

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
SECRETARIA

3-10-79

ENTRADA N.º 340

TD
678

R. 4041

BASES GENETICAS DE LAS RESPUESTAS A LA LUZ DE
PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS



Trabajo realizado en el Departamento de Genética,
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, pa-
ra optar al grado de Doctor en Ciencias, por la
licenciada

ISABEL LOPEZ DIAZ

A stylized handwritten signature consisting of a large 'I' and 'D' with a horizontal line extending to the right.

Sevilla, 3 de octubre de 1979

Director y ponente

A handwritten signature in cursive script, reading "Enrique Cerdá Olmedo", underlined.

Prof. Enrique Cerdá Olmedo
Director del Departamento de Genética

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
CICLO DE VIDA	3
SISTEMA SENSORIAL	5
<i>Estímulo luminoso</i>	5
<i>Respuestas a la luz</i>	7
Fotocarotenogénesis	7
Fotodiferenciación	10
Fotomecismo	11
Fototropismo	13
<i>Fotorreceptor</i>	15
<i>Canal de transducción</i>	16
MATERIALES Y METODOS	20
ESTIRPES	20
MEDIOS DE CULTIVO	21
METODOS GENERALES	23
FOTOCAROTENOGENESIS	24
MEDIDAS DE INTENSIDADES LUMINOSAS	25
FOTOCAROTENOGENESIS CON AZUL DE METILENO	26
FOTODIFERENCIACION	26
FOTOINHIBICION DEL CRECIMIENTO	27
RESULTADOS	28
FOTOINDUCCION DE CAROTENOIDES	28
<i>Relación entre el contenido de β-caroteno y la intensidad luminosa</i>	28
<i>Fotocarotenogénesis en mutantes mad</i>	28
<i>Aislamiento y caracterización de mutantes pic</i>	33
<i>Curvas de respuesta a la intensidad en mutantes pic</i>	37

<i>Obtención de dobles mutantes madB pic</i> ...	39
<i>Fotocarotenogénesis en mutantes defec-</i> <i>tivos en la regulación de la caroteno-</i> <i>génesis</i>	43
<i>Fotoinducción de β-caroteno por luz</i> <i>roja mediante azul de metileno</i>	46
FOTODIFERENCIACION	49
<i>Fotoiniciación de esporangióforos gigan-</i> <i>tes en mutantes mad</i>	51
<i>Fotoinhibición de esporangióforos ena-</i> <i>nos en mutantes mad</i>	51
FOTOINHIBICION DEL CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE QUINACRINA	54
DISCUSION	57
FOTOINDUCCION DE CAROTENO	57
<i>La respuesta de la estirpe silvestre</i>	57
<i>Base genética de la fotocarotenogénesis</i> ..	58
FOTODIFERENCIACION	62
<i>Respuesta en el tipo silvestre</i>	62
<i>Base genética de la fotodiferenciación</i> ..	64
FOTOINHIBICION DEL CRECIMIENTO	67
INTEGRACION DE LAS RESPUESTAS	68
BIBLIOGRAFIA	70

INDICE DE FIGURAS

1. Ciclo asexual de *Phycomyces* y detalle de la zona de crecimiento del esporangióforo 6
2. Fotomecismo en el tipo silvestre en respuesta a una elevación de la intensidad luminosa de 6310 veces durante 0,5 minutos, empezando en el tiempo 0 12
3. Angulos de equilibrio fotogeotrópico para la estirpe silvestre y dos mutantes. La gráfica indica la desviación media de la vertical, de esporangioforos expuestos durante 6 horas a iluminación azul lateral de la intensidad indicada 14
4. Flujo de información entre estímulos y respuestas, y genes responsables de pasos específicos en la transducción sensorial (Bergman et al., 1973) y elaboración personal de datos posteriores.. 18
5. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno (ppm) de la estirpe silvestre NRRL1555 en función de la intensidad luminosa 29
6. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno de los mutantes *madB*, C111 y C109, y la estirpe silvestre NRRL1555 a distintas intensidades luminosas, en relación con el contenido en la oscuridad 31
7. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno de los mutantes *madA*, C21 y C47, y la estirpe

silvestre NRRL1555 a distintas intensidades luminosas, en relación con el contenido en la oscuridad	32
8. Contenido de β -caroteno de la estirpe mutante S252 (<i>pic-1</i>) y de la estirpe silvestre cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de vitamina A	36
9. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno de los mutantes S252 (<i>pic-1</i>) y S253 (<i>pic-2</i>) y de la estirpe silvestre NRRL1555 a distintas intensidades luminosas, en relación con el contenido en la oscuridad	38
10. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno de los mutantes S290 (<i>madB103 pic-1</i>), C111 (<i>madB103</i>), S252 (<i>pic-1</i>) y la estirpe silvestre NRRL1555 a distintas intensidades luminosas, en relación con el contenido en la oscuridad	42
11. Espectro de absorción en un extracto de la estirpe C2 (<i>carA5</i>). a) Absorbancia por gramo de materia seca en micelios incubados 4 días a la luz. b) Absorbancia por gramo de materia seca en micelios incubados 4 días en la oscuridad. Los micelios se rompieron en una mezcla de éter de petróleo y metanol; la fracción de éter de petróleo que contiene los carotenos se desecó y resuspendió en hexano antes de obtener el espectro de absorción	45

12. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno de la estirpe S283 (doble mutante *carA carS*) y la estirpe silvestre NRRL1555, a distintas intensidades luminosas, en relación con el contenido en la oscuridad 47
13. Fotodiferenciación de esporangióforos en la estirpe silvestre. Número de esporangióforos enanos y número de esporangióforos gigantes en función de la intensidad de luz azul 50
14. Fotoiniciación de esporangióforos gigantes en mutantes *mad*. Número de esporangióforos gigantes por caja de Petri en función de la intensidad luminosa en la estirpe silvestre NRRL1555 y las mutantes C111 (*madB103*), C21 (*madA7*) y C141 (*carA5 madC51*) 52
15. Fotoinhibición de esporangióforos enanos. Número de esporangióforos enanos por caja, respecto al valor del silvestre en la oscuridad, en función de la intensidad de luz azul, en las estirpes mutantes C111 (*madB103*), C21 (*madA7*) y C141 (*madC51 carA5*). En cada experimento se incluye la estirpe silvestre NRRL1555 como testigo .. 53
16. Fotoinhibición por quinacrina. a) Peso seco de micelios de la estirpe silvestre NRRL1555 y el mutante C109 (*madB101*) cultivados con 0,18 mM de quinacrina durante distinto número de días bajo la luz o en la oscuridad. b) Lo mismo para el mutante C112 (*madB104*) y el correspondiente testigo silvestre 55

17. Cadena de transducción sensorial que conecta el estímulo luminoso con las respuestas de fototropismo y fotocarotenogénesis. Ordenación de las nuevas mutaciones implicadas en la transducción para la fotocarotenogénesis 61

18. Conexión de la fotodiferenciación con la cadena de transducción sensorial para el fototropismo 66

INDICE DE TABLAS

I.	Estirpes de <i>Phycomyces</i> usadas en esta tesis	21
II.	Contenido de β -caroteno (ppm) de estirpes silvestre y mutantes cultivadas en oscuridad	33
III.	Contenido de β -caroteno, en luz blanca y en la oscuridad, de la estirpe silvestre y los mutantes <i>pic</i>	34
IV.	Análisis de 90 germoesporas de un solo germoesporangio del cruzamiento C304 \times S252	41
V.	Contenido de β -caroteno sintetizado a la luz y a la oscuridad por la estirpe silvestre NRRL1555, la estirpe doble mutante <i>madB pic-1</i> y las estirpes parentales S252 y C304	43
VI.	Fotoinducción del β -caroteno en la estirpe S120 ...	43
VII.	Contenido de β -caroteno (ppm) en micelios incubados durante 7 días en medio SIV, con azul de metileno (30 μ M) o sin él, e iluminadas continuamente con luz roja (4 W/m ²) o en la oscuridad ..	48
VIII.	Contenido de β -caroteno de micelios silvestres de NRRL1555 incubados en medio GA un número variable de días, con o sin azul de metileno (30 μ M) e iluminado o no con luz roja	48

RESUMEN

En este trabajo se han estudiado las bases genéticas de varias respuestas de *Phycomyces* a la luz, concluyéndose que:

1. El contenido de β -caroteno de la estirpe silvestre, aumenta en función de los valores absolutos de intensidad luminosa, a partir de un valor umbral de 10^{-5} W/m², aproximadamente.
2. Los mutantes *madA* y *madB* poseen umbrales de intensidad más altos que el silvestre para la fotoinducción de β -caroteno y curvas de respuesta semejantes a la del silvestre pero desplazadas hacia intensidades de 4 a 30 veces más altas.
3. Se han aislado los primeros mutantes específicamente defectuosos en la fotoinducción de carotenos. Uno de ellos (estirpe S253, mutación *pic-2*) presenta la misma respuesta que el silvestre, pero a intensidades luminosas mayores y parece afectar a un transductor "temprano". Otro (estirpe S252, mutación *pic-1*) responde menos que el silvestre a cualquier intensidad y parece afectar a un transductor "tardío".
4. Un doble mutante *carA carS* carece por completo de fotoinducción de carotenos. La función de al menos uno

de estos genes, ya implicados en la regulación de la carotenogénesis, es necesaria para mediar el efecto de la luz sobre esta ruta.

5. La luz roja no induce la carotenogénesis, haya o no azul de metileno en el medio.

6. La luz estimula la formación de esporangióforos gigantes (macroforogénesis) e inhibe la de esporangióforos enanos (microforogénesis). Bastan intensidades del orden de 10^{-10} W/m² de luz azul. No se da una conversión biunívoca de unos esporangióforos en otros, ya que son menos los esporangióforos gigantes inducidos por la luz que los enanos inhibidos.

