

TD
676

TD
676

ANALISIS GENETICO DE LA CAROTENOGENESIS
EN EL HONGO *Phycomyces blakesleeanus*

R. 4034

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Ciencias, por el Licenciado

SANTIAGO TORRES MARTINEZ

Sevilla, Diciembre de 1978

Director y Ponente

Profesor Enrique Cerdá Olmedo
Director del Departamento de Genética

En esta tesis se han realizado estudios genéticos y bioquímicos de mutantes con alteraciones en la carotenogénesis, su regulación interna y su estimulación por agentes químicos. Concluimos que:

1. Un solo gen determina dos funciones: una que llamamos A, es necesaria para la síntesis de carotenos; la otra, que llamamos R, es la ciclasa del licopeno. El segmento proximal del gen (extremo 5' del ARN mensajero y extremo amino del polipéptido) es responsable de la función A y el segmento distal es responsable de la función R. Los segmentos A y R son separados por una proteasa antes de pasar a desempeñar sus funciones en la ruta.

2. El producto del segmento A actúa probablemente facilitando el transporte de sustratos en el complejo carotenogénico. La falta de este producto A provoca una escasez general de sustratos, que impide el funcionamiento normal de la ruta.

3. La gran acumulación de β -caroteno en los mutantes superproductores (gen *carS*) no se debe a falta de degradación o transformación del β -caroteno, sino a una síntesis más activa de este compuesto. El producto del gen *carS* participa en la regulación de la carotenogénesis, posiblemente en el mecanismo de retroinhibición.

4. La activación de la carotenogénesis por diversos agentes químicos depende de, al menos, una función celular, revelada por la existencia de mutantes insensibles a estímulos externos.

5. La 2-(4-clorofeniltio)triethylamina (CFTA) no parece tener un efecto estimulador de la carotenogénesis independiente de su efecto inhibitorio de la ciclasa. El aumento en la cantidad de carotenos puede ser un efecto secundario debido al mecanismo de control por retroinhibición.

6. El monooleato de polioxietilensorbitano ("Tween-80") contrarresta la inhibición parcial de la ciclación por CFTA o por mutaciones *carR* en heterocariosis, permitiendo probablemente el acceso de los sustratos licopeno y γ -caroteno a complejos con ciclasas activas.

INDICE DE MATERIAS

RESUMEN.....	2
INDICE DE MATERIAS.....	3
INDICE DE TABLAS.....	6
INTRODUCCION.....	8
- BIOSINTESIS DE CAROTENOS EN <i>Phycomyces</i>	9
- REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE CAROTENOS EN <i>Phycomyces</i>	13
- <i>Mutantes superproductores de β-caroteno</i>	16
- <i>Mutantes con escaso o nulo contenido de carotenos</i>	17
- <i>Regulación por factores ambientales</i>	19
- <i>Mutantes insensibles a factores ambientales</i>	21
- GENETICA DE LA CAROTENOGENESIS EN OTROS MICROORGANISMOS.....	22
- MUTAGENOS.....	24
- <i>Mutaciones producidas por la nitrosoguanidina</i>	24
- <i>Mutaciones producidas por ICR-170</i>	26
MATERIALES Y METODOS	
- ESTIRPES.....	28
- METODOS DE CULTIVO	
- <i>Medios de crecimiento</i>	30
- <i>Inoculación</i>	32
- <i>Condiciones de cultivo</i>	32
- <i>Recolección de esporas</i>	33
- OBTENCION DE HETEROCARIONTES.....	33
- ANALISIS QUIMICO	
- <i>Extracción</i>	34

- Separación cromatográfica.....	35
- Identificación y cuantificación.....	36
- MARCADO RADIOACTIVO.....	37
- CRUZAMIENTOS.....	37
- MUTAGENESIS.....	38
- Mutagénesis con nitrosoguanidina.....	38
- Mutagénesis con ICR-170.....	40

RESULTADOS Y DISCUSION

- ANALISIS GENETICO.....	41
- Análisis genético del fenotipo AR.....	41
- Cruzamientos entre estirpes de los fenotipos A y R.....	43
- Discusión del análisis genético.....	46
- INDUCCION DE MUTANTES DE COLOR.....	48
- Nitrosoguanidina.....	50
- ICR-170.....	52
- Discusión de la inducción de mutantes de color.....	52
- REVERSION DE LOS MUTANTES DE COLOR.....	54
- Reversión del fenotipo A.....	54
- Reversión del fenotipo AR.....	56
- Discusión de la reversión de mutantes de color.....	57
- ANALISIS GENETICO DE LOS REVERTIENTES.....	59
- Naturaleza de los revertientes amarillos...	59
- Naturaleza de un revertiente rojo.....	60
- Discusión del análisis genético de los revertientes.....	60
- EFECTO DE LA VITAMINA A Y LA CFTA SOBRE LA RUTA DE SINTESIS DE LOS CAROTENOS.....	62
- Efecto de la vitamina A sobre los mu- tantes de fenotipo I.....	63

- Efecto de la CFTA sobre los mutan- tes de fenotipo I.....	64
- Acción conjunta de la CFTA y la Vi- tamina A.....	64
- Discusión de los mutantes insensibles y los reguladores químicos.....	68
- FUNCION DEL GEN <i>carS</i> EN LA CAROTENOGENESIS.....	72
DISCUSION GENERAL	
- FENOTIPO AR.....	75
- FENOTIPO A.....	77
- REGULACION DE LA CAROTENOGENESIS.....	78
BIBLIOGRAFIA.....	82
AGRADECIMIENTOS.....	89

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Estirpes de <i>Phycomyces</i> utilizadas en esta tesis.....	29
Tabla 2.	Estirpes heterocariontes de <i>Phycomyces</i> utilizadas en esta tesis.....	30
Tabla 3.	Análisis genético del fenotipo AR.....	42
Tabla 4.	Cruzamientos entre estirpes de los fenotipos A y R.....	45
Tabla 5.	Búsqueda de mutantes de color en las estirpes NRRL1555 y C115.....	51
Tabla 6.	Búsqueda de revertientes de mutantes blancos.....	55
Tabla 7.	Análisis genético de los revertientes amarillos.....	59
Tabla 8.	Análisis genético de la estirpe S165, de fenotipo R, revertiente de otra AR....	61
Tabla 9.	Contenido de β -caroteno de la estirpe silvestre NRRL1555 y las de fenotipo I, en medio mínimo con y sin vitamina A.....	63
Tabla 10.	Contenido de β -caroteno, γ -caroteno y licopeno de la estirpe silvestre NRRL1555 y las de fenotipo I, en medio mínimo con y sin CFTA.....	65
Tabla 11.	Efecto conjunto de la CFTA y la vitamina A sobre la estirpe silvestre NRRL1555.....	66
Tabla 12.	Efecto de los diferentes componentes de la solución emulsificadora sobre la acción estimuladora de la vitamina A, en la estirpe silvestre NRRL1555.....	66

Tabla 13. Efecto de los diferentes componenetes de la solución emulsificadora sobre el contenido de carotenos de la estirpe silvestre NRRL1555 cultivada en presencia de CFTA.....	67
Tabla 14. Efecto de la vitamina A y el "Tween-80" sobre la carotenogénesis en micelios heterocariontes C2 * C9.....	69
Tabla 15. Marcado radioactivo del β -caroteno.....	73

INTRODUCCION

El desarrollo actual de la Biología Molecular está basado, en gran parte, en la búsqueda y estudio de sistemas sencillos, que faciliten la adquisición de conocimientos sobre el funcionamiento de los procesos celulares.

La regulación de las diferentes funciones celulares y el estudio de los mecanismos necesarios para realizarla constituye uno de los aspectos más interesantes de las investigaciones que se están llevando a cabo actualmente en Biología. El hecho de que, en eucariontes, los mecanismos de regulación puedan diferir notablemente de los conocidos en procariontes hace necesaria la utilización de organismos eucarióticos poco complejos, en los cuales el estudio de los mecanismos regulatorios sea más accesible.

La utilización de *Phycomyces blakesleeanus* obedece a razones de este tipo. Aún cuando su comportamiento es variado y complejo, *Phycomyces* es un organismo eucariótico que permite una fácil manipulación.

La elección de la carotenogénesis y su regulación como objeto de estudio, también obedece a razones de tipo práctico. Por una parte, los aspectos químicos de la ruta de síntesis de los carotenos han sido ya ampliamente estudiados

(revisión en Davies, 1975), lo que supone un paso previo importante para un trabajo de tipo genético. De otra parte, al tratarse de compuestos coloreados, se detectan más fácilmente los mutantes.

Algunos aspectos de la carotenogénesis en *Phycomyces* han sido objeto de numerosos estudios, que han sido revisados recientemente (Cerdá Olmedo y Torres Martinez, 1977; 1978).

BIOSINTESIS DE CAROTENOS EN *PHYCOMYCES*

El β -caroteno es el pigmento responsable del color amarillo del micelio de *Phycomyces*, y está presente en la mayoría de las etapas del ciclo de vida. La concentración del pigmento varía en función de condiciones ambientales como nutrientes, luz y temperatura (Friend y Goodwin, 1954; Bergman *et al.*, 1973).

Los primeros mutantes de color en *Phycomyces* fueron aislados por M. Heisenberg en 1967. Existen en la actualidad dos extensas colecciones, obtenidas en el California Institute of Technology, de Pasadena y en el Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla. Los principales fenotipos mutantes encontrados son: blanco, rojo y amarillo intenso. Estos mutantes han sido utilizados en tres tipos de investigaciones: el estudio de su fenotipo, sobre todo de su contenido en carotenos, la asignación de las mutaciones a genes, mediante las técnicas genéticas de complementación, y el estudio cuantitativo de heterocariontes. Estas investigaciones nos dan una imagen coherente de la ruta

biosintética.

Algunos de los mutantes blancos acumulan fitoeno en vez de β -caroteno (Meissner y Delbrück, 1968; Eslava *et al.*, 1974). Las correspondientes mutaciones pertenecen todas al mismo grupo de complementación, que define el gen *carB* (Ootaki *et al.*, 1973). Los mutantes rojos acumulan licopeno en vez de β -caroteno (Meissner y Delbrück, 1968). En este trabajo los llamaremos "mutantes de fenotipo R" (por rojo). Las mutaciones correspondientes han ocurrido en un mismo grupo de complementación, distinto del anterior, que define el gen *carR*. La existencia de estos dos tipos de mutantes apoya fuertemente la existencia en *Phycomyces* de la ruta de síntesis de carotenos propuesta por Porter y Lincoln (Porter y Lincoln, 1950) para el tomate, en el cual el fitoeno y el licopeno son intermediarios esenciales (Fig. 1).

No se han aislado mutantes que acumulen otros presuntos intermediarios de la ruta. Existen varias explicaciones a este hecho: los esteroides son componentes esenciales de las membranas celulares y por tanto es poco probable que se obtengan mutantes que tengan bloqueada la biosíntesis de los esteroides. Los intermediarios hasta el pirofosfato de farnesilo (^C15) son comunes a ambas rutas, la de los esteroides y la de carotenos; por tanto los mutantes incapaces de metabolizar tales intermediarios serían inviables. La síntesis de pirofosfato de geranilgeraniol (^C20) supone la adición de un residuo prenilo, que, si fuera llevada a cabo por la

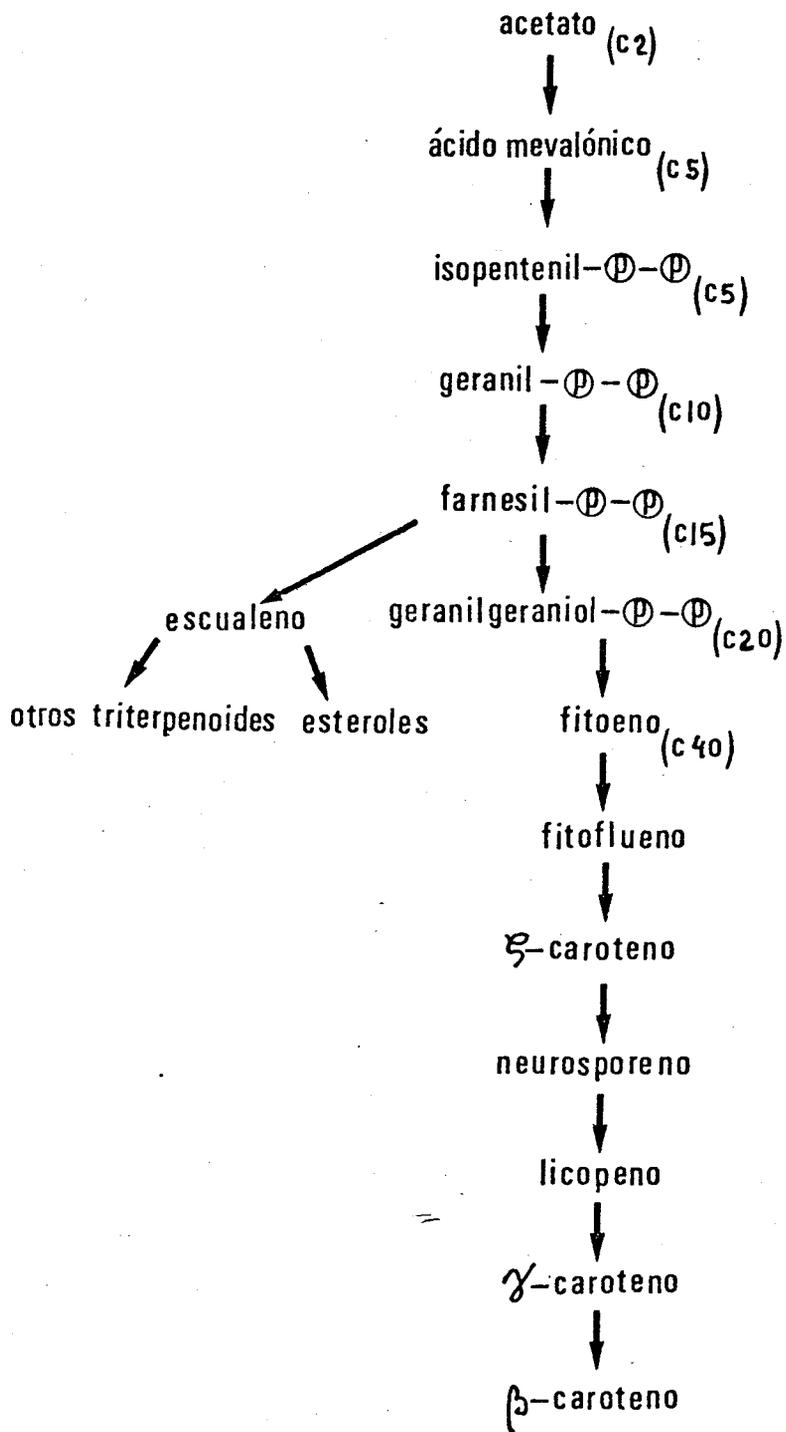


Figura 1. Esquema general de la biosíntesis de carotenos.

misma transferasa del prenilo responsable de las dos reacciones previas, no necesitaría la existencia de un gen adicional. Las enzimas responsables para el paso $C_{15} \rightarrow C_{20}$ (Altman *et al.*, 1972) pueden intervenir quizás en el paso $C_{15} \rightarrow C_{30}$ de la biosíntesis de los esteroides; en este caso, las mutaciones que las inactivan bloquearían simultáneamente ambas rutas y serían inviábiles.

Todas las deshidrogenaciones desde el fitoeno hasta el licopeno pueden ser realizadas por la misma enzima, codificada por el gen *carB*. Los mutantes *carB* rezumantes, que acumulan fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno y neurosporeno apoyan esta hipótesis (Eslava y Cerdá Olmedo, 1974). La hipótesis explica también la acumulación de estos mismos intermediarios en micelios cultivados en presencia de difenilamina (Olson y Knizley, 1962).

