

Ingeniería genética en hongos filamentosos: Clonamiento del gen de invertasa de *Neurospora crassa*

Genetic Engineering in Filamentous Fungi: Cloning of Invertase
Gene from *Neurospora crassa*

MARGARITA CARU

Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile,
Casilla 653, Santiago, Chile.

The invertase wild type gene of *N. crassa* was cloned into the YRp7 yeast vector. This recombinant plasmid was selected by functional complementation of an invertaseless mutant strain of *S. cerevisiae*. The isolated recombinant plasmid (named pNC2) carries a 7.6 Kb BamHI DNA fragment from *N. crassa*. The cloned DNA hybridized with the *N. crassa* genomic DNA and transformed an invertase mutant of *N. crassa* *Inv*⁻ to *Inv*⁺. Transformation of *N. crassa* *Inv*⁻ to *Inv*⁺ seems to take at least two different integration events. One of them involves an integration closely linked to *inv* locus, and the other one apparently involves an integration of cloned DNA at a genomic site different than the *inv* locus.

Las Técnicas de Ingeniería Genética, aplicadas a microorganismos, han permitido el desarrollo de sistemas de clonamiento molecular y de transferencia génica por transformación. En particular, los hongos filamentosos resultan ser sistemas muy atractivos para aplicar estas metodologías, pues la mayoría de las enzimas de uso industrial son de origen fúngico (Timberlake y Marshall, 1989). El aislamiento de marcadores genéticos para la construcción de vectores de hongos y la caracterización de la transformación genética son requisitos indispensables para el desarrollo de sistemas de clonamiento en estos organismos. En la actualidad se han desarrollado metodologías que permiten la transformación genética, ya sea mediante la obtención de esferoplastos en presencia de PEG-CaCl₂ (Case *et al.*, 1979) o mediante el tratamiento de conidios germinados con sales de litio para conseguir competencia (Dhawale *et al.*, 1984). Sin embargo, todos ellos se caracterizan por la baja frecuencia de transformación y porque el plasmidio transformante se integra al genoma del huésped.

Hasta ahora no se dispone de vectores con origen de replicación cromosómico del tipo *ars* (autonomous replicating sequence) que sea funcional en hongos filamentosos (Suczi y Radford, 1983; Paietta y Marzluf, 1985). Por esta razón el aislamiento de ge-

nes fúngicos se ha conseguido básicamente por complementación de mutaciones de *Escherichia coli*, de este modo se ha clonado el gen *qa2*⁺ (Vapnek *et al.*, 1977); *nit-3* (Smarrelli y Garret, 1982); *pyr-4* (Buxton y Radford, 1983); *trp-1* (Keeseey y Demos, 1982) de *Neurospora crassa*, entre otros. Sin embargo, esta estrategia de clonamiento tiene sus limitaciones, debido a la baja probabilidad de expresión de genes eucarióticos en bacteria. Otros métodos, como la hibridación con sondas de DNA marcado se han usado para aislar los genes de histona H3 y H4 de *N. crassa* (Woudt *et al.*, 1983) y el gen *alcA* que codifica la deshidrogenasa alcohólica de *Aspergillus nidulans* (Olsen *et al.*, 1982). Akins y Lambowitz (1985) han desarrollado un método de clonamiento molecular mediante enriquecimiento del plasmidio recombinante, que complementa la mutación en estudio, a través de transformaciones sucesivas del hongo.

En el presente trabajo se ha considerado que la complementación de mutaciones génicas de *Saccharomyces cerevisiae* es una estrategia alternativa para el aislamiento de genes de hongos filamentosos, en especial aquellos que requieren un procesamiento molecular para su expresión. Algunos de estos procedimientos serán ilustrados con el clonamiento de una enzima extracelular de *N. crassa*: invertasa (β -D fructofuranosida-

sa-fructohidrolasa EC 3.2.1.26). Esta glicoproteína cataliza la hidrólisis del enlace β -fructósido en una variedad de sustratos, entre ellos la sacarosa. La mayoría de los organismos que hidrolizan sacarosa lo hacen sin incorporar el disacárido mismo. La existencia de un mutante de *N. crassa* que carece de invertasa funcional (*Inv*⁻) (Sargent y Woodward, 1969) y que es incapaz de crecer en sacarosa como única fuente de carbono, indicaría que la hidrólisis es una reacción esencial para la utilización de la sacarosa por este organismo.