7. Sólo los genes *mada* y *madB* de la cadena sensorial del fototropismo participan en la fotodiferenciación de esporangióforos.

8. El gen *madB* no participa en la fotoinhibición del crecimiento por quinacrina.

9. Se demuestra la existencia, tanto en micelios como en esporangióforos, de un conjunto de transductores sensoriales comunes a muchas respuestas distintas a la luz: tropismo, carotenogénesis, macroforogénesis y microforogénesis. Otras respuestas a la luz, como la inhibición en presencia de quinacrina, no son mediadas por este conjunto de transductores.

INTRODUCCION

Las investigaciones de esta tesis intentan aplicar a la fisiología sensorial el mismo enfoque reduccionista que permitió resolver otros problemas básicos de la Biología, como los de la naturaleza, replicación y expresión del mensaje genético. El éxito del intento depende en gran parte de la elección de un sistema de estudio apropiado. *Phycomyces blakesleeanus* es un organismo relativamente sencillo que posee un sistema sensorial relativamente complicado y se presta a estudios morfológicos, bioquímicos y genéticos.

CICLO DE VIDA DE *PHYCOMYCES*

Phycomyces es un hongo unicelular cenocítico, perteneciente al orden Mucorales de la clase Zigomicetos. Es un saprófito terrestre con dos ciclos de vida, uno sexual y otro asexual.

El ciclo de vida asexual comienza con una espora elipsoidal multinucleada (la mayoría tienen 3 ó 4 núcleos). Colocada en un medio apropiado, la espora germina, produciendo hifas cilíndricas no tabicadas. Las hifas crecen por su ápice y se ramifican, de forma que su conjunto, o micelio, se extiende unos dos centímetros diarios. Los núcleos se dividen por elongación y constricción sin pérdida de membrana nuclear (Franke y Reau, 1973). La masa micelial y el número de núcleos aumentan ilimitadamente.

A los dos o tres días, en circunstancias apropiadas, comienza un proceso de diferenciación llamado esporogénesis que consiste en la emisión de grandes hifas aéreas, cilíndricas, no ramificadas, de unas 100 μm de diámetro, que se llaman esporangióforos y atraviesan los siguientes estadios (Errera, 1884; Gruen, 1959):

I. El esporangióforo crece verticalmente, a 1 ó 2 mm/h.

II. Ocurre un segundo proceso de diferenciación llamado esporangiogénesis durante el cual el esporangióforo deja de crecer verticalmente pero su extremo se expande dando una esfera apical llamada esporangio.

III. Tercer proceso de diferenciación o esporogénesis. En esta fase no hay crecimiento ni engrosamiento apical, pero una pared transversal o columela aparece dentro del esporangio y en el espacio así separado del esporangióforo se forman esporas, o sea, porciones multinucleadas de citoplasma que se rodean de fuertes paredes. Cada esporangio contiene unas 10^5 esporas.

IV. Comienza de nuevo el crecimiento vertical, localizado en una zona cilíndrica debajo del esporangio. Además, el esporangio y la parte superior del esporangióforo giran alrededor del eje del esporangióforo. El esporangio se ennegrece. Inicialmente, y durante poco tiempo, la rotación, vista desde arriba, es contraria a las agujas del reloj (fase IVa) y posteriormente, en sentido de las agujas del reloj (fase IVb).

En esta fase IVb se realizan los estudios fisiológicos, porque la velocidad de elongación se mantiene muy constante para cada esporangióforo y próxima a 3 mm/h; la rotación del esporangio requiere unos 30 minutos.

El ciclo asexual está esquematizado en la figura 1.

Sobre el ciclo sexual que tiene menor importancia para este trabajo, véase Cerdá Olmedo, 1974.

SISTEMA SENSORIAL

Phycomyces detecta gran variedad de estímulos ambientales, como luz, gravedad, productos químicos, proximidad de obstáculos y viento. Las respuestas pueden ser modificaciones en el crecimiento del esporangióforo (mecismos y tropismos), activación de la síntesis del β -caroteno y estimulación o inhibición de varias transiciones durante el desarrollo. Se han escrito varias versiones sobre la fisiología sensorial de este hongo (Bergman et al., 1969; Foster, 1977; Delbrück y Cerdá Olmedo, 1977; Cerdá Olmedo, 1977). En esta introducción trataremos sólo los aspectos más directamente relacionados con nuestras investigaciones, que se centran en la genética y fisiología de la fotosensibilidad.

