

CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE *PODOSPORA ANSERINA*

Ramón-Vidal, D., Ferrer, S. y Vicente, E. *

RESUMEN

A pesar de que la biología básica de *Podospora anserina* está bien conocida, hasta el momento no se han podido determinar las condiciones óptimas para la obtención de un micelio en las adecuadas condiciones fisiológicas como para sufrir el ataque enzimático encaminado a la liberación de sus protoplastos. A este hecho cabe unir los bajos valores registrados en bibliografía referente al crecimiento vegetativo y procesos de esporulación y germinación de esta especie fúngica.

Por todo ello decidimos abordar en el presente trabajo el estudio, caracterización y mejora de una serie de parámetros que influyen de forma decisiva en el cultivo de *P. anserina*, tanto en el crecimiento en medio sólido y líquido como en la producción y germinación de sus microconidios. Como resultado de los valores obtenidos, se ha podido modelar un protocolo que permite disponer en tiempos muy cortos de una abundante cantidad de micelio en excelentes condiciones fisiológicas para la liberación de protoplastos.

SUMMARY

Culture conditions in *Podospora anserina*.

The basic biology of *Podospora anserina* is well known, but the growth conditions for the production of a good mycelium suitable enough for the isolation of protoplasts have not been described hitherto. Furthermore, the rates cited in literature about vegetative growth, production and germination of microconidia are very low.

Prompted by these data we studied the growth in solid and liquid media, and the production and germination of microconidia, characterizing and improving different factors. As a conclusion we have elaborated an schedule for the production of high amounts of juvenile mycelium at short term, adequate for the liberation of protoplasts.

* Departamento de Microbiología, Facultad de Biología. Universidad de Valencia. Burjasot, Valencia.

INTRODUCCION

La existencia en el Ascomycete *Podospora anserina* de un plásmido (pDNA), abre interesantes posibilidades de cara al futuro, relativas a su empleo como vector de clonación en experiencias de Ingeniería Genética con hongos filamentosos.

Con anterioridad al empleo del pDNA en la formación de moléculas de DNA recombinante se hace preciso perfilar ciertos aspectos relativos a la biología básica de este hongo: condiciones de cultivo, obtención de protoplastos, etc. Tan sólo cuando éstos se encuentren totalmente establecidos y optimizados se podrá abordar con relativa seguridad las experiencias genéticas.

En este trabajo nosotros intentamos identificar y mejorar las condiciones de cultivo de *P. anserina*, tanto en lo que hace referencia a su crecimiento vegetativo como a los fenómenos de producción y germinación de esporas asexuales.

MATERIAL Y METODOS

a) Cepas

Las cepas + y - de *Podospora anserina* s nos fueron cedidas gentilmente por el Dr. Karl Esser, del Lehrstuhl für Allgemeine Botanik de la Ruhr Universität.

b) Medios.

- AMM: medio según PRILLINGER y ESSER (1977), a base de acetato.
- CMM: medio según ESSER (1974), hecho con harina de maíz.
- CZM: medio mínimo Czapeck de Oxoid.
- FOM: medio de Fowell según LODDER (1974).
- GOM: medio de Gorodkova según LODDER (1974).
- MEM1: medio de extracto de malta según FERRER *et al.* (1982).
- MEM2: medio de extracto de malta según comunicación personal del Dr. J. F. Peberdy, y de composición: Extracto de Malta 0,5%, Extracto de Levadura 0,5% y Glucosa 0,5%.

- MFM: medio según RAMÓN (1983), a base de comida de rata.
- MGM: medio de germinación de microconidios según ESSER (1974).
- MME1: medio mínimo 1 según ESSER (1974).
- MME2: medio mínimo 2 según ESSER (1974).
- MMP: medio mínimo según PONTECORVO (1953).
- MPM: medio de producción de microconidios según ESSER (1974).
- PDM: medio Potato Dextrose Broth de Difco.
- PMM: medio de esporulación según PONTECORVO (1953).
- RFM: medio según RAMÓN (1983), a base de comida de conejo.
- SAM: medio de Sabouraud de Oxoid.
- SSM: medio de almidón soluble según RAMÓN (1983).

c) Condiciones de cultivo.