El sistema genético de invertasa de *N. crassa* podría servir de modelo en el estudio de los procesos de síntesis y excreción de exoenzimas. Desde un punto de vista biotecnológico, hay dos aspectos atrayentes en la manipulación genética de los hongos filamentosos: i) la posibilidad de aumentar su potencial biosintético, en especial la producción de glicoproteínas, y ii) el desarrollo como huésped de clonado para la expresión de genes eucarióticos de origen heterólogo que no pueden ser expresados en sistemas bacterianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y plasmidios: *Escherichia coli* cepa C600 (*F*⁻, *thi1*, *thr1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *SupE44*, λ ⁻). *Saccharomyces cerevisiae* cepa MR17A (*MAT α* , *trp1*, *leu1*, *mal0*, *suc0*, *lys*⁻, *met6*). *Neurospora crassa* cepas silvestres 74A (StA4) FGSC N^o 262 y 77a FGSC N^o 3834 y los mutantes deficientes en invertasa *inv*⁻A FGSC N^o 1856, *inv*⁻a FGSC N^o 1857 (Sargent y Woodward, 1969) se obtuvieron del Fungal Genetics Stock Center, Arcata, California, USA (Barrat y Rimbey, 1982). DNA del plasmidio YRp7 (Tschumper y Carbon, 1980) fue proporcionado por el Dr. A. Jiménez. La librería genómica de *N. crassa* 74A construida en el sitio BamHI del plasmidio YRp7 fue proporcionada por el Dr. V. Cifuentes.

Condiciones de cultivo: Las bacterias se crecieron en medio LB con Ampicilina (100 μ g/ml) a 37°C. *S. cerevisiae* se creció en medio YEP (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%). *N. crassa* se creció rutinariamente en medio mínimo Vogel (Vogel, 1956) suplementado con 2% de sacarosa a 25°C.

Purificación del DNA plasmidial: El DNA plasmidial de *E. coli* se obtuvo mediante el método descrito por Birboim y Doly (1979). El DNA total de levaduras fue preparado según el método de Sher-

man *et al.* (1983). El DNA cromosómico de *N. crassa* se purificó por el método descrito por Leach *et al.* (1986).

Transformación genética: *E. coli* se transformó por el método de Cohen *et al.* (1972) y los transformantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina. Los esferoplastos de *S. cerevisiae* se transformaron mediante el método de Hinnen *et al.* (1978). Los transformantes *Suc*⁺ de levadura se seleccionaron en medio YNB (medio base de nitrógeno para levaduras 0,7%-Difco-suplementado con 50 μ g/ml de leucina, histidina, lisina, metionina y 2% de sacarosa). Conidios de *N. crassa inv*⁻ se transformaron por el método del acetato de litio (Dhawale *et al.*, 1984).

Digestiones con endonucleasas de restricción y electroforesis en geles de agarosa: 0,5-1,0 μ g de DNA plasmidial y 2-4 μ g de DNA cromosómico se incubaron con 4-6 unidades de enzimas en 20 μ l de mezcla de reacción. Las condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica fueron las recomendadas por Maniatis *et al.* (1982). La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 0,7% en tampón Tris-EDTA con Bromuro de etidio 0,5 μ g/ml. Se usó el DNA del bacteriófago λ digerido con HindIII como estándar de peso molecular.

Hibridación DNA-DNA: El DNA plasmidial y cromosómico se digirió con la endonucleasa de restricción adecuada, se sometió a electroforesis en agarosa al 0,7% y luego se transfirió a papel de nitrocelulosa de acuerdo al método de Southern (1975). La hibridación DNA-DNA se realizó con DNA plasmidial marcado con ³²P-PNC2 como sonda radiactiva (Rigby *et al.*, 1977).

Análisis genético: Los cruzamientos se realizaron en medio Westergaard (Westergaard y Mitchell, 1947). El análisis de cromátidas se realizó mediante el aislamiento de esporas al azar (Davis y De Serres, 1970).