Las dos ciclaciones desde el licopeno hasta β -caroteno pueden ser llevadas a cabo por otra enzima, codificada por el gen *carR*. La presencia de licopeno, γ -caroteno y β -caroteno en micelios que están creciendo en presencia de compuestos que inhiben la ciclación como la 2-(4-clorofeniltio)trietilamina (CFTA) o la nicotina (Coggins *et al.*, 1970; Howes y Batra, 1970; Batra *et al.*, 1973) apoyan esta propuesta.

El mejor apoyo a la idea de que una enzima está involucrada en varias reacciones viene de los análisis de complementación cuantitativa. Los heterocariontes entre alelos *carB* mutantes y silvestres acumulan fitoeno, fitoflueno, ζ -caroteno, neurosporeno y productos totalmente deshidrogenados (Aragón *et al.*, 1976). Los

heterocariontes entre alelos *carR* mutantes y silvestres acumulan licopeno, γ -caroteno y β -caroteno (De la Guardia *et al.*, 1971). Las relaciones matemáticas entre los análisis cuantitativos de los carotenos y las proporciones nucleares en los heterocariontes llevan a una propuesta concreta sobre la organización de la ruta (Figs. 2 y 3): el fitoeno se incorpora a un primer complejo formado por cuatro copias de una deshidrogenasa del fitoeno, codificadas todas por los genes *carB* presentes en la células, y después por dos copias de una ciclasa del licopeno, codificadas por los genes *carR* presentes en la célula. De esta forma cuando los alelos mutante y silvestre coexisten en la misma célula, las enzimas inactivas pueden incorporarse al complejo. Al llegar a una enzima inactiva los intermediarios no serán transformados, sino expulsados del complejo y se acumularán en el citoplasma en las mismas proporciones en que fueron fabricados.

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE CAROTENOS EN *PHYCOMYCES*

En la oscuridad, y en ausencia de estimulaciones especiales, el tipo silvestre de *Phycomyces* acumula, a los cuatro días de crecimiento en medio mínimo, alrededor de 40 μ g de β -caroteno por gramo de materia seca (en adelante "ppm").

Se han aislado mutantes que, en las mismas circunstancias, acumulan notablemente más o notablemente menos β -caroteno que el tipo silvestre.

Se conocen también circunstancias ambientales que incrementan o disminuyen la carotenogénesis.

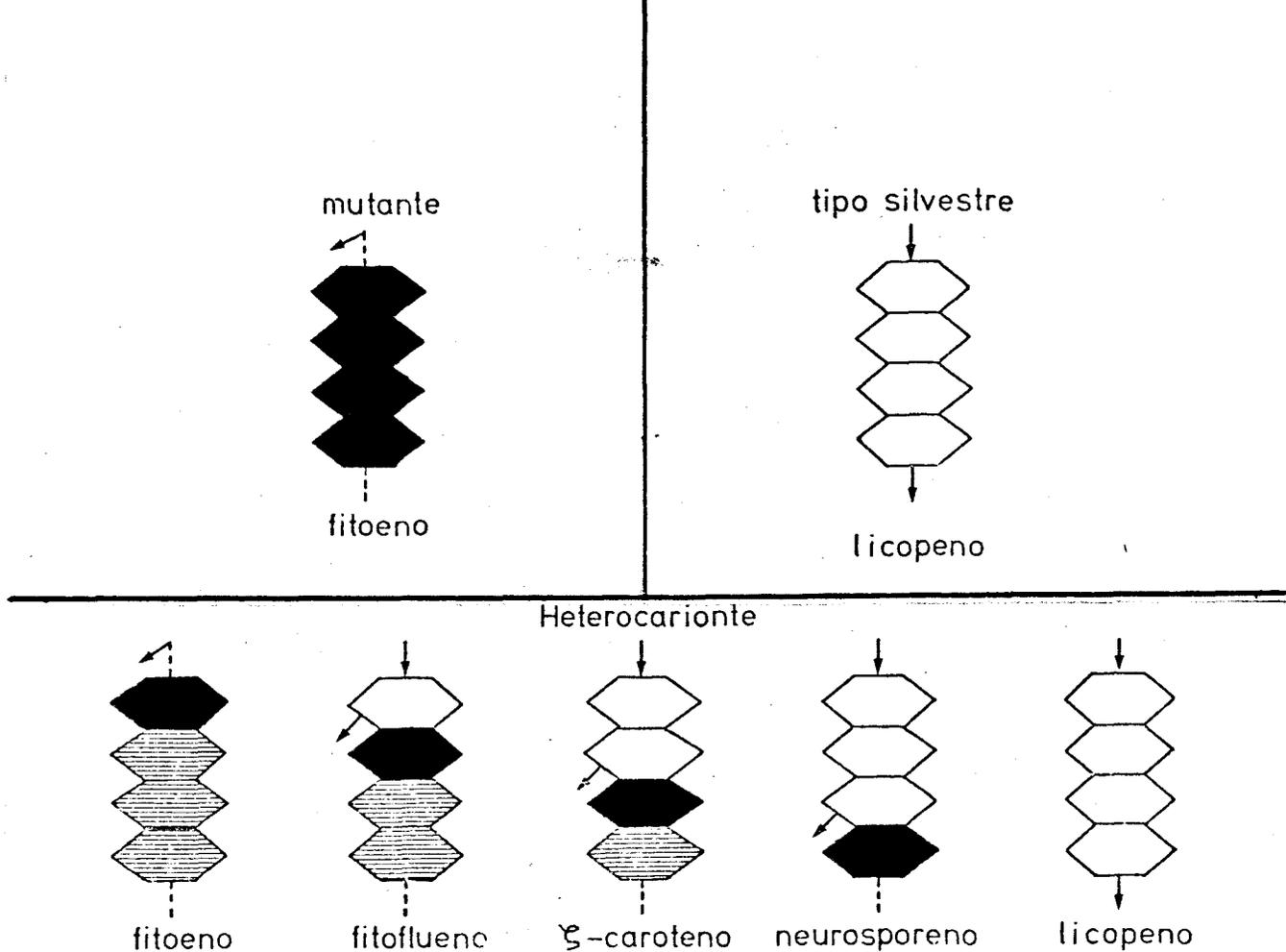


Figura 2. Las reacciones desde fitoeno hasta licopeno son llevadas a cabo, sucesivamente, por cuatro moléculas de la deshidrogenasa del fitoeno. Los símbolos blancos representan enzimas activas, producto del alelo del tipo silvestre. Los símbolos negros, el producto de un mutante *carB*, enzimáticamente inactivo, pero capaz de integrarse en el complejo. Los símbolos rayados, indistintamente uno u otro. Arriba a la izquierda, agregado enzimático de un mutante *carB*. Arriba a la derecha, el del silvestre. La parte inferior de la figura representa los complejos enzimáticos posibles en los heterocariontes entre alelos silvestre y *carB*, y los productos que se esperan.

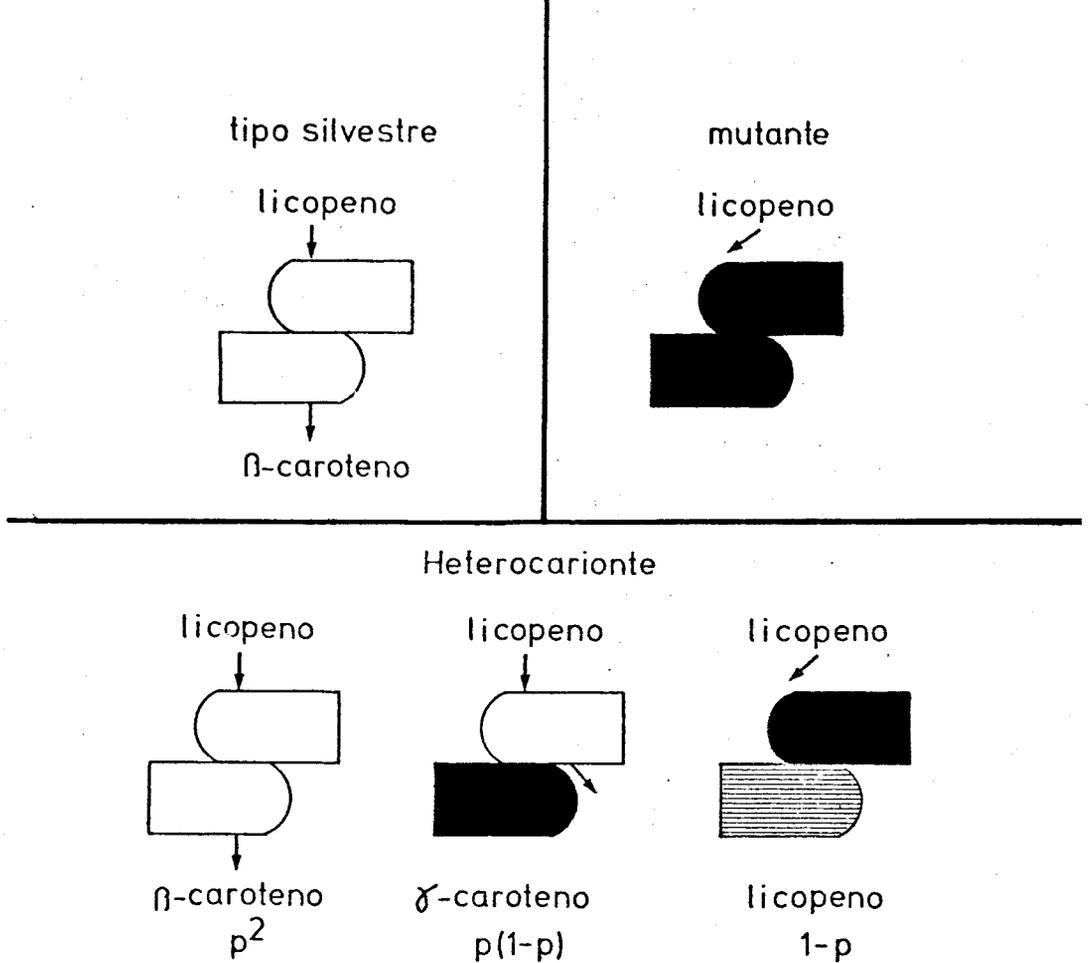


Figura 3. Las reacciones desde licopeno hasta β -caroteno son llevadas a cabo, sucesivamente, por dos moléculas de la ciclasa del licopeno. Los símbolos blancos representan enzimas activas, producto del tipo silvestre. Los símbolos negros, el producto de un mutante *carR*, enzimáticamente inactivo pero capaz de integrarse en el complejo. Los símbolos rayados, indistintamente uno u otro. Arriba a la derecha, agregado enzimático de un mutante *carR*. Arriba a la izquierda, el del silvestre. La parte inferior de la figura representa los complejos enzimáticos posibles en los heterocariontes entre alelos silvestres y *carR*, sus productos, y las frecuencias esperadas en el supuesto de que no haya discriminación a nivel de transcripción, traducción y agregación.

Mutantes superproductores de β -caroteno

Las mutaciones en el gen *carS* incrementan el contenido de β -caroteno hasta aproximadamente 4000 ppm.

Se han propuesto dos hipótesis (Murillo y Cerdá Olmedo, 1976) que explican este hecho. Hipótesis (a): en el tipo silvestre existe una regulación de las actividades enzimáticas implicadas en la carotenogénesis. El β -caroteno formado se acumula y no se metaboliza apreciablemente. En los mutantes *carS* esta regulación ha sido alterada y se consiguen actividades mucho mayores. Como las mutaciones *carS* son recesivas, lo más fácil es suponer que inutilizan un producto regulador difusible por el citoplasma que normalmente tiende a disminuir las actividades enzimáticas. Hipótesis (b): en el tipo silvestre existen mecanismos muy activos de degradación del β -caroteno, que son inutilizados por la mutación *carS*.

La ruta de los carotenos se estimula siempre que la producción de β -caroteno se ve dificultada, bien por la existencia de mutaciones *carB* o *carR* (Murillo y Cerdá Olmedo, 1976), o por la acción de inhibidores (Olson y Knizley, 1962; Coggins *et al.*, 1970). Esto sugiere que la ruta es retroinhibida por el β -caroteno y que su falta provoca la estimulación de la síntesis. El hecho de que los dobles mutantes *car^B carS* no acumulen más fitoeno que los mutantes *carB* puede sugerir como más probable la hipótesis (a), y que el producto de *carS* participe en la regulación por retroinhibición. No obstante, en esta tesis se hacen nuevos experimentos que tratan de dilucidar esta alternativa.

Mutantes con escaso o nulo contenido de carotenos

Algunos mutantes blancos no acumulan cantidades importantes de ningún caroteno, ni siquiera fitoeno. Contienen muy pequeñas cantidades (del orden de 1 ppm) de β -caroteno. En este trabajo los llamaremos "mutantes de fenotipo A" (por "albinos"). Entre ellos no hay complementación, pero todos complementan con los mutantes *carB*. Estos mutantes han sido asignados al gen *carA* (Ootaki *et al.*, 1973).

Varias investigaciones han intentado encontrar un bloqueo de la ruta de la carotenogénesis, pero no han encontrado ninguno concreto. No puede descartarse, sin embargo, que el gen *carA* intervenga en una reacción enzimática, anterior al fitoeno, y que el bajo nivel de β -caroteno en los mutantes de fenotipo A represente un nivel residual de actividad enzimática.

Caben también otras posibilidades. El gen *carA* podría ser un gen regulador y los mutantes blancos de fenotipo A podrían tener permanentemente inhibida la ruta. Como caso concreto: *carA* podría participar en la retroinhibición de la ruta y sus mutantes serían capaces de retroinhibir en cuanto se formara una pequeña cantidad del producto final. El producto de *carA* podría también actuar como llave de paso de la carotenogénesis o como transportador de sustratos intermedios. En este caso el paso de los sustratos se vería disminuido a nivel general sin acumularse significativamente ningún compuesto intermedio de la ruta.

Es frecuente aislar otro tipo de mutantes blancos, que acumulan pequeñísimas cantidades de licopeno. Estos

mutantes no complementan ni con *carA* ni con *carR* (Ootaki *et al.*, 1973), y presentan características de ambos, ya que acumulan pequeñísimas cantidades de licopeno, pero no β -caroteno. En este trabajo los llamaremos "mutantes de fenotipo AR".

Los mutantes de fenotipo AR se pueden obtener también buscando color blanco tras el tratamiento mutagénico de una estirpe mutante roja de fenotipo R. Presumiblemente también podrían obtenerse a partir de un mutante de fenotipo A, pero la búsqueda de blancos en un fondo blanco no es trivial.

Hasta ahora se venían considerando simplemente como dobles mutantes que habían sufrido simultáneamente una mutación en el gen *carA* y otra en el gen *carR* (Ootaki *et al.*, 1973).

Varios indicios vienen a poner en duda esta sencilla interpretación. En primer lugar, se encuentran muy frecuentemente mutantes de fenotipo AR tras tratar una estirpe amarilla con el mutágeno nitrosoguanidina. Habría que suponer una tasa de doble mutación altísima, aun mayor que la de mutación simple a fenotipo R.

Los mutantes de fenotipo AR presentan además una serie de peculiaridades, como por ejemplo su comportamiento en heterocariosis. Los heterocariontes C5 * C6 (blanco *carB* * blanco de fenotipo AR) no acumulan los compuestos intermedios licopeno y γ -caroteno como sería de esperar si las ciclasas de C6, aunque no funcionales, se incorporaran al complejo enzimático (Aragón *et al.*, 1976). Esto puede indicar que las ciclasas de C6 no com-

piten en la formación del complejo carotenogénico, ocupando su lugar las ciclasas de C5 y produciéndose por tanto acumulación de β -caroteno. La no competitividad de los núcleos de C6 en este sentido podría deberse a que no se fabrican las ciclasas.

Una hipótesis para explicar estos hechos sería que las mutaciones A y R afectan a segmentos distintos de un mismo gen. A es el segmento proximal del gen (extremo 5' del ARNm y extremo amino de la proteína), mientras que R es el segmento distal. El fenotipo AR podría obtenerse por una sola mutación que afectase a ambas funciones (principalmente terminación prematura o desfase).