I.-CRECIMIENTO VEGETATIVO

Para determinar y cuantificar el crecimiento en medio sólido, se sembraron placas de los medios anteriormente mencionados por series duplicadas. Se llevaron a incubación todas las placas a 27°C, si bien una serie se mantuvo en la oscuridad y la otra fue expuesta a la luz ($3,5 \mu E m^{-2}s^{-1}$). Al cabo de 6 días se determinó en cada placa el diámetro de colonia, así como el aspecto general y ausencia o presencia de pigmento en la misma.

En cuanto a los medios líquidos el estudio realizado fue más profundo, analizándose los siguientes parámetros: tipo de medio, presencia o ausencia de luz ($0,7 \mu E m^{-2}s^{-1}$), pH del medio, tipo de agitación y tiempo de crecimiento. En todos los casos se inocularon matraces de 250 ml con 25 ml del medio en cuestión, llevándose a incubación a los diferentes tipos de agitación y 27°C. Al cabo de 24-48 horas, excepto en la experiencia de la influencia del tiempo de cultivo donde los muestreos fueron diarios, se determinó la biomasa producida en forma de peso húmedo.

II.-OBTENCION DE MICROCONIDIOS

Se analizaron en este caso los parámetros del tipo de medio, pH del mismo, influencia de la luz ($3,5 \mu E m^{-2}s^{-1}$) e influencia de la Ampicilina. Para ellos se inocularon placas Petri con suspensiones de micelio para los diferentes tipos de medio, y se llevaron a incubación a $27^{\circ}C$ durante 10 días. Pasado este tiempo se determinó el número de conidios producidos por placa.

III.-GERMINACION DE LOS MICROCONIDIOS.

Se estudió la influencia que sobre el proceso pudieran tener el tipo de medio, el pH del mismo, la luz ($3,5 \mu E m^{-2}s^{-1}$), la adición de Ampicilina y la existencia de un pretratamiento de tipo térmico a los conidios. El proceso consistió en inocular 10^7 microconidios por placa de los diferentes medios, llevando las placas a incubar a $27^{\circ}C$ durante 5 días, pasados los cuales se contó el número de colonias por placa.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos para el estudio sobre los medios sólidos se pueden observar en las Tablas 1 y 2. A la vista de los mismos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

(a) El diámetro de colonia al crecer el hongo en algunos medios mínimos (CZM) o pobres (FOM, GOM) superó al obtenido al crecerlo en medios completos (CMM, MEM₂). Este hecho no se debe interpretar como un mayor crecimiento en medios mínimos o pobres, puesto que las colonias obtenidas en ellos son laxas y sus hifas se difunden muy profusamente por el agar en busca de los nutrientes sin apenas cruzarse. En cambio, en los medios complejos las hifas se entrecruzan y apelmazan unas con otras, dando a pesar de haber habido un mayor crecimiento, una menor difusión y por lo tanto un menor diámetro.

(b) En ciertos medios (CMM, FOM, GOM, MFM, MEM₂, PMM y RFM) la cepa - dió diámetro de colonia superior al

de la cepa +. En ningún caso la cepa + obtuvo un diámetro netamente superior al de la cepa -.

(c) Son muchos los medios en los cuales el diámetro de colonia conseguido fue superior al crecer el hongo en presencia de luz, dando idea de la influencia positiva de la misma en el proceso.

(d) Para las dos cepas se detectó una gran influencia del tipo de medio en la producción de pigmentos. A mayor cantidad de nutrientes en el medio, mayor y más rápida producción de pigmento. Todos los medios completos, a excepción del SSM, producen dicha sustancia. Los medios pobres, excepto el PMM, también lo hacen aunque en menor medida. Los medios mínimos no lo producen en ningún caso en las condiciones estudiadas.

(e) La presencia de la luz influye muy fuertemente en la producción de pigmento. Hay casos en los cuales se produce tan sólo a la luz (RFM y SAM). En los casos en los que se produce a la luz y en oscuridad el depósito en el primer caso es indudablemente mucho mayor.