RESULTADOS

Clonamiento del gen *inv*⁺: La estrategia de clonamiento del gen está basada en la complementación génica de mutantes *suc*⁰ de *S. cerevisiae* por plasmidios provenientes de la genoteca de *Neurospora*. La genoteca se utilizó para transformar la cepa MR17A de *S. cerevisiae*. Se seleccionaron los transformantes capaces de crecer en sacarosa como única fuente de carbono. El DNA total de cada uno de los transformantes se utilizó para transformar *E. coli* C600 y se seleccionó para resistencia a ampicilina. El plasmidio recombinante aislado de los clones bacterianos Amp^r posee un inserto

de 7,6 Kb determinado por electroforesis en geles de agarosa (Fig. 1). La identidad del fragmento insertado se investigó mediante hibridación de DNA genómico de la cepa silvestre 74A de *N. crassa* con DNA plasmidial marcado con ^{32}P - α -ATP. El plasmidio recombinante hibrida con el DNA genómico del hongo (dato no mostrado). El mapa de restricción de este plasmidio se muestra en la Fig. 2.

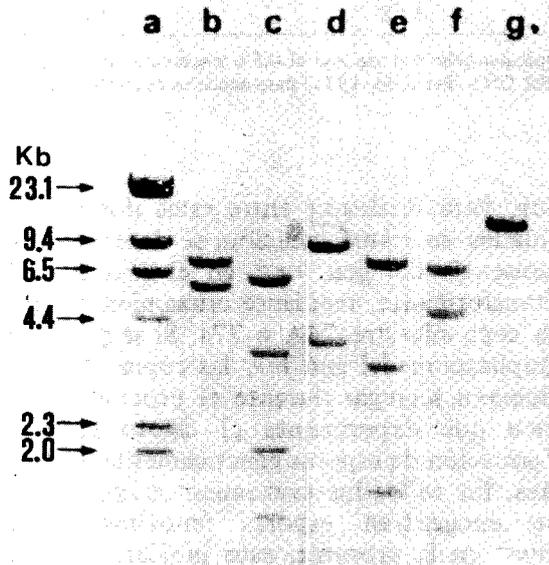


Fig. 1: Electroforesis de los fragmentos de restricción del DNA de pNC2. El DNA plasmidial purificado se trató con diferentes endonucleasas de restricción y los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. a) DNA del bacteriófago λ digerido con HindIII, DNA de pNC2 tratado con b) BamHI, c) EcoRI, d) XhoI, e) SalI, f) BglII y g) PvuII.

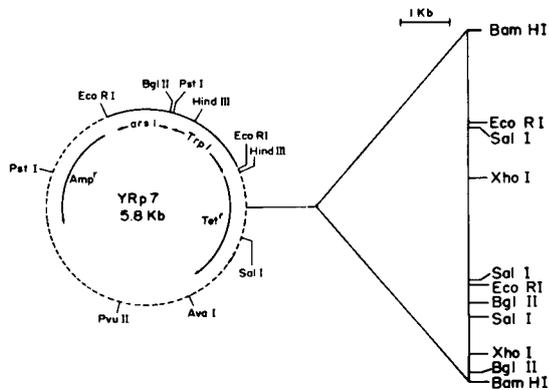


Fig. 2: Mapa físico de restricción del plasmidio recombinante pNC2 (izq.). Mapa de restricción del vector YRp7, DNA de levadura (—), y DNA de pBR322 (-----) (der.). Mapa de restricción del fragmento de 7,6 Kb de DNA genómico de *Neurospora crassa*.

Transformación genética: La cepa mutante de *N. crassa inv⁻* se utilizó como receptor en los experimentos de transformación con DNA de pNC2. La frecuencia de transformación obtenida fue de 45-50 transformantes/ μg de DNA. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad para utilizar sacarosa como única fuente de carbono. En la Tabla I se muestran los valores de actividad enzimática obtenidos en los transformantes *Inv⁺*. En todos los casos ensayados la actividad de invertasa es similar a la obtenida con el control 74A, cuando las colonias son homocarióticas.

Aproximadamente, el 50% de los transformantes seleccionados pierden la capacidad de crecer en sacarosa, en posteriores subcultivos. Estos transformantes abortivos no fueron considerados en el cálculo de la frecuencia de transformación. Los transformantes estables que se aislaron resultaron ser heterocarióticos en su mayoría, debido a que se usaron macroconidios como receptores en la transformación. Para obtener transformantes homocarióticos *Inv⁺* se realizaron rutinariamente cruzamientos entre las colonias *Inv⁺* seleccionadas y la cepa mutante receptora *inv⁻*. En la Tabla I se muestra la proporción de núcleos *Inv⁺/Inv⁻* en los transformantes obtenidos.