Para decidir entre las hipótesis de dos genes distintos y de un gen bifuncional, esta tesis desarrolla varias líneas experimentales que enfocan el problema desde diferentes puntos de vista.

Regulación por factores ambientales

La reacción sexual incrementa la carotenogénesis (Blakeslee, 1904) a través de los ácidos trispóricos (Caglioti *et al.*, 1966; Sutter, 1977). Los heterocariontes intersexuales, es decir, los que contienen núcleos de sexo opuesto, acumulan hasta 400 ppm de β -caroteno (Murillo y Cerdá Olmedo, 1976). Sin embargo, la síntesis de licopeno no aumenta en los heterocariontes entre mutantes *carR* de sexo opuesto, a menos que alguna de las mutaciones *carR* sea rezumante y se produzca algo de β -caroteno. Esto encaja con la idea de que los ácidos trispóricos derivan del β -caroteno (Bu'Lock *et al.*, 1974).

Las interacciones sexuales y las mutaciones *carS* deben actuar independientemente en la carotenogénesis ya que los heterocariontes formados por mutantes *carS* de sexo opuesto acumulan aproximadamente 15000 ppm de β -caroteno (Murillo y Cerdá Olmedo, 1976).

Muchos agentes químicos estimulan la carotenogénesis en diferentes grados (Eslava *et al.*, 1974; Reyes *et al.*, 1964; Ninet *et al.*, 1969). Particularmente interesante es la acción de la vitamina A. La vitamina por sí misma no se convierte en carotenos, pero estimula la ruta. De esta manera, aumenta la acumulación de β -caroteno en el tipo silvestre, de licopeno en mutantes *carR* y de fitoeno en mutantes *carB* (Eslava *et al.*, 1974).

La vitamina A actúa de forma independiente de la interacción sexual y las mutaciones *carS*, ya que los heterocariontes intersexuales y los mutantes *carS* se estimulan por la vitamina A.

La mutación *car-102* hace constitutiva la acción estimuladora que en la estirpe silvestre depende de la presencia de vitamina A (Murillo y Cerdá Olmedo, 1976).

Varias estimulaciones distintas de la carotenogénesis se han reunido en un heterocarionte intersexual, que contiene las mutaciones *carS* y *car-102*, y que se estabiliza por la presencia de mutaciones letales equilibradas. La estirpe resultante acumula alrededor de 25000 ppm de β -caroteno, más de 500 veces el contenido de la estirpe silvestre en las mismas condiciones (Murillo *et al.*, 1978).

En presencia de CFTA se encuentra una fuerte inhibición de la ciclación con acumulación de licopeno y γ -caroteno, y, además, un notable aumento de la cantidad total de carotenos (Aragón, 1974; Murillo, 1975). Este aumento podría ser un efecto secundario: al inhibirse la síntesis de β -caroteno, se pierde parte de la retroinhibición de la carotenogénesis por el β -caroteno. En esta tesis se aportan nuevos datos sobre los efectos de la vitamina A y la CFTA.

La estimulación de la síntesis de carotenos por la luz ha sido investigada principalmente en *Fusarium* (Rau, 1975; Schrott y Rau, 1977), *Mycobacterium* (Batra, 1971) y *Neurospora* (Harding *et al.*, 1969; De Fabo *et al.*, 1976). La luz incrementa más de 10 veces el contenido de β -caroteno de *Phycomyces* (Garton *et al.*, 1951; Bergman *et al.*, 1973), pero el efecto de bajas dosis de luz no es fácilmente detectable, porque se acumulan cantidades considerables del pigmento en la oscuridad. Algunos mutantes defectivos en el fototropismo (gen *madB*) son parcialmente defectivos en la fotoinducción de la carotenogénesis (Bergman *et al.*, 1973), sugiriendo así el uso de un fotorreceptor común.

Mutantes insensibles a factores ambientales

La estimulación de la carotenogénesis por agentes químicos, como la vitamina A, y físicos, como la luz, depende probablemente de funciones celulares concretas. Según este razonamiento, sería posible obtener mutantes deficientes en dichas funciones celulares que serían incapaces de responder a diferentes factores ambientales.

F.J. Murillo buscó mutantes insensibles al efecto de la vitamina A, obteniendo las estirpes S119 y S120. También buscó mutantes insensibles a la acción de la CFTA, obteniendo las estirpes S142 y S144. Los primeros estudios con estas estirpes, de tipo cualitativo, pusieron de manifiesto que las cuatro estirpes eran insensibles tanto a la acción estimuladora de la vitamina A, como a las acciones inhibidora y estimuladora de la CFTA. Estos hechos sugieren la existencia de un mecanismo común de acción para la vitamina A y la CFTA. En esta tesis se ha realizado un estudio cuantitativo de estos mutantes.

También se han buscado mutantes insensibles al efecto estimulador de la luz. En este sentido, se han aislado algunas estirpes que son bastante defectivas en la fotoinducción de la carotenogénesis, pero normales en cuanto a otras respuestas a la luz, y contenido de β -caroteno en la oscuridad. El estudio de estos mutantes se está llevando a cabo en nuestro Departamento por Isabel López Díaz y sus investigaciones pueden aclarar muchos aspectos del proceso de la fotoinducción y sus relaciones con cada una de las demás vías de estimulación de la carotenogénesis.

GENETICA DE LA CAROTENOGENESIS EN OTROS MICROORGANISMOS

El color naranja característico de *Neurospora* se debe a una mezcla de varios carotenos, incluidos β -caroteno y neurosporaxantina. Se conocen mutantes de color desde hace muchos años (Haxo, 1956; Barratt, 1954), y se han utilizado en estudios de complementación y recombinación, pero su análisis genético y fenotípico se

ha realizado generalmente a nivel cualitativo. Con riesgo de extrapolación y simplificación, la situación en *Neurospora* puede asemejarse bastante a la de *Phycomyces*.

Algunos mutantes blancos, *al-2* y *al-3* no presentan ningún carotenoide (Kushwaha *et al.*, 1978). El resto de los mutantes blancos *al-1*, acumulan fitoeno o, si son rezumantes, una mezcla de fitoeno y sus derivados deshidrogenados, encontrándose fenotipos ligeramente diferentes. Las mutaciones *al-1* y *al-2* están estrechamente ligadas y casi todos los pares de mutantes con dichas mutaciones complementan (Huang, 1964; Subden y Threlkeld, 1970; Subden y Goldie, 1973). La mutación *al-3* está situada en otro cromosoma.

Los mutantes amarillos sintetizan carotenos, pero no el compuesto oxidado neurosporaxantina. Estos mutantes forman un grupo de complementación, el gen *ylo*, que no está ligado a ninguno de los anteriores.

Aunque en *Neurospora* son factibles los análisis de complementación cuantitativa (ver Fig. 1 en Davis, 1969), no han sido empleados para obtener información sobre la organización de las sucesivas reacciones de la ruta de síntesis. Análisis electroforéticos de las proteínas en este organismo han puesto de manifiesto diferencias de una banda entre la estirpe silvestre y un mutante *al-2*, interpretándose esta banda como un complejo proteínico involucrado en la carotenogénesis (Subden y Turian, 1970; Subden y Turian, 1970).

Desde hace bastantes años se están realizando estudios sobre la carotenogénesis en diferentes hongos y bacterias. También se han aislado mutantes (Bonner

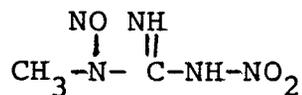
et al., 1946; Cantino y Hyatt, 1953), pero hay poca información sobre análisis genéticos. La situación en *Ustilago violacea* (Garber *et al.*, 1975) es interesante porque en algunos mutantes se encuentran productos que aparentemente no es capaz de sintetizar la estirpe silvestre. Los mutantes de carotenos de *Rhodospseudomonas capsulata* se localizan en cinco grupos, situados todos contiguos en un pequeño segmento de cromosoma. Esto suscita la posibilidad de que todos los genes de la ruta estén regulados coordinadamente en un "operón de los carotenoides" (Yeu y Marrs, 1976).

MUTAGENOS

Las peculiaridades mutacionales de la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (nitrosoguanidina) y del 2-Metoxi-6-cloro-9-(3-(etil-2-cloroetil)aminopropilamino) acridina dihidrocloruro (ICR-170) juegan un papel importante en algunos capítulos de esta tesis. En esta sección se resumen las acciones de estos mutágenos.

Mutaciones producidas por la nitrosoguanidina

La nitrosoguanidina es un agente alquilante monofuncional.



Las mutaciones causadas por la nitrosoguanidina son casi siempre revertibles por ella misma y por mutágenos que producen cambios de una base por otra, sugiriendo así que la nitrosoguanidina causa principalmente cambios de bases (Eisenstark *et al.*, 1965; Whitfield *et al.*, 1966).

Coulondre y Miller (1977) han estudiado recientemente la inducción de mutantes ámbar y ocre en el gen *lacI* de *Escherichia coli* y su reversión por varios mutágenos. Demostraron que la nitrosoguanidina induce preferentemente cambios GC \rightarrow AT, y muy pocos cambios AT \rightarrow GC. Esto ocurre tanto en la inducción de mutantes ámbar como ocre, como en su reversión. Los cambios AT \rightarrow CG, GC \rightarrow TA, AT \rightarrow TA y GC \rightarrow CG no se encontraron nunca.

Esta alta especificidad para cambios GC \rightarrow AT de la nitrosoguanidina había sido demostrada anteriormente en *Saccharomyces cerevisiae* (Prakash y Sherman, 1973) estudiando la reversión de mutantes en el gen del iso-1-citocromo c.

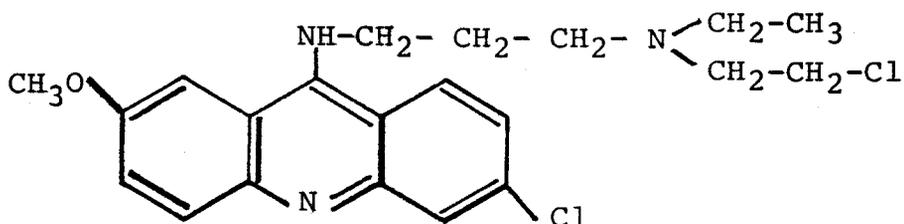
La nitrosoguanidina produce ocasionalmente mutaciones de cambio de fase, como lo demuestra el hecho de que en bacterias (Oescheger y Hartman, 1970) algunos desfases son revertidos por nitrosoguanidina. La identificación de los cambios producidos en la secuencia de aminoácidos de los revertientes demostró que la nitrosoguanidina producía delecciones de pares GC (Yournon y Heath, 1969).

Sobre la nitrosoguanidina y su mecanismo de acción se ha acumulado una considerable literatura, de la que se puede encontrar revisiones recientes (Neale,

1976; Cerdá Olmedo y Ruiz Vázquez, en prensa).

Mutaciones producidas por ICR-170

ICR-170 es un compuesto sintetizado y estudiado en el Instituto para la Investigación del Cáncer, de Filadelfia, cuya estructura completa es:



ICR-170 es un buen mutágeno para hongos (Culbertson *et al.*, 1977), mientras que otro compuesto análogo, ICR-191, es mejor mutágeno para bacterias (Ames *et al.*, 1966). Ambos mutágenos constan de un anillo derivado de la acridina, y una cadena lateral en el carbono 9, con un grupo monofuncional de mostaza nitrogenada.

Aunque el mecanismo de acción de estos mutágenos no ha sido aún clarificado, parece que ambos grupos estructurales, el anillo acridina y el grupo de mostaza nitrogenada, son necesarios para producir mutaciones (Malling, 1967).

Tanto el ICR-191 como el ICR-170 producen preferentemente desfases en el ADN, por adición o delección de bases, principalmente pares GC (Yournon y Heath, 1969; Brusick, 1972; Culbertson *et al.*, 1977). Estas mutaciones generalmente sólo son revertidas espontáneamente o por los mismos mutágenos.

Sobre estos compuestos y el tipo de mutaciones que producen existe una abundante literatura, así como algunas revisiones (Roth, 1974).

MATERIALES Y METODOS

ESTIRPES

Las estirpes de *Phycomyces blakesleeanus* empleadas en este trabajo se indican en la Tabla 1. Se designan de acuerdo con la nomenclatura genética propuesta por Demerec *et al.* (1966). Las estirpes se designan con una letra mayúscula según el laboratorio de donde fueron obtenidas: C, California Institute of Technology, Pasadena; S, Universidad de Sevilla; B, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin. Junto a cada estirpe se expresa el tipo sexual, (+) ó (-), a que pertenece, y en el caso de mutantes, las diferencias genéticas conocidas respecto al tipo silvestre: las mutaciones que afectan a la síntesis de carotenoides se designan con las letras *car*; a las respuestas fototrópicas, *mad*; a la síntesis de ácido nicotínico, *nic*. El origen de cada estirpe se indica dando la estirpe original y el mutágeno utilizado (NG = tras mutagénesis con nitrosoguanidina, ICR = tras mutagénesis con ICR-170) o el cruzamiento del que deriva.

Los heterocariontes utilizados en este trabajo se indican en la Tabla 2. El asterisco separa los dos tipos de núcleos presentes en el micelio. Los heterocariontes han sido obtenidos utilizando el método desarrollado por Ootaki (1973).

TABLA 1. *Estirpes de Phycomyces utilizadas en esta tesis*

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Notas</u>
NRRL1555	(-)	Silvestre, colección de Northern Regional Research Lab., Peoria, Ill. USA.
B141	(+)	Silvestre, isogénica con NRRL1555. Obtenida por A. P. Eslava.
B142	(+)	Idem.
C2	carA5 (-)	Blanco, de NRRL1555, NG
C6	carAR12 mad-48 (-)	Blanco, de NRRL1555, NG
C9	carR21 (-)	Rojo, de NRRL1555, NG
C115	carS42 mad-107 (-)	Superamarillo, de NRRL1555, NG
C171	carA30 carR21 (-)	Blanco, de C9, NG
C242	carA5 nicA101 (+)	Del cruce C170 x S102
S102	nicA101 (-)	De NRRL1555, NG
S104	carS42 carAR115 mad-107 (-)	Blanco, de C115, NG
S119	car-113 (-)	Insensible a vitamina A, de NRRL1555, NG
S120	car-114 (-)	Insensible a vitamina A, de NRRL1555, NG
S124	carS42 car-119 mad-107 (-)	Blanco, de C115, ICR
S125	carS42 car-119 mad-107 (-)	Blanco, de C115, ICR
S142	car-129 (-)	Insensible a CFTA, de NRRL1555, NG
S144	car-131 (-)	Insensible a CFTA, de NRRL1555, NG
S160	carS42 carAR115 car-136 mad-107 (-)	Amarillo, de S104, NG
S162	carS42 carAR115 car-138 mad-107 (-)	Amarillo, de S104, NG
S165	carS42 carAR115 car-141 mad-107 (-)	Rojo, de S104, NG

TABLA 2. *Estirpes heterocariontes de Phycomyces utilizadas en esta tesis*

<i>Heterocarionte</i>	<i>Genotipo</i>
<i>C2 * C9</i>	<i>carA5 (-) * carR21 (-)</i>
<i>C6 * NRRL1555</i>	<i>carAR12. mad-48 (-) * (-)</i>
<i>C9 * S102</i>	<i>carR21 (-) * nicA101 (-)</i>
<i>S165 * S102</i>	<i>car-141 carAR115 carS42 mad-107 (-) * nicA101 (-)</i>

METODOS DE CULTIVO

Medios de crecimiento

El medio empleado para los cultivos fue el medio GAEL. Por cada litro contiene: 30 g de D(+)glucosa, 2 g de L-asparagina.H₂O, 0,5 g de SO₄Mg.7H₂O, 1,5 g de PO₄H₂K, 0,25 mg de tiamina-HCl y 1 g de extracto de levadura (Difco). Para cultivo sólido se añaden 10 g de agar Analema. La tiamina se esteriliza separadamente por filtración. El resto del medio se autoclava, y antes de extenderlo en cajas se le añade la tiamina. Se han utilizado las dos variantes siguientes de este medio: el medio GA, que carece de extracto de levadura, se emplea como medio mínimo en cultivos destinados a los análisis cuantitativos; el medio GAELA, que es el medio GAEL suplementado con ClH 1N, después del auto-

clavado, hasta un pH de 3.3, permite un crecimiento colonial.