Ante estos datos decidimos utilizar como medio sólido completo de tipificación de *P. anserina* el CMM, dado el aspecto tan característico que las colonias del hongo crecidas sobre él tienen. Se consideró como un buen medio mínimo el CZM, pues produce buen crecimiento y su preparación es fácil.

Las condiciones de crecimiento en medio líquido de *P. anserina* daban hasta el momento resultados de aumento de biomasa en el tiempo muy pobres. En las mejores condiciones (ESSER, 1974) tan sólo se lograban 5 g de micelio húmedo por litro de CMM y tras 4-5 días de incubación, con lo cual surgían una serie de problemas: se deben utilizar grandes volúmenes de medio, el tiempo de crecimiento es muy largo, y por esta misma razón el micelio producido es viejo y pigmentado, lo cual dificulta la actuación de los enzimas líticos de cara a la obtención de protoplastos. Para intentar solventar estos problemas se analizaron una serie de parámetros.

TABLA 1

MEDIAS DE LOS DIAMETROS (en cm) y desviaciones típicas de los valores de las colonias al cabo de 6 días de crecimiento de las cepas + y - de *P. anserina* en diferentes tipos de medios sólidos y con ausencia o presencia de luz. (-: crecimiento no detectado).

MEDIO	TIPO	CEPA +		CEPA -	
		Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
ACMM	Completo	2,3±0,2	2,2±0,2	3,3±0,2	2,8±0,2
ACZM	Mínimo	4,8±0,3	4,5±0,3	5,0±0,5	4,5±0,5
AFOM	Pobre	6,1±0,6	5,1±0,3	6,5±0,3	5,9±0,7
AGOM	Pobre	6,2±0,3	5,0±0,3	7,1±0,7	5,5±0,3
AMEM ₁	Completo	4,3±0,5	4,1±0,4	4,1±0,3	3,9±0,3
AMEM ₂	Completo	2,1±0,1	2,2±0,2	2,8±0,2	2,1±0,2
AMFM	Completo	4,9±0,4	4,1±0,4	6,5±0,3	5,0±0,3
AMGM	Pobre	0,1±0,1	0,1±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1
AMME ₁	Mínimo	—	—	0,1±0,1	—
AMME ₂	Mínimo	1,5±0,2	2,0±0,2	3,6±0,3	2,1±0,2
AMMP	Mínimo	0,2±0,1	0,7±0,1	0,8±0,2	0,7±0,1
AMPM	Pobre	3,0±0,2	1,6±0,2	2,4±0,3	1,5±0,2
APDM	Completo	1,7±0,2	1,8±0,2	1,8±0,1	1,7±0,2
APMM	Pobre	0,1±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	0,6±0,2
ARFM	Completo	4,5±0,3	3,9±0,3	5,6±0,5	4,4±0,4
ASAM	Completo	2,2±0,2	1,5±0,2	1,9±0,3	3,1±0,3
ASSM	Completo	6,1±0,5	6,2±0,6	5,9±0,5	5,6±0,4

TABLA 2

ASPECTO DE LAS COLONIAS al cabo de 6 días de crecimiento de las cepas + y - de *P. anserina* en diferentes tipos de medios sólidos y con ausencia o presencia de luz. (+++: pigmento muy abundante. ++: pigmento abundante. +: pigmento en pequeña cantidad. -: ausencia de pigmento. R: colonia rosácea. A: colonia algodonosa. ?: crecimiento no detectado).

