

TA
615

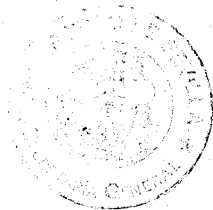
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 212 número 24 del libro
correspondiente.

Sevilla, 4 MAYO 1988

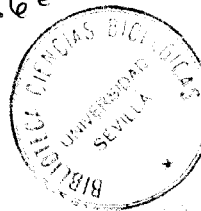
El Jefe del Negociado de Tesis,

A. Rojas



Mutantes superproductores de beta-caroteno
de Phycomyces blakesleeanus

R.6662



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

Luis Miguel Salgado Rodríguez
Luis Miguel Salgado Rodríguez

Sevilla, Abril de 1988

Director y Ponente

E. Cerdá Olmedo

Profesor Enrique Cerdá Olmedo

Catedrático y director del Departamento de Genética

A José María Barrientos

A Enrique Cerdá Olmedo

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Esta Tesis aplica métodos genéticos y bioquímicos al estudio de la biosíntesis de caroteno en el hongo Phycomyces blakesleeanus.

El análisis genético clasifica los mutantes superproductores de beta-caroteno en tres grupos: uno compuesto por mutantes del gen carS, otro compuesto por mutantes de un nuevo gen regulador de la ruta que denominamos carD y el último que consta solamente de la estirpe S444, una estirpe de las más carotenogénicas que se conocen.

Los mutantes carD contienen de 600 a 900 ug de beta-caroteno por g de materia seca en las condiciones normales y responden a las cuatro vías de activación ambiental de la carotenogénesis. Este gen está cerca del centrómero de un cromosoma diferente del que contiene los genes reguladores, carA y carS, y los genes estructurales de la carotenogénesis.

La epistasia de las mutaciones carS y carA sobre el gen carD indica que sus productos actúan en un mismo mecanismo de regulación de la carotenogénesis.

Para establecer la relación entre los genes reguladores carA y carS hemos aislado dobles mutantes carA carS por recombinación. Los dobles mutantes carA carS son amarillos y contienen más beta-caroteno (250 a 500 ug por g peso seco) que la estirpe silvestre. Elevan su contenido en beta-caroteno en respuesta al ftalato de dimetilo, pero no a la luz o al retinol.

Dos mutaciones del gen carS con fenotipo superproductor amarillo se combinan para dar un fenotipo superrepresor blanco. El estudio cuantitativo de la relación entre este fenotipo y el silvestre establece que el producto del gen carS actúa como multímero.

El mutante S444, superproductor de beta-caroteno, fue

aislado por tratamiento mutagénico de esporas de una estirpe mutante carS. Su fenotipo sugiere que es un heterocarionte con componentes incapaces de vivir en homocariosis. El análisis genético de S444 indica abundantes alteraciones cromosómicas.

La actividad carotenogénica in vitro de la estirpe silvestre depende de las condiciones de cultivo del micelio. Se utilizaron micelios cultivados sobre agar para que los resultados sean comparables a los de los estudios in vivo.

Superan la actividad carotenogénica in vitro del tipo silvestre en condiciones normales los extractos de los mutantes superproductores, los de mutantes que sintetizan carotenos distintos del beta-caroteno y los de micelios silvestres cultivados en presencia de luz, retinol o ftalato de dimetilo. El retinol y el ftalato de dimetilo no tienen ningún efecto añadidos in vitro.

No modifican la actividad carotenogénica in vitro los mutantes blancos carA, el doble mutante carS superrepresor, los dobles mutantes carA carS, ni la interacción sexual.

La comparación de la carotenogénesis in vivo e in vitro sugiere una hipótesis general de regulación de la ruta que incluye una regulación de la expresión génica y al menos dos regulaciones metabólicas. La expresión génica requiere el producto de carA, cuya acción es modulada por el beta-caroteno a través del producto de carS. El producto del gen carD es un regulador positivo de carS.

INDICE DE MATERIAS

RESUMEN	1
INDICE DE MATERIAS	3
INDICE DE FIGURAS	5
INDICE DE TABLAS	6
INTRODUCCION	8
MATERIALES Y METODOS	
Estirpes	18
Métodos generales	20
Métodos genéticos	21
Determinación de la tasa de germinación	21
Métodos analíticos	21
Carotenogénesis <u>in vitro</u>	22
RESULTADOS	
I.- MUTANTES SUPERPRODUCTORES DE BETA-CAROTENO	
Clasificación genética de los mutantes superproductores	24
Análisis genético de la mutación <u>carD</u>	26
II.- INTERACCION DE LAS FUNCIONES <u>carA</u> Y <u>carS</u>	
Obtención de dobles mutantes <u>carA carS</u>	31
Fenotipo de los dobles mutantes <u>carA carS</u>	33
Análisis genético por recombinación de las estirpes S105, S114 y S115	35
Estudio de complementación de un mutante <u>carS</u> blanco	37
III.- ESTUDIO DEL MUTANTE SUPERPRODUCTOR DE BETA-CAROTENO S444	
Aislamiento y propiedades	41
Producción de beta-caroteno por la estirpe S444	42
Estudio genético de la estirpe S444	45
IV.- CAROTENOGENESIS <u>IN VITRO</u>	
Actividad carotenogénica <u>in vitro</u> de la estirpe silvestre y un mutante <u>carS</u>	48

Actividad carotenogénica de extractos de mutantes <u>car</u> .49	
Influencia de los agentes activadores	53
DISCUSION	
Mutantes superproductores de beta-caroteno	55
Interacción de las funciones <u>carA</u> y <u>carS</u>	60
Carotenogénesis <u>in vitro</u>	62
Consideraciones finales	66
BIBLIOGRAFIA	68
AGRADECIMIENTOS	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo asexual y sexual de <u>Phycomyces</u>	9
Figura 2. Biosíntesis del fitoeno a partir del 3-hidroxi- metilglutaril-CoA	11
Figura 3. Conversión del fitoeno en beta-caroteno	13
Figura 4. Contenido de beta-caroteno en el heterocarionte A87 * S477 en función de la proporción de núcleos (R) S477	40
Figura 5. Cinética de producción de beta-caroteno por la estirpe S444 en medio mínimo sólido en función del tiempo	43
Figura 6. Cinética de producción de beta-caroteno por la estirpe S444 en medio mínimo líquido en función del tiempo	43
Figura 7. Producción total de beta-caroteno por la stirpe S444 en función del tiempo en los experimentos descritos en las Figs. 5 y 6	45
Figura 8. Incorporación de mevalonato radiactivo, total, en escualeno y en carotenos, en función de la dilución de los extractos de las stirpes C115, S226 y S444	51
Figura 9. Comparación entre la actividad carotenogénica <u>in</u> <u>vivo</u> e <u>in vitro</u> de la stirpe silvestre y diversos mutantes de la ruta.	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estirpes de <u>P. blakesleeanus</u> utilizadas en este trabajo	19
Tabla 2. Fenotipo de algunos mutantes de <u>P. blakesleeanus</u> superproductores de beta-caroteno	25
Tabla 3. Complementación de los mutantes <u>carD</u>	26
Tabla 4. Acumulación de beta-caroteno (ppm) en la estirpe S102 y en tres mutantes <u>carD</u> en respuesta a diferentes estímulos	27
Tabla 5. Análisis genético por recombinación de las mutaciones <u>carA</u> y <u>carD</u>	28
Tabla 6. Análisis genético por recombinación de las mutaciones <u>carD</u> y <u>carS</u>	30
Tabla 7. Análisis genético del cruce S200 X (C115 * S102) ..	32
Tabla 8. Estimulación de la carotenogénesis en la estirpe silvestre y algunos mutantes de <u>P. blakesleeanus</u> por tres activadores independientes	34
Tabla 9. Análisis genético por recombinación de los mutantes S105, S114 y S115	36
Tabla 10. Segregación de la auxotrofia para el ácido nicotínico y del color de la colonia en el cruce S395 X S115	38
Tabla 11. Contenido de beta-caroteno en los dos segregantes superamarillos del cruce S236 X S105	38
Tabla 12. Tasa de germinación de las esporas de C115 y del mutante S444	42
Tabla 13. Producción de beta-caroteno por la estirpe S444 a los nueve días de cultivo en diferentes medios líquidos	44
Tabla 14. Estudio genético por recombinación de la estirpe S444	47

Tabla 15. Comparación de la actividad carotenogénica de extractos del silvestre y un mutante <u>carS</u> según los micelios se hayan cultivado en medio mínimo líquido o sólido	49
Tabla 16. Actividad carotenogénica <u>in vitro</u> de algunas estirpes superproductoras de beta-caroteno	50
Tabla 17. Actividad carotenogénica <u>in vitro</u> de diversos mutantes de la carotenogénesis	53
Tabla 18. Actividad carotenogénica de extractos de la estirpe silvestre cultivada en presencia de activadores de la biosíntesis de beta-caroteno	54

INTRODUCCION

La posibilidad de afrontar con éxito un problema biológico depende en gran parte del organismo que se utiliza como modelo. Es deseable que éste tenga un ciclo de vida corto, crezca en medios definidos y pueda ser manipulado genéticamente.

Phycomyces blakesleeanus es un cigomiceto utilizado como modelo de estudio en diferentes laboratorios. Responde a una variedad de estímulos: luz, gravedad, agentes químicos, viento y obstáculos (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987). Estas respuestas han sido estudiadas principalmente en las estructuras aéreas llamadas esporangióforos, y particularmente en el estadio IV del desarrollo de estos (ver Fig. 1, ciclo de vida).

El micelio de Phycomyces responde también a estímulos físicos y químicos. Así, se han estudiado la fotodiferenciación (Bergman, 1972), fotoinhibición de la deshidrogenasa del alcohol (Garcés y Medina, 1985) y la estimulación de la carotenogénesis por la luz (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980; Jayaram et al., 1980) y productos químicos (Cerdá-Olmedo, 1987; Bejarano et al., 1988).

El micelio y los esporangióforos jóvenes de la estirpe silvestre de Phycomyces son amarillos debido a la acumulación de beta-caroteno. Esto fue sugerido hace más de 50 años (Schopfer, 1935; Schopfer y Jung, 1935). La incorporación de nuevas técnicas analíticas, espectrofotometría y cromatografía principalmente, al final de los años cuarenta posibilitó un estudio sistemático de los carotenoides de Phycomyces, llevado a cabo principalmente por Goodwin y sus colaboradores (Goodwin, 1952; 1980). Los estudios genéticos y bioquímicos han demostrado que la biosíntesis de este compuesto es similar a la encontrada en otros organismos como Neurospora crassa, Fusarium aqueductum, Euglena gracilis y Chlorella spp

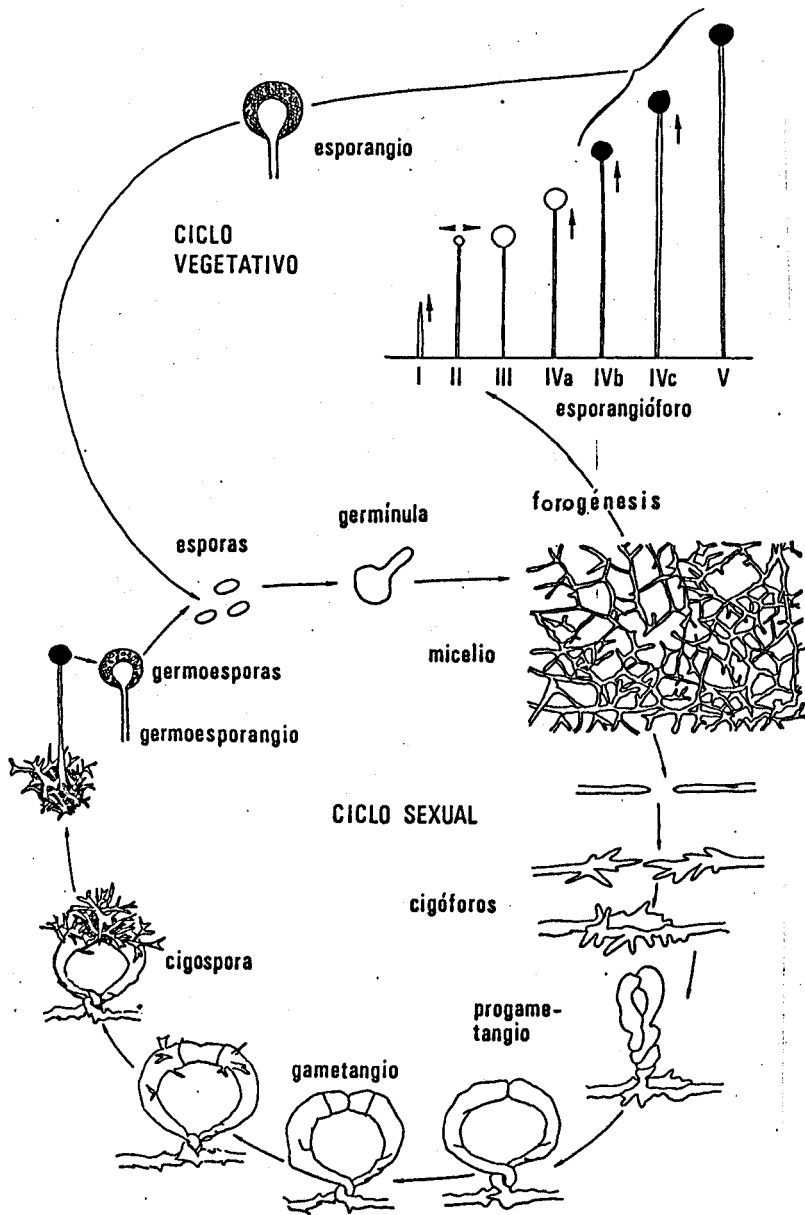


Figura 1. Ciclo asexual y sexual de *Phycomyces*. En la figura se muestran las distintas etapas del desarrollo de los esporangioforos, y de la formación de la cigospora (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987).

(Harding y Shropshire, 1980; Ruddat y Garber, 1983).

A partir del ácido mevalónico (Fig. 2) se obtiene el principal precursor de la ruta, isopentenilpirofosfato. La adición sucesiva de residuos de cinco átomos de carbono da lugar a farnesilpirofosfato. En este punto se separan las rutas biosintéticas de los esteroides y de los carotenos.

El fitoeno, primer caroteno de la ruta, deriva de la condensación de dos moléculas de geranilgeraniolpirofosfato (Fig. 3). Cuatro deshidrogenaciones y dos ciclaciones dan el producto final de la ruta en Phycomyces, el beta-caroteno.

Los aspectos genéticos de la ruta en los pasos anteriores al fitoeno son casi desconocidos. El problema estriba en la dificultad de buscar mutantes en esa parte de la ruta; en Phycomyces no se ha encontrado ninguno.

Los estudios enzimáticos con varios organismos sugieren que las reacciones de condensación del isopentenilpirofosfato con los demás intermediarios de la ruta son catalizadas por la misma enzima, la transferasa de prenilo (Rilling, 1985), al menos hasta la síntesis del farnesilpirofosfato (Packter, 1973). Se ha purificado una transferasa de prenilos de Phycomyces, pero no era lo suficientemente estable como para efectuar estudios similares a los publicados con enzimas de otros organismos (Rilling, 1985).

La formación del geranilgeraniolpirofosfato requiere una enzima diferente (Rilling, 1985). Esta enzima en N. crassa parece ser el punto de regulación de la activación, al menos, por la luz (Harding, comunicación personal).