En los cruzamientos sexuales se utilizó otro medio, el agar patata, que permite obtener un mayor número de zigosporas. También se usó en los cultivos destinados a obtener esporangióforos para la formación de heterocariontes, ya que los esporangióforos son más robustos y escasos, lo que facilita su manipulación. Para preparar este medio, se trocean 200 g de patatas peladas y se hierven durante 1 hora en un litro de agua; se filtra, se añaden al líquido filtrado 20 g de glucosa y 10 g de agar y se completa hasta un litro si fuera preciso. Después de autoclavado se le añade la tiamina de la misma forma que para el medio GAEL.

En algunos casos los medios de cultivo se han suplementado con productos químicos:

2(4-clorofeniltio)trietilamina-HCl, que se indica en adelante como CFTA. Ha sido proporcionado por el Dr. Henry Yokoyama, del Fruit and Vegetable Chemistry Laboratory, Pasadena (California). Se añadió a los cultivos en solución acuosa, esterilizada por filtración, en las concentraciones deseadas.

Vitamina A. El acetato de retinol (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) se disolvió en etanol, se emulsificó con dimetilsulfóxido (DMSO), vaselina y monooleato de polioxietilensorbitano ("Tween-80") y se añadió al medio en las concentraciones deseadas, antes de verterlo a cajas de Petri. Los medios contenían así 0,5% vaselina, 0,5% "Tween-80", 0,1% etanol y 0,1% DMSO. Aunque no se especifique, todos los medios a los que se añá-

dieron vitamina A o agentes emulsificantes contenían 0,1% etanol. Para evitar la descomposición de la vitamina A por la luz, los medios que la contienen se usan enseguida.

Inoculación

Se han empleado dos formas diferentes de inoculación de los medios de cultivo. En algunos casos los cultivos se inocularon con esporas vegetativas, previamente activadas por calentamiento a 48°C durante 15 minutos (Rudolph, 1960). Las esporas empleadas en las inoculaciones se pueden contar usando una cámara Thomas o Petroff-Hauser.

En otros casos los cultivos se iniciaron con un pequeño trozo de micelio (unos 2 mm²) obtenido de un cultivo previo. El trozo de micelio se deposita en el centro de la caja con la ayuda de unas pinzas.

Condiciones de cultivo

Los cultivos se incubaron a temperatura constante de 22° - 23°C. Los cultivos destinados a análisis químico se mantuvieron en completa oscuridad y los cultivos destinados a observaciones o recolección de esporas se mantuvieron en una cámara normalmente iluminada.

Los cultivos de los cruzamientos sexuales se mantuvieron a 15° - 16°C durante los primeros quince días, hasta la formación de zigosporas, y después se mantuvieron a 22° - 23°C, hasta su germinación.

Recolección de esporas

Se cultivó el tipo deseado durante 6 - 7 días en cajas Petri en medio GAEL. A partir del tercer día empiezan a aparecer los esporangióforos, cada uno de los cuales origina el esporangio que contiene miles de esporas. A partir del tercer o cuarto día los esporangios empiezan a tropezar con la tapa de la caja, quedando pegados muchos de ellos. Las esporas se recolectan lavando esta tapa con 5 ml de agua estéril y rompiendo los esporangios con un esparcidor. Una vez recogidas, se lavan dos veces por centrifugación a 2000 - 3000 rpm durante 3 minutos. Las esporas se conservaron en solución acuosa en un refrigerador, donde sobreviven varios meses.

OBTENCION DE HETEROCARIONTES

Para obtener los heterocariontes utilizados en este trabajo se siguió el método de Ootaki (1973): dos bloques de agar, de alrededor de 1 cm de lado, se colocaron enfrentados sobre un portaobjetos. Sobre cada uno de estos bloques se coloca un esporangióforo joven, sin esporangio, de las estirpes que deben formar el heterocariontes. Con ayuda de una tijeras especiales (Micro Dissecting Scissors, Clay Adams, Parsippany) se cortaron las puntas de cada uno de los esporangióforos, procurando que la sección de uno de ellos resultara mayor que la del otro. Se maniobran los dos bloques de agar hasta lograr introducir uno de los esporangióforos en el otro, por sus extremos cortados, haciendo que penetre aproximadamente un milímetro. Esta operación final se realizó bajo un binocular.

Alrededor de 24 horas después, surgen uno o varios esporangióforos en el lugar del injerto. En ese momento se comprueba si había o no fusión entre los dos esporangióforos, intentando separarlos suavemente.

Se siembran en agar GAELA las esporas procedentes de los esporangios regenerados. El crecimiento colonial en este medio permite comprobar fácilmente, por la heterogeneidad de los micelios aparecidos, si se ha obtenido el heterocarionte deseado.

ANALISIS QUIMICO

Los análisis químicos para la determinación del contenido en carotenoides se realizaron siguiendo métodos similares a los descritos por Britton y Goodwin (1971) y De la Guardia *et al.* (1971).

Extracción

Los micelios se separan del medio de cultivo al término del periodo de incubación, se limpian cuidadosamente de agar con ayuda de una espátula, se secan repetidamente con papel absorbente y se cortan en pequeños trozos. Una parte, aproximadamente la cuarta parte del total, se emplea para determinar la proporción de materia seca, por desecación a 105°C durante una hora.

El resto se mezcla con 20 ml de éter de petróleo (punto de ebullición 50° - 70°C) y 20 ml de etanol. Se bate durante tres minutos en una batidora Sorvall Omni-Mixer y se recoge la capa sobrenadante de éter de petró-

leo, donde se encuentran disueltos los carotenoides. Al resto se le añaden otros 20 ml de éter de petróleo, repitiéndose la operación hasta tres veces. La fracción de metanol, más densa que la de éter de petróleo, queda en el fondo, y contiene los restos de micelio y la mayoría de los fosfolípidos y del ergosterol. Todas las operaciones de batido se hacen en ausencia de luz y a baja temperatura, para evitar en lo posible la oxidación de los carotenoides.

Las distintas fracciones de éter de petróleo se mezclan finalmente y se evaporan empleando un rotoevaporador (Gallemkamp EU100, Inglaterra) conectado a una bomba de vacío (Millipore Corporation, Bedford, Mass., USA).

Separación cromatográfica

La separación previa de los carotenos se hace en una columna preparada con 10 g de alúmina neutra o básica (desactivada hasta el grado III, según Brockman, por adición de 0,6 ml de agua destilada). La columna se eluye añadiendo éter de petróleo hasta la desaparición del color en las fracciones recogidas. El eluido de la columna se concentra por desecación hasta un volumen aproximado de 1 ml y se vierte lo más rápidamente posible en la columna separadora. Este paso previo separa los carotenoides de muchas impurezas, en especial del ergosterol, compuesto abundante en *Phycomyces*, y que absorbe a longitudes de onda similares a las del fitoeno. La columna separadora, de unos 20 mm de diámetro, contiene pesos iguales de óxido de magnesio y tierra de diatomeas, previamente activados por

separado, calentándolos a 180°C durante 4 horas. Los dos componentes se suspenden, antes de verterlos en la columna, en éter de petróleo con el fin de obtener una columna suave y continua, sin poros ni huecos, y con una altura de 15 cm aproximadamente.

Para la elución de la columna se utiliza en primer lugar éter de petróleo que eluye sucesivamente fitoeno y fitoflueno luego se añaden concentraciones crecientes de acetona en éter de petróleo, eluyéndose β -caroteno (1% de acetona), ζ -caroteno (2% de acetona) y γ -caroteno (5% de acetona). Finalmente el licopeno se eluye con 10% de etanol en éter de petróleo.

La columna se mantiene protegida de la luz durante todo el proceso.

Las distintas fracciones se secan completamente en el rotoevaporador y se redisuelven en un volumen medido de n-hexano para obtener su espectro de absorción.

Identificación y cuantificación

Los espectros de absorción de las distintas fracciones procedentes de la separación cromatográfica se registraron en un espectrofotómetro Beckman modelo Acta CIII.

El criterio seguido para la identificación de los carotenoides fue el de la comparación de sus espectros de absorción con los ya publicados (Goodwin, 1952; Davies, 1965).

Las concentraciones de los carotenoides se calcularon a partir de sus coeficientes de absorción (Tomes, 1963) y se refirieron al peso seco de los micelios de los que fueron extraídos.

Los espectros, así como las propiedades cromatográficas coincidieron perfectamente con los publicados.

MARCADO RADIOACTIVO

La lactosa del ácido DL-(2-¹⁴C)mevalónico (The Radiochemical Centre, Amersham, Inglaterra) se mezcló con mevalonato no radioactivo en las proporciones deseadas y se añadió al medio de cultivo ya autoclavado, antes de extenderlos en cajas. Para determinar la radioactividad, la solución de β -caroteno purificado se colocó en viales, se desecó en atmósfera de N₂, se disolvió en 10 ml de tolueno que contenía 30 mg de 2,5-difeniloxazol y se contó en un contador de centelleo Unilux II-A.

CRUZAMIENTOS

En cajas con agar patata se inocularon dos trozos pequeños de micelio (unos 2 mm²), uno de cada tipo sexual que se deseaba cruzar, y se incubaron durante 15 días a 15° - 16°C, en condiciones normales de iluminación. A los tres días de inoculados los micelios, los frentes de crecimiento de ambos se encontraron aproximadamente en el centro de la caja y comenzaron a formar las estructuras sexuales. A los 5 - 6 días aparecían

las primeras zigosporas. A los 15 días las cajas se colocan a 22° - 23°C y permanecen aquí hasta su germinación. Normalmente se utilizaron 10 - 15 cajas para cada cruzamiento y se recogieron en total entre 200 y 1000 zigosporas. A los 60 - 80 días las zigosporas se recogieron con ayuda de pinzas estériles, y se lavaron con abundante agua sobre una rejilla metálica para eliminar impurezas. Una vez bien limpias se colocaron en grandes cajas de plástico, y sobre papel de filtro, continuamente humedecido. Las cajas con las zigosporas se mantienen a 22° - 23°C y con luz normal.

Cuando las zigosporas empezaron a germinar, los germoesporangios se recogieron con pinzas estériles y mediante una presión adecuada con las pinzas se liberaron las germoesporas que se fueron guardando en tubos con 1 ml de agua estéril. Cuando los tubos contenían las germoesporas procedentes de unos 100 germoesporangios, se procedió al análisis de su contenido. Para ello, se sembraron en medio GAELA, que permite el crecimiento colonial de los micelios producidos por las distintas germoesporas.

MUTAGENESIS

Mutagénesis con nitrosoguanidina

El procedimiento seguido en los experimentos de mutagénesis con nitrosoguanidina, un poderoso agente mutagénico y cancerígeno, ha sido semejante al empleado por otros autores en este mismo organismo (Cerdá Olmedo y Reau, 1970; Ootaki *et al.*, 1973, y otros).

La nitrosoguanidina se obtuvo de Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA.

Ya que las soluciones de NG son inestables, especialmente en presencia de la luz, se conservaron en congelador a -20°C en tubos que contenían 0,5 ml de solución a una concentración de 1 mg/ml. Inmediatamente antes de su uso, se descongeló un tubo a temperatura ambiente. Una vez usado se desechó el resto de la solución.

El tampón usado en los tratamientos fue citrato-fosfato pH 7,5, preparado según Gomori (1955).

Alrededor de 10^6 esporas del tipo deseado se resuspendieron en 0,9 ml del tampón citrato-fosfato y se activaron por calentamiento a 48°C durante 15 minutos. A continuación se añadió a la suspensión de esporas 0,1 ml de la solución concentrada de NG, consiguiéndose así una concentración final del mutágeno de 0,1 mg por ml. La suspensión se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, agitándola a intervalos, para evitar la sedimentación de las esporas. A continuación se centrifugó la suspensión, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 5 ml de agua destilada estéril, para resuspender nuevamente las esporas. Se volvió a centrifugar y se repitió la operación dos veces, para asegurar la eliminación del mutágeno. Después del último lavado las esporas se resuspendieron en un volumen adecuado de agua destilada estéril, considerando que la supervivencia a este tratamiento suele ser del orden del 1 al 5% de las esporas tratadas. Este parámetro se precisó en cada caso tomando muestras de las esporas antes y después del tratamiento e inoculándolas, tras la dilución apropiada, en agar GAELA.

El reconocimiento de los mutantes de color se hizo por simple observación de los micelios coloniales aparecidos después de 3 - 4 días de incubación de las cajas inoculadas con las esporas mutagenizadas. Aquellas colonias que presentaban el cambio de color deseado, se trasplantaron a cajas con agar GAEL, se cosecharon sus esporas y se purificaron por siembra en agar GAELA.

Mutagénesis con ICR-170

Alrededor de 10^6 esporas del tipo deseado se re-suspendieron en 0,9 ml de agua destilada estéril y se activaron por calentamiento a 48°C durante 15 minutos. A continuación se añadió a la suspensión de esporas 0,1 ml de una solución acuosa de ICR-170 de forma que la concentración final del mutágeno fuese de 20 μg por ml. El ICR-170 fue amablemente donado por R.M. Peck, Institute for Cancer Research, Philadelphia. La solución de ICR-170 se preparó inmediatamente antes de realizar el experimento. Una vez añadido el mutágeno, la solución se mantuvo a temperatura ambiente, en completa oscuridad, y durante cuatro horas en continua agitación suave. A continuación se centrifugó y se lavaron las esporas repitiendo la operación tres veces. A partir de aquí, el procedimiento que se siguió fue semejante al descrito para la mutagénesis con nitrosoguanidina.

RESULTADOS Y DISCUSION

ANALISIS GENETICO

La hipótesis del gen bifuncional, propuesta en la Introducción, predice que los fenotipos AR se deben a una sola mutación y que las mutaciones responsables de los fenotipos A, R y AR afectan al mismo gen.

Análisis genético del fenotipo AR

Para determinar si el fenotipo AR se debe a una o dos mutaciones, se cruzó una estirpe AR, de color blanco, obtenida tras un solo tratamiento mutagénico, y una estirpe silvestre, de color amarillo. Si el fenotipo AR se debiera a dos mutaciones distintas, *carA* y *carR*, se podrían obtener recombinantes *carA*, que serían blancos, y *carR*, que serían rojos. Los recombinantes blancos se distinguirían de los parentales por volverse amarillos en presencia de vitamina A.

Como las estirpes AR son impotentes para formar zigosporas, se construyó el heterocarionte entre la estirpe C6, de fenotipo AR, y la estirpe silvestre NRRL1555. El heterocarionte se cruzó con las estirpes B141 y B142, de fenotipo silvestre e isogénicas con NRRL1555.

Las zigosporas comenzaron a germinar a los 100 días, aproximadamente, desde la iniciación del cruzamiento. Se estudiaron aisladamente algunos germoespo-

rangios y se encontró que prácticamente todos contenían germoesporas viables. La Tabla 3 da los resultados del análisis masal de las germoesporas. En ningún caso se observaron recombinantes, o sea, colonias rojas ni blancas activables por vitamina A. En el cruzamiento número 3 se sembraron, además, $2,82 \times 10^6$ germoesporas a una densidad de 30000 germoesporas por caja, densidad a la que se deberían poder distinguir colonias rojas, si existieran. Tampoco se encontró ninguna colonia roja. Concluimos, por tanto, no haber encontrado recombinantes en estos cruzamientos.