MEDIO	TIPO	CEPA +		CEPA -	
		Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
ACMM	Completo	+++	+	+++	+
ACZM	Mínimo	A-	A-	A-	A-
AFOM	Pobre	+++	-	+++	-
AGOM	Pobre	R	-	R	-
AMEM ₁	Completo	++	+	++	+
AMEM ₂	Completo	+++	+	+++	+
AMFM	Completo	A+	A-	A+	A-
AMGM	Pobre	-	-	-	-
AMME ₁	Mínimo	?	?	-	?
AMME ₂	Mínimo	A-	A-	A-	A-
AMMP	Mínimo	-	-	-	-
AMPM	Pobre	A++	A++	A++	A++
APDM	Completo	++	++	++	++
APMM	Pobre	-	-	-	-
ARFM	Completo	A+++	A++	A+++	A++
ASAM	Completo	++	-	++	-
ASSM	Completo	A-	A-	A-	A-

En primer lugar se vió la influencia del tipo de medio, al crecer el hongo durante 36 horas con agitación y luz en 25 ml de diferentes tipos de medio. Los resultados son los que aparecen en la Tabla 3. Al someter estos datos a un análisis estadístico de la varianza para un diseño factorial sin repetición con posterior test de rango continuo de Duncan, se diferenciaron dos grandes grupos de medios: por un lado el compuesto por GOM, MEM₂, MFM, RFM y SSM, cuyo rendimiento bajo estas condiciones se puede considerar superior a los 45 g/l de medio; por otro el compuesto por CMM, MEM₁, PDM y SAM, con rendimiento próximo a los 10-15 g/l. Por otra parte, y de acuerdo con estos datos, se observa un mayor índice de crecimiento de la cepa - en todos los casos.

Se analizó también la influencia que la presencia o ausencia de luz pudiera tener sobre el crecimiento en líquido. Para ello se probaron series de varios medios con o

sin luz, durante 36 horas y bajo las mismas condiciones de cultivo citadas anteriormente; los resultados que se obtuvieron quedan reflejados en la Tabla 4. Se puede observar en todos los casos el mayor índice de crecimiento en presencia de luz.

Para determinar el efecto del pH del medio, se creció el hongo en MEM₂ a diferentes pHs desde pH 2,0 a pH 9,0 en intervalos de una unidad. Los valores conseguidos tras 30 horas de crecimiento en las condiciones anteriormente reseñadas se pueden apreciar en la Figura 1. Sin duda, el pH óptimo es de 7,0. Valores por arriba o abajo limitan muy fuertemente el crecimiento. Este pH óptimo es elevado si se compara con los pHs óptimos de crecimiento para las especies fúngicas que suelen estar entre 4,0 y 5,0. A estos valores la respuesta de crecimiento de *P. anserina* es muy baja, prácticamente se produce tan sólo un crecimiento residual.

TABLA 3

MEDIDAS DE LA BIOMASA (en g) y desviaciones típicas de los valores obtenidos al crecer *P. anserina* en 25 ml de diferentes tipos de medios líquidos por 36 horas a 27°C y agitación orbital en presencia de luz.

MEDIO	CEPA +	CEPA -
CMM	0,34 ± 0,03	1,06 ± 0,06
GOM	0,72 ± 0,09	1,67 ± 0,05
MEM ₁	0,19 ± 0,01	0,49 ± 0,08
MEM ₂	0,74 ± 0,06	1,45 ± 0,09
MFM	0,64 ± 0,08	1,69 ± 0,07
PDM	0,11 ± 0,03	0,45 ± 0,08
RFM	0,86 ± 0,04	1,79 ± 0,07
SAM	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02
SSM	0,66 ± 0,08	1,42 ± 0,08

TABLA 4

RESPUESTAS DE CRECIMIENTO y desviaciones típicas de los valores (en g) de *P. anserina* en diferentes medios líquidos al crecerla por 36 horas a 27°C y agitación orbital y en presencia o ausencia de luz.

MEDIO	CEPA +		CEPA -	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
CMM	0,34 ± 0,03	0,02 ± 0,01	1,06 ± 0,06	0,50 ± 0,08
GOM	0,72 ± 0,09	0,58 ± 0,05	1,67 ± 0,05	1,25 ± 0,07
MEM ₂	0,74 ± 0,06	0,63 ± 0,03	1,45 ± 0,09	1,34 ± 0,03
RFM	0,86 ± 0,04	0,70 ± 0,04	1,79 ± 0,07	1,45 ± 0,06