Se ha supuesto que las condensaciones del farnesilpirofosfato y del geranilgeraniolpirofosfato para dar escualeno y fitoeno, respectivamente, pueden ser catalizadas por la misma enzima al ser reacciones similares. Un argumento bastante fuerte en su contra es que el escualeno tiene un doble enlace central y el fitoeno no (Gregonis y Rilling, 1974). El caroteno con doble enlace central, el licoperseno, no se ha en-

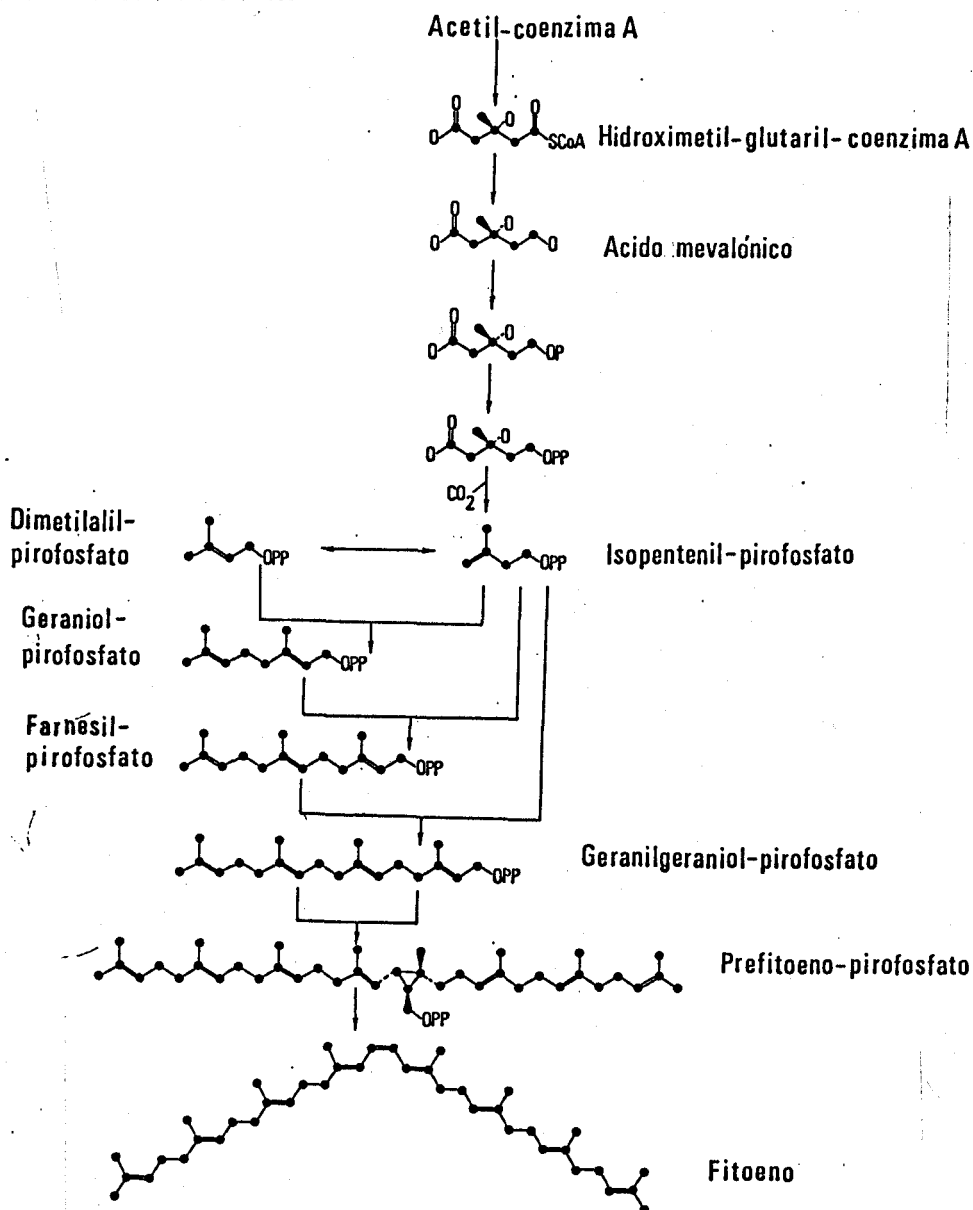


Figura 2. Biosíntesis del fitoeno a partir del 3-hidroximetilglutaril-CoA. En esta figura y en la siguiente se han representado los átomos de carbono con círculos negros y se han suprimido los átomos de hidrógeno.

contrado en Phycomyces ni por mutación ni por inhibición química de la ruta. Otro hecho que apunta en favor de la existencia de enzimas diferentes es la inhibición diferencial de la ruta de los esteroides y los carotenoides con el herbicida norfluorazon (Sandmann et al., 1980; Sandmann y Boger, 1983), que inhibe parcialmente la formación de fitoeno pero no la de escualeno.

El fitoeno que se produce en la ruta mostrada en la Figura 2 es el isómero 15 cis. La comparación de las estructuras de este intermediario con el producto final, beta-caroteno, muestra 7 diferencias. Este hecho podría, en principio, implicar a siete enzimas producto de otros tantos genes. Sin embargo, las diferentes interconversiones son llevadas a cabo de manera simple y elegante (Fig. 3).

La ruta esquematizada en la Figura 3 se basa en el esquema propuesto para el tomate por Porter y Lincoln (1950) y que ha sido confirmado por estudios genéticos y bioquímicos. Los primeros mutantes de la carotenogénesis fueron aislados por Meissner y Delbrück (1968). Muchos de los mutantes de la ruta se pueden identificar fácilmente porque acumulan carotenos distintos del beta-caroteno o concentraciones de este compuesto diferentes a los de la estirpe silvestre.

Las cuatro deshidrogenaciones que convierten al fitoeno en licopeno son efectuadas por un complejo de cuatro ejemplares de la deshidrogenasa del fitoeno, producto del gen carB (Aragón et al., 1976). Las dos ciclaciones en los extremos del licopeno que producen el beta-caroteno son catalizadas por dos ejemplares de la ciclasa del licopeno (De la Guardia et al., 1971), uno de los productos del gen bifuncional carRA (Torres-Martínez et al., 1980).

La isomerización parece ser que ocurre antes de la primera deshidrogenación o va acoplada a ella. Parece claro que no es debida a la deshidrogenasa del fitoeno, porque los mutantes carB fabrican in vivo el fitoeno 15 cis (Than et al.,

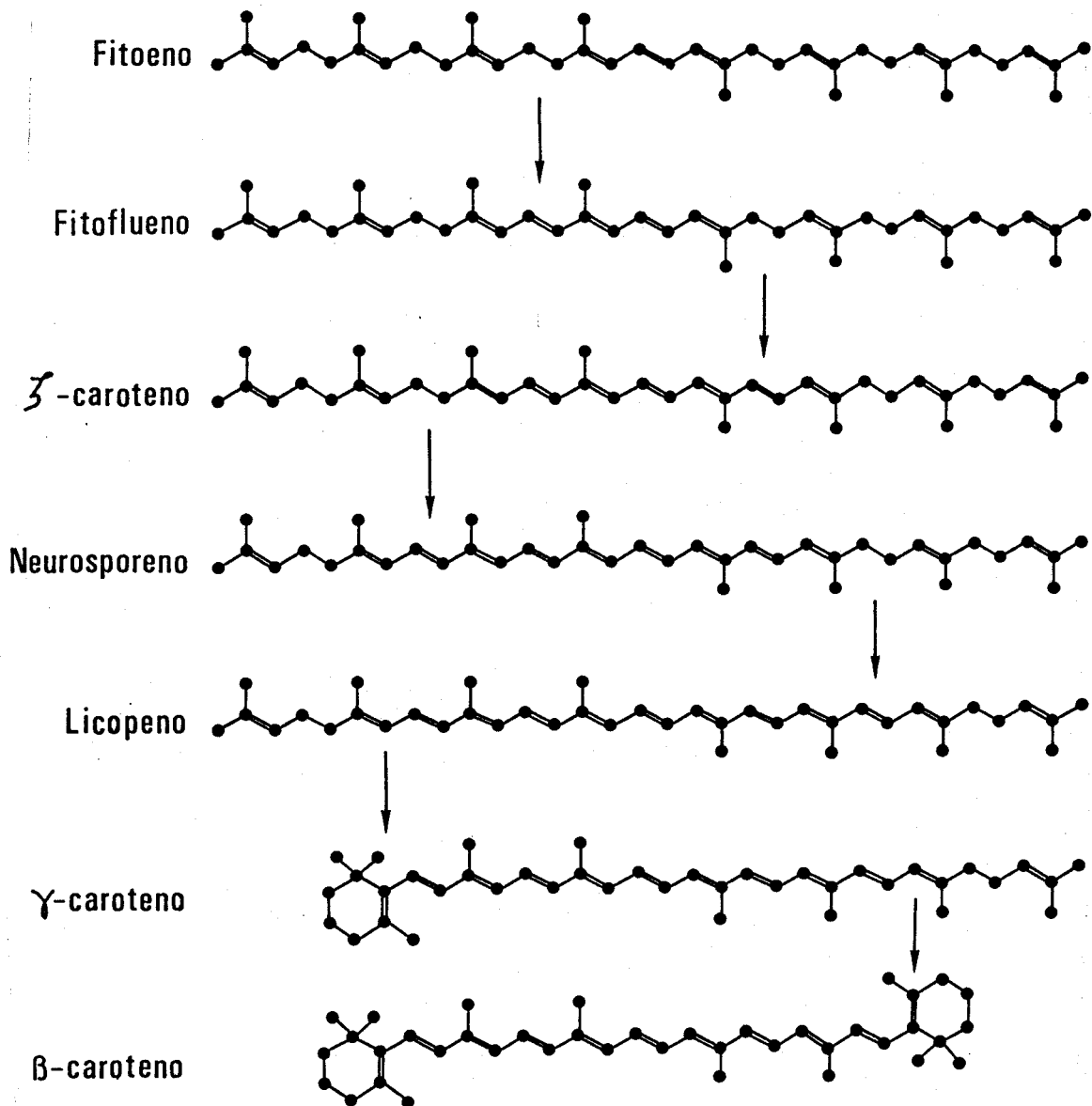


Figura 3. Conversión del fitoeno en beta-caroteno.

1972) e in vitro fitoeno todo trans. (De la Concha et al. 1983).

El beta-caroteno regula su propia síntesis utilizando, al menos, el producto del gen carS para la retroinhibición de la ruta (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976). Las mutaciones en este gen son recesivas y su pérdida origina un aumento en la biosíntesis de este compuesto, con acumulación de 2500 a 5000 ug por g peso seco (ppm de ahora en adelante) según el alelo. Ninguno de los mutantes afectados en el gen carS son estimulables por retinol y son incapaces de formar cigosporas.

El mecanismo de acción del producto de carS no está claro. Algunos estudios de carotenogénesis in vitro sugieren que regula la actividad enzimática de la ruta (De la Concha et al., 1983). Por estudios genéticos y fisiológicos se ha postulado que el producto del gen carS forma parte de un complejo con el producto del gen carA y el beta-caroteno, responsable de la inhibición de la ruta por su producto final (Bejarano et al., 1988).

Los mutantes afectados en la región A del gen bifuncional carRA, denominados carA, acumulan menos beta-caroteno que el tipo silvestre, con un promedio de 4 ppm. Pueden ser estimulados por los compuestos químicos y son capaces de completar el ciclo sexual (Eslava et al., 1974; Cerdá-Olmedo, 1987; Bejarano, 1988). Este producto parece tener un papel complejo. Existen resultados que le asignan un papel como transportador de sustratos (Murillo et al., 1981), hay otros que sugieren un papel regulador en la ruta (Murillo, 1980) y su papel parece claro en la fotoinducción de la misma y la regulación por producto final (Bejarano, 1988; Bejarano et al., 1988).

Los cultivos del tipo silvestre de P. blakesleeanus en medio mínimo sólido y en oscuridad durante cuatro días contienen alrededor de 40 ppm. Esta cantidad se conserva casi constante a lo largo del tiempo, pero puede ser incrementada

por la luz, ciertos compuestos químicos, la reacción sexual y ciertas mutaciones (Cerdá-Olmedo, 1987).

La iluminación continua de los cultivos de P. blakesleeanus con 1 W/m^2 aumenta unas 10 veces el contenido de beta-caroteno (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980). En la estimulación de la síntesis de beta-caroteno por la luz (fotocarotenogénesis) intervienen al menos 7 genes: madA, madB, picA, picB, carA, carC y carS (Cerdá-Olmedo, 1984; 1987). Los productos de los genes madA y madB son responsables del proceso general de percepción de la luz y firmes candidatos a estar afectados en el complejo fotorreceptor para el fototropismo (Galland y Lipson, 1987; Presti y Galland, 1987).

El gen carC ha sido caracterizado por estudios genéticos y fisiológicos (Revuelta y Eslava, 1983; 1984). Sus mutantes acumulan menos beta-caroteno que la estirpe silvestre y responden parcialmente a la estimulación por luz. El producto de este gen tiene efectos epistáticos sobre los otros genes de la carotenogénesis, por lo que su acción podría consistir en estabilizar el complejo inhibidor pA-beta-caroteno-pS o facilitar su formación (Cerdá-Olmedo, 1987).

Los genes picA y picB han sido poco estudiados: se aislaron como deficientes para la fotoinducción (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980), por lo que los trabajos se han enfocado en su respuesta a la luz (Jarayam et al., 1980). No se descarta, por lo tanto, que uno de los dos genes pic coincidiera con el gen carC. Ningún mutante afectado en el gen carRA presenta fotoestimulación de la carotenogénesis, lo que le atribuye un papel central en esta respuesta (Cerdá-Olmedo, 1987; Bejarano, 1988).

Algunos compuestos químicos, como el retinol y el ftalato de dimetilo, incrementan el contenido de beta-caroteno hasta cerca de las 3500 ppm (Bejarano et al., 1988). Los efectos de ambos compuestos son aditivos y afectan de modo diferente a los mutantes de la carotenogénesis (Bejarano,

1988), lo que implica mecanismos de acción diferentes.

Se han aislado mutantes llamados "quimioinsensibles", de color amarillo similar al silvestre que responden poco o nada a la estimulación por productos químicos (Cerdá-Olmedo, 1987; Resultados no publicados de nuestro laboratorio). Se han caracterizado genéticamente dos de ellos: uno define el gen carI y el otro ha sido asignado al gen carRA (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982). De los estudios genéticos se deduce que los compuestos químicos, para ejercer su acción, necesitan al menos de los productos génicos de carI y carA. Existe otro mutante quimioinsensible que no complementa a las mutaciones carI o carA mencionadas (Resultados no publicados de nuestro laboratorio).

Es posible obtener estirpes de Phycomyces que contengan núcleos de los dos sexos, denominadas heterocariontes intersexuales. La heterocariosis intersexual con núcleos silvestres induce la acumulación de aprox. 400 ppm de beta-caroteno. Los ácidos trispóricos son los responsables de la estimulación de la carotenogénesis debida a la reacción sexual (Sutter, 1987). La estimulación sexual de la ruta requiere la presencia de beta-caroteno y no ocurre en los mutantes quimioinsensibles (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986).

Los estudios de carotenogénesis in vitro han confirmado la ruta de biosíntesis propuesta (Fig. 2 y 3). Los hechos que la apoyan son: producción de fitoeno, fitoflueno, zeta-caroteno, neurosporeno, licopeno (Lee y Chichester, 1969) y gamma-caroteno (Bramley y Davies, 1976); conversión de estos intermediarios en beta-caroteno (Davies, 1973; Bramley et al., 1977); y la competición de intermediarios no radiactivos con mevalonato radiactivo en la producción de beta-caroteno (Bramley y Davies, 1976). Sin embargo, la obtención de beta-zeacaroteno in vitro en ciertas condiciones sugiere que el orden de las reacciones no es absolutamente fijo (Bramley et al., 1977).

Las enzimas que catalizan las reacciones previas al fitoeno están en la fracción soluble, mientras que las restantes están unidas a membranas. Se han solubilizado parcialmente la deshidrogenasa del fitoeno y la ciclasa del licopeno (Bramley y Taylor, 1985), lo que abre la posibilidad de su purificación.