TABLA 3. Análisis genético del fenotipo AR

Cruzamiento 1: B141 x (C6 * NRRL1555)

Cruzamiento 2: B142 x (C6 * NRRL1555)

Cruzamiento 3: B142 x (C6 * NRRL1555)

	1	2	3
Germoesporangios estudiados	50	50	617
Germoesporas estudiadas	1584	815	2820
<i>Proporciones:</i>			
amarillas	0,696	0,54	0,868
blancas fenotipo A	0,00	0,00	0,00
blancas fenotipo AR	0,304	0,46	0,132
rojas	0,00	0,00	0,00
Proporción de cruces en que intervino C6	0,6	0,92	0,264
Número de meiosis en que intervino C6	30	46	163

El heterocarionte podría dar lugar a dos tipos de cruzamientos, según intervenga el núcleo silvestre, produciendo progenie íntegramente amarilla, o el núcleo C6, produciendo progenie blanca y amarilla, en proporciones presuntamente iguales. La proporción de cruzamientos en los que intervino el núcleo C6 se puede estimar, por consiguiente, como el doble de la proporción de progenie blanca, y aparece indicada en la tabla. Como cada cruzamiento contiene usualmente la progenie de una sola meiosis, estimamos haber observado la progenie de 239 meiosis en las que intervinieron núcleos C6. No habiendo encontrado recombinantes, podemos concluir con probabilidad mayor del 95% que la frecuencia de recombinación es menor de 1,5% (Spiegel, 1969).

Por tanto, el fenotipo AR se debe a una sola mutación o a dos mutaciones que se encuentran estrechamente ligadas en un cromosoma.

Cruzamiento entre estirpes de los fenotipos A y R

Si los fenotipos A y R se deben a mutaciones distintas de un mismo gen, la producción de recombinantes deberá tener lugar con frecuencia nula o muy escasa. Al cruzar estirpes de fenotipos A (blancos) y R (rojos) se podría obtener por recombinación tipos silvestres amarillos y dobles mutantes, presumiblemente de fenotipo AR.

De nuevo se plantea el problema de que el fenotipo R implica impotencia para la producción de zigosporas. Como en el caso anterior, este inconveniente se

puede resolver utilizando un heterocarionte, pero existe la dificultad adicional de que la estirpe ayudadora silvestre daría abundante progenie amarilla, que se podría confundir con los recombinantes amarillos esperados. Se construyó el heterocarionte entre las estirpes C9, de fenotipo R, y S102, amarilla y auxótrofa para el ácido nicotínico. Este heterocarionte se cruzó con la estirpe C242, de fenotipo A y auxótrofa para el ácido nicotínico. La auxotrofia se debe en ambos casos a la misma mutación, que ha sido objeto de numerosas investigaciones en nuestro Departamento y es notablemente estable ya que nunca se ha detectado reversión espontánea. La progenie del cruzamiento C242 por S102 será toda auxótrofa y la eliminaremos sembrando las germo esporas en medio mínimo.

Las zigosporas comenzaron a germinar a los 100 días aproximadamente desde el comienzo del cruzamiento. La Tabla 4 da los resultados de los análisis masales de la progenie. No se encontró ningún recombinante. Aunque no se han incluido en la tabla, aproximadamente el 0,5% de las colonias protótrofas de la progenie tenían color amarillo o amarillento; sembradas sus esporas en medio ácido, resultaron en todos los casos ser heterocariontes de blanco y rojo o blanco y amarillo auxótrofo, es decir, que tampoco contenían recombinantes entre sus componentes.

La viabilidad de las germo esporas mejora notablemente en medio nutritivo, respecto al medio mínimo con ácido nicotínico. Debe ser un efecto inespecífico de la mejor alimentación, ya que no hay mutaciones auxotróficas que los justifiquen.

TABLA 4. Cruzamientos entre estirpes de los fenotipos A y R.
1 y 2 representan diferentes proporciones nucleares
de C9 en el cruzamiento (C9 * S102) x C242

	<u>1</u>	<u>2</u>
Germoesporangios estudiados	660	343
Germoesporas viables:		
en medio nutritivo	$7,7 \times 10^4$	$1,37 \times 10^4$
en medio mínimo con ácido nicotínico	$2,16 \times 10^4$	$6,37 \times 10^4$
en medio mínimo sin ácido nicotínico	$2,1 \times 10^3$	$2,33 \times 10^4$
Progenie estudiada ^a	1518	642
amarillas	0,46	0,24
blancas fenotipo A	0,38	0,47
blancas fenotipo AR	0,00	0,00
rojas	0,16	0,29
Progenie protótrofa estudiada ^b	951	714
amarillas	0,00	0,00
blancas fenotipo A	0,53	0,485
blancas fenotipo AR	0,00	0,00
rojas	0,47	0,515
Proporción ^c de cruces en que intervino C9	0,19	0,73
Proporción de meiosis en que intervino C9	125	250

^aColonias producidas por germoesporas en medio mínimo con ácido nicotínico.

^bColonias producidas por germoesporas en medio mínimo.

^cEstimada como el doble de la proporción de protótrofos (cociente de viabilidad en medio mínimo a viabilidad en medio mínimo más ácido nicotínico).

La proporción de cruzamientos en que intervino el componente C9 del heterocarionte puede estimarse como el doble de la proporción de progenie protótrofa y aparece indicado en la tabla. Hay otras posibles estimaciones, pero ésta nos parece la mejor, porque la mutación *nicA101* produce auxotrofia, sin otros efectos fenotípicos secundarios conocidos. En total estimamos haber estudiado los productos de 375 meiosis diferentes del cruzamiento C9 por C242. Concluimos que, con probabilidad mayor del 95%, la frecuencia de recombinación entre mutaciones responsables de los fenotipos A y R es de menos de 1%.

Discusión del análisis genético

Los resultados del análisis genético del fenotipo AR demuestran que éste es debido a una sola mutación o a dos mutaciones que están estrechamente ligadas, ya que no se encuentran recombinantes de fenotipo A o de fenotipo R.

Los cruzamientos entre estirpes de fenotipo A y de fenotipo R demuestran igualmente que las mutaciones responsables están estrechamente ligadas, ya que no se encuentra ningún recombinante amarillo.

Estos resultados son compatibles con la hipótesis de la existencia de un solo gen con dos segmentos, correspondientes a las funciones A y R, pero no excluyen totalmente la posibilidad de que sean dos genes vecinos, difícilmente separables por recombinación. Esta posibilidad es debilitada por dos tipos de consideraciones adicionales:

En cruzamientos entre dos mutantes distintos del gen *nicA* de *Phycomyces* (Eslava *et al.*, 1974) se encontraron recombinantes estudiando un número total de meiosis menor que el que se ha estudiado en esta tesis.

Además, no es probable que dos genes que afectan al mismo proceso se encuentren próximos en el genomio de *Phycomyces*. En procariontes los genes que determinan una ruta metabólica están, muchas veces, estrechamente ligados en el cromosoma, formando operones. En eucariontes los genes relacionados a nivel funcional suelen estar dispersos por el genomio y no se conocen casos de mensajeros poligénicos ni de operones. En *Phycomyces* los genes que determinan el comportamiento fototrópico se encuentran todos distantes unos de otros (Eslava *et al.*, 1976). Un caso de presunto ligamiento, la región *his4* de *Saccharomyces cerevisiae* (Fink, 1966), ha resultado ser en realidad un solo gen con tres segmentos funcionales distintos (Fink *et al.*, resultados no publicados). Con muy escasa probabilidad de error, las mutaciones estrechamente ligadas y funcionalmente relacionadas se pueden atribuir al mismo gen.

Por tanto, los resultados de los análisis genéticos sugieren por sí solos que las mutaciones que determinan los fenotipos A y R afectan a un mismo gen.

INDUCCION DE MUTANTES DE COLOR

La hipótesis del gen bifuncional permite predecir los fenotipos que se pueden encontrar según los cambios que se produzcan en el ADN. La Fig. 4 esquematiza los cambios posibles y los fenotipos esperados.

Consideremos dos tipos de mutaciones cuya frecuencia se puede aumentar con mutágenos: sustituciones de bases y desfases. Las sustituciones de bases pueden tener dos consecuencias distintas. Si la sustitución lleva consigo el reemplazamiento de un aminoácido por otro, se obtendría un polipéptido diferente. Si el reemplazamiento acarrearía pérdida de función, se obtendrían mutantes de fenotipo A o de fenotipo R, según el segmento afectado. Estos resultados se esperarían tanto en la hipótesis del gen bifuncional, como en la hipótesis de dos genes distintos.

Las sustituciones de bases pueden dar lugar, también, a un triplete terminador, con lo que se origina una terminación prematura de la síntesis de la proteína. Las terminaciones prematuras llevan consigo, generalmente, la pérdida de actividad proteínica. En la hipótesis del gen bifuncional, este tipo de sustitución originaría mutantes de fenotipo AR, si la terminación tiene lugar en el segmento A, y mutantes de fenotipo R si tiene lugar en el segmento R.

En la hipótesis del gen bifuncional, las sustituciones de bases originarían, por tanto, los tres fenotipos: A, R y AR.

SUSTITUCIONES

DESFASES

cambio de sentido terminacion prematura

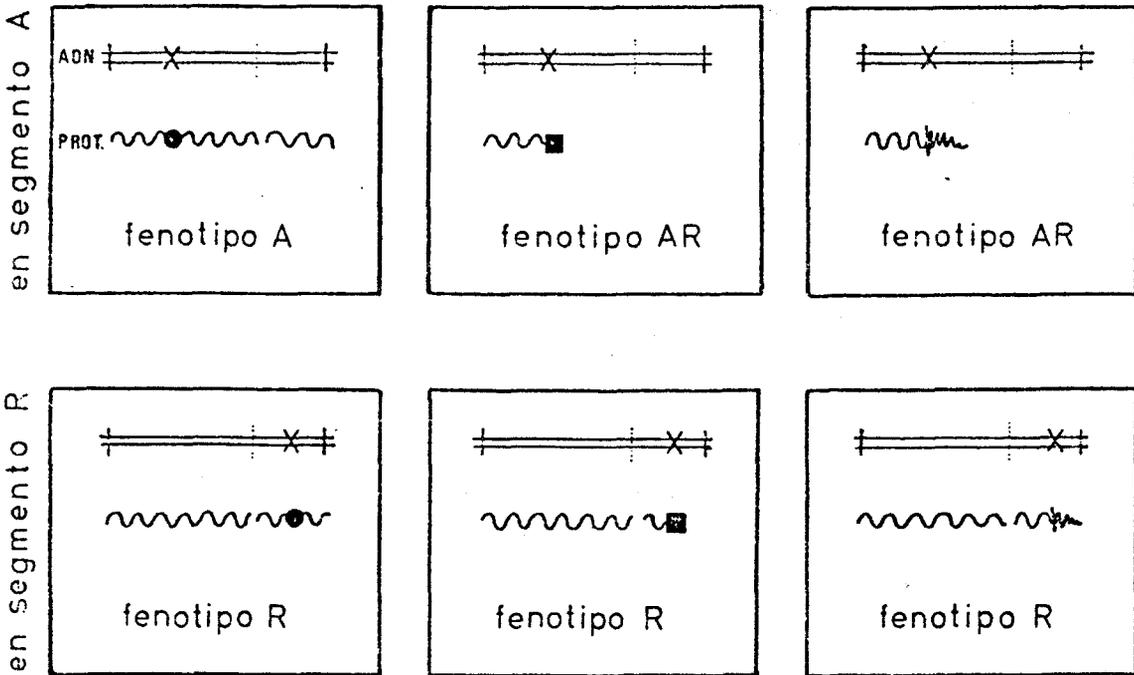


Figura 4. Esquema propuesto para el gen bifuncional, con los tipos de mutaciones posibles y los fenotipos que determinan. El segmento proximal, y de mayor longitud, en el ADN indica el segmento A, y corresponde en la proteína al extremo amino. El segmento distal en el ADN corresponde al segmento R. X indica la mutación: ● sustitución de un aminoácido por otro, ■ terminación prematura y [scribble] cambio de secuencia con terminación prematura.

Los desfases, al añadir o quitar bases, originan un cambio en la fase de lectura de los tripletes en el ADN. Esto tiene como consecuencia la síntesis de un polipéptido totalmente distinto a partir del lugar de la mutación y carente de actividad.

En la hipótesis del gen bifuncional los desfases en el segmento A afectarían también a la lectura del segmento R, originando así mutantes de fenotipo AR. Si el cambio se produce en el segmento R, se originarían mutantes de fenotipo R.

En la hipótesis de dos genes distintos, las mutaciones en A producirían sólo mutantes de fenotipo A, y lo mismo con R, ya fueran sustituciones o desfases. La producción de un mutante de fenotipo AR requeriría una mutación en cada gen.

La utilización de mutágenos que produzcan los dos tipos de cambios, y el estudio de los fenotipos que se obtienen, constituirían una discriminación poderosa y original entre las dos hipótesis.

Aunque los mutágenos disponibles no son totalmente específicos, se sabe que la nitrosoguanidina induce sobre todo sustituciones, y que el ICR-170 induce fundamentalmente desfases. Por consiguiente, decidimos investigar los fenotipos inducidos por ambos mutágenos.

Nitrosoguanidina

La primera columna de la Tabla 5 indica los fenotipos de mutantes encontrados tras 10 tratamientos inde-

pendientes de esporas NRRL1555 con nitrosoguanidina. En total se estudiaron unos $4,7 \times 10^6$ micelios procedentes de esporas tratadas, sembrados a razón de unos 20000 micelios por caja.

TABLA 5. Búsqueda de mutantes de color en las estirpes NRRL1555 y C115

Mutágeno empleado	NG		ICR	
	NRRL1555	C115	NRRL1555	C115
Estirpe estudiada				
Supervivientes estudiados (millones)	4,7	0,15	0,84	0,3
Fenotipos encontrados:				
A	14	5	0	0
AR	4	1	3	2
R	3	0	0	0

Además de los mutantes reseñados en la tabla se encontraron varios mutantes morfológicos interesantes para otras investigaciones y mutantes amarillos que acumulan cantidades de β -caroteno distintas de la del silvestre, desde unas tres veces menos hasta unas cuarenta veces más.

Muchos de los mutantes A, AR y R se encontraban en heterocariosis en forma de micelios blanquecinos, amarillos claros o rojizos. Parte de las esporas de estos heterocariontes formaban micelios blancos o rojos, que se purificaron. Este hecho dificulta la cuantificación de los mutantes encontrados, ya que algunos micelios heterocarióticos pudieron pasar indetectados.

La tabla 5 incluye también los mutantes de color obtenidos por F.J. Murillo en la estirpe C115, superproductora de β -caroteno, en el curso de sus estudios sobre regulación de la carotenogénesis.

ICR-170

La tercera columna de la tabla 5 indica los fenotipos de mutantes encontrados tras 10 tratamientos independientes de esporas NRRL1555 con ICR-170. En total se estudiaron $8,4 \times 10^5$ micelios procedentes de esporas tratadas, sembradas a razón de unos 5000 micelios por caja.

También se incluyen en esta tabla los datos correspondientes a la mutagénesis con ICR-170 de la estirpe C115, realizadas por F.J. Murillo.

Discusión de la inducción de mutantes de color

La hipótesis del gen bifuncional se ve plenamente confirmada por los tipos de mutantes obtenidos tras tratamientos con nitrosoguanidina e ICR-170.

La nitrosoguanidina, de acuerdo con los resultados, induce sobre todo sustituciones de bases, ya que se encuentran los tres tipos de mutantes esperados: A, R y AR. No se descarta que algunos de los mutantes R y AR se deban a desfases. Los mutantes que se encuentran mayoritariamente son los de fenotipo A (por sustitución de aminoácidos).

Con ICR-170 sólo se encuentran mutantes de fenotipo AR, que según la hipótesis del gen bifuncional, se deban a desfases. Es particularmente interesante que los fenotipos A, los más abundantes con nitrosoguanidina, no se hayan encontrado con ICR-170. Este resultado no tiene justificación posible en la hipótesis de dos genes diferentes.