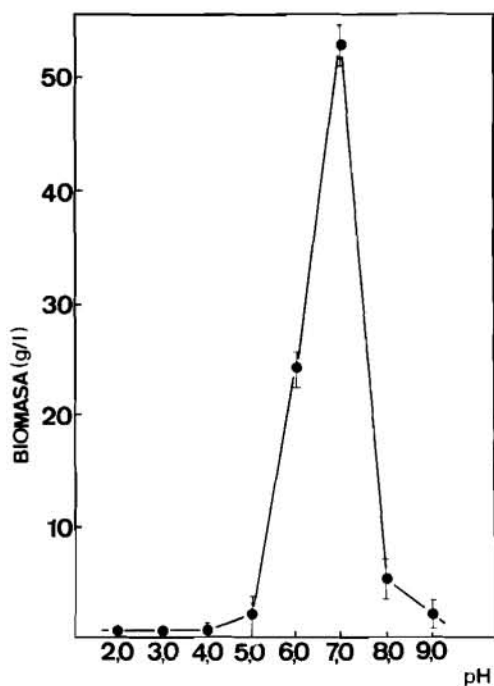


FIGURA 1.-INFLUENCIA DEL pH en el crecimiento en medio líquido de *P. anserina*. La experiencia se realizó en MEM₂ y 36 horas de incubación a 27°C y agitación orbital en presencia de luz.

Dada la intensa relación del tipo de agitación con las condiciones de aireación del cultivo, se decidió probar tres diferentes tipos de agitación: la orbital, la transversal y una tercera mediante un agitador magnético, y en las condiciones ya establecidas con anterioridad. Tras 36 horas de incubación, la agitación orbital proporcionó unos 54 g de micelio por litro, mientras que la transversal daba 35 y la magnética tan sólo 11. Parece ser pues que la agitación orbital proporciona al medio la mejor aireación posible, siendo de cualquier manera la más eficaz.

En otro apartado, resultaba para nosotros interesante conocer la cantidad de biomasa producida tanto a tiempos cortos (24 horas) como a tiempos más largos (72 horas o más); si a tiempos cortos se logra una cantidad de micelio suficiente como para

obtener protoplastos, la liberación de los mismos se ve ampliamente favorecida al no estar engrosada la pared. Las experiencias se llevaron a cabo en las condiciones óptimas ya mencionadas, obteniéndose los datos de la Figura 2, donde se aprecia que se consigue al cabo de 24 horas un rendimiento de 40 g de micelio húmedo por litro de medio, cantidad más que suficiente para obtener protoplastos. En cuanto a los tiempos largos la producción al cabo de 4-5 días llega a ser de 185 g/l de medio; si comparamos estos datos con los de bibliografía anteriormente citados en los cuales se obtenían 5 g/l de medio (ESSER, 1974), se ha mejorado la producción en aproximadamente 37 veces.

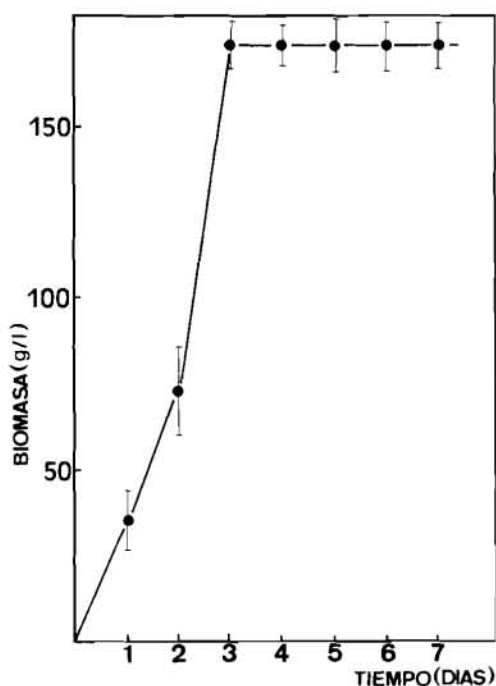


FIGURA 2.-RESPUESTA DE CRECIMIENTO EN EL TIEMPO DE *P. anserina* al ser cultivada en MEM₂, 27°C y agitación orbital en presencia de luz.