Este trabajo contribuye al estudio de la carotenogénesis combinando los dos enfoques más importantes hasta la fecha, el genético y el bioquímico. Para el trabajo genético partimos del supuesto de que podrían existir mutantes superproductores de beta-caroteno diferentes a carS, algunos de los cuales podrían estar ya en las colecciones de estirpes de Phycomyces. La estimulación de la carotenogénesis por mecanismos independientes del gen carS sugiere la posible construcción de estirpes hiperproductoras de beta-caroteno que reunieran dos o más de tales mecanismos. Además queríamos estudiar la interrelación entre las mutaciones carA y carS dado que los estudios previos sugerían su papel regulador de la ruta.

El trabajo bioquímico se centró en la carotenogénesis in vitro. Los estudios previos (De la Concha et al., 1983) con estirpes superproductoras se hicieron con extractos celulares obtenidos de micelios cultivados en medio líquido. En estas condiciones no se encontró una gran diferencia en la incorporación de precursores radiactivos a carotenos entre la estirpe silvestre y los mutantes carS. Ya que la producción de caroteno por Phycomyces depende de las condiciones de cultivo (Goodwin, 1952), decidimos obtener los extractos para los trabajos de carotenogénesis in vitro a partir de micelios cultivados en medio sólido.

MATERIALES Y METODOS

ESTIRPES

La Tabla 1 enumera las estirpes de Phycomyces blakesleeanus usadas en este trabajo junto con su genotipo y su origen. La procedencia de las diferentes estirpes y otros detalles pueden ser consultados en "Genetic nomenclature and strain catalogue of Phycomyces" (edición offset por T. Ootaki, Yamagata, Japón, 1982) y la revisión de Cerdá-Olmedo de 1985.

La denominación de las estirpes utiliza letras y números para indicar respectivamente el laboratorio de procedencia y el número de catálogo. Así NRRL indica el Northern Regional Research Laboratory, USDA, Peoria, Illinois; A, el Departamento de Genética de la Universidad de Salamanca; C, el Instituto de Tecnología de California; y S, el Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla.

Los genotipos indican el sexo (+) ó (-), y las mutaciones conocidas de la estirpe respecto a la silvestre. Las mutaciones se designan con tres letras minúsculas que hacen referencia al proceso biológico afectado: las mutaciones car afectan a la síntesis de carotenoides; las mad a la respuesta fototrópica; las gal confieren resistencia a 2-desoxigalactosa; las geo al geotropismo; las rib, lys y nic al metabolismo de riboflavina, lisina y ácido nicotínico respectivamente. A continuación de las letras minúsculas, una mayúscula indica el gen mutado y un número, el alelo.

En la Tabla 1 el fondo genético "N" es el de la estirpe silvestre NRRL1555 y sus derivados por mutación espontánea; "N mut" es el mismo expuesto a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (excepto en A87, que fue expuesto a radiación ultravioleta); "N iso" es isogénico con "N", obtenido por al menos 5 retrocruzamientos con NRRL1555; "Mezcla" deriva del cruza-

=====
 Tabla 1. Estirpes de P. blakesleeanus utilizadas en este trabajo.

ESTIRPE	GENOTIPO	FONDO GENETICO
NRRL1555	<u>silvestre</u> (-)	N
A44	<u>ribA2 carA5</u> (+)	Mezcla
A56	<u>silvestre</u> (+)	N iso
A87	<u>lisA401</u> (-)	N mut
B36	<u>nicA101</u> (+)	N iso
C2	<u>carA5</u> (-)	N mut
C5	<u>carB10 geo-10</u> (-)	N mut
C9	<u>carR21</u> (-)	N mut
Cl15	<u>carS42 mad-107</u> (-)	N mut
S101	<u>carS42 mad-107</u> (+)	Mezcla
S102	<u>nicA101</u> (-)	N mut
S105	<u>carS101 carS42 mad-107</u> (-)	N mut
S114	<u>carS110 carS42 mad-107</u> (-)	N mut
S115	<u>carS111 carS42 mad-107</u> (-)	N mut
S144	<u>carI131</u> (-)	N mut
S198	<u>carA57</u> (+)	Mezcla
S200	<u>carA87</u> (+)	Mezcla
S225	<u>carD171 nicA101</u> (-)	N mut
S226	<u>carD172 nicA101</u> (-)	N mut
S229	<u>carD174 nicA101</u> (-)	N mut
S236	<u>nicA101</u> (+)	N iso
S280	<u>carA5 carS42 mad-107</u> (-)	Mezcla
S281	<u>carA5 carS42 mad-107</u> (-)	Mezcla
S303	<u>carS179</u> (-)	N iso
S395	<u>nicA101 gal-5</u> (+)	N iso
S444	<u>carS42 car-401 mad-107</u> (-)	N mut
S468	<u>carA57 carS42</u> (+)	Mezcla
S470	<u>carA87 carS42</u> (-)	Mezcla
S471	<u>carA87 carS42</u> (+)	Mezcla
S477	<u>nicA101 carS111 carS42</u> (-)	N iso
S497	<u>carS42</u> (-)	N iso
S498	<u>carS101 mad-107</u> (-)	N iso
S242 * S243	(1)	Mezcla

(1) Heterocarionte intersexual entre dos mutantes carS estabilizado por letales recesivos (Murillo et al., 1978).
 =====

miento de al menos dos estirpes naturales de fondos genéticos distintos.

METODOS GENERALES

Como medio mínimo se utilizó el descrito previamente por Sutter (1975) utilizando 2 g/l de asparagina como fuente de nitrógeno. Como medio completo se utilizó el anterior suplementado con 1 g de extracto de levadura por litro. El medio sólido contenía 15 g de agar por litro. Cuando se deseaba crecimiento colonial, se le añadía al medio sólido antes de verterlo en cajas de Petri 7 ml de HCl 1 N por litro de medio, consiguiéndose de esta forma un pH final de aproximadamente 3.3.

Los medios semiindustriales para el crecimiento de la estirpe S444 contenían 30 g/l de melazas y como fuente de nitrógeno 4 g/l de fosfato de amonio o 10 g/l de harina de soja.

Para los estudios de recombinación se utilizó el medio denominado agar patata (Eslava y Alvarez, 1987).

Los suplementos para el crecimiento de mutantes auxótrofos (lisina 200 mg/l, riboflavina 50 mg/l y ácido nicotínico 10 mg/l) o los compuestos químicos para los estudios de estimulación (250 mg de acetato de retinol emulsificado con 1 ml de etanol y 4 de polioxietilensorbitanmonooleato o solución 500 mM de ftalato de dimetilo en etanol) fueron añadidos a partir de soluciones concentradas a los medios ya autoclavados.

Los cultivos se iniciaron normalmente a partir de esporas previamente activadas por choque térmico a 48°C durante 15 minutos

Todos los cultivos se incubaron a 22°C y en oscuridad, a menos que se indique otra cosa. Los cultivos en medio líquido se efectuaron en matraces de Erlenmeyer de 250 ml con 80 ml de medio en un agitador circular.

METODOS GENETICOS

Para obtener y fusionar protoplastos de P. blakesleeanus se siguió el método de Suarez et al. (1987).

Para aumentar la tasa de mutación se expusieron esporas de la estirpe Cl15 a 100 mg/ml de N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina durante 20 minutos, siguiendo el método descrito por Roncero et al. (1984).

Para realizar los cruzamientos se siguió el método descrito por Eslava y Alvarez (1987). Los análisis de tétradas se hicieron recogiendo las germosporas de cada germosporangio en tubos con 1 ml de agua estéril y sembrando alícuotas en los medios adecuados.

DETERMINACION DE LA TASA DE GERMINACION.

Para determinar la tasa de germinación se utilizó medio mínimo esterilizado por filtración, siguiendo el método descrito por Rivero y Cerdá-Olmedo (1987). Se definió como espora germinada aquella que tenía un tubo de germinación de longitud igual o mayor que el diámetro de la espora hinchada. El porcentaje de germinación es la media de dos determinaciones independientes de al menos 200 células en cada una.

METODOS ANALITICOS

Definimos como peso seco al obtenido después de congelar la muestra a -20°C y liofilizarla a 0.5 Torr, por al menos, 12 horas.

La glucosa presente en los medios de cultivo se determinó por el método de la oxidasa de la glucosa en un analizador de glucosa YSI modelo 27 (Yellow Springs Instruments, Ohio, USA).

Se determinó la proteína por el método de Lowry et al. (1951), con albúmina de suero bovino como patrón.

Se cuantificó el beta-caroteno presente en las muestras siguiendo el método descrito por Govind y Cerdá-Olmedo (1986).

CAROTENOGENESIS IN VITRO

Se separaron del agar con ayuda de una espátula y se secaron con papel de filtro, micelios cultivados cuatro días en oscuridad en agar mínimo. Se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron en un mortero preenfriado hasta conseguir un polvo fino. Se dejó aumentar la temperatura del triturado y se homogeneizó con tampón A (0.4 M tris(hidroximetil)aminometano, 5 mM 2-mercaptoetanol, pH 8.0) enfriado, a razón de 0.75 ml por micelio de una caja de Petri.

El homogeneizado se centrifugó a 12100 g durante 30 minutos, descartándose el precipitado.

La reacción enzimática se incubó en tubos de 1.5 X 15 cm en un volumen final de 0.5 ml a 24°C durante 3 h en agitación suave y en oscuridad. La mezcla de reacción estuvo compuesta por: 50 ul de D-L [2-C¹⁴]mevalonato sódico (48.5 nmoles, 8333 Bq incorporables de la forma L; otros tantos en la D), 240 ul de solución de cofactores (10 uM ATP, 1 uM NAD, 1 uM NADP, 1 uM FAD y 20.83 mM KF en tampón A) y 10 ul de solución de iones divalentes (200 mM MgCl₂ y 300 mM MnCl₂). Para iniciar la reacción se añadió 200 ul de extracto crudo; para terminarla 2 ml de metanol. A continuación se pueden congelar los tubos a -20°C hasta su análisis.

Las muestras a analizar se pasaron a un embudo de separación, se mezclaron con aproximadamente 50 ml de solución saturada de NaCl y se extrajeron 3 veces con 10 ml de éter etílico. Las fracciones etéreas se juntaron y se eliminó el agua de ellas tratándolas 1 h con 10 g de Na₂SO₄. El éter se eliminó por evaporación al vacío y el residuo se resuspendió en 5 ml de éter etílico (EE). Se separaron alícuotas de 0.2 ml para medir la radiactividad.

Al resto se añadió 1 ml de una mezcla de terpenos marcadores (150 ug de escualeno, 100 ug de fitoeno, 50 ug de licopeno y 50 ug de beta-caroteno en 1 ml de éter de petróleo de punto de ebullición 40-60°C, ER), se concentró por evapora-

ción al vacío, se resuspendió en un volumen pequeño de EP (aprox. 0.5 ml) y se pasó a través de una columna (0.8 X 3 cm) de alúmina grado II-III mezclada con agua (30 mg/g alúmina); se eluyó con aprox. 3 ml de EP, separándose de esta forma el escualeno y parte del fitoeno. El resto de carotenos se eluyeron con una mezcla de EP:EE (3:1 v/v) hasta la salida del licopeno (aprox. 4 ml).

Las muestras se secaron bajo corriente de nitrógeno, se cromatografiaron en capa fina de gel de sílice (Merck) con éter de petróleo (P. Eb. 60-80°C) como fase móvil en una cámara de saturación. Las bandas de beta-caroteno y licopeno se marcaron y fueron tratadas al igual que las otras. Los cromatogramas se expusieron a vapores de I₂, se raspó el material de las bandas de carotenos y escualeno y se midió su radiactividad.

Para medir la radiactividad las muestras se colocaron en viales de 1.5 X 5 cm con 5 ml de una solución 5 g/l de 2,5-difeniloxazol en tolueno y se contaron durante 5 min un contador de centelleo Beckman modelo LS 2800. La radiactividad de fondo fué siempre menor de 0.5 Bequerelios.

RESULTADOS.

I.- MUTANTES SUPERPRODUCTORES DE BETA-CAROTENO.

Los mutantes que acumulan grandes cantidades de beta-caroteno resaltan en un fondo silvestre. Se puede identificar una colonia superproductora de beta-caroteno en una caja que contenga 30000 colonias silvestres (Torres-Martínez et al., 1980). La fácil identificación ha hecho posible que se cuente con una gran cantidad de ellos.

El análisis genético era, por el contrario, muy laborioso. Sólo tres estirpes, C115, M1 y S100, fueron sometidas a análisis por complementación (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976). Llevan mutaciones recesivas que no complementan entre sí que definen el gen carS. Hemos reconsiderado el fenotipo y la genética de los mutantes superproductores y hemos descubierto un nuevo gen, carD (Tabla 2).

Los mutantes carS no representan el techo máximo de producción de beta-caroteno en Phycomyces, ya que la incrementan en respuesta a varios productos químicos (Bejarano, 1988) y a la estimulación sexual (Murillo, et al., 1978).

A partir de la estirpe C115, portadora de una mutación carS, se obtuvo la cepa S444 que la supera ampliamente en contenido de beta-caroteno (Tabla 2). Mutaciones como la presente en S444 son muy raras, ya que sólo se encontró un mutante de este tipo durante el escrutinio de, aproximadamente, millón y medio de colonias procedentes de esporas mutagenizadas.

Clasificación genética de los mutantes superproductores.

Buscamos en la colección de estirpes de P. blakesleeanus mutantes superproductores aún no clasificados. Construimos

=====
 Tabla 2. Fenotipo de algunos mutantes de P. blakesleeanus superproductores de beta-caroteno.

Estirpe	Gen mutado	B.C. ^b	Cruza	Estimulación ^a por:			
				Luz	Ret.	F.D.	Sexo
NRRL1555		55	si	+	+	+	+
C115	<u>carS</u>	3550	no	-	-	+	+
M1	<u>carS</u>	4160	no		+		+
S100	<u>carS</u>	1560	no		+	+	+
S303	<u>carS</u>	4900	no	-	-	+	+
S497	<u>carS</u>	5100	no	-	-	+	+
S498	<u>carS</u>	3650	no	-	-	+	+
S225	<u>carD</u>	958	si	+	+	+	+
S226	<u>carD</u>	915	si	+	+	+	+
S229	<u>carD</u>	646	si	+	+	+	+
S444	<u>carS</u> y ?	9100	no	-	-	-	-
S242*S243	<u>carS</u> y ?	15000	no	-	-	-	-

^aEstímulos descritos: Luz blanca (4 W/m²), acetato de retinol (0.75 mM), ftalato de dimetilo (3 mM) y sexo (ácidos trispóricos, 10 ug/ml, o heterocariosis intersexual). Los datos de las estirpes M1, S100 y S303 se han completado con resultados obtenidos por Murillo y Cerdá-Olmedo (1976), Govind y Cerdá-Olmedo (1986) y Bejarano (1988).

^bContenido de beta-caroteno acumulado en cultivos de cuatro días en medio mínimo y en oscuridad.

=====

heterocariontes por el método de Ootaki (1973). La estirpe S229 no complementa con C115. A diferencia de los mutantes carS conocidos, S229 forma cigosporas con estirpes de sexo opuesto. Otras estirpes superproductoras de beta-caroteno y capaces de cruzar no complementan entre sí (Tabla 3).

Proponemos la denominación de carD para el gen mutado en

=====
 Tabla 3. Complementación de los mutantes carD.
 =====

	S225	S226	S229
A87	+	+	+
C115	+	+	+
S225	-	-	-
S226	-	-	-

=====

estas estirpes. Los micelios de distintos mutantes carD acumulan distintas cantidades de beta-caroteno, entre 600 y 900 ppm en condiciones no estimuladas.

Los incrementos que sufren estas estirpes bajo la acción de diversos activadores de la carotenogénesis se muestran en la Tabla 4. Todos estos mutantes incrementan su contenido de beta-caroteno como respuesta a los diferentes estimuladores empleados. Esto representa una importante diferencia con respecto a los mutantes carS, que sólo pueden ser activados por ftalato de dimetilo, y no responden ni a la luz ni al retinol.

Otra diferencia importante entre los mutantes carS y los mutantes carD, es que, aunque ambos son estimulados por las hormonas sexuales y son capaces de iniciar el ciclo sexual, únicamente estos últimos forman cigosporas. Este hecho facilita los análisis por recombinación.