Los resultados sugieren, además, que A es el segmento proximal del gen (extremo 5' del ARN mensajero y extremo amino de la proteína), mientras que R es el segmento distal, como hemos supuesto en la Fig. 4. En efecto, en este caso los fenotipos A y AR se originará por mutaciones en el segmento A y el fenotipo R, por mutaciones en el segmento R.

El número total de mutantes con fenotipo A y AR se puede considerar como el tamaño mutacional del segmento A, y el número de mutantes con fenotipo R, como el del segmento R. Con nitrosoguanidina los tamaños mutacionales de los segmentos proximal y distal están en la proporción 24:3; con ICR-170, 5:0. Estas proporciones no son significativamente diferentes.

La hipótesis alternativa de que R sea el segmento proximal y A el distal lleva a tamaños mutacionales

relativos de 8:19 para la nitrosoguanidina y 5:0 para el ICR-170. La clara diferencia entre estas proporciones exigiría la implausible condición adicional de que el segmento terminal, el mayor en sensibilidad a nitrosoguanidina, no sea sensible a ICR-170.

Los resultados obtenidos inducen a pensar que el segmento A es considerablemente mayor que el segmento R, al menos en cuanto a susceptibilidad a mutación. El esquema de la figura 4 ha tenido en cuenta esta diferencia de tamaño.

En resumen, los resultados apoyan fuertemente la hipótesis del gen bifuncional y sugieren que A sea el segmento proximal y R el distal.

REVERSION DE LOS MUTANTES DE COLOR

La reversión de los fenotipos A y AR puede contribuir información adicional sobre la naturaleza de las mutaciones correspondientes. Los desfases no pueden revertir mutaciones por sustitución ni las sustituciones pueden revertir mutaciones por desfase. Por consiguiente, estudiamos la reversión por nitrosoguanidina e ICR-170 de varios mutantes de fenotipo A y AR.

Reversión del fenotipo A

Se mutagenizó la estirpe C2, portadora de una mutación de fenotipo A, con los mutágenos ICR-170 y nitrosoguanidina. Los resultados de estos experimentos se detallan en la Tabla 6. Como puede verse, la estirpe

TABLA 6. Búsqueda de revertientes de mutantes blancos

Estirpe tratada Su fenotipo	C2		C171	C6		S104	S124		S125	
	A		AR	AR		AR	AR		AR	
Mutágeno empleado	NG	ICR	NG	NG	ICR	NG	NG	ICR	NG	ICR
Supervivientes estudiados (millones)	0,42	0,82	0,16	0,154	2,46	0,24	0,18	0,56	0,093	0,78
Fenotipos encontrados:										
Silvestre (amarillo)	12	0	0	0	0	3	0	0	0	0
R (rojo)	0	0	65	7	0	13	0	0	0	0

C2 revierte a fenotipo silvestre (amarillo) con una frecuencia relativamente alta, cuando se trata con nitrosoguanidina pero no ocurre esto cuando el mutágeno empleado es el ICR-170. La estirpe C2 fue obtenida por tratamiento con nitrosoguanidina de la estirpe silvestre NRRL1555.

Reversión del fenotipo AR

Las estirpes con fenotipo AR pueden obtenerse de dos formas: tras un solo tratamiento mutagénico de una estirpe silvestre, o tras dos tratamientos mutagénicos, aislando un fenotipo A o R como paso intermedio.

La estirpe C171 fue obtenida por mutagénesis con nitrosoguanidina de una estirpe de fenotipo R. Debe contener, por tanto, dos mutaciones distintas que afecten a la carotenogénesis. Los resultados de los experimentos de reversión con esta estirpe se resumen en la tabla 6. Todos los revertientes son rojos; casi todos presentan un color rojo menos intenso que el de la estirpe original C9, es decir, que las mutaciones de reversión no proporcionan una recuperación completa de la función A.

Las estirpes C6 y S104 fueron obtenidas de un solo tratamiento mutagénico con nitrosoguanidina de la estirpe silvestre NRRL1555 (en el caso de C6) o de la estirpe superamarilla C115 (en el caso de S104). Los resultados de los experimentos de reversión de estas dos estirpes se muestran en la tabla 6. Los revertientes anotados no pueden ser contaminantes porque presentan otros rasgos hereditarios de sus progenitores:

fototropismo defectuoso en el caso de C6 y orientación peculiar de los esporangióforos y fototropismo defectuoso, en el caso de S104.

Las estirpes S124 y S125, de fenotipo AR, fueron obtenidas por tratamiento de la estirpe C115 con el mutágeno ICR-170. Los experimentos de reversión con estas dos estirpes se resumen en la tabla 6. Tras los tratamientos con nitrosoguanidina e ICR-170, las esporas se sembraron en cajas con y sin vitamina A, para detectar posibles revertientes de fenotipo A. Además de la ausencia de revertientes amarillos o rojos, reflejada en la tabla, tampoco se detectaron revertientes de fenotipo A.

Discusión de la reversión de mutantes de color

De acuerdo con la hipótesis del gen bifuncional, las estirpes de fenotipo A, obtenidas con nitrosoguanidina, se deberán a una sustitución de base en el segmento A, y sólo serían revertidas por el mismo mutágeno. Los resultados obtenidos al mutagenizar la estirpe C2, de fenotipo A, concuerdan con la hipótesis propuesta, poniéndose además de manifiesto la elevada frecuencia de reversión del fenotipo A con nitrosoguanidina. También serían de esperar en el caso de que hubiera dos genes distintos, *carA* y *carR*.

Los resultados obtenidos al revertir la estirpe C171, de fenotipo AR, obtenida tras dos tratamientos mutagénicos sucesivos son los esperados tanto en la hipótesis del gen bifuncional como en el caso de dos genes distintos.

En la hipótesis del gen bifuncional, las estirpes AR, portadoras de una sola mutación, podrían revertir a fenotipo silvestre ya fuera por reversión verdadera (una nueva mutación que afectara al mismo gen) o por supresión (una mutación en un gen distinto y seguramente distante, frecuentemente relacionado con la traducción del mensaje genético).

En la hipótesis de dos genes distintos, las estirpes AR, portadoras de dos mutaciones distintas, no podrían revertir a fenotipo silvestre con frecuencia detectable más que en el caso, muy improbable, de que ambas mutaciones fueran suprimibles por el mismo supresor intergénico.

La existencia de revertientes amarillos de estirpes AR constituye así un firme apoyo a la hipótesis del gen bifuncional. El que algunos de estos revertientes amarillos fueran revertientes verdaderos sería además completamente contradictorio con la hipótesis de dos genes distintos. La naturaleza de estos revertientes amarillos se estudia en el apartado siguiente.

La existencia de revertientes rojos de estirpes AR es justificable tanto en una hipótesis como en otra. En el caso de la hipótesis del gen bifuncional, se trataría de mutaciones en genes distintos, que suplirían la función A (como la suplen la vitamina A y otros agentes químicos). Más raramente, el fenotipo AR podría deberse a dos mutaciones en el mismo gen o la reversión de la función A podría ir acompañada de una nueva mutación en R. En la hipótesis de dos genes distintos, la reversión a rojo es lo normal al recuperarse la función A y mantenerse inactivo el gen R.

ANALISIS GENETICO DE LOS REVERTIENTES

La discusión del apartado precedente subraya el interés de averiguar si las reversiones encontradas son reversiones verdaderas (ligadas estrechamente a la mutación original) o mutaciones supresoras (en genes distantes).

Naturaleza de los revertientes amarillos

Se llama S160 y S161 a dos revertientes amarillos de S104. Se cruzan por la estirpe silvestre B142. Si los revertientes amarillos se hubieran debido a supresión intergénica se encontrarían recombinantes libres del supresor y por tanto con el fenotipo AR original. No se encontró ningún recombinante blanco (Tabla 7). Se concluye que ambos revertientes se deben a reversión verdadera y no a supresión intergénica.

TABLA 7. Análisis genético de los revertientes amarillos
Cruzamiento 1: S160 x B142
Cruzamiento 2: S161 x B142

	1	2
<i>Germoesporangios estudiados</i>	182	201
<i>Germoesporas viables estudiadas</i>	$\sim 10^6$	$\sim 10^6$
<i>Proporción de germoesporas:</i>		
<i>amarillas</i>	1,00	1,00
<i>blancas</i>	0,00	0,00
<i>rojas</i>	0,00	0,00

Naturaleza de un revertiente rojo

Los revertientes rojos de S104 son, como las demás estirpes rojas, incapaces de cruzamiento sexual. Como en situaciones análogas anteriores, se construyó un heterocariontes apropiado. El cruzamiento estudiado era, pues, (S165 * S102) x C242, donde S165 es una estirpe roja obtenida por mutagénesis de S104. Además S165 presenta el comportamiento afototrópico y los esporangióforos peculiares de su estirpe ancestral, C115, caracteres que la hacen fácilmente identificable. La estirpe S102, amarilla, es portadora de una mutación de auxotrofia para el ácido nicotínico y la C242 es blanca, de fenotipo A, y portadora del mismo marcador auxotrófico.

Los resultados aparecen en la Tabla 8. Puede estimarse que el componente S165 participó en el 64% de las meiosis. No se determinó el porcentaje de germoesporangios viables; si ninguno fuera estéril se habrían investigado los resultados de 377 meiosis en que participaron núcleos S165.

Discusión del análisis genético de los revertientes

No se encuentran recombinantes blancos en los cruzamientos en que intervienen los revertientes amarillos S160 y S161, por lo que se concluye que ambos revertientes se deben a reversión verdadera y no a supresión intergénica. Este resultado apoya fuertemente la hipótesis del gen bifuncional y es totalmente contradictorio con la hipótesis de dos genes distintos.

TABLA 8. Análisis genético de la estirpe S165, de fenotipo R, revertiente de otra AR

<i>Germoesporangios estudiados</i>	589
<i>Germoesporas viables:</i>	
<i>en medio nutritivo</i>	$1,7 \times 10^5$
<i>en medio mínimo con ácido nicotínico</i>	$5,0 \times 10^4$
<i>en medio mínimo sin ácido nicotínico</i>	$1,6 \times 10^4$
<i>Progenie estudiada^a</i>	407
<i>amarillas</i>	0,28
<i>blancas fenotipo A</i>	0,45
<i>blancas fenotipo AR</i>	0,00
<i>rojas</i>	0,27
<i>Progenie protótrofa estudiada^b</i>	1317
<i>amarillas</i>	0,00
<i>blancas fenotipo A</i>	0,47
<i>blancas fenotipo AR</i>	0,00
<i>rojas</i>	0,53

^aColonias producidas por germoesporas en medio mínimo con ácido nicotínico.

^bColonias producidas por germoesporas en medio mínimo.

Tampoco se encuentran recombinantes en los cruza-
mientos en los que interviene el revertiente rojo S165.
La falta de recombinantes amarillos entre las mutacio-
nes responsables de los fenotipos R y A confirma el es-
trecho ligamiento establecido ya en secciones anterio-
res. También faltan los recombinantes que cabría esperar
si la reversión se debiera a una mutación supresora in-
tergénica (blancos de fenotipo AR y amarillos). Esto de-
muestra que la reversión ocurrió exactamente donde la
mutación original o muy cerca de ella. Siguiendo el ra-
zonamiento del capítulo anterior, parece probable que
la nitrosoguanidina produjo dos mutaciones simultáneas.
Las mutaciones dobles ligadas no constituyen una excusa
elegante, pero no son excepcionales tras tratamientos
con nitrosoguanidina, como descubrieron Guerola *et al.*
(1971) y ha confirmado una abundante literatura poste-
rior (Cerdá Olmedo y Ruiz Vázquez, en prensa). Sería
conveniente realizar análisis genéticos de otros rever-
tientes rojos, obtenidos a partir de otras estirpes de
fenotipo AR.

EFECTO DE LA VITAMINA Y LA CFTA SOBRE LA RUTA DE SIN- TESIS DE LOS CAROTENOS

Los experimentos que se detallan a continuación
caracterizan cuantitativamente los mutantes insensibles
a los efectos de la vitamina A y de la CFTA, a los que
llamamos "mutantes de fenotipo I", y tratan de diluci-
dar el papel de estos compuestos químicos en la carote-
nogénesis.

Efecto de la vitamina A sobre los mutantes de fenotipo I

La Tabla 9 muestra la cantidad de β -caroteno (en μg por g de materia seca, o "ppm") acumulada por la estirpe silvestre y las estirpes de fenotipo I tanto en medio mínimo como en medio mínimo suplementado con vitamina A (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Las estirpes de fenotipo I tienen fuertemente disminuida su capacidad de activación por vitamina A, aunque no son totalmente insensibles.

La estirpe S142 tiene una morfología peculiar: su micelio crece con marcados círculos concéntricos de densidades muy diferentes. No fue usada en las investigaciones posteriores.

TABLA 9. Contenido de β -caroteno de la estirpe silvestre NRRL1555 y las de fenotipo I, en medio mínimo con y sin vitamina A

Estirpe	β -caroteno, ppm		Cociente
	Sin vitamina A	Con vitamina A	
NRRL1555	55,0	977,6	17,7
S119	17,5	120	6,9
S120	40,6	170	4,2
S142	250,5	584,7	2,3
S144	35,4	147	4,1

Efecto de la CFTA sobre los mutantes de fenotipo I

La Tabla 10 muestra los análisis del contenido en carotenos de la estirpe silvestre y los mutantes de fenotipo I cultivados en medio mínimo y medio mínimo suplementado con CFTA.

Los mutantes de fenotipo I son insensibles a la acción inhibitoria de la CFTA sobre la ciclación ya que las cantidades de licopeno y γ -caroteno acumuladas en su presencia son notablemente más bajas que las observadas en la estirpe silvestre NRRL1555 en las mismas condiciones. Son, además, insensibles a la acción estimuladora de la CFTA sobre la cantidad total de carotenos.

Acción conjunta de la CFTA y la vitamina A

La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos al cultivar la estirpe silvestre NRRL1555 en presencia de CFTA (50 $\mu\text{g/ml}$) y cantidades crecientes de vitamina A.

Se observa que las sustancias emulsificadoras contrarrestan la inhibición de la ciclación por CFTA, permitiendo una mayor síntesis de β -caroteno. Por consiguiente se investigó cuál de los componentes de la emulsión era realmente necesario para la acción estimuladora de la vitamina A. La Tabla 12 muestra el efecto de los diferentes componentes de la emulsión sobre la acumulación de β -caroteno producida por la estirpe silvestre NRRL1555 en presencia de vitamina A. Se sabe ya (Eslava *et al.*, 1974) que los agentes emulsificantes solos no estimulan apreciablemente la carotenogénesis.

TABLA 10. Contenido de β -caroteno, γ -caroteno y licopeno (en ppm) de la estirpe silvestre NRRL1555 y las de fenotipo I, en medio mínimo con y sin CFTA

Estirpe	Sin CFTA β -car.	50 μ g/ml de CFTA				250 μ g/ml de CFTA			
		lic.	γ -car.	β -car.	Total	lic.	γ -car.	β -car.	Total
NRRL1555	55	83	32	46	161	321	37	47	405
S119	17,5	1	9	17	27	<0,1	8	10	18
S120	41	1	6	28	35	<0,1	11	22	33
S144	35	8	7	14	29	6	7	9	22

TABLA 11. Efecto conjunto de la CFTA y la vitamina A sobre la estirpe silvestre NRRL1555

CFTA	Vitamina A ($\mu\text{g/ml}$)	Emulsifi- cantes*	Carotenos, ppm			
			lic.	γ -car.	β -car.	Total
0	0	-	0	0	55	55
50	0	-	83	32	47	163
50	0	+	19	11	96	126
50	10	+	16	11	105	132
50	50	+	18	15	158	191
50	100	+	21	19	365	405

*Presencia (+) ausencia (-) de la mezcla en la que se emulsiona la vitamina A.

