



Universiteit
Leiden

The Netherlands

**Genetic and environmental factors determining
heterogeneity in preservation stress resistance of
Aspergillus niger conidia**

Seekles, S.J.

Citation

Seekles, S. J. (2022, January 18). *Genetic and environmental factors determining heterogeneity in preservation stress resistance of Aspergillus niger conidia*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3250007>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3250007>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

In **Hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie gegeven over voedsel conservering en de daarbij horende uitdagingen. Voedsel en voedsel conservering zijn cruciaal voor het menselijk bestaan. Echter, het efficiënt conserveren van voedsel brengt vele uitdagingen met zich mee. Microben, zoals filamenteuze schimmels, overleven sommige conserveringstechnieken en kunnen vervolgens leiden tot contaminatie van voedselproducten. De overvloedig aanwezige asexuele sporen (conidia) van filamenteuze schimmels overleven de condities toegepast in conserveringstechnieken, door hun relatief hoge stress resistentie. Om conserveringstechnieken te kunnen verbeteren is het cruciaal om de moleculaire mechanismen achter de hoge stress resistentie beter te begrijpen. Bovendien zijn conidia ook zeer heterogeen in hun vermogen om conserveringstechnieken te overleven en voedsel te contamineren, wat deels verklaard kan worden door genetische verschillen tussen stammen en soorten. Daarnaast is er ook onderzoek dat suggereert dat conidia van dezelfde stam, die genetisch identiek zijn, ook heterogeen zijn in hun vermogen om conserveringstechnieken te overleven. Daarom concentreert het werk beschreven in dit proefschrift zich op de identificatie van genetische en omgevingsfactoren die de heterogeniteit in stress resistentie tegen conserveringstechnieken van *Aspergillus niger* conidia bepaalt.

Hoofdstuk 2 beschrijft onderzoek over het effect stam variabiliteit op de sorbinezuur resistentie van 100 *A. niger* stammen. De stam met de hoogste sorbinezuur sensitiviteit, geïsoleerd van druiven, had een disruptie in het gen dat codeert voor transcriptie factor SdrA. Ook zijn 240 *A. niger* stammen, elk gedeleteerd in een enkele transcriptie factor, gescreend op hun resistentie tegen zwakke zuren. Een aantal mutanten lieten sensitiviteit zien tegen zwakke zuren, en specifiek een stam waar het gen *warB* was gedeleteerd was sensitief tegen een groot scala aan zwakke zuren die gebruikt worden als voedsel conserveringsmiddelen. Gen *warB* heeft een additief effect op de resistentie van *A. niger* tegen zwakke zuren vergeleken met stammen met mutaties in transcriptie factoren bekend uit de literatuur; *sdrA* en *warA*. Dit onderzoek toont het belang van tran-

scriptie factoren aan als regulators van de stressreactie van *A. niger* gedurende stress veroorzaakt door zwakke zuren.

In **Hoofdstuk 3** wordt het onderzoek naar het effect van stam diversiteit op de hitte resistentie van *P. variotii*, *P. roqueforti* en *A. niger* conidia beschreven. Hitte resistentie wordt daarbij voor elke stam gekwantificeerd in de vorm van zogenaamde D-waardes. Het maximale verschil in D-waarde tussen stammen binnen één soort was een factor 5 a 8, en daarom consistent tussen de drie schimmel soorten. Statistisch gezien is de impact van factor 'stam' in dezelfde orde grootte in schimmelsporen als in bacteriële sporen. Dit suggereert dat de impact van factor 'stam' op de hitte resistentie van sporen consistent is tussen voedsel bedervende soorten, en daardoor voorspelbaar, wat de voedsel industrie in staat stelt factor 'stam' te modeleren in voedselbederf risico's.