Análisis genético de la mutación carD.

Para definir la situación del gen carD con respecto a

=====
 Tabla 4. Acumulación de beta-caroteno (ppm) en la estirpe S102 y en tres mutantes carD en respuesta a diferentes estímulos.

ESTIRPE	ESTIMULO ^a					
	LUZ		Retinol ^b		Ftalato ^c	
	(-) (±)	(-) (±)	(-) (±)	(-) (±)	(-) (±)	(-) (±)
S102	64	253	136	2237	74	1396
S225	958	1363	1074	2382	1007	1810
S226	915	1199	1065	2492	1016	1619
S229	646	939	809	3382	662	2942

^aLuz blanca (4 W/m²), acetato de retinol (0.75 mM), ftalato de dimetilo (2 mM).

^bEstos cultivos contienen Tween 80 (4% v/v) y etanol (1% v/v) como emulsificantes.

^cEstos cultivos contienen etanol (1% v/v).

=====

otros genes que afectan la carotenogénesis efectuamos el análisis por recombinación de la estirpe S229. La Tabla 5 describe el cruzamiento con A44, cuya mutación carA es un buen marcador centromérico del grupo de complementación número IV (Orejas et al., 1987), donde se encuentran los genes estructurales de la ruta y el gen carS.

Las cigosporas del cruce A44 X S229 comenzaron a germinar después de 140 días de iniciado éste. Muchos germosporangios, alrededor del 60%, no contenían germosporas viables. Hicimos el análisis de tétradas a 40 germosporangios con ger-

=====
 Tabla 5. Análisis genético por recombinación de las mutaciones carA y carD.

Cruce: A44 X S229	
Genotipos: <u>ribA2 carA5</u> (+) X <u>nicA101 carD174</u> (-)	

Germosporangios estudiados	86
Germosporangios viables	55
Tétradas regulares	37
Ditipos parentales (colonias blancas y superamarillas)	12
Ditipos recombinantes (colonias silvestres y blancas)	22
Tetratipos (colonias silvestres, blancas y superam.)	3
Tétradas irregulares (sólo colonias blancas)	3

=====

mosporas viables, de los cuales 37 contenían tétradas regulares.

Los recombinantes carA carD (presentes en los ditipos recombinantes) son blancos e indistinguibles fenotípicamente del mutante carA. La alta frecuencia de recombinantes demuestra que carA y carD no están ligados y por tanto que carD no forma parte de la región carB-carRA que rige varias funciones relacionadas con la carotenogénesis. Al ser baja la frecuencia de tetratipos, tanto carA como carD deben estar ligados a su centrómero y, como no están ligados entre si, carD tiene que estar cerca del centrómero de un cromosoma distinto del que lleva el grupo IV de ligamiento. Al situar la mutación carD en un grupo de ligamiento diferente, no puede ser un alelo de carS.

Los ditipos recombinantes fueron más abundantes que los

ditipos parentales y la diferencia es significativa ($P=4\%$) según el método de χ^2 cuadrado o el análisis binomial. Este tipo de resultados llamado "ligamiento inverso", es infrecuente pero no imposible en estudios de recombinación con hongos (Esser y Kuenen, 1967; Fincham et al. 1979).

La existencia de dos genes independientes cuya mutación produce un fenotipo superproductor de beta-caroteno nos hizo preguntarnos por el fenotipo del doble mutante carD carS. Este doble mutante podría acumular más beta-caroteno que cualquiera de sus parentales e informar sobre las funciones de los productos correspondientes.

Como se ha mencionado anteriormente los mutantes carS son incapaces de formar cigosporas. Para que recombinen se cruzan utilizando heterocariontes que contienen núcleos carS y núcleos "ayudadores", dotados de una mutación de auxotrofia, por una estirpe de sexo opuesto que lleve la misma mutación de auxotrofia. La descendencia de los núcleos ayudadores se elimina sembrando los productos meióticos en un medio sin el suplemento auxotrófico (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982).

Las cigosporas del cruce diseñado para intentar responder las preguntas anteriores comenzaron a germinar a los 130 días de iniciado éste. Sólo el 46% de los germosporangios contenía germosporas viables (Tabla 6).

El contenido de beta-caroteno de los dobles mutantes carD carS no difiere significativamente del de la estirpe carS. Los resultados confirman que carD y carS son genes distintos y no estrechamente ligados.

El principal objetivo del cruce carD X carS era obtener dobles mutantes. De 10 tétradas analizadas 6 fueron ditipos recombinantes y no obtuvimos ningún tetratipo. Ya que carS no está ligado a su centómero esperábamos obtener numerosos tetratipos. De hecho, en cruzamientos carA X carS se han obtenido 52% (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982) o 72% (esta tesis, pág 32) de tetratipos. La diferencia de resultados podría

=====
 Tabla 6. Análisis genético por recombinación de las mutaciones carD y carS.

Cruce: (S101 * S236) X S229
 Genotipo: (carS42 mad-107 (+) * nicA101 (+)) X nicA101 carD174 (+)

Germosporangios estudiados	28
Germosporangios viables	13
Germosporangios con colonias auxótrofas solamente	3
Tétradas completas	10
Ditipos parentales (colonias <u>carD</u> y <u>carS</u>)	4
Ditipos recombinante (colonias silvestres y <u>carD</u> <u>carS</u>)	6
Tetratipos (colonias silvestres, <u>carD</u> , <u>carS</u> y <u>carD</u> <u>carS</u>)	0

=====

deberse a la falta de isogenicidad de las estirpes usadas en los cruzamientos, que podrían portar distintas ordenaciones cromosómicas.

II.- INTERACCION DE LAS FUNCIONES carS Y carA.

Obtención de dobles mutantes carA carS.

Por mutagénesis con nitrosoguanidina de la estirpe C115 superproductora de beta-caroteno, F. Murillo aisló una serie de mutantes, algunos de los cuales tenían fenotipo albino. Por ser estimulables por retinol y por otros indicios algunos de ellos fueron considerados dobles mutantes carA carS (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976).

En un trabajo posterior, M. I. G. Roncero, aisló un doble mutante carA carS por recombinación entre las estirpes C2 y C115. El doble mutante es amarillo y acumula alrededor de 250 ppm de beta-caroteno (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982). La diferencia de fenotipo entre los dobles mutantes obtenidos por los dos métodos podría achacarse a los diferentes alelos carA presentes en cada caso.

Para probar la validez de ese razonamiento y obtener, además, nuevos dobles mutantes efectuamos dos cruces entre la estirpe C115, el mismo mutante carS utilizado en los dos trabajos anteriores, y dos nuevas estirpes portadoras de mutaciones carA. Como antes, los cruzamientos exigen la presencia de núcleos "ayudadores", S102 en este caso.

Las cigosporas del cruzamiento S200 X (C115 * S102) germinaron después de 4 meses de latencia (Tabla 7). La escasa isogenicidad de las estirpes que intervinieron en el cruce es, seguramente, la causa de la alta proporción de germosporangios estériles (50%) y de tétradas irregulares (30%). Estas tétradas se suponen incompletas, es decir, debidas a la pérdida de un producto meiótico. Así, los tritipos y los monotipos parentales representan tetratipos y ditipos parentales incompletos respectivamente. La inexistencia de ditipos irregulares (un producto parental y otro recombinante) indica

=====
 Tabla 7. Análisis genético del cruce S200 X (C115 * S102)

Genotipo: carA87 (+) X (carS42 mad-107 (-) * nicA101 (-))

Germosporangios estudiados	102
Germosporangios fértiles	51
Germosporangios con colonias auxótrofas	11
Germosporangios con colonias solo protótrofas	40
Tétradas regulares	28
Ditipos parentales (colonias <u>carA</u> y <u>carS</u>)	4
Ditipos recombinantes (colonias silvestres y <u>carA carS</u>)	4
Tetratipos (colonias silvestres, <u>carA</u> , <u>carS</u> y <u>carA carS</u>)	20
Tétradas irregulares	12
Monotipos parentales (colonias <u>carA</u>)	3
Tritipos (colonias silvestres, <u>carS</u> y <u>carA carS</u>)	5
Tritipos (colonias <u>carA</u> , <u>carA carS</u> y silvestres)	4

=====

que no se pierden dos productos meióticos a la vez.

El análisis genético (Tabla 7) indica que los genes carA y carS no están estrechamente ligados (46% de recombinación, no es significativamente distinto del 50%). Roncero encontró una frecuencia de recombinación para ambos genes del 36% (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982). Contando las tétradas irregulares junto con las regulares de las que probablemente derivan, los genes carA y carS (Tabla 7) dan 29 tetratipos, 5-7 ditipos parentales y 4 ditipos recombinantes. El estudio estadístico conjunto de estos datos y de los obtenidos por Roncero por el método de χ^2 cuadrado, indican ($5\% > P > 2.5\%$) que no pertenecen al mismo conjunto.

No analizamos en detalle el cruce S198 X (C115 * S102),

pero aislamos de los ditipos recombinantes obtenidos algunos dobles mutantes carA57 carS42.

Normalmente el análisis genético se hace inmediatamente después de la germinación de las cigosporas. Si, por cualquier motivo, se desea posponerlo, es aceptable la congelación de las germosporas a -20°C . En 10 germosporangios del cruce S200 X (C115 * S102) se observó una media de 2780 germosporas viables. En 10 germosporangios del mismo cruce congelados en agua a -20°C durante dos meses se observó una media de 2340 germosporas viables.

Los dobles mutantes carA carS obtenidos por recombinación (que combina los alelos carA5, carA57 y carA87 con el alelo carS42) son amarillos. Los presuntos dobles mutantes de este tipo obtenidos por Murillo a partir de la estirpe C115 son blancos. El color pudiera no ser la única diferencia fenotípica entre ambos grupos de mutantes. Decidimos, por lo tanto, hacer un estudio más detallado de su comportamiento.

Fenotipo de los dobles mutantes carA carS.

Los dobles mutantes carA carS obtenidos por recombinación contienen cantidades apreciables de beta-caroteno, incluso más altas que los de la estirpe silvestre en las mismas condiciones. Los niveles basales varían de 240 a 580 ppm, dependiendo del alelo (Tabla 8). Por el contrario, las estirpes obtenidas por dos ciclos de mutagénesis contienen muy escaso beta-caroteno.

Ninguna de las estirpes de la Tabla 8 es fotoinducible. La validez de esta afirmación es clara para las estirpes obtenidas por recombinación, pero menos para las otras, cuyo bajo nivel basal de beta-caroteno hace difícil descartar que las desviaciones observadas sean debidas a error experimental.

Todas las estirpes de la Tabla 8 son activables por retinol y ftalato de dimetilo. El efecto del retinol en los do-

=====
 Tabla 8. Estimulación de la carotenogénesis en la estirpe silvestre y algunos mutantes de P. blakesleeanus por tres activadores independientes.

Estirpe	Genotipo relevante	Contenido de beta-caroteno (ppm)					
		Luz blanca (4 W/m ²)		Retinol ^a (0.75 mM)		Ftalato ^b (2 mM)	
		(-) (+)	(-) (+)	(-) (+)	(-) (+)	(-) (+)	(-) (+)
NRRL1555	silvestre (-)	45	207	104	1686	92	1100
S105	<u>carS42</u> <u>car-101</u> (-)	2	3	5	601	3	165
S114	<u>carS42</u> <u>car-110</u> (-)	3	5	7	379	4	174
S115	<u>carS42</u> <u>car-111</u> (-)	2	4	5	692	3	356
S280	<u>carA5</u> <u>carS42</u> (+)	262	232	311	527	303	1186
S281	<u>carA5</u> <u>carS42</u> (-)	244	198	283	409	322	1206
S468	<u>carA57</u> <u>carS42</u> (+)	546	463	590	869	623	2130
S470	<u>carA87</u> <u>carS42</u> (-)	436	422	470	512	462	1540
S471	<u>carA87</u> <u>carS42</u> (+)	583	444	696	879	654	2425

^aEstos cultivos contienen Tween 80 (4% v/v) y etanol (1% v/v) como emulsificantes.

^bEstos cultivos contienen etanol (1% v/v).

=====

bles mutantes carA carS obtenidos por recombinación es muy escaso. Esta limitación no puede ser explicada por la "incapacidad" de las estirpes de incrementar la cantidad de caroteno, ya que con ftalato de dimetilo los mismos mutantes presentan incrementos mayores en los niveles de beta-caroteno.

Las claras diferencias fenotípicas entre los dobles mutantes carA carS obtenidos por recombinación y los demás de la Tabla 8 inducen la sospecha de que estos últimos no sean

en realidad dobles mutantes carA carS.

Análisis genético por recombinación de las estirpes S105, S114 y S115.

Las observaciones descritas en el apartado anterior nos indujeron a analizar genéticamente por recombinación los mutantes blancos derivados de C115 por mutación.

Los tres cruces (Tabla 9) produjeron germosporangios fértiles en su gran mayoría. Hubo pocas tétradas irregulares y éstas fueron fácilmente asignables como tétradas regulares incompletas.

No obtuvimos ditipos recombinantes y los tetratipos fueron muy escasos. Este resultado demuestra que las mutaciones car responsables del fenotipo albino en estas estirpes están estrechamente ligadas al gen carS. Como no se conocen otros genes car en las inmediaciones de carS, podemos suponer que están en el propio gen carS.

En total de los tres cruces independientes analizados, sólo se encontraron 2 germosporangios, de los 198 estudiados, que reflejaran recombinación entre los marcadores car. Este resultado sugiere una frecuencia de recombinación cercana al 0.5%. Este valor es similar al 0.6% encontrado para la frecuencia de recombinación entre dos alelos del gen nica (Eslava et al., 1975) y al 1.1% para dos alelos del gen carRA (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982) de P. blakesleeanus.

La frecuencia máxima de recombinación necesaria para que de 198 germosporangios estudiados se encuentren dos, uno o ningún tetratipo, según la distribución binomial, es de 3.5% (P=5%). Este valor de recombinación es superior al que hemos encontrado para el gen carS. De este resultado y su similitud con los previamente publicados para recombinaciones intragénicas concluimos que las dos mutaciones presentes en las estirpes albinas de la Tabla 9 están en el gen carS. Por lo

=====
 Tabla 9. Análisis genético por recombinación de los mutantes S105, S114 y S115.

Cruce No. 1	S395 X S115
Genotipos:	<u>gal-5</u> <u>nicA101</u> (+) X <u>car-111</u> <u>carS42</u> <u>mad-107</u> (-)
Cruce No. 2	S236 X S105
Genotipos:	<u>nicA101</u> (+) X <u>car-101</u> <u>carS42</u> <u>mad-107</u> (-)
Cruce No. 3	S236 X S114
Genotipos	<u>nicA101</u> (+) X <u>car-110</u> <u>carS42</u> <u>mad-107</u> (-)

	Cruce		
	1	2	3
Latencia (días)	90	123	122
Germosporangios estudiados	59	59	100
Germosporangios fértiles	53	52	93
Tétradas regulares	45	45	80
Ditipos parentales (col. blanc. y amar.)	45	44	79
Ditipos recombinantes (col. <u>carS</u> y otra)	0	0	0
Tetratipos (col. blanc., amar., <u>carS</u> y otra)	0	1	0
Tétradas irregulares	8	7	13
Monotipos parentales (col. blanc. o amar.)	8	7	13
Tritipos (col. blanc. amar. y superamar.)	0	0	1

=====
 tanto, proponemos la reclasificación de los mutantes albinos (S115 y similares) como dobles mutantes carS carS.

La frecuencia de recombinación intragénica para los tres genes estudiados de P. blakesleeanus es ligeramente mayor que los encontrados en otros organismos eucarióticos, que suele ser de 0.1-0.01% (Fincham, et al. 1979).