Análisis de los transformantes: Se establecieron las relaciones de ligamiento entre el gen *inv⁺* transformante y el marcador genético *al3⁻*. El locus *al3* se encuentra en el grupo de ligamiento V a una distancia de aproximadamente 15 a 17 μm del locus *inv*. Los porcentajes de recombinación obtenidos en los cruzamientos entre los transformantes y la cepa marcadora (*al3⁻, inv⁻*) sugieren que hay, al menos, dos tipos de transformantes. Un tipo de transformante se caracteriza porque el gen *inv⁺* aparece segregando independientemente del locus *al3* con valores de recombinación de 43-46%. En la Fig. 3 se muestra un esquema de los cruzamientos realizados y los resultados esperados para un transformante por inserción no-ligada. Un segundo tipo de transformante muestra porcentajes de recombinación entre 16,4-21,2%, indicando que las combinaciones alélicas parentales en los dos loci tienden a permanecer

TABLA I

Actividad específica de invertasa y proporción de núcleos en los transformantes de *Neurospora crassa* con DNA de pNC2

| Transformante | Proporción de núcleos Inv ⁻ : Inv ⁺ | Actividad específica de invertasa U/mg de proteína | |
|-----------------|--|---|---------------|
| | | Heterocariótico | Homocariótico |
| TN 7.4a | 1 : 1 | 0,83 | 1,69 |
| TN 3.1a | 0 : 1 | 1,43 | 1,58 |
| TN 3.11a | 0 : 1 | 1,74 | 1,74 |
| TN 3.16a | 2 : 1 | 0,42 | 1,72 |
| 74A (silvestre) | 0 : 1 | 1,68 | 1,68 |

Las colonias transformadas se sembraron en medio mínimo suplementado con maltosa al 0,5% y se crecieron por 72 h a 25°C. La actividad enzimática se determinó por el método del DNS (Bernfeld, 1955) para azúcares reductores. Una unidad (U) = mg de azúcares reductores/ml/min a 37°C.

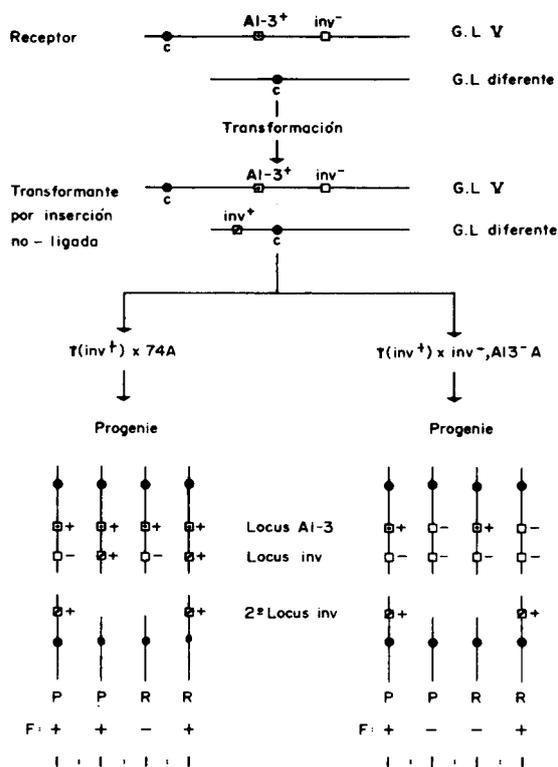


Fig. 3: Esquema de los cruces realizados con los transformantes de *Neurospora crassa* y los resultados esperados para una transformación por inserción no-ligada; c = centrómero, G.L. = grupo de ligamiento, P = genotipos parentales, R = genotipos recombinantes, F = fenotipo Inv.

juntas en la progenie. Este último tipo de transformante podría corresponder a un reemplazo del gen mutante *inv*⁻ por su alelo silvestre o bien una inserción del gen *inv*⁺ transformante ligada al locus

inv. Para distinguir entre estas dos modalidades de transformación, se determinó la presencia del gen *inv*⁻ en el genoma del transformante, mediante cruces con la cepa silvestre 74A o 77a. Si se produce duplicación del gen *inv*, las copias del gen deberán segregarse durante el proceso meiótico que experimenta el cigoto para la formación de esporas genéticamente haploides. En todos los cruces analizados se encuentran esporas fenotípicamente Inv⁻ en la progenie, esto indicaría que la transformación ocurre por inserción del gen *inv*⁺ y no por reemplazo. 2-3% de las esporas son Inv⁻. En la Fig. 4 se muestra un esquema de los cruces realizados para determinar la localización del gen *inv*⁺ transformante en el grupo de ligamiento V. Las esporas Inv⁻ representan la mitad de los recombinantes producidos en el cruce. Los otros recombinantes son indistinguibles fenotípicamente de los parentales, debido a las combinaciones genéticas producidas. Para el caso de los transformantes no-ligados se encuentra entre 20-26% de las esporas fenotípicamente Inv⁻ (Fig. 3), por lo tanto, el porcentaje de recombinación esperado es de aproximadamente 40-50%.