Se puede considerar el sistema de crecimiento vegetativo en líquido a 27°C y agitación orbital con luz y GOM, MEM₂, MFM, RFM o SSM a pH 7,0 como ampliamente satisfactorio.

Por otra parte, las esporas asexuales de *P. anserina* son en realidad los microconidios del hongo (ESSER, 1974). Para obtener un buen micelio al partir del cual liberar protoplastos se hace imprescindible una primera siembra a partir de microconidios, con el fin de asegurar la edad y estado fisiológico del cultivo. La producción de microconidios en MPM, tal y como aparece descrita en el artículo antes citado, se podía considerar como suficiente para nuestras necesidades. No obstante decidimos estudiar algunos factores que pudieran influir y con ello optimizar un poco más las condiciones. En primer lugar se analizó de una forma cualitativa la capacidad de producción de microconidios en diferentes tipos de medios, tanto ricos como pobres en nutrientes. No se pudo apreciar esporulación en ningún medio completo, teniendo ésta lugar por el contrario en dos medios pobres (FOM y MPM) y en el medio mínimo MMP de entre todos los ensayados. Todos estos datos concuerdan con el hecho de que la entrada en esporulación se produce ante la falta de nutrientes. Se consideró el medio óptimo de esporulación el MPM por ser el que mayor tasa producía de todos. En segundo lugar se probó la influencia que sobre la esporulación pudiera tener la ausencia o presencia de luz, determinándose un efecto negativo al disminuir el nivel de producción desde 10^7 a 10^5 microconidios por placa. En tercer lugar se analizó la influencia del pH del medio, sembrándose placas de MPM desde pH 4,0 a pH 8,0 en intervalos de una unidad, detectándose las producciones que aparecen en la Figura 3. El pH óptimo de producción es de 4,0; valores por debajo no permiten el crecimiento de *P. anserina* y valores por arriba decrecen la producción ampliamente. Finalmente se estudió el efecto que pudiera tener la Ampicilina en el proceso de la esporulación, no detectándose variaciones significativas entre los 0 y 1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la producción de microconidios interesaba optimizar el proceso de

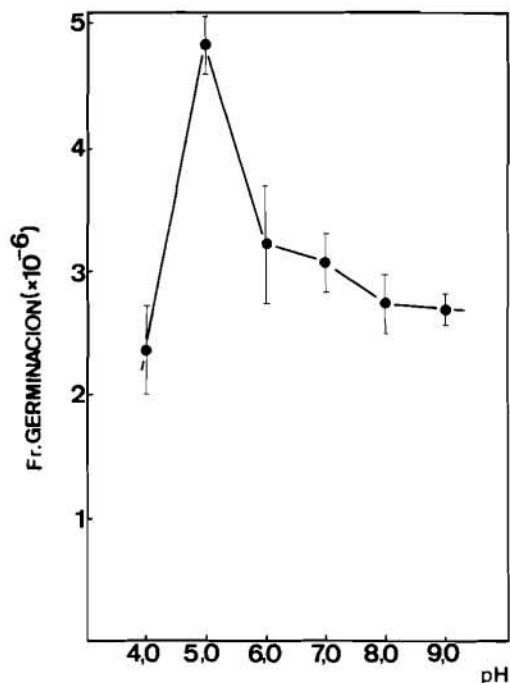


FIGURA 3.—INFLUENCIA DEL pH EN LA ESPO-RULACION DE *P. anserina*. La prueba se realizó en MPM incubándose las placas por 10 días a 27°C y oscuridad.

germinación de los mismos y superar así la creencia general de que en esta especie fúngica no germinan (ESSER, 1974). En nuestro caso ciframos inicialmente la frecuencia de germinación en 10^{-7} para ambas cepas en MGM. Obviamente esto dificulta enormemente el proceso de siembra, pues obliga a conseguir cantidades de microconidios próximas a 10^{10} para sembrar un matraz con 25 ml de medio. Por ello se pasaron a analizar los siguientes parámetros. En un principio se determinó qué tipo de medio era el óptimo para la germinación viéndose que era el MGM si bien el MEM₂ y RFM son capaces de proporcionar resultados sólo ligeramente inferiores. Paralelamente se estableció que la luz no ejercía ningún tipo de influencia en la capacidad de germinación de los microconidios. Por el contrario si se vió que el pH del medio