Como demostración de una segregación independiente presentamos en la Tabla 10 la segregación de la auxotrofia para el ácido nicotínico y el color (silvestre o albino) en el cruce S395 X S115. Se aprecia claramente la igual frecuencia de ditipos parentales y ditipos recombinantes y de genotipos parentales y recombinantes, hechos típicos de genes independientes. Esta regularidad en la segregación descarta que hubiéramos perdido selectivamente algún recombinante. El alto número de tetratipos indica que al menos uno de los marcadores debe estar alejado del centrómero.

En el tritipo obtenido en el cruce S236 X S114 obtuvimos colonias blancas, amarillas y una colonia superamarilla, la cual ha sido denominada S496. En el único tetratipo obtenido del cruce S236 X S105 obtuvimos colonias blancas, amarillas y dos clases de superamarillas (de diferente intensidad), dos de las cuales se han denominado S497 y S498.

Analizamos el contenido de beta-caroteno en las dos colonias superamarillas obtenidas del cruce S236 X S105. Efectuamos las determinaciones por duplicado en dos extracciones independientes por el procedimiento del doble ciego. Los resultados, mostrados en la Tabla 11, indican que la estirpe S498 acumula una cantidad de beta-caroteno similar al de la estirpe C115, y representa el recombinante carS42. El mutante S497 acumula más caroteno que la estirpe C115 y representa, por lo tanto, el recombinante carS101.

Es interesante el hecho de que dos mutaciones que separadas dan fenotipo superamarillo, al combinarse den un fenotipo albino.

Estudio de complementación de un mutante carS blanco.

En el estudio de complementación entre S115 y la cepa silvestre (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976) algunos heterocariotes contenían más beta-caroteno que el más coloreado de

=====
 Tabla 10. Segregación de la auxotrofia para el ácido nicotínico y del color de la colonia en el cruce S395 X S115
 =====

Genotipos: nicA101 gal-5 (+) X car-111 carS42 mad-107 (-)

Germosporangios estudiados	59
Germosporangios fértiles	53
Análisis de tétradas	
Tétradas regulares	32
Ditipos parentales	6
Ditipos recombinantes	5
Tetratipos	21
Tétradas irregulares	21
Monotipos parentales	2
Monotipos recombinantes	2
Tritipos	17

Análisis de productos meióticos

Número de colonias estudiadas	1810
Número de colonias blancas	943
Número de colonias amarillas (silvestres)	867
Número de colonias superamarillas u otras	0

	<u>nicA⁺</u>	<u>nicA⁻</u>
colonias blancas	502	441
colonias amarillas	377	490

=====
 Tabla 11. Contenido de beta-caroteno en los dos segregantes superamarillos del cruce S236 X S105
 =====

<u>Estirpe</u>	<u>Experimento</u>	<u>beta-caroteno(ppm)</u>
C115	1	3 600
"	2	3 900
S497	1	4 800
"	2	5 400
S498	1	3 500
"	2	3 800

=====

los parentales. Ya que aquel estudio quedó incompleto, a falta de las determinaciones de la proporción nuclear en los heterocariontes, lo repetimos con más detalle.

Por fusión de protoplastos de las estirpes A87 (auxótrofa para lisina y silvestre para la carotenogénesis) y S477 (auxótrofa para ácido nicotínico y con dos mutaciones carS que le confieren fenotipo albino) obtuvimos el heterocarionte correspondiente; entre las colonias producidas por sus esporas elegimos siete que a simple vista tenían una coloración diferente y comparamos su contenido en beta-caroteno con su proporción de ambos tipos de núcleos.

En la Figura 4 se muestra la curva de complementación obtenida. Comprobamos que algunos heterocariontes acumulan más beta-caroteno que cualquiera de los parentales. Este resultado se explica únicamente si se asume que los productos inhibidores de la estirpe silvestre y del doble mutante carS carS están interaccionando, y que las moléculas híbridas no son funcionales.

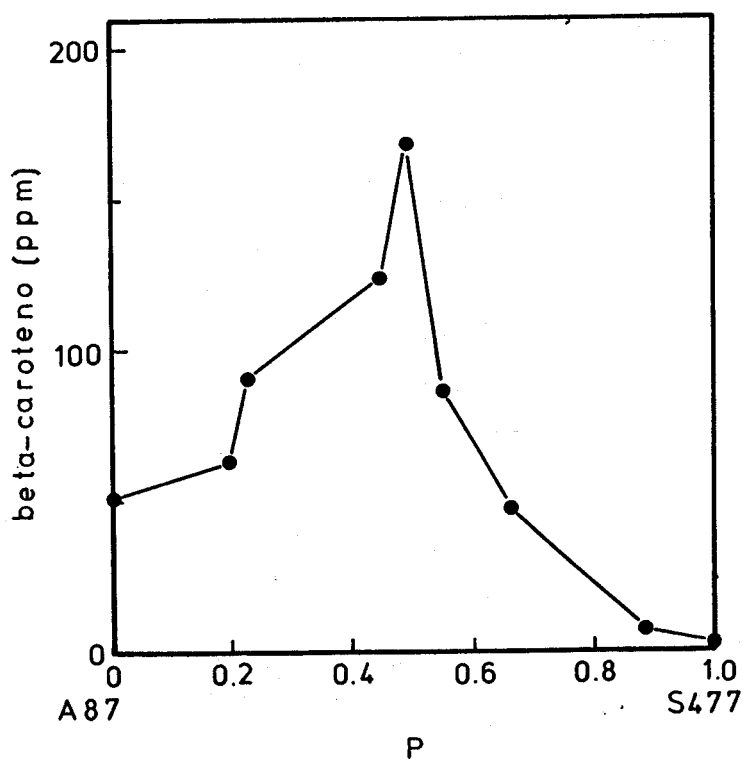


Figura 4. Contenido de beta-caroteno en el heterocariote A87 * S477 en función de la proporción de núcleos (R) S477.

III.- ESTUDIO DEL MUTANTE SUPERPRODUCTOR DE BETA-CAROTENO S444.

Aislamiento y propiedades.

Como se ha visto anteriormente, los mutantes carS no representan un límite superior absoluto a la acumulación de beta-caroteno. La combinación de mutaciones carS e interacción sexual permite obtener estirpes con unas cinco veces más beta-caroteno que los mejores mutantes carS. Nos preguntamos si habrá mutaciones capaces de elevar el contenido de beta-caroteno de los mutantes carS.

La estirpe S444 fue aislada tras exponer esporas de C115 al mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Pág. 21). Presenta un curioso fenotipo: su micelio es un poco más grueso que el silvestre, produce muy pocos esporangióforos que son más gruesos que lo normal, los esporangióforos tienen pocas esporas viables y su micelio presenta sectores de color anaranjado de distinta intensidad. Los sectores de diferente coloración son más evidentes después de un pase por esporas, encontrándose desde colonias que son superamarillas a las que son anaranjado intenso. Sin embargo, todos los intentos de purificar alguno de los segregantes, ya sea de mayor o menor coloración, han sido infructuosos.

Aunque el parental C115 es de sexo (-), S444 no responde a la estimulación por estirpes de ninguno de los dos sexos. Su fenotipo en general recuerda al de un heterocarionte intersexual. El no poder purificar ninguno de los segregantes sugiere la presencia de mutaciones letales en los núcleos que supuestamente componen el heterocarionte.

Los distintos sectores no sólo se diferencian en el color, sino también en la germinabilidad de las escasas esporas que producen. Elegimos tres tipos de micelio y utilizamos la

=====

Tabla 12. Tasa de germinación de las esporas de Cl15 y del mutante S444.

Origen de las esporas	% de germinación
Cl15	81
S444 micelio superamamrillo	68
S444 micelio anaranjado	76
S444 micelio anaranjado oscuro	56

=====

estirpe parental Cl15 como testigo (Tabla 12). En el mutante S444 observamos gran cantidad de esporas anormales y fragmentos celulares. Las germínulas que se producían eran con frecuencia deformes.

Intentamos aislar más mutantes de este tipo. La búsqueda exhaustiva entre al menos 1×10^5 colonias producidas por esporas tratadas con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina no tuvo éxito. Este resultado implica que la mutación o combinación de mutaciones responsables del fenotipo de la estirpe S444 ocurre con muy baja frecuencia.

Producción de beta-caroteno por la estirpe S444.

Las Figuras 5 y 6 describen la acumulación de beta-caroteno en función del tiempo de la estirpe S444 en medio mínimo sólido y líquido. A diferencia de otras cepas superproductoras, que acumulan mayor cantidad de caroteno en medio sólido, S444 acumula 12000 ppm en medio líquido y 9000 ppm en medio

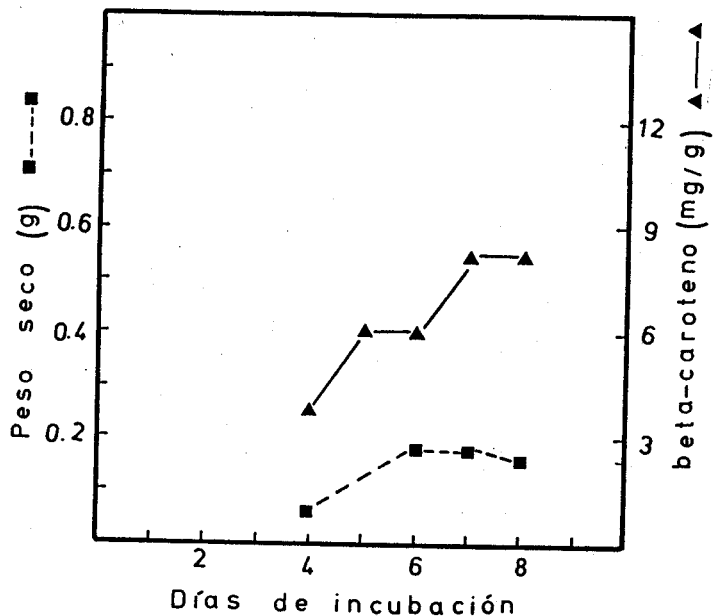


Figura 5. Cinética de producción de beta-caroteno por la estirpe S444 en medio mínimo sólido en función del tiempo.

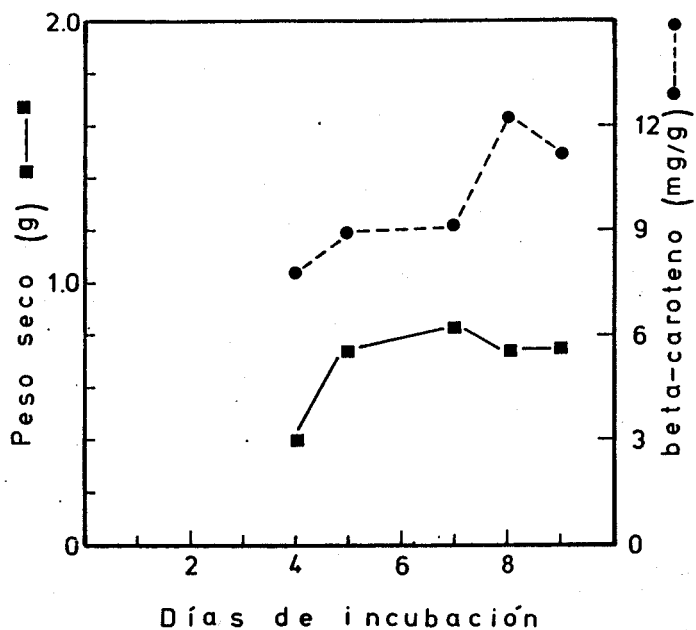


Figura 6. Cinética de producción de beta-caroteno por la estirpe S444 en medio mínimo líquido en función del tiempo.

sólido.

La máxima acumulación de beta-caroteno en ambos medios se alcanza con la finalización del crecimiento. Esta relación puede apreciarse más claramente en la Figura 7, donde se observa que a partir del sexto día el contenido total de beta-caroteno permanece constante.

Para valorar una posible aplicación industrial de la estirpe S444, estudiamos su producción de beta-caroteno en otros medios. Elegimos dos medios semiindustriales para determinar en ellos su capacidad de producción (Tabla 13). El peso seco en estos medios fue similar al del testigo en medio mínimo (SIV). La producción de beta-caroteno fue bastante baja, alcanzándose en el mejor de los casos sólo un tercio de la del testigo.

Es posible que esta baja producción sea debida a que en los medios con melazas, excesivamente ricos en carbohidratos, no se haya alcanzado aún la fase estacionaria del crecimiento, que, de acuerdo con lo mostrado anteriormente, conduce a la máxima producción.

=====
 Tabla 13. Producción de beta-caroteno por la estirpe S444 a los nueve días de cultivo en diferentes medios líquidos.

Medio utilizado	Peso seco(g)	beta-caroteno(ppm)
Melazas y fosfato de amonio	0.4106	4 332
Melazas y harina de soja	0.5837	2 535
Medio mínimo (SIV)	0.4902	12 250

=====

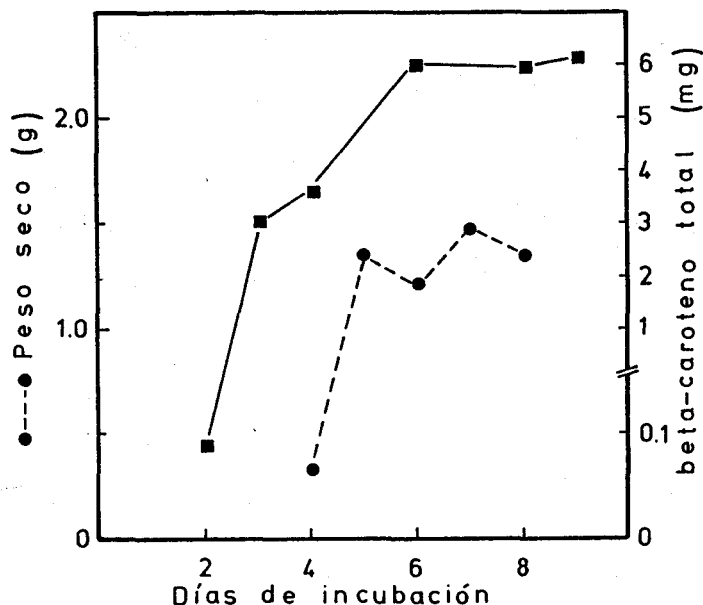


Figura 7. Producción total de beta-caroteno por la estirpe S444 en función del tiempo en los experimentos descritos en las Figs. 5 y 6.

Estudio genético de la estirpe S444.

La estirpe S444 tiene asignado el alelo car-401 para la mutación responsable del aumento en el contenido de beta-caroteno. Para ubicar esta nueva mutación dentro de su genomio y poder obtener, de ser posible, una estirpe hiperproductora de beta-caroteno con un crecimiento más homogéneo y saludable, decidimos cruzarla.

Como mencionamos anteriormente, S444 no es capaz de reaccionar sexualmente, es necesario recurrir al uso de nú-

cleos ayudadores en heterocariosis. Las colonias que se obtienen a partir de esporas del heterocarionte S102 * S444 son todas superamarillas, lo que implica que la nueva mutación presente en S444 es dominante. La presencia de una mutación nicA en los núcleos ayudadores S102 facilita el análisis genético, ya que cruzándola con una estirpe que tenga una mutación similar es posible determinar y seleccionar los recombinantes de los núcleos S444 (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982). En nuestro caso utilizamos B36 (Tabla 14).

Para el cruzamiento del heterocarionte S102 * S444 utilizamos colonias lo más amarillas posible, con el fin de que los núcleos S444 fueran mayoritarios. En los tres cruces estudiados, la fertilidad de los germosporangios fue muy alta, al menos del 80%. El análisis de tétradas mostrado es para la segregación del color. No obtuvimos ninguna colonia superamarilla (carS o de otro tipo), de lo cual asumimos que ninguna de las tétradas era regular. De los dos tipos de tétradas irregulares obtenidas una contenía sólo colonias que eran fenotípicamente indistinguibles de la estirpe silvestre y fueron clasificadas como monotipos parentales. En las clasificadas como ditipos, las colonias que acompañaban a las silvestres eran de apariencia anormal, caracterizadas por un micelio muy fino, incapaces de formar colonias de aspecto vigoroso en medio acidificado o de extenderse por la superficie del medio sólido no acidificado, incapaces de crecer en medio mínimo, mejorando al crecer en medio complejo (1% de extracto de levadura, 0.5% de peptona y 2% de glucosa).