Estímulo luminoso

La energía luminosa es utilizada por muchos organismos vivos como forma de conseguir información sobre

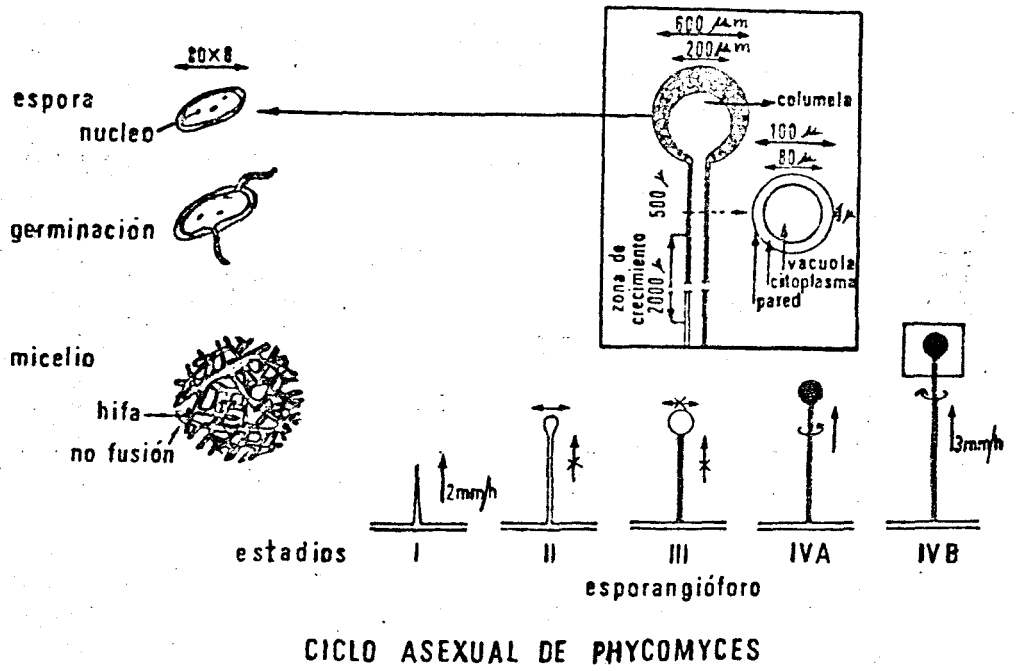


Figura 1. Ciclo asexual de *Phycomyces* y detalle de la zona de crecimiento del esporangióforo.

el medio ambiente y esta utilización abarca desde la simple iniciación de una función fisiológica en bacterias, a la visión enormemente compleja de los vertebrados.

Las moléculas encargadas de captar dicha energía luminosa varían en cuanto al espectro de radiación luminosa que son capaces de absorber. Los organismos responden a unas radiaciones u otras según sea el espectro de absorción de sus fotorreceptores y la posible presencia de pigmentos o filtros modificadores.

La luz azul y ultravioleta de onda larga provocan diversas respuestas en muchos seres vivos distintos incluyendo bacterias, hongos, protistas, plantas y animales. *Phycomyces* se encuentra entre estos organismos sensibles a la luz azul.

Respuestas a la luz

Fotocarotenogénesis. Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos por la naturaleza: muchos organismos, desde bacterias a plantas superiores, son capaces de sintetizarlos por sí mismos y otros, como los animales, los obtienen en su dieta.

Una de las principales funciones de los carotenoides es proteger al organismo de los daños que le pueda ocasionar la luz (Krinsky, 1968; Burnett, 1976). Se sabe que la luz visible, captada por moléculas llamadas fotosensibilizadoras, es capaz de pasar las moléculas de oxígeno presentes, desde su estado basal de triplete al estado de singlete excitado, el cual

es un poderoso agente oxidante que ocasiona daños celulares (Foote, 1968). Los carotenoides reaccionan con el oxígeno en estado de singlete haciendo que vuelva a su estado normal y disipando la energía de excitación en forma de calor.

En *Phycomyces* el β -caroteno sirve además como precursor de los ácidos trispóricos, que son mensajeros químicos en la reacción sexual (Sutter, 1975, 1977). También sirve como precursor de las esporopoleninas, polímeros del β -caroteno que se encuentran en las paredes de los esporangióforos y las zigosporas (Furch y Gooday, 1978; Furch, 1978).

En *Phycomyces* el micelio de tipo silvestre es de color amarillo debido a que acumula β -caroteno. En la oscuridad y en ausencia de estimulaciones especiales, el contenido de β -caroteno en la estirpe silvestre después de 4 días de incubación es de unos 50 μg por gramo de materia seca (en adelante ppm). La genética y la regulación de la síntesis ha sido revisada recientemente por Cerdá Olmedo y Torres Martínez (1979).

Existen mutantes afectados en los genes que intervienen en la síntesis de β -caroteno. Los mutantes *carB* están bloqueados en la deshidrogenación del fitoeno, acumulan este producto en lugar de β -caroteno y son de color blanco. Los mutantes *carR* tienen bloqueada la ciclación del licopeno. Acumulan licopeno y son de color rojo.

La ruta está regulada por varios agentes ambientales con la participación de varios genes.

Las mutaciones en el gen *carS* incrementan el contenido de β -caroteno hasta aproximadamente 4000 ppm. La ruta de síntesis es retroinhibida por el β -caroteno y se cree que el alelo silvestre del gen *carS* participa en la regulación por retroinhibición.

Los mutantes en el gen *carA* no acumulan cantidades importantes de ningún caroteno, ni siquiera fitoeno. Contienen pequeñísimas cantidades de β -caroteno (del orden de 1 ppm). No se ha encontrado ningún bloqueo de la ruta de la carotenogénesis.

