptica, que miden de 8-13 por 5-7.5 μm . Al igual que la mayoría de las esporas de otros hongos, éstas se encuentran en un estado de latencia constitutiva, y pueden pasar de un estado de reposo a uno de intensa actividad metabólica cuando se inducen a germinar por tratamientos físicos como el calor (Robbins *et al.*, 1942) o por la presencia de sustancias químicas como el acetato y el propionato (Borchert, 1962).

Existen varios informes en la literatura sobre los aspectos morfológicos, estructurales y bioquímicos del proceso de germinación de las esporas en *Ph. blakesleeanus* (Furch, 1981; Furch y Pambor, 1983; Van Laere, 1986; Van Laere *et al.*, 1987). Las esporas, una vez inducidas, se empiezan a hinchar y a redondear conforme avanza la germinación; a las 3 h aparecen pequeñas vacuolas que aumentan de tamaño y finalmente se funden para dar lugar a una gran vacuola central; entre las 6-8 h se produce la emisión del tubo germinativo. Solamente entre el 1-4% de las esporas germinan espontáneamente, y menos de 0.1% en medio mínimo preparado con productos puros (Rivero, 1986). Estudios sobre la composición química de la pared celular de las esporas han revelado la presencia de glucosa, en forma de glucanas (25% de peso seco), como el principal componente en forma de carbohidratos (Van Laere *et al.*, 1977), y en menor proporción quitina (4%), además del 11% de proteína y 10% de esporopolenina (Furch y Pambor, 1978a, 1978b).

Rivero (1986) aisló las mutantes con germinación espontánea S-347 y S-377 de *Ph. blakesleeana*. Estas mutantes producen esporangios que forman esporas con una morfología diferente a las de la cepa silvestre. Las células son redondas y presentan una gran vacuola central. En condiciones de humedad apropiada son capaces de crecer, formar esporangióforos con sus correspondientes esporangios, de forma irregular por la presencia de filamentos que son proyectados al exterior y los cuales corresponden a los tubos germinativos de algunas esporas. Las esporas de las mutantes no tienen semejanza estructural con las esporas silvestres en el proceso, de germinación. Se conoce que la pared celular es la estructura que da la forma a la célula, por lo que en este trabajo se analizó la composición química de las paredes celulares de las esporas de las mutantes para compararla con la de la pared celular de las esporas de la cepa silvestre y entender a nivel bioquímico este tipo de mutación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y condiciones de cultivo.- Se utilizó la cepa silvestre de *Phycomyces blakesleeana* y 2 mutantes con germinación espontánea: la S-347 (*dar-52 ger-1 (-)*) y la S-377 (*nicA 101 ger-3 (-)*), donadas por el Dr. Enrique Cerdá-Olmedo, de la Universidad de Sevilla, España. Estas cepas se conservaron en medio de cultivo de extracto de levadura-peptona-glucosa (ELPG) (descrito por Bartnicki-García y Nickerson, 1962). Para la obtención de esporas se inocularon cajas de Petri conteniendo ELPG-agar con una suspensión de esporas (solamente las esporas de la cepa silvestre se preactivaron a 48°C/20 min), y se dejaron incubar a temperatura ambiente (22°C) durante un período de 5-7 días. Las esporas se cosecharon y se lavaron 3 veces con agua destilada centrifugando a 1000 x g/5 min.

Obtención de paredes celulares.- Las esporas obtenidas se resuspendieron en agua destilada y se colocaron en una botella conteniendo perlas de vidrio (0.45-0.5 mm de diámetro), en una relación de 2 volúmenes de la suspensión de esporas por un volumen de perlas de vidrio. La suspensión se trató en un homogenizador Braun durante 5 min para las esporas de la cepa silvestre, y de 2-3 min para las esporas de las cepas mutantes, bajo una corriente de CO₂ líquido para mantener baja la temperatura. El homogenado se centrifugó a 1000 x g/5 min, se descartó el sobrenadante y el residuo conteniendo las paredes celulares se lavó por centrifugación con agua destilada varias veces hasta eliminación total de material citoplásmico. Esto se comprobó observando al microscopio preparaciones frescas del residuo. Las paredes limpias se liofilizaron y se guardaron en un desecador a -70°C.