In **Hoofdstuk 4** wordt de sequentie van neotype *A. niger* stam CBS 554.65 gepresenteerd. De *A. niger* CBS 554.65 stam heeft een MAT1-2 locus, in contrast met de meeste bekende industriële stammen waarvan al een sequentie bekend is, deze industriële stammen hebben allemaal een MAT1-1 locus. De genetische compositie van de paringstype loci MAT1-1 en MAT1-2 zijn vergeleken. Veel van de genen in het MAT1-1 paringstype locus hebben een omgedraaide oriëntatie ten opzichte van hun homologen in het MAT1-2 locus. De omgedraaide oriëntatie van de genen in het MAT1-1 locus is consistent aanwezig, ook in de nieuwe sequenties van 12 MAT1-1 stammen. De filamenteuze schimmel *A. niger* wordt dusver gezien als een puur asexuele schimmel, maar de ontdekking van het omgedraaide paringstype locus leidt tot nieuwe inzichten in de potentie van *A. niger* om zichzelf seksueel te reproduceren. De sequentie van stam CBS 554.65 is de eerste genetische sequentie van hoge kwaliteit van een stam met paringstype MAT1-2, waardoor dit een zeer geschikte stam is voor toekomstig onderzoek hieraan in *A. niger*.

In **Hoofdstuk 5** worden de genoomsequenties van 24 *A. niger sensu stricto* stammen verder geanalyseerd. Een fylogenetische boom met 24 nieuwe sequenties

en acht beschikbare sequenties van de literatuur liet zien dat *A. niger sensu stricto* stammen in drie groepen uiteenvallen. Interessant is dat de industriële stammen die enzymen produceren allemaal clusteren in groep A, terwijl de industriële stammen die organische zuren produceren clusteren in groep B. De verschillen tussen stammen in de fylogenetische boom zijn gebruikt om te bepalen hoe groot de kans is tot heterokaryon formatie, en vervolgens werden paraseksuele kruisingen ingezet met de doelstelling om paraseksuele kruisingen te gebruiken om genetische elementen te identificeren die hitte of sorbinezuur resistentie veroorzaken van de stammen besproken in Hoofdstuk 2 en Hoofdstuk 3. Echter, heterokaryon incompatibiliteit was wijd verspreid onder de stammen, zelfs tussen nauw verwante *A. niger sensu stricto* stammen, waardoor maar een enkele paraseksuele kruising succesvol was, en dus resulteerde in een diploïde stam die beide paringstypes bevat. De inductie van voor de seksuele ontwikkeling nodige sclerotia resulteerde helaas nog niet in ascosporen in deze diploïde stam. De diploïde stam biedt wel nieuwe kansen tot het bestuderen van de mogelijke seksuele cyclus in *A. niger*.

In **Hoofdstuk 6** wordt onderzoek beschreven waarin met CRISPR/Cas9 genoom modificatie technieken ontwikkeld voor *A. niger* in *P. variotii* en *P. roqueforti* DHN-melanine deficiënte stammen zijn gemaakt. Verder werden *kusA*⁻ stammen gemaakt om zo toekomstige genetische modificatie in deze twee voedsel bedervende schimmels te vereenvoudigen. De conidia van melanine deficiënte stammen van de drie voedsel bedervende schimmels zijn getest op hun hitte en UV-C resistentie. De sporen van melanine deficiënte stammen zijn niet aangetast in hun hitte resistentie, maar wel gevoeliger voor UV-C straling in vergelijking met de ouderstammen. Concluderend is melanine van belang voor de UV-C resistentie, maar speelt geen rol in de hitte resistentie van schimmelsporen.