La reacción sexual incrementa la carotenogénesis (Blakeslee, 1904) a través de los ácidos trispóricos (Caglioti et al., 1966; Sutter, 1977). Esta reacción y la mutación *carS* actúan independientemente en la carotenogénesis ya que los heterocariontes formados por mutantes *carS* de sexo opuesto acumulan aproximadamente 15000 ppm (Murillo y Cerdá Olmedo, 1976).

Entre los agentes químicos que estimulan la carotenogénesis está la vitamina A, que aumenta el contenido de β -caroteno en el tipo silvestre, de licopeno en mutantes *carR* y de fitoeno en mutantes *carB* (Eslava et al., 1974). También estimula la carotenogénesis en los mutantes *carA* que se vuelven de color amarillo. La acción de la vitamina A es independiente de la reacción sexual y la mutación *carS*. Se han obtenido mutantes insensibles al efecto de la vitamina A, como las estirpes S119 y S120 (F.J. Murillo, sin publicar).

La luz regula la síntesis de los carotenoides en un amplio rango de organismos. La producción en la oscuridad es muy escasa en algunos hongos (*Fusarium aquaeductum*, *Neurospora crassa* y *Verticillium agaricinum*), y algo mayor en otros como *Phycomyces* (Harding y Shropshire, 1979; Rau, 1976). La luz incrementa el nivel de pigmento producido (Garton et al., 1951; Bergman et al., 1973).

Cuando *Phycomyces* se cultiva bajo iluminación constante se encuentra una relación aproximadamente lineal entre el logaritmo del contenido en carotenoides y el logaritmo de la intensidad luminosa, por encima de cierto umbral de intensidad (Bergman et al., 1973 y esta tesis). Cuando se hacen exposiciones breves, la cantidad de β -caroteno inducido parece ser la suma de dos estimulaciones, cada una con su propio umbral y nivel de saturación (Jayaram et al., 1979).

Fotodiferenciación. Usualmente la formación de esporangióforos parece ser independiente de que los cultivos se hagan en luz u oscuridad. Se pone de manifiesto que la formación de esporangióforos está sometida a regulación por luz azul cuando:

a) el micelio se somete a exposiciones alternas diarias de luz y oscuridad (Bergman, 1972). En este caso los esporangióforos aparecen donde estaba el borde del micelio iluminado.

b) el micelio es mantenido en la oscuridad en un sistema cerrado (Russo, 1977). En este caso la atmósfera cerrada acumula un gas que inhibe la esporogénesis, pero la luz azul contrarresta esta inhibición.

c) en condiciones de escasez de nitrógeno y baja temperatura *Phycomyces* desarrolla esporangióforos ena-

nos de unos 0,3 mm de altura (Thornton, 1971), además de los esporangióforos gigantes usuales. La luz inhibe la formación de esporangióforos enanos y estimula la formación de esporangióforos gigantes (Thornton, 1973).

Estas condiciones diferentes demuestran que la luz determina, junto con otras variables externas la distribución espacial, el número de esporangióforos y el estado alternativo de desarrollo del esporangióforo (gigante o enano).

La luz también induce la diferenciación del esporangio en el extremo del esporangióforo. La esporangiogénesis empieza aproximadamente 29 horas más pronto en la luz que en la oscuridad (Russo, 1977).

La fotodiferenciación de esporangióforos gigantes y enanos ha sido estudiada en esta tesis.

Fotomecismos. Cuando el esporangióforo está iluminado simétricamente, los cambios de la intensidad luminosa provocan cambios en la velocidad de crecimiento (mecismo) del tipo que se ve en la figura 2 (Foster, 1972; Foster y Lipson, 1973). El tamaño de la respuesta se definió por el área de la zona sombreada en la figura o por la amplitud máxima (diferencia entre las velocidades máxima y mínima) y tiene el mismo signo que la variación de la intensidad luminosa. La figura 2 da la respuesta a un estímulo concreto; se han estudiado las respuestas a variados programas de iluminación y se ha determinado la relación general entre estímulos y respuestas (Lipson, 1975, a, b).