Métodos analíticos.- La determinación de ácidos urónicos se llevó a cabo por el método modificado del carbazol descrito por Bitter y Muir (1962). Las proteínas se determinaron por el método de Lowry *et. al.* (1951); para ello se pesaron 10 mg de paredes celulares, se resuspendieron en 5 ml de NaOH 1N y se dejaron a temperatura ambiente durante 48 h. Al cabo de este tiempo se tomaron alícuotas y se les determinó el contenido de proteínas. Los azúcares totales se analizaron por el método de la antrona (Dimler *et. al.*, 1952). La determinación de glucosamina por el método de Elson-Morgan (Ashwell, 1957). Para la determinación de fosfatos en las muestras, se pesaron 5 mg de paredes celulares y se procedió a aplicar el método de Fiske y Subarrow (Umbreit *et al.*, 1951); los fosfatos se calcularon interpolando los resultados en una curva de calibración de Na_2PO_4 (0-50 μg).

Hidrólisis ácida de las paredes celulares.- Procedimiento A. Hidrólisis con H_2SO_4 al 65% (v/v): se pesaron 5 mg de paredes celulares limpias, se resuspendieron en 5 ml de H_2SO_4 al 65% (v/v) y se dejaron en un baño de hielo durante 2 h hasta su disolución. Se tomaron alícuotas y se les determinó el contenido de ácidos urónicos y de azúcares totales.

Procedimiento B. Hidrólisis con HCl 6N: se pesaron 10 mg de paredes celulares, se colocaron en una ampolleta y se les adicionaron 2 ml de HCl 6N. Se sellaron al vacío y se incubaron a 105°C/8h. La muestra hidrolizada se evaporó al vacío con una trampa de NaOH y se resuspendió en agua desionizada y se volvió a evaporar a sequedad. Esto se repitió varias veces hasta que la muestra quedó neutra. Finalmente se resuspendió en agua desionizada y se tomaron alícuotas para la determinación de glucosamina.

Procedimiento C. Hidrólisis con HCl 1N: se pesaron 10 mg de paredes celulares y se resuspendieron en 2 ml de HCl 1N, se colocaron en ampolletas, se sellaron al vacío y se incubaron a 105°C/5h. El hidrolizado se neutralizó con resina de intercambio aniónico Dowex 1x8 en fase HCO_3^- . La muestra se concentró por liofilización y se resuspendió en agua desionizada. Se tomaron alícuotas y se analizaron azúcares por cromatografía en papel.

Procedimiento D. Hidrólisis secuencial de las paredes celulares con HCl 1N y HCl 6N: se pesaron 50 mg de paredes celulares y se trataron secuencialmente como se describió por Van Laere *et al.*, (1977). Se obtuvo una fracción neutra, de la cual se tomaron alícuotas para la identificación de azúcares neutros por cromatografía en papel y para la preparación de los acetatos de alditol respectivos y su posterior identificación por cromatografía de gases.

Cromatografía en papel.- Se aplicaron alícuotas de los problemas (50-100 μg de azúcar) en tiras de papel Whatman No. 1 (4x50 cm) y se dejaron correr en butanol: piridina:agua (6:4:3) durante 36 h. Las tiras de papel se revelaron con ftalato de anilina o con nitrato de plata según el procedimiento descrito por

Trevelyan *at al.* (1950).

Cromatografía de gases.- La muestra conteniendo la fracción de azúcares neutros, de las paredes celulares de las esporas, se procesó según el método de Yang y Hakomori (1971) para detectar los acetatos de alditol respectivo por cromatografía de gases. Las muestras conteniendo los alditoles de los azúcares neutros, se disolvieron en cloroformo. Alícuotas de 1 μ l se analizaron en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Mod 1B equipado con una columna metálica de 180 cm de largo x 3 mm de diámetro interno. El empaque de la fase líquida contenía 3% de SP-2340, y el de la fase sólida Chromosorb Q 100/120. Se utilizó N_2 como gas acarreador a 30 cc/min. Las temperaturas de la columna, del detector y del inyector se ajustaron a 250°C.

RESULTADOS

Composición química de las paredes celulares. Las paredes celulares se obtuvieron de esporas recién cosechadas y lavadas, para evitar cambios en su composición química sobre todo la de las mutantes con germinación espontánea. En la tabla 1 se observan los resultados que se obtuvieron con las mutantes S-347 y S-377 y se comparan con los de la cepa silvestre, que también fue analizada simultáneamente. El contenido de azúcares totales en las mutantes está disminuido más del 50% con relación al de la cepa silvestre. Una diferencia importante que se aprecia es en el contenido de proteínas; este valor se ve ligeramente incrementado en las mutantes. Otro parámetro que se determinó fue el contenido de aminoazúcares y aunque se ve un ligero incremento de éstos en las mutantes, bien pudiera ser una diferencia significativa. El contenido de ácidos urónicos no varió en las mutantes y es muy semejante al de la cepa silvestre.