era bastante importante al obtenerse los resultados que se muestran en la Figura 4 donde se observa que el pH óptimo de germinación es de 5,0 aunque los microconidios son capaces de germinar desde pH 4,0 a pH 9,0. Otro hecho notable es que la Ampicilina, en contra de lo que ocurría en la esporulación, sí es capaz en este caso de afectar al proceso tal y como queda reflejado en la Figura 5, en la que se observa un aumento prácticamente lineal de la frecuencia de germinación desde 0 a 100 $\mu\text{g/ml}$; a partir de aquí se estabiliza la frecuencia, siendo el aumento global de 3 veces. Por último se analizó el efecto que un pretratamiento de tipo térmico pudiera tener sobre la germinación, realizándose pruebas a $-20, 0$ y 58°C . Los pretratamientos a bajas temperaturas apenas tienen ningún efecto, incluso disminuyen ligeramente la viabilidad. Por el contrario el de 58°C aumenta los valores en unas 2 veces respecto al control a temperatura ambiente.

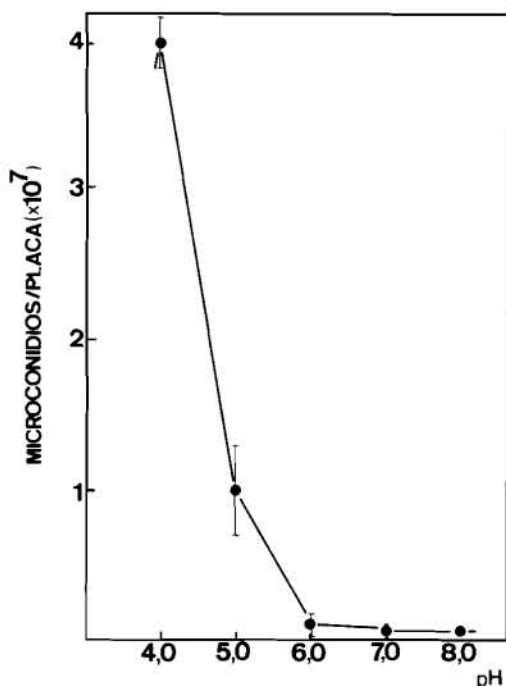


FIGURA 4.-INFLUENCIA DEL pH EN LA GERMINACION de microconidios de *P. anserina*. Se emplearon placas de MGM que se incubaron a 27°C y oscuridad durante 5 días.

A la vista de todos estos resultados se consideró como método óptimo de germinación de los microconidios el empleo de MGM a pH 5,0 y suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina. Se considera asimismo conveniente la realización de un pretratamiento de 15 minutos a 58°C . Con todo ello se puede lograr una tasa de germinación de los microconidios de aproximadamente 10^{-5} .

Como conclusión general del presente trabajo, además de la caracterización de todos los parámetros ya descritos, se ha elaborado un protocolo standard para la obtención de un micelio en condiciones fisiológicas óptimas de cara a la liberación de protoplastos de *P. anserina* que consta de los siguientes pasos: el proceso comienza con el inóculo de microconidios en MGM. Este paso tiene como objetivo el comenzar el proceso a partir de un clon de microconidios que permite asegurar la obtención de micelio juvenil de una forma absoluta. El siguiente punto consiste en el transvase de los microconidios pasados 3 días bajo las condiciones anteriores y que ya han comenzado a germinar, desde el MGM al AMM. Este último medio tiene la particularidad de retrasar la aparición de la senescencia (PRILLINGER y ESSER, 1977), dándose el hecho de que el micelio que crece en él no pigmenta hasta tiempos muy superiores a los normales. Tras 6 días de incubación, se homogeniza este micelio, disponiéndose entonces de un micelio juvenil no pigmentado y que se encuentra en crecimiento activo; éste puede almacenarse a 4°C durante períodos relativamente largos. Al inocular con él nuevos medios, el crecimiento comienza inmediatamente, pudiéndose lograr con tiempos cortos de 24 horas una buena cantidad de micelio. Este micelio se encuentra en excelentes condiciones para el ataque enzimático, al tener la pared poco engrosada y carecer totalmente de pigmento.