La hibridación del DNA genómico de los transformantes con DNA plasmidial marcado con ³²P-α-ATP, revela la presencia de DNA transformante en el genoma de la cepa receptora. Los resultados de hibridación muestran, al menos, dos tipos de patrones de bandas de hibridación. Un

tipo de transformante muestra un patrón de bandas de hibridación en las cuales ninguna de ellas corresponde a la banda control de la cepa receptora *inv*⁻. En la Fig. 5 se muestran los probables eventos de recombinación que permiten la integración del gen *inv*⁺ y el plasmidio vector en el genoma de la cepa huésped. Se indican, además, las bandas de hibridación resultantes después de la digestión con la enzima de restricción PstI. Los resultados de hibridación y de análisis genético para estos transformantes son compatibles con una integración ligada con duplicación.

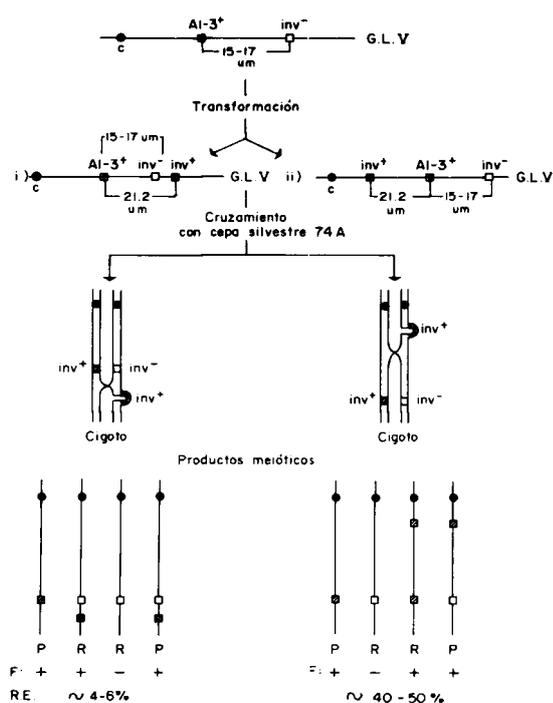


Fig. 4: Esquema de los cruzamientos realizados con los transformantes para determinar ubicación del gen *inv*⁺ en un caso de transformación por inserción ligada. um = unidad mapa, R.E. = resultados esperados. Otras abreviaturas como en la Fig. 3.

En otros casos, se encontró que el DNA de pNC2 puede integrarse en otro sitio del genoma durante la transformación de *Neurospora*. La transformación no-ligada se caracteriza por la presencia de la banda control y, al menos, una banda adicional. En la Fig. 6 se muestra un esquema de los eventos probables y los fragmentos de restricción que se revelan durante la hibridación.

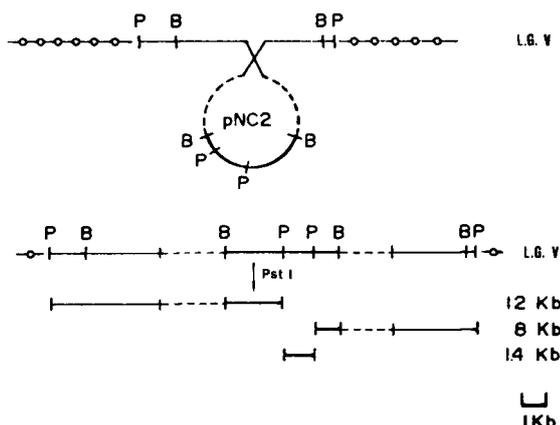


Fig. 5: Diagrama de los eventos de recombinación propuestos para la transformación por inserción ligada. La parte superior del diagrama muestra el mapa de restricción de la región del locus *inv* en el mutante *Inv*⁻ (—), y el evento de recombinación que experimentaría el vector pNC2 híbrido entre YRp7 (—) y el fragmento de 7,6 Kb de DNA genómico del hongo (---). La digestión del DNA de los transformantes *Inv*⁺ con la endonucleasa de restricción PstI generó tres fragmentos (columna derecha) cuando se hibrida con DNA de pNC2 marcado con ³²P. Los sitios de restricción se indican con una letra: P = PstI, B = BamHI, L.G. = Grupo de ligamiento.