TABLA 12. Efecto de los diferentes componentes de la solución emulsificadora sobre la acción estimuladora de la vitamina A, en la estirpe silvestre NRRL1555

Vitamina A $\mu\text{g/ml}$	Adiciones al medio			β -caroteno ppm
	DMSO %	Vaselina %	Tween-80 %	
0	0	0	0	55
200	0,1	0	0	81
200	0	0,5	0	141
200	0	0	0,5	602
200	0,1	0,5	0,5	544

Se encuentra que la emulsificación de la vitamina A en "Tween-80" es necesaria para que produzca un gran incremento en la acumulación de β -caroteno.

A continuación se estudió el efecto de los componentes de la emulsión sobre la estirpe silvestre NRRL1555 cultivada en medio mínimo suplementado con CFTA. La Tabla 13 muestra de una forma cualitativa los resultados obtenidos.

TABLA 13. Efecto de los diferentes componentes de la solución emulsificadora sobre el contenido de carotenos de la estirpe silvestre NRRL1555 cultivada en presencia de CFTA

CFTA ppm	Adiciones al medio			Color del micelio
	DMSO %	Vaselina %	Tween-80 %	
0	0	0	0	amarillo
50	0	0	0	naranja
50	0,1	0	0	naranja
50	0	0,5	0	naranja-amarillento
50	0	0	0,5	amarillo
50	0,1	0,5	0,5	amarillo

Se observa que el "Tween-80" contrarresta por sí solo la inhibición por CFTA de la ciclación de los carotenos.

Algunos micelios del heterocarionte C2 * C9 acumulan licopeno, γ -caroteno y β -caroteno, en concentraciones similares a las encontradas en la estirpe silvestre NRRL1555 en presencia de CFTA. Esto permite estudiar la acción de la vitamina A y el emulsificante sobre la ciclación sin la presencia adicional de un compuesto químico que pudiera estar produciendo otros efectos secundarios. La Tabla 14 muestra el efecto del "Tween-80" y de la vitamina A con el emulsificante sobre el contenido en carotenos de dos micelios de C2 * C9 con proporciones nucleares diferentes.

De nuevo, el "Tween-80" permite la ciclación de los carotenos, dificultada en este caso por la presencia de ciclasas mutantes inactivas codificadas por los núcleos C9, y no afecta a la síntesis total. La vitamina A sigue teniendo efecto muy acusado de estimulación global de la síntesis.

Discusión de los mutantes insensibles y los reguladores químicos

Los resultados obtenidos confirman las observaciones previas sobre los mutantes "insensibles". Se demuestra de una forma cuantitativa que todos ellos son insensibles al efecto estimulador de la vitamina A, al efecto inhibitor de la ciclasa por la CFTA, y al efecto estimulador de la síntesis total por la CFTA.

TABLA 14. Efecto de la vitamina A y el "Tween-80" sobre la carotenogénesis en micelios heterocariontes C2 * C9

Adiciones al medio		Carotenos, ppm				Proporciones relativas		
Tween-80 %	Vitamina A µg/ml	lic.	γ-car.	β-car.	Total	lic.	γ-car.	β-car.
<i>Heterocarionte con ~30% de micelios C2</i>								
0	0	119	33	19	171	0,69	0,19	0,11
0,5	0	16,5	27	106,5	150	0,11	0,18	0,71
0,5	200	35	98	1539	1672	0,02	0,06	0,92
<i>Heterocarionte con ~50% de micelios C2</i>								
0	0	67	39	33	139	0,48	0,28	0,24
0,5	0	25	28	87	140	0,18	0,20	0,62
0,5	200	39	87	2209	2335	0,02	0,04	0,94

Experimentos que se están llevando a cabo actualmente en nuestro Departamento, demuestran que estos mutantes son también insensibles a la estimulación por la β -ionona. La β -ionona estimula la carotenogénesis en la estirpe silvestre de *Phycomyces* de forma similar a como lo hace la vitamina A (Eslava *et al.*, 1974). Esto es una demostración clara de que la vitamina A y la β -ionona activan la carotenogénesis a través de un mismo mecanismo.

Como ya se ha dicho en la Introducción, los ácidos trispóricos también estimulan la carotenogénesis. Existe una relación muy estrecha entre la estimulación de la carotenogénesis por los ácidos trispóricos y la respuesta sexual. El hecho de que los mutantes insensibles sean además incapaces de cruzar normalmente sugiere que también son insensibles al estímulo de las hormonas sexuales.

Podría pensarse que los mutantes insensibles simplemente no dejan entrar en la célula a los compuestos activos. Las grandes diferencias estructurales entre vitamina A, CFTA, β -ionona y hormonas sexuales hacen implausible esta explicación.

Más probable es la existencia de, al menos, una función celular necesaria para estimular químicamente la carotenogénesis. Los mutantes insensibles estudiados tienen alterada esta función celular y son incapaces de responder a cualquier estímulo químico ambiental. El hecho de que la CFTA inhiba la función de la ciclasa, producto del segmento R, y la vitamina A compense la pérdida de la función del segmento A sugiere una relación entre esta función celular y el gen bifuncional.

Los experimentos realizados para estudiar el efecto conjunto de la vitamina A y la CFTA demuestran que en estas condiciones se contrarresta la inhibición de la ciclación por la CFTA. Los resultados demuestran que este efecto es realizado por la sustancia empleada como emulsificante de la vitamina A, el "Tween-80".

Podría pensarse que el "Tween-80" contrarresta el efecto de la CFTA impidiendo que ésta llegue a interaccionar normalmente con las ciclasas. No obstante, nos inclinamos a pensar que el "Tween-80" facilita la reincorporación de los compuestos intermedios licopeno y γ -caroteno a otros complejos enzimáticos.

Los experimentos realizados con el heterocarionte C2 * C9 (fenotipo A * fenotipo R) apoyan esta idea. Micelios de este heterocarionte, de color rojizo por acumular cantidades decrecientes de licopeno, γ -caroteno y β -caroteno, se vuelven amarillos en presencia de "Tween-80". El análisis de estos micelios demuestra que el pigmento que se acumula de forma mayoritaria es el β -caroteno.

La CFTA no parece tener un efecto estimulador de la carotenogénesis independiente de su efecto inhibidor de la ciclasa. En presencia de CFTA, la estirpe silvestre acumula la misma cantidad de β -caroteno que en ausencia del inhibidor; se acumulan, además, γ -caroteno y licopeno. Esto sugiere que la actividad de la ruta está regulada por retroinhibición. La presencia simultánea de CFTA y "Tween-80" conduce a una acumulación extraordinaria de β -caroteno. Podría pensarse en una estimulación global de la síntesis. No obstante, ocurre lo mismo cuando los micelios C2 * C9 se culti-

van en presencia de "Tween-80". Por tanto el incremento de β -caroteno se puede interpretar como consecuencia de la reelaboración de los productos intermedios y no de un efecto estimulador especial.

De esta forma, la CFTA tendría solamente un efecto inhibitor de la ciclasa y el aumento del conjunto de los carotenos sería un efecto secundario debido al mecanismo de control por retroinhibición.

FUNCION DEL GEN *carS* EN LA CAROTENOGENESIS

En la Introducción (página 16) se hacía mención a dos hipótesis que explican la gran acumulación de β -caroteno producida en los mutantes *carS*.

Para dilucidar la alternativa, se hizo un experimento de los llamados a veces "de pulso y caza", es decir, la transferencia de micelio silvestre que contenga β -caroteno radioactivo a un medio no radioactivo. La radioactividad absoluta del β -caroteno debe mantenerse constante si es cierto que el β -caroteno se metaboliza poco, o bajar rápidamente, si es cierto que se metaboliza activamente.

No se conoce un buen método para marcar radioactivamente el β -caroteno. El menos malo es utilizar mevalonato radioactivo, aunque este precursor penetra escasamente en la célula.

Se cultivaron las estirpes NRRL1555 (silvestre) y C115, portadora de una mutación *carS*, en membranas

de diálisis colocadas sobre agar mínimo a pH 3,3 conteniendo 1 μ Ci de (14 C)-mevalonato a 10,9 Ci/mol. A los cuatro días se recolectó la mitad del micelio (muestra A). La otra mitad se colocó sobre medio nuevo, sin (14 C)-mevalonato, y se recolectó dos días después (muestra B). Se extrajo el β -caroteno de las dos muestras y se purificó sucesivamente en columna de tierra de diatomeas/óxido de magnesio y en columna de alúmina. Se determinó el β -caroteno espectrofotométricamente y su radioactividad en contador de centelleo.

Los resultados (Tabla 15) demuestran que entre los días 4 y 6 hay un aumento considerable del peso del micelio y de la cantidad de β -caroteno, pero la radioactividad incorporada en β -caroteno al cuarto día sigue en el mismo material dos días después.

TABLA 15. Marcado radioactivo del β -caroteno. La muestra A corresponde a micelio cultivado durante 4 días en presencia de (14 C)-mevalonato. La muestra B fue incubada dos días más en medio sin mevalonato

Estirpe	Muestra	Peso seco	β -caroteno	
			μ g	c.p.m.
NRRL1555	A	34,5	2,8	733
	B	111	11	769
C115	A	39	84	318
	B	158	190	246

No se observa, por consiguiente, una degradación considerable del β -caroteno en ninguna de las dos estirpes. La mutación *cars* no bloquea un hipotético mecanismo de degradación del β -caroteno, sino que resulta en una síntesis mayor de este compuesto. Por consiguiente el producto del gen *cars* participa en la regulación de la carotenogénesis, posiblemente, como se sugirió en la Introducción, en el mecanismo de retroinhibición.

DISCUSION GENERAL

FENOTIPO AR

Las funciones A (necesarias para la síntesis de carotenos) y R (ciclasa del licopeno) están determinadas por un solo gen bifuncional. El segmento proximal del gen (extremo 5' del ARN mensajero y extremo amino del polipéptido) es responsable de la función A y el segmento distal es responsable de la función R.

Las principales pruebas en favor de esta hipótesis son el estrecho ligamiento entre las mutaciones de fenotipo A (carencia de carotenos) y R (acumulación de licopeno), la producción de fenotipos AR (carencia de ambas funciones) por una sola mutación, la reversión de mutantes de fenotipo AR a silvestre por una sola mutación, la no inducción de mutantes de fenotipo A por ICR-170, mientras que la nitrosoguanidina induce todos los tipos, y las proporciones relativas de cada tipo de mutaciones con cada mutágeno. El alcance de estas pruebas ha sido discutido separadamente en las secciones anteriores.

Los genes y polipéptidos con dos funciones no son una novedad. La polimerasa I del ADN de *E. coli* es un solo polipéptido (Setlow y Kornberg, 1972) que realiza dos funciones distintas: polimerasa (acompañada de exonucleasa 3' → 5') y exonucleasa 5' → 3'. Ambas funciones pueden ser separadas físicamente cortando el polipéptido original en dos fragmentos con tripsina.

Tampoco es nuevo el hecho de que un mismo producto génico pueda realizar, a la vez, funciones enzimáticas y reguladoras. Por ejemplo, el gen *ilv1* de *Saccharomyces cerevisiae* (Bollon, 1975) codifica un producto con dos funciones distintas: una enzimática, el paso de L-treonina a α -cetobutirato, y una reguladora, en la biosíntesis de la isoleucina y la valina. Las dos funciones están, además, perfectamente discriminadas en el polipéptido.

En nuestro caso, para explicar los resultados obtenidos en los estudios de complementación entre estirpes C2 (de fenotipo A) y C9 (de fenotipo R) es necesario suponer que el polipéptido funcional debe separarse en sus dos segmentos, el A y el R. Si el polipéptido se conservase intacto, los heterocariontes C2 * C9 no podrían acumular β -caroteno: los complejos enzimáticos cuyos polipéptidos AR fueran determinados todos por núcleos C2, únicos con ciclación normal, carecerían de la función A. Por el contrario, se acumulan los tres pigmentos en proporciones que presuponen una distribución al azar de las ciclasas normales y defectivas en los complejos carotenogénicos y una independencia entre la capacidad de ciclación y la capacidad global de síntesis de los complejos. Para permitir esta independencia funcional proponemos que los segmentos A y R del polipéptido son separados por una proteasa antes de pasar a desempeñar sus funciones en la ruta.

La consideración de AR como un solo gen o como dos genes transcritos y traducidos conjuntamente depende de la definición de gen que se adopte. La decisión que se adopte sobre este punto determina la nomenclatura genética a recomendar. En nuestro caso nos

parece más práctico seguir llamando *carA* a las mutaciones en el segmento A que no afecten a la función del segmento R, *carR* a las mutaciones en el segmento R que no afecten a la función del segmento A, y *carAR* a las mutaciones que acarrearán la pérdida simultánea de ambas funciones. Así se han designado las estirpes de la Tabla 1.

También se conocen casos, como en el virus de la polio (Jacobson *et al.*, 1970), de síntesis de un gran ARN mensajero, traducido a un solo polipéptido que es cortado después en varios polipéptidos dotados de funciones diferentes. En este caso parece práctico llamar gen al segmento de ADN que codifica cada segmento de polipéptido de función distinta.

FENOTIPO A

Uno de los aspectos más interesantes de la carotenogénesis es la función del segmento A. Como se ha indicado en la Introducción, los mutantes afectados en este segmento son blancos y acumulan pequeñísimas cantidades de β -caroteno.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos llevan a proponer que el producto del segmento A está relacionado con el transporte de sustratos en la carotenogénesis.

La pérdida de la función A es parcialmente dominante, ya que los heterocariontes C3 * C69 (fenotipo A * silvestre) acumulan β -caroteno en cantidades inferiores a la normal (Murillo, 1975). Este efecto parcial-

mente dominante de las mutaciones en el segmento A justifica que los heterocariontes C2 * C9 (fenotipo A * fenotipo R) acumulen los compuestos intermedios licopeno y γ -caroteno. En cambio, los heterocariontes C131 * C9 (silvestre * fenotipo R), en los cuales sólo está presente la función A normal, acumulan β -caroteno como pigmento mayoritario, aún cuando la proporción de núcleos de C131 sea muy pequeña (Fig. 5) (Aragón y Murillo, resultados no publicados).

Las proporciones de pigmentos encontrados en el heterocarionte C131 * C9, se asemejan a las observadas cuando micelios del heterocarionte C2 * C9 se cultivan en presencia de emulsificante "Tween-80" (Fig. 5). Esto sugiere que el "Tween-80" contrarresta la falta de la función A, haciendo que se sintetice más β -caroteno a expensas de los compuestos intermedios licopeno y γ -caroteno. Creemos que la función A normal o el "Tween-80" permiten la translocación de sustratos del citoplasma a los complejos enzimáticos carotenogénicos, de modo que los productos intermedios γ -caroteno y licopeno, elaborados por complejos defectuosos en la ciclación, puedan convertirse en β -caroteno en complejos con ciclasas activas. Según esto, el producto del segmento A actuaría efectivamente como "engrasante" del complejo, y su falta haría que los compuestos sintetizados en unos complejos no pudiesen entrar en otros.