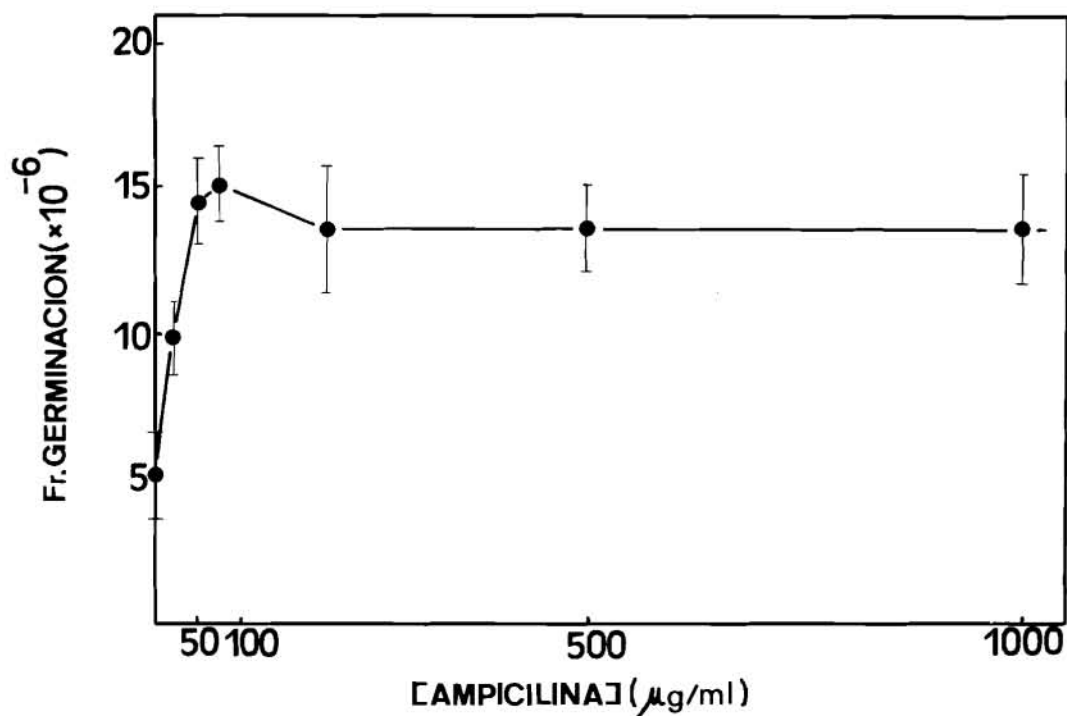


FIGURA 5.—INFLUENCIA DE LA AMPICILINA EN LA GERMINACION de microconidios de *P. anserina*. La experiencia se realizó con placas de MGM que se suplementaron con diferentes concentraciones de Ampicilina, incubándose a 27°C y oscuridad por 7 días.

BIBLIOGRAFIA

- ESSER, K. (1974). *Podospora anserina*. In *Handbook of Genetics*. (King, R.C., ed.): 531-551. New York. Plenum Press.
- FERRER, S., ALONSO, E. y VICENTE, E. (1982). Efecto mutagénico de la radiación ultravioleta y agentes alquilantes sobre diferentes especies del género *Penicillium*. *Collect. Bot.*, 13: 445-459.
- LODDER, J. (1974). *The yeasts (A taxonomic study)*. New York. Elsevier Publishing Company, Inc. 1385 p.p.
- PONTECORVO, G. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5: 141-238.
- PRILLINGER, H. y ESSER, K. (1977). The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. XIII. Action and interaction of genes controlling the formation of lacasse. *Molec. Gen. Genet.*, 156: 333-345.
- RAMON, D. (1983). *Mejora de las condiciones de manipulación del ascomycete Podospora anserina*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Valencia.