In **Hoodstuk 7** werden jonge conidia vergeleken met oudere conidia m.b.t. hun hitte resistentie. Jonge conidia zijn duidelijk meer gevoelig voor hitte dan oudere conidia, en deze hitte resistentie neemt gradueel toe met leeftijd. Deze graduele toename in hitte resistentie correleert met een toename in concentratie van de interne concen-

tratie osmolyten. Deze resultaten suggereren dat jonge sporen nog steeds osmolyten accumuleren tijdens de maturatie, waardoor jonge sporen hitte gevoeliger zijn dan oudere sporen. Mutanten gemaakt door CRISPR/Cas9 genoom modificatie zijn vervolgens gebruikt om zo de rol van interne osmolyten op de hitte resistentie van conidia verder te kunnen bestuderen. Conidia van de *ΔmpdA ΔtpsACB* stam hebben minimale hoeveelheden interne osmolyten en zijn hitte gevoeliger dan de sporen van de ouderstam. De hitte gevoeligheid voor hitte is vergelijkbaar met de hitte gevoeligheid van jonge sporen van de ouderstam. Tijdens het bestuderen van de ontkieming van deze conidia is verder gevonden dat sporen van mutanten met weinig interne osmolyten beter ontkiemde in medium met 10 mM arginine en 0.1 mM proline als koolstofbron in vergelijking met wild-type conidia. Deze conidia lieten ook consistent slechtere ontkieming zien in medium met 10 mM glucose als koolstofbron in vergelijking met wild-type conidia. Concluderend, de ontkieming en hitte resistentie van conidia hangen af van de concentraties interne osmolyten, en deze concentraties variëren met de leeftijd van de sporen. Dus in een sporenpopulatie waarbij verschillende leeftijden voorkomen hebben jonge schimmel sporen significant afwijkende ontkieming en lagere hitte resistentie in vergelijking met oudere schimmel sporen. Dit kan een ecologisch voordeel zijn, een vorm van een zogenaamde “bet-hedging” strategie van de schimmel, waarbij in een populatie genetisch identieke sporen heterogeniteit kan optreden in zowel stress resistentie als ontkieming efficiëntie afhankelijk van de interne compositie aan osmolyten.

In **Hoofdstuk 8** is de rol van de cultivatie temperatuur van het mycelium op de hitte resistentie van de resulterende conidia van *A. niger* onderzocht. Wanneer mycelium wordt gecultiveerd bij hogere temperaturen, neemt de interne concentratie trehalose en ook de hitte resistentie van de onder die omstandigheden gevormde sporen toe. Echter, de conidia van een trehalose deficiënte mutant laten nog steeds een toename in hitte resistentie zien wanneer ze gekweekt worden bij hogere temperaturen. Daarom is er aan het transcriptoom en proteoom van de verschillende sporen onderzoek gedaan waarbij de sporen bij 28°C, 32°C en 37°C zijn opgekweekt zijn om zo de genetische elementen te vinden die de toename in hitte resistentie kunnen verklaren. De sporen opgekweekt

bij 37°C leverden de meeste informatie op, en lieten zien dat voor twee genen zowel het transcript en als op basis daarvan gevormde eiwit meer aanwezig zijn in vergelijking met bij 28°C gevormde sporen. Deze twee genen coderen voor *hsp26/42*-achtige “heat shock” eiwitten. Deze twee genen hebben dus mogelijk een rol in de geobserveerde toename in hitte resistentie wanneer de sporen gevormd worden bij hogere temperaturen.

Hoofdstuk 9 geeft een gedetailleerde beschrijving van het totale onderzoek beschreven in dit proefschrift waarbij de resultaten in een bredere context worden geplaatst. Hypotheses en mogelijke toekomstige onderzoekslijnen worden besproken met als doel onze kennis over de heterogeniteit in stress resistentie van *A. niger* conidia te vergroten.

Het werk beschreven in dit proefschrift vergroot onze kennis over stress resistentie mechanismen in *A. niger*, en laat omgevingsfactoren zien die deze stress resistentie beïnvloeden. Conidia zijn divers in hun stress resistentie, door genetische verschillen (stammen of soorten), maar ook door hun leeftijd en de kweekomstandigheden waaronder ze worden gevormd. Een belangrijk aspect blijkt daarbij de verschillen in de concentraties van interne osmolyten en mogelijk heat shock eiwitten te zijn.