Cuando la fracción conteniendo los azúcares neutros obtenida de las paredes celulares de las esporas por los procedimientos C y D se sometieron a cromatografía en papel, se observaron 3 manchas de hexosas, que por su movilidad fueron identificadas como fucosa, manosa y glucosa (datos no mostrados). Por otro lado, la fracción de azúcares neutros obtenida por el procedimiento D también se utilizó para obtener los acetatos de alditol respectivos, y fueron sujetos a análisis por cromatografía de gases. Los resultados además revelaron la presencia de los mismos azúcares en las mutantes y en la cepa silvestre, aunque en ésta última se observaron otras señales tenues de acetatos de alditol, que no fueron identificados. En la tabla 2 se observan los porcentajes de los azúcares neutros identificados en cada una de las muestras; los datos fueron calculados con base en el área bajo la curva. El

Tabla 1. Composición química de las paredes celulares de las esporas de *Phycomyces blakesleeanus*

	Por ciento del peso seco		
	Mutantes		cepa
	S-347	S-377	silvestre
Azúcares totales	21.0	21.5	45.0
Aminoazúcares	19.8	16.0	14.1
Proteínas	16.1	16.0	9.1
Acidos urónicos	0.94	0.93	1.2
Fosfatos	2.7	2.9	4.3
Residuo no identificado	39.5	42.7	26.3

Para la determinación de ácidos urónicos y azúcares totales se siguió el procedimiento de hidrólisis A, y para los aminoazúcares el procedimiento de hidrólisis B, descritos en Materiales y Métodos.

Tabla 2. Azúcares neutros en las paredes celulares de las esporas de *Phycomyces blakesleeanus*

	Paredes celulares de las esporas (%)*		
	S-347	S-377	silvestre
Fucosa	2.5 (12.0) [†]	4.5 (21.0)	2.0 (4.9)
Manosa	3.0 (14.1)	4.9 (22.9)	0.5 (1.2)
Glucosa	14.3 (68.3)	11.1 (51.7)	26.0 (57.8)
Producto no identificado	1.2 (5.6)	0.9 (4.3)	16.3 (36.1)

La fracción neutra, obtenida por el procedimiento de hidrólisis D, se utilizó para la formación de los alditos respectivos y luego se identificaron por cromatografía de gases, según se detalla en Materiales y Métodos.

* El porcentaje se obtuvo a partir del peso seco de las paredes celulares de las esporas.

[†] Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de cada uno de los azúcares determinado con base en el total de azúcares neutros.

azúcar que se encuentra en mayor proporción en estas estructuras es la glucosa. La comparación del contenido de glucosa de las mutantes con el de la cepa silvestre, mostró que éste es 42 a 53% menor en las mutantes.

DISCUSIÓN

Es evidente que la composición química de las paredes celulares de las esporas de las mutantes S-347 y S-377 es diferente a la de las paredes de las esporas de la cepa silvestre. La principal diferencia radica en el contenido de azúcares totales y en el de proteína, y en menor proporción en el de aminoazúcares. En la cepa silvestre, el 45% del peso seco de las paredes corresponde a azúcares totales (dato también encontrado por Van Laere *et al.*, 1977 y Furch y Pambor, 1978b), en tanto que en las mutantes S-347 y S-377 este valor se encuentra muy disminuido (21 y 21.5%, respectivamente). La identificación de los azúcares por cromatografía en papel y cromatografía de gases de la fracción neutra dió como resultados la presencia de glucosa, manosa y fucosa principalmente, siendo la glucosa la que se encuentra en mayor proporción (>50%) en las diferentes muestras de paredes analizadas. Por otro lado, el contenido de manosa y fucosa es ligeramente mayor en las mutantes que en la cepa silvestre. Esto sugiere que las paredes celulares de las mutantes contiene mayor cantidad de glicoproteínas que la cepa silvestre. También es posible observar una ligera diferencia en el contenido de hexosaminas que indican el incremento de los polímeros, como la quitina, en las mutantes.