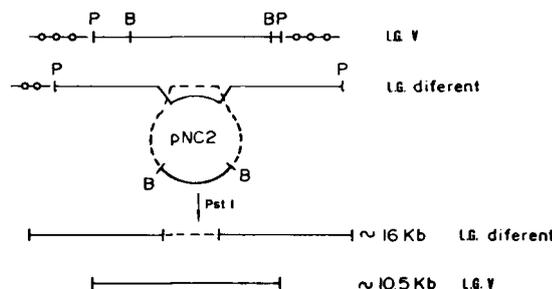


Fig. 6: Diagrama de los eventos de recombinación propuestos para la transformación por inserción no-ligada. Un evento de integración no-ligada del gen *inv*⁻ (región central del diagrama) reveló la presencia de una banda adicional de aproximadamente 16 Kb. Los fragmentos de restricción PstI del DNA de los transformantes se muestra en las dos líneas inferiores del diagrama. Símbolos y letras como en la Fig. 5.

DISCUSIÓN

Un procedimiento alternativo para clonar genes fúngicos podría ser mediante complementación génica de mutaciones específicas de *S. cerevisiae*. Para el clonamiento del gen de invertasa de *N. crassa* se utilizó una genoteca construida en el plasmidio YRp7. Este plasmidio es un híbrido entre pBR322 y un fragmento de DNA de *S. ce-*

revisiae portador del gen *trp1*⁺ y de una secuencia *ars1* (Fig. 2) que permite que el vector se replique autónomamente en levadura (Tschumper y Carbon, 1980).

Siendo *Neurospora* y *Saccharomyces* hongos de la clase Ascomycete, es posible esperar que ambos organismos posean funciones similares. En particular, se conoce que estos dos eucariotas inferiores producen una enzima responsable de la hidrólisis del enlace β -fructósido de la sacarosa. Por lo tanto, la estrategia de clonamiento del gen de invertasa de *N. crassa* utilizó como método de selección la complementación génica de una mutación de *S. cerevisiae* deficiente en invertasa (*suc*^o). El plasmidio recombinante aislado contiene un fragmento de 7,6 Kb de DNA genómico de *N. crassa* y es capaz de complementar la mutación *suc*^o de *Saccharomyces* y la mutación *inv*⁻ de *Neurospora*.

El sistema de transformación de levaduras podría ser útil para el clonamiento de genes fúngicos, ya que, debido a las relaciones filogenéticas entre los organismos se espera que estos posean: i) funciones génicas similares; y ii) sistemas de regulación compatibles que permitan el clonamiento directo de estos genes. Así también pueden ser útiles para la expresión de genes heterólogos que deben ser procesados, para que den un producto génico funcional, como ocurre con las glicoproteínas (Esmon *et al.*, 1981; Novick *et al.*, 1981). Utilizando esta estrategia se ha obtenido el clonamiento exitoso de genes tanto de levaduras como de otros organismos eucarióticos (Nasmyth y Reed, 1980; Henikoff *et al.*, 1981). Estos resultados indican que la utilización de levadura como también de algunos hongos filamentosos podrían proporcionar un sistema alternativo para el clonamiento de genes que requieren procesamiento.

La transformación genética de hongos filamentosos con DNA clonado es un fenómeno que ocurre con baja frecuencia y produce un gran número de transformantes abortivos. Estos transformantes muestran un crecimiento sobre las placas selectivas, pero en posteriores subcultivos o bajando la presión selectiva se pierde el carácter transformante. La explicación de

este fenómeno ha sido generalmente atribuida a la presencia de plasmidios que no se han integrado establemente en el genoma (Kinsey y Rambosek, 1984). Sin embargo, la producción de transformantes abortivos podría ser consecuencia de la heterocariosis inicial de estos transformantes. Los micelios heterocarióticos con bajo número de núcleos transformados se mantendrán en la medida que la tasa de división de los tipos nucleares presentes sea igual. Cualquier retraso en la división del núcleo transformado significaría que su efecto se pierde por dilución en el micelio.