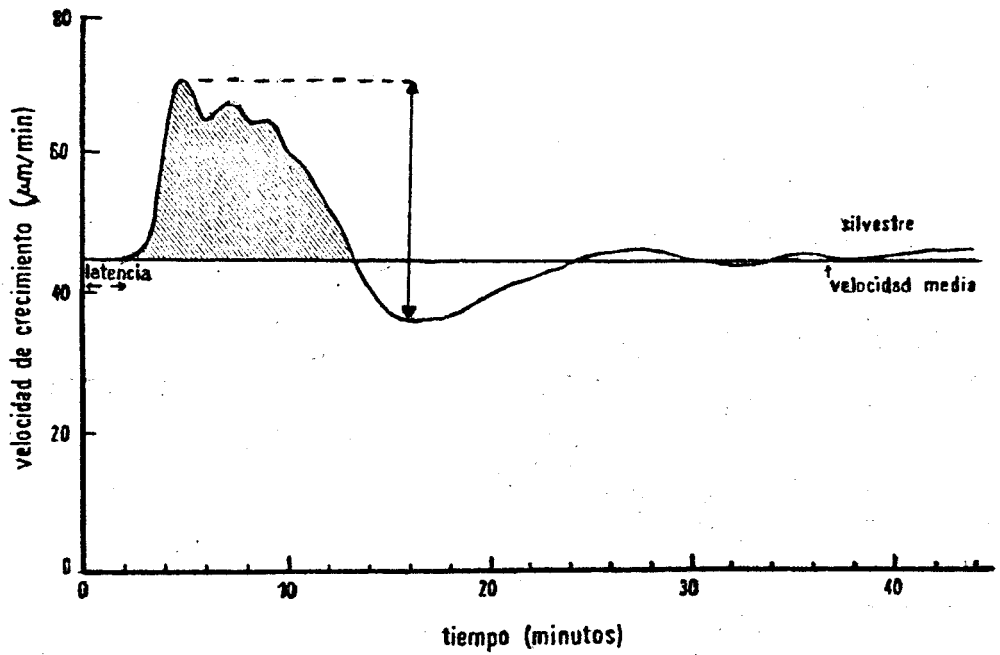


Figura 2. Fotomecismo en el tipo silvestre en respuesta a una elevación de la intensidad luminosa de 6310 veces durante 0,5 min, empezando en el tiempo 0.

El fotomecismo tiene caracter transitorio, aun para estímulos permanentes, lo cual se explica por la existencia de un mecanismo de adaptación: el sistema tiene un nivel de adaptación interno, A, que es comparado continuamente con la intensidad luminosa del exterior, I, de manera que la velocidad de crecimiento (respuesta) depende de esta comparación. El nivel de adaptación se aproxima a la intensidad de luz externa siguiendo una cinética exponencial; el estímulo desaparece cuando la diferencia se hace menor que el ruido del sistema. La adaptación a intensidades ascendentes es más rápida que la adaptación a la oscuridad (Delbrück y Reichardt, 1956).

Fototropismo. El cambio de una iluminación simétrica a otra asimétrica provoca una variación en la dirección del crecimiento del esporangióforo hacia la resultante de las iluminaciones que se apliquen. La dirección final del crecimiento no coincide exactamente con la resultante sino que existe una desviación azimutal (ángulo de Buder), generalmente pequeña y otra vertical, debida al geotropismo.

Cuando la estirpe silvestre se ilumina horizontalmente con intensidad mayor de 4×10^{-6} W/m² de luz azul, la interacción de geotropismo y fototropismo conduce a un ángulo final de 75° con la vertical, denominado ángulo de equilibrio fotogeotrópico. Por debajo de esta intensidad el ángulo de equilibrio fotogeotrópico disminuye y se hace cero para una intensidad umbral de unos 10^{-9} W/m² (Bergman et al., 1973) (figura 3, arriba).

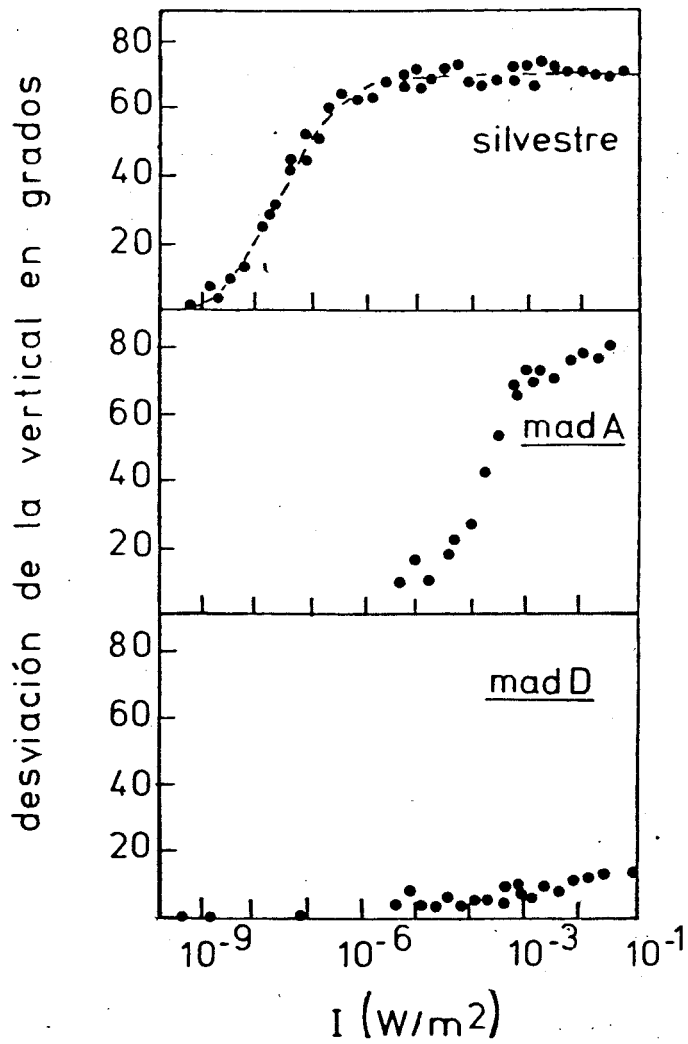


Figura 3. Angulos de equilibrio fotogeotrópico para la estirpe silvestre y dos mutantes. La gráfica indica la desviación media de la vertical de esporangióforos expuestos durante 6 h a iluminación azul lateral de la intensidad indicada.