REGULACION DE LA CAROTENOGENESIS

La ruta de los carotenos podría considerarse como un largo tubo, cuyo producto final sería el β -caroteno, que regularía su propia síntesis por retroinhi-

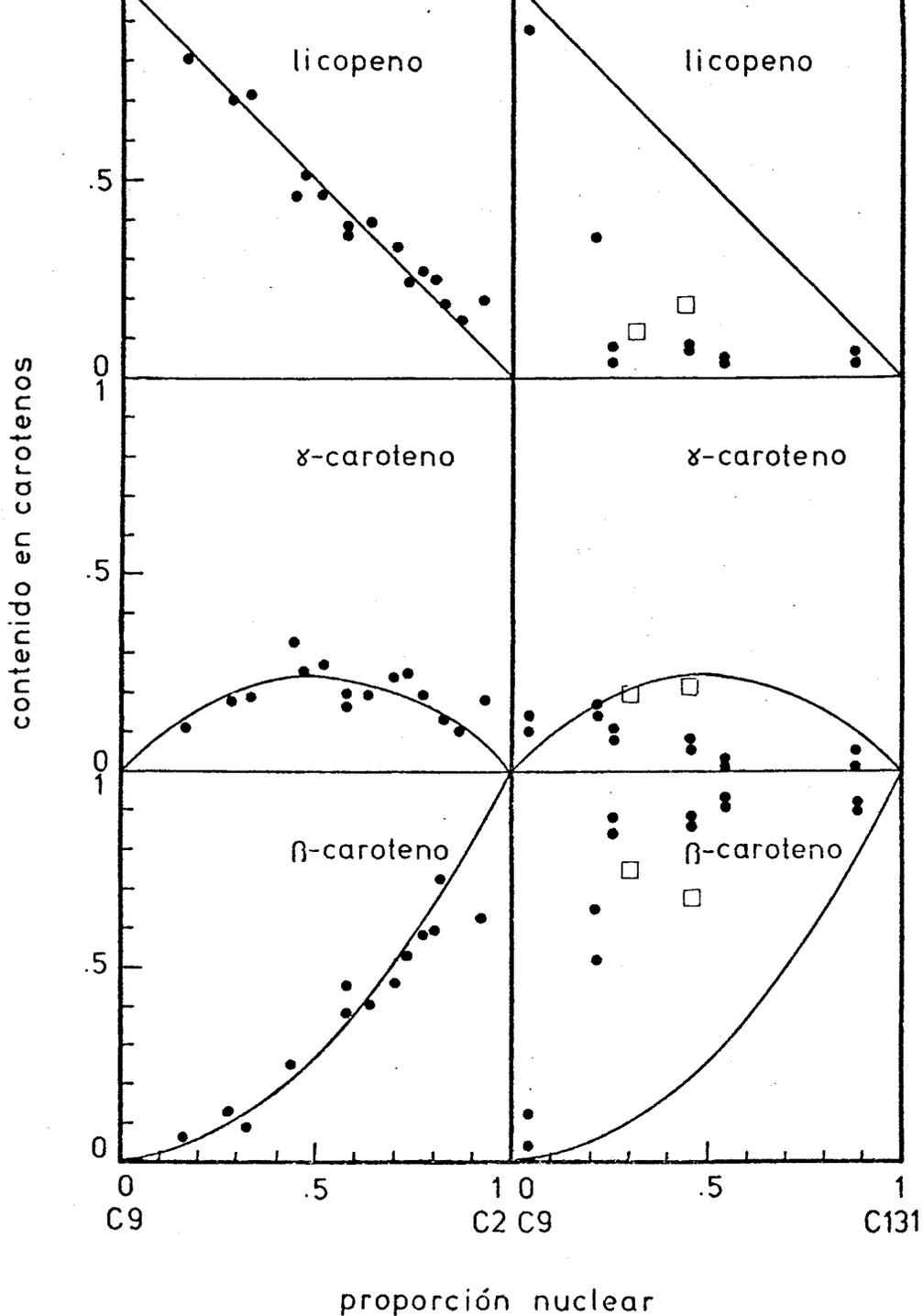


Figura 5. (●) Proporciones de licopeno, γ -caroteno y β -caroteno en los heterocariontes C2 * C9 (a la izquierda) y C9 * C131 (a la derecha), en función de las proporciones nucleares en los heterocariontes. C2 es un mutante de fenotipo A, C9 un mutante de fenotipo R y C131 no lleva mutaciones relacionadas con la carotenogénesis. Las líneas representan las predicciones del modelo presentado en la figura 3. (□) proporciones de licopeno, γ -caroteno y β -caroteno en micelios del heterocarionte C2 * C9 cultivados en presencia de "Tween-80".

bición, a través del producto normal del gen *carS*. Las mutaciones que inactiven este gen conducen a un aumento de la cantidad final de β -caroteno.

El producto del segmento A actuaría sobre esta ruta facilitando el transporte de los sustratos en el complejo carotenogénico. La falta de este producto A provocaría una escasez general de sustratos, que impediría el funcionamiento de la ruta. No es preciso que la función A intervenga en todas las etapas de la síntesis. Así, la función de las deshidrogenasas es independiente de la presencia o ausencia de mutaciones de fenotipo A (Aragón *et al.*, 1976). En la analogía de la tubería, la pérdida de la función A podría representarse como el cierre de un grifo, que corta todo el flujo aunque sólo actúe en un lugar.

La carotenogénesis puede estimularse por diferentes medios, tanto físicos (luz) como químicos (vitamina A, β -ionona, ácidos trispóricos).

La activación de la carotenogénesis por medios químicos depende de al menos una función celular, revelada por la existencia de los mutantes insensibles a estímulos externos. La existencia de estas funciones celulares puede justificarse por su participación en el ciclo sexual del organismo donde el incremento de la carotenogénesis parece preparar la síntesis de paredes celulares compuestas por esporopoleninas, polímeros del β -caroteno. Resulta difícil de imaginar, sin embargo, la razón de la respuesta de este sistema regulador a compuestos artificiales poco parecidos a las hormonas sexuales.

También la activación de la carotenogénesis por la luz depende de funciones celulares específicas ya que se han aislado mutantes que no fotoinducen, y que por tanto deben tener alterada esta función celular. Probablemente esta respuesta tiene una función fotoprotectora.

La regulación de la carotenogénesis merece la atención de los investigadores tanto por su contribución a resolver los problemas de la regulación y las respuestas a estímulos externos en eucariontes como por el interés aplicado de la síntesis de colorantes alimenticios sin efectos nocivos para la salud.

BIBLIOGRAFIA

ALTMAN, L.J., ASH, L., KOWERSKI, R.C., EPSTEIN, W.W., LARSEN, B.R., RILLING, H.C., MUSCIO, F. y GREGONIS, D. E. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.*, *94*, p. 3257.

AMES, B.N. y WHITFIELD, H.J. Jr. (1966) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, *31*, p. 221.

ARAGON, C.M.G. (1974) Tesis Doctoral Universidad de Sevilla.

ARAGON, C.M.G., MURILLO, F.J., DE LA GUARDIA, M.D. y CERDA OLMEDO, E. (1976) *Eur. J. Biochem.*, *63*, p. 71.

BARRATT, R.W., NEWMAYER, D., PERKINS, D.D. y GARNJOBST, L. (1954) *Adv. Genet.*, *6*, p. 1.

BATRA, P.P. (1971) *Photophysiology* (A.C. Giese, ed.), VI, p. 47-76, Academic Press, New York.

BATRA, P.P., GLEASON, R.M. y LONDA, J.W. (1973) *Phytochemistry*, *12*, p. 1309.

BERGMAN, K., ESLAVA, A.P. y CERDA OLMEDO, E. (1973) *Molec. Gen. Genet.*, *123*, p. 1.

BLAKESLEE, A.F. (1904) *Proc. Am. Acad. Arts. Sci.*, *40*, p. 205.

BOLLON, A.P. (1975) *Nature*, *250*, p. 630.

BONNER, J., SANDOVAL, A., TANG, Y.W. y ZECHMEISTER, L. (1946) *Arch. Biochem.*, *10*, p. 113.

BRITTON, G. y GOODWIN, T.W. (1971), *Methods in Enzymology*, *18*, p. 654.

BRUSICK, D.J. (1972) *J. Bacteriol.*, *109*, p. 1134.

BU'LOCK, J.D., JONES, B.E., TAYLOR, D., WINSKILL, N.
y QUARRIE, S.A. (1974) *J. Gen. Microbiol.*, *80*, p. 301.

CAGLIOTI, L., CAINELLI, G., CAMERINO, B., MONDELLI, R.,
PRIETO, A., QUILICO, A., SALVATORI, T., y JEHA, A.
(1966) *Tetrahedron Suppl.*, *7*, p. 175.

CANTINO, E.C. y HYATT, M.T. (1953) *Am. J. Bot.*, *40*,
p. 688.

CERDA OLMEDO, E. y REAU, P. (1970) *Mutat. Res.*, *9*, p.
369.

CERDA OLMEDO, E. y TORRES MARTINEZ, S. (1977) *Avances
de la Bioquímica* (eds. Cornudella, J., Heredia, C.F.,
Oró, J. y Sols, A.) Salvat S.A. Barcelona.

CERDA OLMEDO, E. y TORRES MARTINEZ, S. (1978) *Pure and
Appl. Chem.*, en prensa.

CERDA OLMEDO, E. y RUIZ VAZQUEZ, R. (1978) "Genetics of
Industrial Microorganisms", *American Society for Micro-
biology* (Sebek, O.K. ed.), en prensa.

COGGINS, C.W. Jr., HENNING, G.L. y YOKOYAMA, H. (1970)
Science, *168*, p. 1589.

COULONDRE, C. y MILLER, J.H. (1977) *J. Mol. Biol.*, *117*,
p. 577.

CULBERTSON, M.R., CHARNAS, L., JOHNSON, M.T. y FINK,
G.R. (1977) *Genetics*, *86*, p. 745.

- DAVIES, B.H. (1965) Chemistry and biochemistry of plant pigments (T.W. Goodwin ed.) Acad. Press, London, p. 486.
- DAVIES, B.H. (1975) Ber. Deutsch. Bot. Ges., 88, p. 7.
- DAVIS, R.H. (1969) The Fungi (G.C. Ainsworth y A.S. Sussman, eds.), 2nd ed., II. 567-588, Academic Press, New York.
- DE FABO, E.C., HARDING, R.W. y SHROPSHIRE, W. Jr. (1976) Plant Physiol., 57, p. 440.
- DE LA GUARDIA, M.D., ARAGON, C.M.G., MURILLO, F.J. y CERDA OLMEDO, E. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 68, p. 2012.
- DEMEREK, M., ADELBERG, E.A., CLARK, A.J. y HARTMAN, P.E. (1966) Genetics, 54, p. 61.
- EISENSTARK, A., EISENSTARK, R. y van SICKLE, R. (1965) Mutat. Res., 2, p. 1.
- ESLAVA, A.P. y CERDA OLMEDO, E. (1974) Plant Sci. Lett., 2, p. 9.
- ESLAVA, A.P., ALVAREZ, M.I. y CERDA OLMEDO, E. (1974) Eur. J. Biochem., 48, p. 617.
- ESLAVA, A.P., ALVAREZ, M.I., BURKE, P.V. y DELBRUCK, M. (1975) Genetics, 80, p. 445.
- ESLAVA, A.P., ALVAREZ, M.I., LIPSON, E.D., PRESTI, D. y KONG, K. (1976) Molec. Gen. Genet., 147, p. 235.

FINK, G.R. (1966) *Genetics*, 53, p. 445.

FRIEND, J. y GOODWIN, T.W. (1954) *Biochem. J.*, 57, p. 434.

GARBER, E.D., BAIRD, M.L. y CHAPMAN, D.J. (1975) *Bot. Gaz.*, 136, p. 341.

GARTON, G.A., GOODWIN, T.W. y LIJINSKY, W. (1951) *Biochem. J.*, 48, p. 154.

GOMORI, G. (1955) *Methods in Enzymology*, 1, p. 138.

GOODWIN, T.W. (1952) *Biochem. J.*, 50, p. 550.

GUEROLA, N., INGRAHAM, J.L. y CERDA OLMEDO, E. (1971) *Nature New Biol.*, 230, p. 122.

HARDING, R.W., HUANG, P.C. y MITCHELL, H.K. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.*, 129, p. 696.

HAXO, F.T. (1956) *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, 12, p. 169.

HOWES, C.D. y BATRA, P.P. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 222, p. 174.

HUANG, P.C. (1964) *Genetics*, 49, p. 453.

JACOBSON, M.F., ASSO, J. y BALTIMORE, D. (1970) *J. Mol. Biol.*, 49, p. 657.

KUSHWAHA, S.C., KATES, M., RENAUD, R.L. y SUBDEN, R.E. (1978) *Lipids*, 13, p. 352.

LANSBERGEN, J.C., RENAUD, R.L. y SUBDEN, R.E. (1976)
Can. J. Bot., 54, p. 2445.

MALLING, H.V. (1967) Mutat. Res., 4, p. 265.

MEISSNER, G. y DELBRUCK, M. (1968) Plant Physiol., 43, p.
1279.

MURILLO, F.J. (1975) Tesis Doctoral, Universidad de Se-
villa.

MURILLO, F.J. y CERDA OLMEDO, E. (1976) Molec. Gen.
Genet., 148, p. 19.

MURILLO, F.J., CALDERON, I.L., LOPEZ DIAZ, I. y CERDA
OLMEDO, E. (1978) Appl. Environm. Microbiol., 36, p.
639.

NEALE, S. (1976) Mutat. Res., 32, p. 229.

NINET, L., RENAUT, J. y TISSIER, R. (1969) Biotechn.
Bioengin., XI, p. 1195.

OESCHGER, N.S. y HARTMAN, P.E. (1970) J. Bacteriol.,
101, p. 490.

OLSON, J.A. y KNIZLEY, H. Jr. (1962) Arch. Biochem.
Biophys., 97, p. 138.

OOTAKI, T. (1973) Molec. Gen. Genet., 121, p. 49.

OOTAKI, T., LIGHTY, A.C., DELBRUCK, M. y HSU, W.J.
(1973) Molec. Gen. Genet., 121, p. 57.

PORTER, J.W. y LINCOLN, R.E. (1950) Arch. Biochem. Bio-
phys., 27, p. 390.

PRAKASH, L. y SHERMAN, F. (1973) *J. Mol. Biol.*, 79, p. 65.

RAU, W. (1975) *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 88, p. 45.

REYES, P., CHICHESTER, C.O. y NAKAYAMA, T.O. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, 90, p. 578.

ROTH, J.R. (1974) *Ann. Rev. Genet.*, 8, p. 319.

RUDOLPH, H. (1960) *Planta (Berl.)*, 55, p. 424.

SCHROTT, E.L. y RAU, W. (1977) *Planta*, 136, p. 45.

SETLOW, P. y KORNBERG, A. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, p. 232.

SPIEGEL, M.R. (1969) *Estadística* (ed. McGraw-Hill) Colombia, p. 162.

SUBDEN, R.E. y THRELKELD, S.F.H. (1970) *Genet. Res.*, 15, p. 139.

SUBDEN, R.E. y TURIAN, G. (1970) *Experientia*, 26, p. 935.

SUBDEN, R.E. y TURIAN, G. (1970) *Molec. Gen. Genet.*, 108, p. 358.

SUBDEN, R.E. y GOLDIE, A. H. (1973) *Genetica*, 44, p. 615.

SUTTER, R.P. (1977) *Eukaryotic Microbes as Model Developmental Systems* (D.H. O'Day and P.A. Horgen, eds.), p. 251-272, Marcell Dekker, New York.

TOMES, M.L. (1963) *Bot. Gaz.*, 124, p. 180.

WHITFIELD, H.J. Jr., MARTIN, R.G. y AMES, B.N. (1966)
J. Mol. Biol., 21, p. 335.

YEU, H.C. y MARRS, B. (1976) *J. Bacteriol.*, 126, p. 619.

YOURNO, J. y HEATH, S. (1969) *J. Bacteriol.*, 100, p. 460.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis ha sido posible gracias al Profesor Enrique Cerdá, por su dedicación e inagotable capacidad científica. A Paco Murillo, por su aporte de ideas y continuas discusiones. A todos mis compañeros de laboratorio, que con su amistad han hecho posible que todo esto sea más fácil, muy especialmente a Reyes, las Isabeles, Julio y Paco. A Asunción, cuya ayuda técnica ha sido fundamental. A Maribel, que la ha mecanografiado. Y sobre todo a Rosa, mi compañera, que ha compartido sus malos y buenos momentos, y sin cuyo aliento todo hubiese sido más difícil.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. SANTIAGO TORRES MARTINEZ
titulada "ANÁLISIS GENÉTICO DE LA CAROTENOGENESIS
EN EL HONGO PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS"

acordó otorgarle la calificación de insuficiente
cum laude

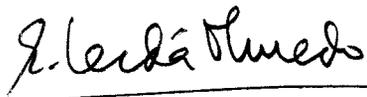
Sevilla, 19 de ENERO de 1979

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,


Presidente.


El Secretario.


El Secretario.