En ninguno de los 98 germosporangios cuyo contenido se estudió se encontraron colonias afototrópicas. Elegimos al azar 32 colonias protótrofas provenientes de 8 germosporangios y se les determinó el sexo. Todas las colonias estudiadas resultaron ser de sexo (+) a excepción de una que resultó de sexo (-).

=====

Tabla 14. Estudio genético por recombinación de la estirpe S444.

Cruce: B36 X (S102 * S444)

Genotipo:

nicA101 (+) X (nicA101 (-) * carS42 mad-107 car-401 (+))

	Cruce		
	1	2	3
Germoesporangios estudiados	108	15	24
Germoesporangios fértiles	95	12	21
Germoesporangios del cruce entre silvestres	27	2	1
Tétradas regulares	0	0	0
Ditipos parentales (col. silvestres y superam.)	0	0	0
Ditipos recombinantes (col. <u>carS</u> y otra)	0	0	0
Tetratipos (col. silvestres, superam. <u>carS</u> y otra)	0	0	0
Tétradas irregulares	68	10	20
Monotipos parentales (col. silvestres)	19	3	3
Monotipos recombinantes (col. <u>carS</u> u otra)	0	0	0
Ditipos (col. silvestres y otra)	49	7	17

=====

IV.- CAROTENOGENESIS IN VITRO.Actividad carotenogénica in vitro de la estirpe silvestre y un mutante carS.

La producción de beta-caroteno por la estirpe silvestre de Phycomyces se ve afectada por las condiciones de cultivo (Cerdá-Olmedo, 1987). Así, en medio líquido aumenta el contenido de este compuesto y el de carotenos intermediarios (Goodwin, 1952), que en medio sólido son casi indetectables.

Hasta ahora los estudios de carotenogénesis in vitro han utilizado extractos de micelios crecidos en medio líquido. La actividad carotenogénica in vitro de la estirpe silvestre y un mutante superproductor de beta-caroteno (carS) no presenta diferencias significativas en estas condiciones (De la Concha et al., 1983).

Como los estudios de regulación de la carotenogénesis hechos en nuestro laboratorio utilizan medio sólido, decidimos investigar la producción de caroteno por extractos de micelios crecidos en medio sólido. La idea básica era comprobar si las diversas regulaciones operan in vitro.

La actividad carotenogénica de los extractos se estimó por la incorporación de mevalonato radiactivo a los diferentes carotenos. Los extractos, que contenían de 2 a 4 mg de proteína, se incubaron durante 3 horas con 48.5 nmoles de DL-mevalonato ($^{14}\text{C}_2$) con un total de 8333 bequerelios incorporables (los del isómero L; el isómero D contenía otros tantos). La incorporación de radiactividad a escualeno fue de 60-70% del total extraíble con éter etílico. Como carotenos se da la suma de fitoeno, licopeno y beta-caroteno, separados por cromatografía en capa fina. Los extractos empleados no convierten eficazmente el fitoeno en otros carotenos: en todas las muestras el fitoeno representaba el 85% o más del total de carotenos.

=====
 Tabla 15. Comparación de la actividad carotenogénica de extractos del silvestre y un mutante carS según los micelios se hayan cultivado en medio mínimo líquido o sólido.

Estirpe	C. cultivo	Proteína (mg)	Incorporación (Bq)		
			Total	Escualeno	Carotenos
NRRL1555	M. líquido	4.0	1615	923	259
NRRL1555	M. sólido	2.3	2046	1591	53
S303	M. líquido	3.5	1686	1171	161
S303	M. sólido	2.6	3294	2134	436

=====

Los extractos de micelios cultivados en medio sólido no dan los mismos resultados que los cultivados en medio líquido (Tabla 15). La diferencia es particularmente notable en los carotenos. Los extractos celulares de micelios crecidos en medio líquido de la estirpe silvestre y un mutante carS (S303) incorporan cantidades comparables de precursores radiactivos a carotenos. Sin embargo, los extractos de micelios S303 crecidos en medio con agar incorporan nueve veces más radiactividad que los correspondientes silvestres.

Actividad carotenogénica de extractos de mutantes car

La actividad carotenogénica de los extractos de las estirpes silvestre y S303, como se ha visto en el apartado anterior, varía con las condiciones de cultivo. Decidimos estu-

=====
 Tabla 16. Actividad carotenogénica in vitro de algunas estirpes superproductoras de beta-caroteno.

Estirpe	Genotipo relevante	Proteína (mg)	Incorporación (Bq)		
			Total	Escualeno	Carotenos
NRRL1555	silvestre	2.1	2694	1607	32
C115	<u>carS</u>	2.8	4421	2679	295
S303	<u>carS</u>	2.6	3294	2130	436
S226	<u>carD</u>	3.2	5064	2955	521
S444	<u>carS</u> y ?	4.6	1398	495	224
S242 * S243	<u>carS</u> y ?	2.4	3190	2063	304

=====

diar la actividad carotenogénica in vitro de otras estirpes superproductoras de beta-caroteno para comprobar si las diferencias encontradas estaban asociadas con el fenotipo superproductor. Para la obtención de los extractos utilizamos micelios crecidos en medio sólido.

Los extractos de los mutantes superproductores ensayados incorporan más radiactividad en carotenos que los silvestres (Tabla 16). El mutante S444 parece presentar menos actividad in vitro que los otros mutantes utilizados, pero con una mayor proporción de carotenos.

La incorporación de precursores radiactivos a carotenos depende de la concentración de proteína utilizada (Fig. 8). La actividad carotenogénica no es proporcional a la concentración del extracto; se observa un efecto cooperativo que sugiere la necesidad de agregación de las enzimas de la ruta.

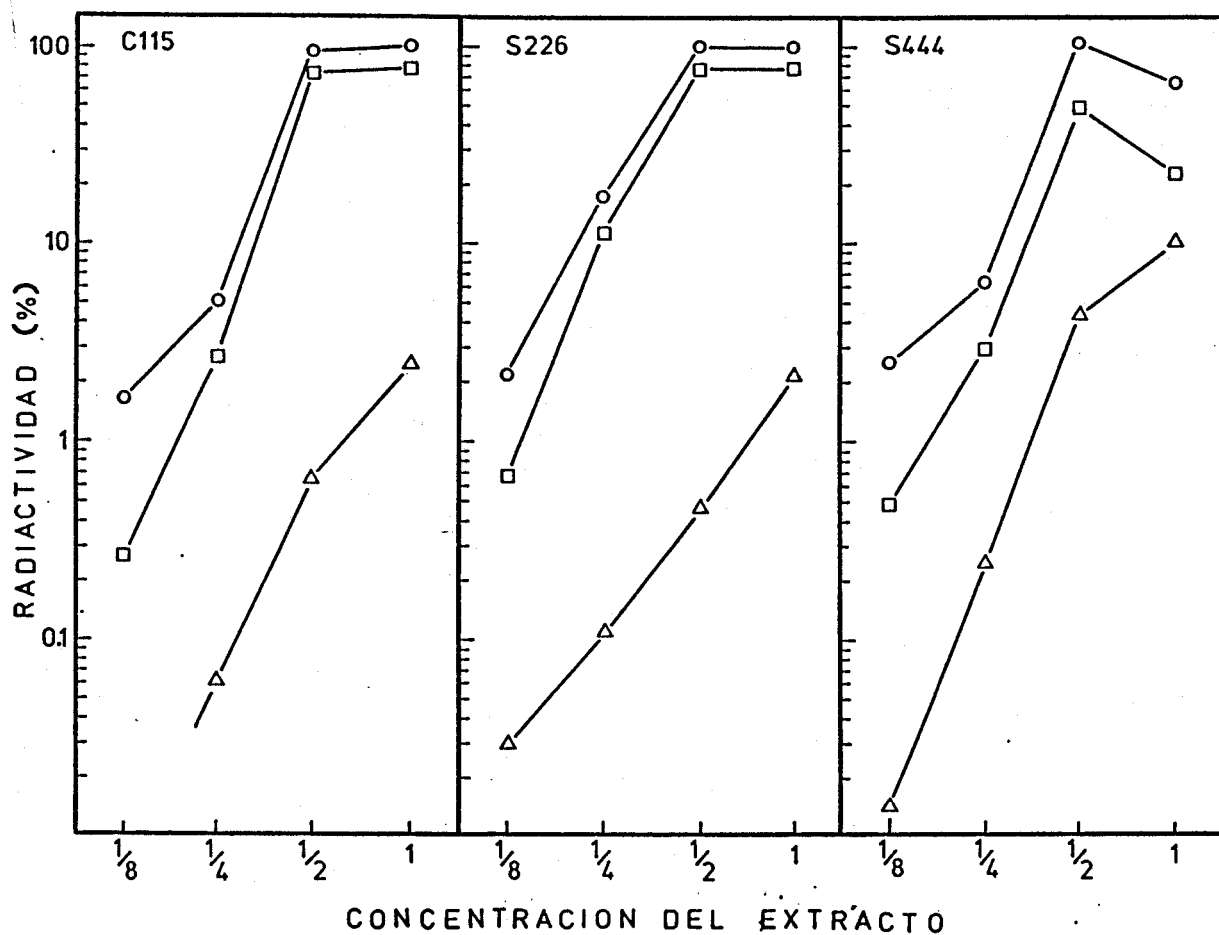


Figura 8. Incorporación de mevalonato radiactivo (O) Total, (□) en escualeno, (Δ) y en carotenos, en función de la dilución de los extractos de las estirpes C115, S226 y S444. Los extractos no diluidos tenían 2.8, 3.2 y 4.6 mg de proteína respectivamente.

En las condiciones utilizadas es esta Tesis, la incorporación radiactiva total y a escualeno estaban saturadas, incluso en las diluciones a 1/2. Por el contrario, la carotenogénesis in vitro se beneficiaría probablemente de una mayor concentración de los extractos. La extrapolación de las curvas de la Fig. 8 sugiere que, de poder concentrarlos 10 veces más, a niveles comparables a los que hay in vivo, carotenos y esteroides se sintetizarían en cantidades similares in vitro, como ocurre en estas estirpes in vivo.

Los resultados con extractos de mutantes estructurales de la ruta se parecen a los de los mutantes superproductores (Tabla 17). En ella puede apreciarse que el bloqueo de la ruta en la deshidrogenasa del fitoeno (estirpe C5) o en la ciclase del licopeno (estirpe C9) hace que sus extractos incorporen al menos 10 veces más radiactividad que los silvestres.

La estirpe C2, portadora de una mutación carA, que in vivo tiene un fenotipo albino, in vitro tiene una actividad carotenogénica similar a la de la estirpe silvestre. Este patrón de incorporación se mantiene en el doble mutante carA carS, estirpe S470.

Otro mutante con fenotipo albino que fue incluido en nuestros estudios fue el S477, portador de una doble mutación en el gen carS. La incorporación de precursores radiactivos a carotenos fue muy baja, en fuerte contraste con las altas incorporaciones obtenidas con los otros mutantes carS, pero en concordancia con el comportamiento in vivo.

Un resultado llamativo fue el del mutante S144, portador de una mutación carI que lo hace insensible a la estimulación por compuestos químicos. Esta estirpe in vivo fabrica un poco menos caroteno que la silvestre, pero in vitro tiene una actividad carotenogénica casi 10 veces mayor.

=====
 Tabla 17. Actividad carotenogénica in vitro de diversos mu-
 tantes de la carotenogénesis.

Estirpe	Genotipo relevante	Proteína (mg)	Incorporación (Bq)		
			Total	Escualeno	Carotenos
NRRL1555	silvestre	2.3	1130	864	27
C2	<u>carA</u>	3.0	2749	1978	34
C5	<u>carB</u>	3.8	3644	2082	501
C9	<u>carR</u>	3.6	2385	1577	248
S144	<u>carI</u>	2.6	3009	1959	216
S470	<u>carA carS</u>	3.5	3633	2684	20
S477	<u>carS carS</u>	3.4	1536	1038	7

=====

Influencia de los agentes activadores

Se conocen cuatro vías independientes de activación de la carotenogénesis (Bejarano, 1988): por luz, retinol, ftalato de dimetilo y hormonas sexuales. La estimulación por las hormonas sexuales no funciona in vitro, según se ve comparando el heterocarionte S242 * S243 con los mutantes superproductores (Tabla 16). Presentamos ahora el efecto de los estímulos restantes.

En la Tabla 18 puede verse que los tres activadores aplicados durante el crecimiento del micelio, aumentan la actividad de los extractos. Los niveles alcanzados son comparables a los obtenidos con los mutantes superproductores de beta-caroteno o de otros carotenos.

=====

Tabla 18. Actividad carotenogénica de extractos de la estirpe silvestre cultivada en presencia de activadores de la biosíntesis de beta-caroteno.

Condiciones de cultivo	Proteína (mg)	Incorporación (Bq)		
		Total	Escualeno	Carotenos
Luz blanca 15 W/m ²	2.6	4082	2518	581
Retinol 0.75 mM	3.0	5196	3509	479
Ftalato 3 mM	4.2	5177	2892	581
Testigo con emulsif.	2.1	2694	1607	32
Testigo sin emulsif.	2.3	908	551	25

=====

La adición de retinol o de ftalato de dimetilo a los extractos de la estirpe silvestre obtenidos en su ausencia no modifican la actividad carotenogénica. Es decir, estos agentes no actúan in vitro, aunque son muy potentes in vivo.

DISCUSION

MUTANTES SUPERPRODUCTORES DE BETA-CAROTENO

La gradual acumulación de investigaciones sobre la carotenogénesis de Phycomyces ha permitido proponer modelos cada vez más completos y resolver puntos oscuros o de difícil explicación. Este trabajo contribuye a este estudio combinando los dos enfoques más importantes a la fecha, el genético y el bioquímico.

La existencia de una proteína inhibidora de la carotenogénesis, pS, el producto del gen carS, sugiere la posibilidad de encontrar varios tipos de mutantes superproductores de beta-caroteno. Cabría esperar que ciertas mutaciones muy específicas de carA podrían dar un fenotipo superproductor aun en presencia de pS y beta-caroteno. Estas mutaciones serían relativamente raras, sobre todo en comparación con la pérdida o inactivación de pS. También cabe pensar que la formación del complejo pS:pA:beta-caroteno o la acción de éste sobre la carotenogénesis requieran otras funciones génicas, cuya mutación podría dar un fenotipo superproductor. Finalmente, podría haber mutaciones superproductoras en mecanismos independientes de carS; en tal caso, partiendo de un mutante carS se podrían aislar dobles mutantes con una producción de caroteno aun mayor.

Mutantes carD

La caracterización de la colección de mutantes superproductores de beta-caroteno, existentes en el laboratorio, nos condujo a la identificación de una nueva clase de mutantes de fenotipo diferente al de los carS. La complementación con los mutantes carS nos llevó a asignarlos a otro gen, al cual denominamos carD.

Estos mutantes se caracterizan por un nivel de beta-caroteno de alrededor de 900 ppm, responden a los cuatro grupos

de estímulos conocidos (luz, retinol, ftalato de dimetilo y sexualidad) y forman cigosporas.

Existe una interrelación entre la carotenogénesis y la actividad sexual: las alteraciones de la ruta de los carotenos producen esterilidad. Como las hormonas sexuales (ácidos trispóricos) derivan del beta-caroteno no es extraño que los mutantes carentes de beta-caroteno sean incapaces de estimular al sexo opuesto (Sutter, 1975). Las estirpes carA, que completan el ciclo sexual pero producen menos cigosporas que la estirpe silvestre, contienen pequeñas cantidades de beta-caroteno.

Pero ésta no es la única relación entre carotenogénesis y sexualidad. Las estirpes carS, que tienen grandes cantidades de beta-caroteno, no forman cigosporas. Para explicarlo, podría suponerse que el exceso de beta-caroteno dificulta las reorganizaciones de membranas necesarias para la formación de gametangios y la fusión de éstos en cigosporas.