Fotorreceptor

Las investigaciones sobre el pigmento visual para el fototropismo han llevado a la conclusión de que el fotorreceptor es una flavoproteína.

Los espectros de acción para fotomecismo y para fototropismo sugieren que el fotorreceptor sea una flavina o un carotenoide. El carotenoide ha sido descartado, ya que los mutantes carentes de β -caroteno presentan fotofisiología normal (Bergman et al., 1973; Presti et al., 1977).

El coeficiente de extinción molecular del fotorreceptor, derivado de estudios fisiológicos, coincide con el de la riboflavina (Lipson, 1975, a, b). Otra prueba a favor de las flavinas es el pequeño pico que presenta el espectro de acción para el fotomecismo a 595 nm (Delbrück et al., 1976), que corresponde a la excitación necesaria para pasar del estado basal al de triplete en las flavinas. La existencia de este pico indica que el estado de triplete es capaz de iniciar los procesos fisiológicos que conducen a la respuesta.

Productos químicos inhibidores de las flavinas, como la quinacrina (Haas, 1944), producen un efecto distinto sobre el crecimiento de *Phycomyces* en la luz y en la oscuridad (Carlile, 1962).

En esta tesis se han llevado a cabo experimentos de fotoinhibición por quinacrina en mutantes afectados en transductores tempranos de la cadena sensorial, para tratar de establecer si este efecto tiene lugar vía el canal de fototransducción.

Generalmente se admite que el fotorreceptor es común para todas las respuestas a la luz pero no existe la seguridad de que así sea.

En *Fusarium aquaeductum* la luz induce la carotenogénesis, pero la luz roja también es efectiva si al medio se añade azul de metileno. Se sabe que los colorantes de este tipo median reacciones de fotooxidación, que pueden ser llevadas a cabo por flavinas pero no por carotenoides (Lang-Feulner y Rau, 1975).

En el presente trabajo se ha estudiado el papel del azul de metileno en *Phycomyces* en experimentos similares.

Canal de transducción

La conexión entre estímulos y respuestas puede exigir la existencia de moléculas encargadas de elaborar y transmitir la información recibida por los receptores de los estímulos a los efectores encargados de ejecutar las respuestas. Las moléculas que participan en la detección, elaboración y transmisión de la información y en la ejecución de las respuestas se llaman transductores sensoriales.

Una vía para descubrir y estudiar los transductores es el análisis genético del proceso sensorial. El análisis genético permite identificar los genes responsables de cada paso de la transducción y describir sus interrelaciones.

Bergman et al. (1973) caracterizaron mutantes con fototropismo anormal (mutantes *mad*) y los clasificaron en tres grupos basándose en las respuestas a la luz y a otros estímulos. A partir de estos datos formularon una propuesta de cadena sensorial que enlaza tres clases de estímulos (luz, gravedad y obstáculos) con tres tipos de respuestas (tropismos, iniciación de esporangióforos e inducción de la carotenogénesis). Ootaki et al. (1974) encontraron entre los mutantes *mad* cinco grupos de complementación, que definen los cinco genes designados *madA* a *madE*. Eslava et al. (1976) confirmaron estos genes, descubrieron uno nuevo, denominado *madG*, y determinaron que todos ellos son independientes genéticamente. Recientemente se ha encontrado otro gen, *madF* (P. Fischer, datos no publicados) que complementa con todos los demás (Ootaki y Presti, datos no publicados).

Todos estos datos pueden resumirse en el esquema de la figura 4.

Los mutantes defectivos en el fototropismo muestran curvas de equilibrio fotogeotrópico distintas de la del silvestre (Bergman et al., 1973). Los mutantes *madA*, *madB* y *madC*, afectados en los transductores tempranos, tienen curvas desplazadas hacia intensidades más altas pero con el mismo aspecto general que la del silvestre. El mutante C21 (*madA7*) tiene también una curva del mismo estilo, pero con una pendiente algo más acusada. Estos mutantes se comportan como el silvestre si se les da mucha más luz (10^4 a 10^6 veces) que al silvestre. Los mutantes que afectan pasos más cercanos a la respuesta muestran curvas completamente diferentes, con unas pendientes muy reducidas (Fig. 3).