El análisis genético y los experimentos de hibridación de DNA de los transformantes de *N. crassa* sugieren que el DNA dador puede integrarse en más de un sitio en el genoma del receptor, ya sea: i) adyacente o ligado al locus *inv* o ii) no-ligado al locus *inv* en el mismo u otro grupo de ligamiento.

Cuando la recombinación ocurre ligada al locus *inv* no se observa reemplazo del gen mutante *inv*⁻ por el alelo silvestre *inv*⁺, sino que usualmente se producen duplicaciones en el genoma. Estas duplicaciones pueden detectarse por segregación de los genes durante el proceso meiótico. En todos los transformantes ensayados se observó segregación del gen *inv*⁻ presente en el genoma del receptor.

Los resultados también indican que la transformación puede ocurrir por integración en otro sitio del genoma. Si estos eventos son frecuentes, indicaría que la transformación no requiere de alta homología para que ocurra la integración. Paietta y Marzluf (1985), utilizando el gen *qa-2*⁺ para transformar *Neurospora* observaron que solamente en el 10% de los casos la integración ocurre en regiones homólogas. Sin embargo, esto podría variar según sea el gen en estudio. En general, la integración no-ligada al locus original parece ser un fenómeno común en los hongos filamentosos. El análisis de transformantes de *Penicillium chrysogenum* con el gen *trpC* (Sánchez *et al.*, 1987) y de *Aspergillus nidulans* con el gen *amds* (Tilburn *et al.*, 1983) muestran eventos de integración en otras regiones del genoma de estos hongos. También se ha observado que estos eventos de integración pueden ser múltiples (Paietta

y Marzluf, 1985; Fincham, 1989), sin embargo, el análisis de los transformantes Inv⁺ indica que éstos se producen por eventos únicos. Este aspecto puede ser muy interesante para la manipulación genética de los hongos filamentosos, ya que la integración múltiple permitiría modificar la dosis génica en estos organismos. El aumento del número de copias del gen por transformación podría proporcionar cepas más estables que aquellas obtenidas mediante amplificación de genes llevados por plasmidios.

Aunque los hongos filamentosos aún no están establecidos como sistema de transformación con fines biotecnológicos, ellos podrían ser muy eficientes en la síntesis y excreción de productos heterólogos de interés industrial (Saunders *et al.*, 1986, 1989). La gran versatilidad metabólica y el gran potencial biosintético de los hongos los hace muy atractivos para la obtención de cepas mejoradas genéticamente que permitan la innovación de bioprocesos.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a los Dres. A. Jiménez, del Centro de Biología Molecular de Madrid; G. Pincheira y V. Cifuentes por su colaboración, por facilitarme parte del material biológico y la genoteca del hongo. Este trabajo fue parcialmente financiado por el Servicio de Investigación y Biblioteca de la Universidad de Chile y por el Programa de Cooperación Científica entre la Universidad de Chile y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España.