El análisis general de la composición química de las paredes celulares de las mutantes de germinación espontánea, indica que estas células además de diferencias en la morfología celular y el mecanismo de inducción en la germinación, el cual parece estar ausente en estas mutantes, presentan diferencias bioquímicas respecto a las esporas de la cepa silvestre. Furch y Pambor (1978b) estudiaron el cambio de los componentes de la pared celular en esporas de la cepa silvestre de *Ph. blakesleeana* después de haber sido activadas con calor e incubadas a diferentes intervalos de tiempo, y encontraron que el contenido de polisacáridos disminuyó del 50 al 35%; la proteína se incrementó del 10 al 20% aproximadamente, y también se observó un incremento en el contenido de quitina, después de haber incubado las células durante 4 h. Estos resultados coinciden con los obtenidos en las mutantes con germinación espontánea pues hay una disminución en el contenido de carbohidratos y un incremento en la proteína y en la quitina. Esto permite sugerir que las esporas de las mutantes, son células que se encuentran en un estadio inicial del proceso de germinación, debido a su similitud en la composición química con las es-

poras de la cepa silvestre pre-activadas e incubadas durante 4 h.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con los apoyos parciales de la Sub-Secretaría de Educación Superior e Investigación Científica de la SEP y de la Dirección Adjunta de Desarrollo Científica del CONACyT, a quienes manifestamos nuestro agradecimiento. Agradecemos también el apoyo técnico de la Q.B.P. Ana Gómez Villanueva.

LITERATURA CITADA

- Ashwell, G., 1957. Colorimetric analysis of sugars. In: Collowick, S.P. y N.O. Kaplan (eds.), Methods in Enzymology. Vol. III, Academic Press, Nueva York, pp. 73-105.
- Bartnicki-García, S. y W.J., Nickerson, 1962. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. J. Bacteriol. 64: 841-858.
- Bergman, K., P.V. Burke, E. Cerdá-Olmedo, C.N. David, M. Delbruck, K.W. Foster, E.W. Goodell, M. Heisenberg, M. Zalokar, D.S. Dennison y W. Shropshire Jr., 1969. *Phycomyces*. Bacteriol. Rev. 33: 99-157.
- Bitter, T. y M. Muir, 1962. A modified uronic acid carbazol reaction. Anal. Biochem. 4: 330-334.
- Borchert, R., 1962. Über die Azetat-aktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. Beitr. Biol. Pflanz. 38: 31-61.
- Cerdá-Olmedo, E., 1975. The genetics of *Phycomyces blakesleeanus*. Genet. Res. Camb. 25: 285-296.
- Cerdá-Olmedo, E. y E.D. Lipson, 1987. A biography of *Phycomyces*. In: Cerdá-Olmedo, E. y E.D. Lipson, (eds.). *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, pp. 7-26.
- Dimler, R.J., W.C. Shaeffer, C.S. Wise y C.E. Rist, 1952. Quantitative paper chromatography of D-glucose and its oligosaccharides. Anal. Chem. 24: 1411-1413.
- Furch, B., 1981. Spore germination: heat mediated events. In: Turian G. y H.R. Hois (eds.). The fungal spore; morphogenetic controls. Academic Press, Nueva York, pp. 413-433.

- Furch, B. y L. Pambor, 1978a. Cell wall constituents of *Phycomyces blakesleeanus*. 2. Localization of sporopolein in the zygospore and sporangiospores. Microbios Lett. 4: 211-219.
- Furch, B. y L. Pambor, 1978b. Cell wall constituents of *Phycomyces blakesleeanus*. 3. Carbohydrate and protein composition of sporangiophore cell wall in relation to heat induced germination. Microbios Lett. 8: 71-80.
- Furch, B. y L. Pambor, 1983. *Phycomyces* spore activation: Heat triggered ultrastructural events. Microbios Lett. 22: 37-49.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Rivero, F., 1986. Germinación de las esporas de *Phycomyces blakesleeanus*. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- Robbins, W.J., V.W. Kavanagh y F. Kavanagh, 1942. Growth substances and dormancy of spores of *Phycomyces*. Bot. Gaz. 104: 224-242.
- Trevelyan, W.E., D.P. Procter y J.S. Harrison, 1950. Detection of sugar on paper chromatograms. Nature 166: 444-445.
- Umbreit, W.W., Burris, R.H. y J.F. Stauffer, 1951. Manometric Techniques and Tissue Metabolism. Burgess, Minneapolis.
- Van Laere, A.J., 1986. Biochemistry of spore germination in *Phycomyces*. FEMS Microbiol. Rev. 32: 189-198.
- Van Laere, A.J., A.R. Carlier y J.A. Van Assche, 1977. Cell wall carbohydrates in *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. Arch. Microbiol. 112: 303-306.
- Van Laere, A.J., B. Furch y J.A. Van Assche, 1987. The sporangiophore : dormancy and germination. In: Cerdá-Olmedo E. y E.D. Lipson (eds.). Phycomyces. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, pp. 247-279.
- Yang, H.J. y S.I. Hakomori, 1971. A sphingolipid having a novel type of ceramide and lacto-N-fucopentaose III. J. Biol. Chem. 246: 1191-1200.