Para completar la relación entre carotenos y sexualidad, la estimulación de la carotenogénesis por los ácidos trispóricos requiere de la presencia de beta-caroteno (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986)

Llama la atención que los mutantes carD formen cigosporas, pero no los mutantes carS. Una posibilidad sería que el límite máximo de beta-caroteno para poder formar cigosporas estuviera en 1000 ppm, por ejemplo. Sin embargo, ya que el contenido de caroteno de los mutantes carS y los carD no es muy diferente, creemos que un límite tan estrecho resulta poco creíble. Además, los intentos para cruzar estirpes carS en presencia de inhibidores de la carotenogénesis han fracasado. Es posible, por tanto, que la sexualidad nada tenga que ver directamente con la superproducción de caroteno y que el producto del gen carS tenga otro papel distinto durante el ciclo sexual.

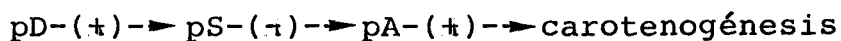
Las estirpes carD y carS tienen la misma actividad ca-

rotenogénica in vitro. Sin embargo los mutantes carD contienen, in vivo, cuatro o cinco veces menos beta-caroteno que los mutantes carS.

La cantidad de beta-caroteno que acumula el doble mutante carD carS no difiere significativamente de la propia del parental carS. La falta de un efecto aditivo entre las dos mutaciones implica su participación en un mecanismo común de activación de la ruta. La epistasia de la mutación carS sobre la carD sugiere que el producto de carD actúa antes que el de carS en un hipotético mecanismo de acción lineal.

El doble mutante carA carD tiene un fenotipo albino, lo mismo que carA. La epistasia de la mutación carA sobre la carD implica, al igual que para el caso de la mutación carS, que los dos genes están actuando a través de un mecanismo común y además, que el producto del gen carA es el que se encontraría al final, si se asume una secuencia de acción lineal. Ya que ni carD ni carS son capaces de estimular la carotenogénesis en ausencia del producto de carA, pD y pS deben estar actuando sobre pA.

En base a los datos genéticos y asumiendo una vía lineal de regulación, la interacción entre los productos de los genes carA, carD y carS podría ser de la siguiente forma:



El papel de pD en el diagrama anterior sería controlar la actividad o la concentración de pS. Se puede imaginar una degradación proteolítica o una regulación de la síntesis de pS, o incluso que pD actuara como correpresor en la regulación de pA.

Mecanismos de regulación similares al propuesto, llamados "de regulación en cascada", han sido encontrados en las

vías metabólicas de otros hongos. Entre los casos mejor estudiados están la utilización de galactosa en Saccharomyces cerevisiae (Johnston, 1987), la asimilación de nitrato en Aspergillus nidulans (Arst y Scazzocchio, 1985) y la utilización del quinato (Giles et al., 1985) y del fosfato (Metzenberg et al., 1973) en Neurospora crassa. Estos sistemas tienen en común la utilización de dos genes reguladores, uno de los cuales regula la acción del otro con la cooperación de un producto metabólico. En nuestro sistema de regulación tales genes reguladores serían carA y carS y el metabolito, el beta-caroteno; en nuestro caso tenemos la intervención de un tercer gen regulador, carD.

En el estudio de recombinación de las mutaciones carA y carD se obtuvieron menos ditipos parentales que recombinantes. Para explicar este hecho, que no es infrecuente, existen dos interpretaciones: (a) cuando entre dos genes situados en el mismo cromosoma hay abundancia de casos de doble entrecruzamiento que afecta a las cuatro cromátidas (interferencia positiva); (b) cuando dos genes ligados a centrómeros de cromosomas distintos segregan preferencialmente en combinaciones no parentales durante la meiosis I; Michie (1953) atribuyó esta tendencia a la presencia de regiones de afinidad en cromosomas no homólogos. Tanto carA (Eslava et al., 1975) como carD (Tabla 5 de esta Tesis) son marcadores centroméricos. Como no están próximos, deben estar en cromosomas distintos. La explicación más apropiada del exceso de recombinantes es por tanto la (b).

Mutante S444

Existen varias vías independientes de estimulación de la carotenogénesis (Bejarano et al., 1988). La estirpe S444 acumula más beta-caroteno, el doble o triple, que los mutantes carS. No está claro que S444 haya hecho constitutivo un mecanismo regulador independiente de carS y ya conocido (luz,

sexo o ftalato de dimetilo). Ya se conocían estirpes hiperproductoras de beta-caroteno (Murillo et al., 1978) que reúnen la estimulación debida a mutaciones carS y la estimulación sexual. La estirpe S444 a diferencia de las citadas estirpes hiperproductoras, no es, en principio, heterocarionte intersexual. Sin embargo, es bastante probable que su fenotipo, al menos en parte, sea debido a heterocariosis entre mutaciones letales. Soportan esta posibilidad la dificultad de obtener mutantes similares, la repetida segregación de fenotipos distintos en las esporas vegetativas y las diferencias en la tasa de germinación.

Ni la estirpe S444 ni un heterocarionte intersexual incrementan la actividad carotenogénica in vitro por encima de la presente en mutantes carS. Además, S444 carece de rastros de reacción sexual y resulta difícil de cruzar aun con la ayuda de otras estirpes. Este hecho y el comportamiento similar in vitro con un heterocarionte intersexual sugieren que en S444 está en marcha, de forma constitutiva, algún mecanismo carotenogénico que usualmente es inducido durante el ciclo sexual.

El análisis genético por recombinación del mutante S444 dio resultados sorprendentes. Entre las colonias provenientes de tres cruces distintos no encontramos ninguna que tuviera fenotipo superproductor. Cualquiera que sea la naturaleza molecular de las mutaciones responsables del fenotipo de S444, las mutaciones carS42 y mad-107 presentes en la estirpe parental C115 deberían estar en todos los núcleos de S444. Sin embargo, resultó muy extraño que ninguna de ellas estuviera presente en la descendencia de S444.

Los marcadores de S444 que aparecen en la descendencia fueron el gen nicA y el sexo (+). De hecho, la aparición del alelo silvestre de nicA es la única prueba de que los núcleos de S444 participaron en el cruce. Con una frecuencia de 60-70% se obtuvieron germoesporangios en los cuales había re-

combinantes protótrofos. Las colonias que solían acompañar a estos recombinantes tenían un fenotipo con alteraciones muy graves del desarrollo.

El único carácter distintivo que encontramos entre nicA y el resto de los genes que aparentemente no intervinieron en el proceso de recombinación es que el gen nicA está ligado a su centrómero. Lo que sugiere que en la estirpe S444 existen graves alteraciones cromosómicas deleciones por ejemplo, que dificultan la transmisión meiótica de grandes fragmentos cromosómicos.

Tales alteraciones, y en particular las deleciones terminales explicarían, en principio, porque se recuperan en la descendencia sólo los alelos silvestres de muchos genes, aunque la célula no tiene forma de conocer durante la meiosis la procedencia de cada alelo y no utilizamos ningún método de selección que favorezca la recuperación de determinadas combinaciones. Explican, además, la ausencia de fenotipos superproductores como el de S444 entre la descendencia y la inestabilidad de esta estirpe durante el crecimiento vegetativo.

INTERACCION ENTRE LAS FUNCIONES DE carA Y carS

Un punto de controversia había sido que el doble mutante carA carS obtenido por recombinación fuera amarillo (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982) y unos presuntos dobles mutantes carA carS obtenidos por doble exposición a mutágenos fueran blancos (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976). Como se ha visto en esta Tesis, todos los dobles mutantes carA carS son amarillos, tienen un nivel basal de beta-caroteno mayor que la estirpe silvestre (de 250 a 550 ppm), no son estimulables por la luz ni por el retinol y forman cigosporas. La obtención de nuevos dobles mutantes carA carS por recombinación elimina la posibilidad de que el color amarillo sólo ocurriera con un cierto alelo carA y exige una reinterpretación de los dobles mutantes blancos.

Del estudio por recombinación de los presuntos dobles mutantes carA carS blancos se ha visto que portan dos mutaciones en el gen carS y ninguna en el gen carA. Estas mutaciones se separan, raramente, por recombinación y cada una por separado da fenotipo superamarillo. Resultado no del todo sorprendente. Una de las formas posibles de explicarlo es la corrección de un desfase por otro, de modo que cada desfase inactive al producto carS y los dos juntos le confieran un fenotipo superrepresor.

El estudio de los mutantes carS blancos y los dobles mutantes carA carS nos ha ayudado a entender un poco más la función de los productos de los genes carA y carS. Se ha demostrado que pS en presencia de beta-caroteno inhibe la ruta (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976) y que el retinol y sus análogos impiden esta inhibición (Bejarano et al., 1988). Los resultados sugieren que pS se une al beta-caroteno y el retinol compite con éste.

El comportamiento de los mutantes carS blancos en heterocariosis nos indica que en la inhibición de la ruta pS está actuando como multímero y, además, el heteromultímero no es funcional. Esto se concluye por el hecho de que el heterocariote carS carS * silvestre (Fig. 4) tiene un contenido de beta-caroteno mayor que cualquiera de las estirpes en homocariosis.

Existen muchas pruebas del papel central de pA en la regulación de la carotenogénesis. De entre ellas se pueden citar algunos ejemplos. Los mutantes nulimorfos de este gen (llamados carRA) no hacen beta-caroteno en ninguna circunstancia. Los mutantes hipomorfos (llamados carA) tienen menos beta-caroteno que el silvestre; su contenido en beta-caroteno no es modificado por iluminación. Los heterocariotes con mutaciones carA son más sensibles que el tipo silvestre a la inhibición química de la ciclasa. Se atribuye al gen carA una mutación que produce quimioinsensibilidad.

CAROTENOGENESIS IN VITRO

Para comprobar y completar las hipótesis sobre la regulación de la carotenogénesis derivadas de los estudios genéticos hacen falta estudios bioquímicos. Los trabajos in vitro, aparte de proveer de un medio para ensayar las actividades enzimáticas de la ruta, pueden dar información sobre las posibles alteraciones que sufren algunos mutantes y para comprobar ciertas hipótesis.

Al igual que en los trabajos anteriores (Bramley y Davis, 1975; 1976; De la Concha et al., 1983) la mayor parte de la radiactividad incorporada in vitro se encuentra en el escualeno. La radiactividad de los carotenos corresponde al menos en un 85% a fitoeno. La razón del predominio de este caroteno puede ser que al romper con nitrógeno líquido no se extraigan grandes cantidades de proteínas de membranas, entre las que se encuentran las enzimas que catalizan la conversión de fitoeno en beta-caroteno (Bramley y Taylor, 1985).

Utilizamos medio sólido para obtener los micelios, en lugar del medio líquido, porque la carotenogénesis no es idéntica en ambas condiciones y los estudios genéticos se hicieron en medio sólido. Los extractos de micelios cultivados en medio sólido reflejan mejor que los cultivados en medio líquido las diferencias que existen in vivo entre los mutantes superproductores y la estirpe silvestre (comparar los resultados de esta Tesis con los de De la Concha et al., 1983).

La estimulación de la carotenogénesis que se observa in vivo en heterocariontes intersexuales no se detecta in vitro, como muestra la estirpe S242 * S243. La actividad carotenogénica de esta estirpe no difiere de la de los mutantes carS que la componen. Podría ser que los ácidos trispóricos, o alguno de sus derivados, activen las enzimas de la ruta a través de un producto que carezca de efecto in vitro, por ejemplo, por dilución o pérdida de compartimentación. Se ha pro-

puesto que en Blakeslea trispora (Rao y Modi, 1977) los ácidos trispóricos estimulan la actividad y la síntesis de las enzimas de los pasos iniciales de la ruta.

En la Figura 9 presentamos la comparación de la actividad carotenogénica in vivo e in vitro de la estirpe silvestre y diversos mutantes de la ruta. Lo primero que puede apreciarse es que no existe una correlación lineal entre ambas actividades. Sin embargo, la distribución de los puntos no es aleatoria y nos ha permitido establecer un modelo de regulación a nivel molecular.

Las actividades carotenogénicas in vitro de los mutantes superproductores (carS y carD), los mutantes carentes de producto final (carB y carR) y el tipo silvestre expuesto a luz, ftalato de dimetilo y retinol son similares (Fig. 9), dentro de la variabilidad experimental. Las diferencias encontradas pueden no ser significativas debido al gran número de reacciones implicadas. En estas condiciones no es posible precisar las pequeñas diferencias que podrían existir entre algunos mutantes, carS y carD por ejemplo.

Estos resultados indican que la activación de la ruta de los carotenos por mutación o por activadores se conserva in vitro. Los efectos de la cicloheximida sobre la activación por retinol (Eslava et al., 1974) y la luz, por ejemplo en Neurospora crassa (Harding y Mitchell, 1968) o Fusarium aquaeductum (Bindl et al., 1970), sugieren un incremento de la cantidad de enzimas, como el que se obtendría por aumento de la transcripción. En este contexto es interesante observar que los activadores químicos no tienen efecto in vitro sobre los extractos silvestres.

Precisando, la hipótesis propuesta es que el complejo regulador pA:pS:beta-caroteno controla los niveles de transcripción de las enzimas de la carotenogénesis. Esta hipótesis explica que los mutantes que han perdido la inhibición por producto final tengan actividades carotenogénicas elevadas.

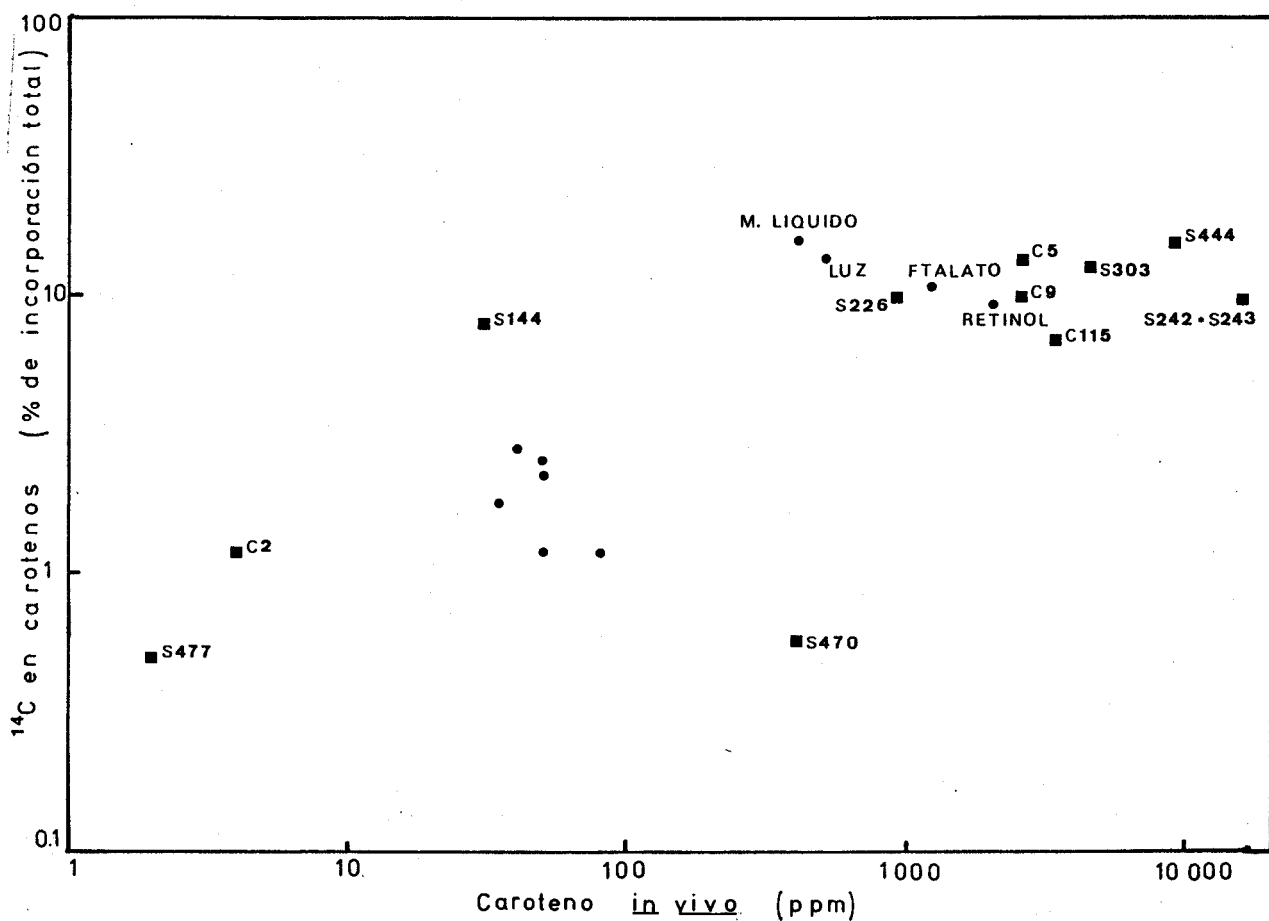


Figura 9. Comparación entre la actividad carotenogénica in vivo e in vitro de la estirpe silvestre (●) y diversos mutantes de la ruta (■). Cultivos en medio sólido, sin activadores químicos y en oscuridad, excepto los silvestres que se indican. Datos tomados de las Tablas 15, 16, 17 y 18 de esta Tesis que se completaron con resultados no mostrados de nuestro laboratorio. La estirpe C2 porta una mutación carA; C5, carB; C9, carR; C115 y S303, carS; S144, carI; S226, carD; S477, carS carS; S470, carA carS; S444, carS y otra desconocida; S242 * S243 es un heterocariote intersexual de estirpes carS.