REFERENCIAS

- AKINS, R.A. y LAMBOWITZ, A.M. (1985) General methods for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2272-2278.
- BARRAT, R.W. y RIMBEY, R.L. (1982) *Neurospora* stock list. *Neurospora Newslett.* 29: 45-106.
- BERNFELD, D. (1955) Amylases α and β . En *Methods in Enzymology*, vol. I (ed. S.P. Colowick y N.O. Kaplan), Academic Press Inc., pp. 149-158.
- BIRBOIM, H.C. y DOLY, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 7: 1513-1523.
- BUXTON, F.P. y RADFORD, A. (1983) Cloning of the structural gene for orotidine 5'-phosphate carboxylase of *Neurospora crassa* by expression in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 190: 403-405.
- CASE, M.; SCHWEIZER, M.; KUSHNER, S. y GILES, N. (1979) Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5259-5263.
- COHEN, S.; CHANG, A. y HSU, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114.
- DAVIS, R.H.; DE SERRES, F.J. (1970) Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. En *Methods in Enzymology*, vol. XVIII (ed. H. Tabor & W. Tabor), Academic Press Inc., pp. 79-143.
- DHAWALE, S.S.; PAIETTA, J.V. y MARZLUF, G.A. (1984) A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*. *Curr. Genet.* 8: 77-79.
- ESMON, B.; NOVICK, P. y SCHEKMAN, R. (1981) Compartmentalized assembly of oligosaccharides on exported glycoproteins in yeast. *Cell* 25: 451-460.
- FINCHAM, J.R. (1989) Transformation in Fungi. *Microbiol. Rev.* 53 (1): 148-170.
- HENIKOFF, S.; TATCHELL, K.; HALL, B.D. y NASMYTH, K.A. (1981) Isolation of a gene from *Drosophila* by complementation in yeast. *Nature* 289: 33-37.
- HINNEN, A.; HICHS, J.B. y FINK, G.P. (1978) Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929-1933.
- KEESEY, J.K. y DEMOSS, J.A. (1982) Cloning of the *trp-1* gene from *Neurospora crassa* by complementation of a *trpC* mutation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 152: 954-958.
- KINSEY, J.A.; RAMBOSEK, J.A. (1984) Transformation of *Neurospora crassa* with the cloned *am* (glutamate dehydrogenase) gene. *Mol. Cell. Biol.* 4: 117-122.
- LEACH, J.; FINKELSTEIN, B.B.; RAMBOSEK, J.A. (1986) Rapid miniprep of DNA from filamentous fungi. *Fungal Genetics Newslett.* 33: 32-33.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. y SAMBROOK, J. (eds.) (1982) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. CSHL, New York, pp. 98-106.
- NASMYTH, K.A. y REED, S.I. (1980) Isolation of genes by complementation in yeast: Molecular cloning of a cell-cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2119-2123.
- NOVICH, P.; FERRO, S.; SCHEKMAN, R. (1981) Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25: 461-469.
- OLSEN, J.; DOY, C.H.; COLSEN, J.; PATEMAN, J.A. y NORRIS, U. (1982) Molecular biology of expression and cloning of genes in *Aspergillus nidulans*. *Neurospora Newslett.* 29: 11.
- PAIETTA, J.V. y MARZLUF, G.A. (1985) Gene disruption by transformation in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1554-1559.
- RIGBY, P.W.; DIECKMANN, M.; RHODES, C. y BERG, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251.
- SANCHEZ, F.; LOZANO, M.; RUBIO, V. y PEÑALVA, M.A. (1987) Transformation in *Penicillium chrysogenum*. *Gene* 51: 97-102.
- SARGENT, M.L. y WOODWARD, D.O. (1969) Gene-enzyme relationship in *Neurospora invertase*. *J. Bacteriol.* 97: 867-872.
- SAUNDERS, G.; TUIITE, M.F. y HOLT, G. (1986) Fungal cloning vectors. TIBTECH-April: 93-98.
- SAUNDERS, G.; PICKNETT, T.M.; TUIITE, M.F. y WARD, M. (1989) Heterologous gene expression in filamentous fungi. TIBTECH-October 7: 283-287.
- SHERMAN, F.; FINK, G.R. y METZENBERG, R.L. (1983) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, New York, CSHL.

- SMARRELLI, J. y GARRET, R.H. (1982) Isolation of *Neurospora* nitrate reductase structural gene: Evidence for its expression in *E. coli*. *Neurospora Newslett.* 29: 11.
- SOUTHERN, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- SUZCI, A. y RADFORD, A. (1983) ARS8 sequences in the *Neurospora* genome. *Neurospora Newslett.* 30: 13.
- TILBURN, J.; SCAZZICHIO, C.; TAYLOR, G.G.; ZABICKY-ZISSMAN, J.H.; LOCKINGTON, R.A. y DAVIES, R.W. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26: 201-221.
- TIMBERLAKE, W.E. y MARSHALL, M.A. (1989) Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *Science* 244: 1313-1317.
- TSCHUMPER, G. y CARBON, J. (1980) Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene. *Gene* 10: 157-166.
- VAPNEK, D.; HAUTALA, J.A.; JACOBSON, J.W.; GILES, N.H.; KUSHNER, S.R. (1977) Expression in *Escherichia coli* K12 of the structural gene for catabolic dehydroquinase of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3508-3512.
- WESTERGAARD, M. y MITCHELL, H.K. (1947) *Neurospora*: A synthetic medium favouring sexual reproduction. *Am. J. Bot.* 34: 573-577.
- WOUTD, L.P.; PASTINK, A.; KEMPERS-VEENSTRA, A.E.; JANSEN, A.E.M.; MAGER, W.H. y PLANTA, R.J. (1983) The genes coding for histone H3 and H4 in *Neurospora crassa* are unique and contain intervening sequences. *Nucl. Acids. Res.* 11: 5347-5360.