Tal es el caso de los mutantes afectados en el gen carS o en alguno de los genes estructurales, carB o carR. La actividad carotenogénica similar de los mutantes carD con la de los carS no es sorprendente si se tiene en cuenta que están actuando en la misma vía, como se ha visto anteriormente.

Las estirpes C2, S470 y S477, que in vivo tienen diferentes cantidades de beta-caroteno, in vitro tienen actividades similares a la del silvestre (Fig. 9). Estas estirpes tienen en común la alteración de la función de pA, ya sea por mutación carA (en C2 y S470) o por superinhibición (en S477). En línea con la hipótesis del párrafo anterior, la función de pA sería activar la transcripción, modulada por pS y el beta-caroteno. La pérdida absoluta de pA (mutantes carRA) no es compensable por nada e impide la respuesta a todos los estímulos conocidos.

Las estirpes con una actividad pA rezumante, mutantes carA, responden a ciertos estímulos de la carotenogénesis. El incremento en su contenido de beta-caroteno, por el retinol o por una mutación carS, no va acompañado de un incremento en la cantidad de enzimas. Este resultado pone de manifiesto una función adicional del complejo pA:pS:beta-caroteno, esta sería regulando la actividad de las enzimas de la ruta. Esta función ya se sospechaba por la heterogeneidad de los mutantes carS (Tabla 2). Esta acción directa podría explicar el papel de pA en el transporte de sustratos (Murillo et al., 1981), que también podría ser indirecto, a través de un gen transcrito bajo la autoridad de pA.

El mutante S144, portador de una mutación carI, de color amarillo claro y escasamente estimulable por la luz y productos químicos (Bejarano, 1988), mostró una alta actividad carotenogénica in vitro. Es posible explicar el comportamiento de S144 de acuerdo con la hipótesis de la regulación presentada anteriormente. Como el mutante S144 ya tiene una cantidad elevada de enzimas, no es sorprendente que no sea

capaz de ser estimulado si lo está ya. Ahora bien, la incapacidad de incrementar su contenido de caroteno teniendo las enzimas para hacerlo, puede ser debida a problemas de acceso de los sustratos. Esto implica la existencia de una compartimentación de las enzimas, que ya fué sugerida por Bejarano (1988). Según esta explicación el mutante carI está alterado en el proceso de compartimentación de las enzimas de la ruta. La desregulación de la transcripción no implica una mutación adicional, sino que es debida a un efecto indirecto, los niveles bajos de beta-caroteno. Esto explica también el por qué no se ha encontrado un mutante carI absolutamente quimioinsensible, es decir que no responda a los productos químicos: las enzimas activas existentes seguirían respondiendo, al menos parcialmente, a la regulación de su actividad enzimática. El mutante Sl44 podría ser muy útil para estudiar la compartimentación de las enzimas de la ruta y la regulación de este proceso.

CONSIDERACIONES FINALES

Los trabajos bioquímicos o de biología molecular van atrasados respecto a los estudios genéticos. La localización de parte de las enzimas de la ruta en las membranas y el comportamiento hidrofóbico de los productos finales ha dificultado los estudios enzimológicos. La solubilización parcial de dichas enzimas (Bramley y Taylor, 1985) y la introducción de mejoras en las condiciones de ensayo de sus actividades facilitarán, sin duda, los estudios e incrementarán nuestro conocimiento acerca de sus propiedades. Por otra parte, se está utilizando en nuestro laboratorio la cromatografía de afinidad para aislar proteínas que se unan al anillo beta del caroteno. Esto debe permitir la purificación de los productos reguladores, ya que de acuerdo con nuestros resultados pA, pS o ambos interaccionan con el beta-caroteno.

La aplicación de las técnicas de biología molecular ha

experimentado un gran avance. Se han construido vectores de clonación (Suárez y Eslava, 1988; Arnau et al., 1988) que abren la posibilidad de obtener y estudiar a nivel molecular los productos génicos de las diversas rutas, metabólicas y sensoriales. Por la facilidad de estudio y la gran cantidad de estudios genéticos que existen, los primeros en ser aislados serán los genes de la carotenogénesis. Esto permitirá comprobar y completar el modelo de regulación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-ARAGON, C. M. G., MURILLO, F. J., DE LA GUARDIA, M. D. y CERDA OLMEDO, E. (1976) Eur. J. Biochem. 63:71
- 2.-ARNAU, J., MURILLO, F. J. y TORRES-MARTINEZ, S. (1988) Mol. Gen. Genet. en prensa
- 3.-ARST, H. N. y SCAZZOCCHIO, C. (1985) En "Gene manipulations in fungi", Academic Press. J. W. Bennett y L. L. Lasure, Ed. pp. 309
- 4.-BEJARANO, E. R. (1988) Tesis doctoral, U. Sevilla
- 5.-BEJARANO, E. R., PARRA, F., MURILLO, F. J. y CERDA OLMEDO, E. (1988) Arch. Microbiol., en prensa
- 6.-BERGMAN, K. (1972) Planta 107:53
- 7.-BINDL, E., LANG, W. y RAU, W. (1970) Planta. 94:156
- 8.-BRAMLEY, P. M. y DAVIES, B. H. (1975) Phytochemistry 14: 463
- 9.-BRAMLEY, P. M. y DAVIES, B. H. (1976) Phytochemistry 15: 1913
- 10.-BRAMLEY, P. M. y TAYLOR, R. F. (1985) Biochim. Biophys. Acta. 839: 155
- 11.-BRAMLEY, P. M., THAN, A. y DAVIES, B. H. (1977) Phytochemistry. 16: 235
- 12.-CERDA OLMEDO, E. (1984) En "Blue light effects in Biological systems", Springer-Verlag. J. H. Senger, Ed. pp. 220
- 13.-CERDA OLMEDO, E. (1985) En "Steroids and isoprenoids" Methods in Enzymology. 110: 220
- 14.-CERDA OLMEDO, E. (1987) En "Phycomyces" Cold Spring Harbor. E. Cerdá Olmedo y E. Lipson, Ed. pp. 199-222
- 15.-CERDA OLMEDO, E. y LIPSON, E. (1987). En "Phycomyces" Cold Spring Harbor. E. Cerdá Olmedo y E. Lipson, Ed. pp. 7-26
- 16.-DE LA CONCHA, A. (1983) Tesis doctoral, U. Sevilla
- 17.-DE LA CONCHA, A., MURILLO, F. J., SKONE, E. J. y BRAMLEY, P. M. (1983) Phytochemistry 22:441

- 18.-DE LA GUARDIA, M. D., ARAGON, C. M. G., MURILLO, F. J. y CERDA OLMEDO, E. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68:2012
- 19.-ESLAVA, A. P., ALVAREZ, M. I. y CERDA OLMEDO, E. (1974) Eur. J. Biochem. 48: 617
- 20.-ESLAVA, A. P., ALVAREZ, M. I., BURKE, P. V. y DELBRUCK, M. (1975) Genetics 80: 445
- 21.-ESLAVA, A. P. y ALVAREZ, M. I. (1987). En "Phycomyces" Cold Spring Harbor. E. Cerdá Olmedo y E. Lipson, Ed. pp. 361
- 22.-ESSER, K. y KUENEN, R. (1967) En "Genetics of fungi" Springer-Verlag. pp.266
- 23.-FINCHAM, J. R. S., DAY, P. R. y RADFORD, A. (1979) En "Fungal Genetics" Blackwell Scientific Publications. pp. 88
- 24.-GALLAND, P. y LIPSON, E. (1987). En "Phycomyces" Cold Spring Harbor. E. Cerdá Olmedo y E. Lipson, Ed. pp. 49
- 25.-GARCES, R. y MEDINA, J. R. (1985) Exp. Mycol. 9:94
- 26.-GILES, N. H., CASE, M., BAUM, J., GEEVER, R., HUIET, L., RETEL, V. y TYLER, B. (1985). Microb. Reviews. 49: 338
- 27.-GOODWIN, T. W. (1952) Biochem. J. 50: 550
- 28.-GOODWIN, T. W. (1980) "The Biochemistry of the carotenoids" Chapman and Hall. T. W. Goodwin, Ed. Vol. 1
- 29.-GOVIND, N. S. y CERDA OLMEDO, E. (1986) J. Gen. Microbiol. 132: 2775
- 30.-GREGONIS, D. E. y RILLING, H. C. (1974) Biochemistry 13:1538
- 31.-HARDING, R. W. y MITCHELL, H. K. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 128: 814
- 32.-HARDING, R. W. y SHROPSHIRE, W. (1980) Ann. Rev. Plant Physiol. 31:217
- 33.-JARAYAM, M., PRESTI, D. y DELBRUCK, M. (1979) Exp. Mycol. 3: 42

- 34.-JARAYAM, M., LEUTWILER, L. y DELBRUCK, M. (1980)
Photochem. Photobiol. 32:241
- 35.-JOHNSTON, M. (1987) Microbiol. Reviews. 51: 458
- 36.-LOPEZ DIAZ, I. y CERDA OLMEDO, E. (1980) Planta 150:134
- 37.-LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R.
J. (1951) J. Biol. Chem. 183: 265
- 38.-MEISSNER, G. Y DELBRUCK, M. (1968) Plant Physiol. 43: 1279
- 39.-MICHIE, D. (1953) Nature. 171: 26
- 40.-METZENBERG, R. L., GLEASON, M. K. y LITTLEWOOD, S. (1974)
Genetics. 77: 25
- 41.-MURILLO, F. J. (1980) Plant. Sci. Lett. 17: 201
- 42.-MURILLO, J. F. y CERDA OLMEDO, E. (1976) Mol. Gen. Genet.
148: 19
- 43.-MURILLO, F. J., TORRES MARTINEZ, S., ARAGON, C. M. G. y
CERDA OLMEDO, E. (1981) Eur. J. Biochem. 119: 511
- 44.-MURILLO, F. J., CALDERON, I. L., LOPEZ DIAZ, I. y CERDA
OLMEDO, E. (1981) Appl. Environ. Microbiol. 36: 639
- 45.-OOTAKI, T. (1973) Mol. Gen. Genet. 121: 49
- 46.-OREJAS, M., PELAEZ, M. I., ALVAREZ, M. I. y ESLAVA, A. P.
(1987) Mol. Gen. Genet. 210:
- 47.-PACKTER, N. M. (1973) En "Biosynthesis of acetate-derived
compounds", N. M. Packter, Ed. pp.143
- 48.-PORTER, J. W. y LINCOLN, R. E. (1950) Arch. Biochem
Biophys. 27:390
- 49.-PRESTI, D. y GALLAND, P. (1987). En "Phycomyces" Cold
Spring Harbor. E. Cerdá Olmedo y E. Lipson, Ed. pp. 93
- 50.-RAO, S. y Modi, V. (1977) Experientia. 33: 31
- 51.-REVUELTA, J. L. y ESLAVA, A. P. (1983) Mol. Gen. Genet.
192: 225
- 52.-REVUELTA, J. L. y ESLAVA, A. P. (1984) Curr. Genet. 8: 261
- 53.-RILLING, H. C. (1985) Methods Enzymol. 110:145
- 54.-RIVERO, F. y CERDA OLMEDO, E. (1987) Mol. Gen. Genet.
209: 149.

- 55.-RONCERO, M. I. G. y CERDA OLMEDO, E. (1982) Curr. Genet.
5:5
- 56.-RONCERO, M. I. G., ZABALA, C. y CERDA OLMEDO, E. (1984)
Mutat. Res. 125: 195
- 57.-RUDDAT, M. y GARBER, E. D. (1983) En "Secondary metabolism
and differentiation in fungi", J. W. Bennet y A. Ciegler,
Ed. pp. 95
- 58.-SANDMANN, G. y BOGER, P. (1983) Weed Sci. 31:338
- 59.-SANDMANN, G., HILGENBERG, W. y BOGER, P. (1980) Z.
Naturforsch. 35c:927
- 60.-SCHOPFER, W. H. (1935) C. R. Soc. Biol. 118: 3
- 61.-SCHOPFER, W. H. Y JUNG, A. (1935) C. R. Soc. Biol.
120: 1093
- 62.-SUARES, T., OREJAS, M., ARNAU, J. y TORRES MARTINEZ, S.
(1987). En "Phycomyces" Cold Spring Harbor. E. Cerdá
Olmedo y E. Lipson, Ed. pp. 351
- 63.-SUARES, T. y ESLAVA, A. P. (1988) Mol. Gen. Genet.
en prensa
- 64.-SUTTER, R. P. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 127
- 65.-SUTTER, R. P. (1987). En "Phycomyces" Cold Spring Harbor.
E. Cerdá Olmedo y E. Lipson, Ed. pp. 317
- 66.-THAN, A., BRAMLEY, P. M., DAVIES, B. H. Y REES, A. F.
Phytochemistry. 11: 3187
- 67.-TORRES MARTINEZ, S., MURILLO, F. J. y CERDA OLMEDO, E.
(1980) Genet. Res. 36: 299

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma muy especial a Javier Avalos, Francisco Rivero y Eduardo Rodríguez, las discusiones y críticas constructivas, además, su amistad y todos los buenos momentos que me hicieron pasar.

A Juan Jiménez, Luis Corrochano y Reyes Candau sus comentarios, sugerencias y apoyo moral. A todos los demás miembros del Departamento de Genética su cooperación.

A las personas que hicieron que me sintiera como en casa, ya que, fue fundamental para poder seguir adelante. Fueron muchas, pero merecen mención especial Isabel de la Cruz, Beluca y Marta Alonso y Aurora Salguero. Con ellas, los alumnos de diversos cursos de esta Facultad con los que tuve oportunidad de convivir en diferentes actividades, no sólo académicas.

Finalmente a Esperanza Benitez su amistad, ayuda y apoyo para la conclusión de este trabajo, además por las grandes dosis de paciencia que derrochó.

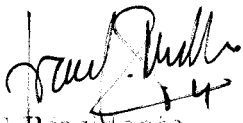
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha para juzgar la Tesis Doctoral


D. Luis Miguel Selgado Rodríguez
titulada Mutantes superproductores de beta-caroteno
de Phycomyces blakesleeana.

acordó otorgarle la calificación de APTO "Cum Laude"

Sevilla, tres de Junio 1988

El Vocal,

El Presidente

El Vocal,

El Secretario,


El Vocal,

El Doctorado,