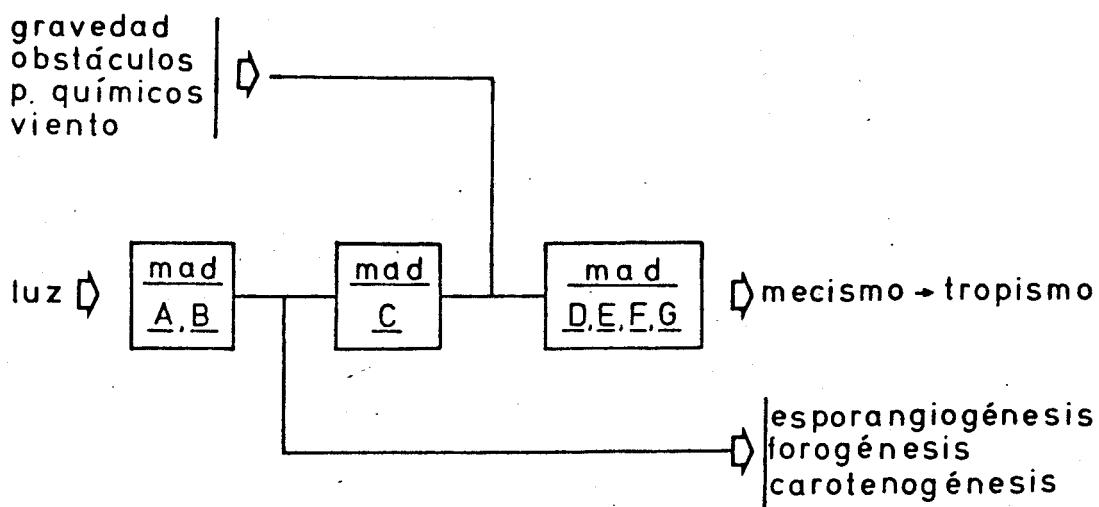


Figura 4. Flujo de información entre estímulos y respuestas, y genes responsables de pasos específicos en la transducción sensorial (Bergman et al., 1973, y elaboración personal de datos posteriores).

Algunos mutantes con fototropismos defectuosos, como los del gen *madB*, son también defectuosos en la fotocarotenogénesis (Bergman et al., 1973; Ootaki et al., 1974). El gen *madA* quedó sin estudiar para esta respuesta, aunque se le supuso semejante a *madB*, y los genes "tardíos" presentan fotocarotenogénesis normal.

La relación entre fotoforogénesis y dosis de luz ha sido determinada en sistemas cerrados para el tipo silvestre, mutantes deficientes en el fototropismo y mutantes carentes de β -caroteno (Galland y Russo, 1979). Sólo los mutantes *madA* y *madB* son defectuosos en esta respuesta, con umbrales 10^3 y 10^5 veces más altos que la estirpe silvestre. El mutante C149 (mutación *madD120*) tiene el extraño efecto de disminuir la respuesta a altas intensidades luminosas. Los mutantes deficientes en la síntesis de caroteno tienen el umbral para la fotoforogénesis incrementado de 100 a 2000 veces; el incremento es tanto mayor cuanto menor es la capacidad de síntesis residual de β -caroteno. Los autores no creen que el β -caroteno sea el fotorreceptor para la fotoforogénesis, sino que un derivado del β -caroteno (probablemente el retinol) es necesario para ejecutar la respuesta.

Los mutantes *madA* y *madB* son también defectuosos en la formación de bandas de esporangióforos cuando se alterna luz y oscuridad (Bergman, 1972; Bergman et al., 1973) y en la fotoesporangiogénesis (Russo, sin publicar).

Los genes *madA* y *madB* definen por tanto dos transductores implicados en todas las respuestas a la luz

estudiadas hasta ahora y presentes en todo el organismo, incluyendo el micelio vegetativo y los esporangióforos.

En esta tesis se ha estudiado la participación de los productos de varios genes *mad*, incluyendo *mada* y *madB*, en la fotoinducción de caroteno y en la diferenciación alternativa de esporangióforos gigantes y enanos.

Se ha avanzado poco en la investigación de la naturaleza química de los transductores sensoriales. Parece improbable que los mutantes estudiados hasta ahora afecten al fotorreceptor. Es probable (según resultados de Lipson, Galland y Russo) que los productos de los genes *madB* y *madC* intervengan en la adaptación.

La estimulación luminosa va acompañada de un decrecimiento inmediato, pero transitorio, en la concentración de adenilato cíclico (Cohen, 1974). Un mutante *madD*, que no muestra esta variación del AMPc, parece contener una fosfodiesterasa del AMPc anormal (Cohen, 1978). Se puede sugerir que el gen *madD* determina la estructura de la fosfodiesterasa, y que esta enzima está regulada por la luz (Cohen y Atkinson, 1978).

MATERIALES Y METODOS

ESTIRPES

Las estirpes de *Phycomyces blakesleeanus* utilizadas en esta tesis se indican en la Tabla I. Se designan de acuerdo con la nomenclatura genética propuesta por Demerec et al. (1966). Cada estirpe se nombra con una letra mayúscula que indica el laboratorio de procedencia (C, California Institute of Technology; S, Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla; B, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin; L, University of Syracuse), seguida de un número de aislamiento.

Los genotipos se indican mediante tres letras minúsculas que hacen referencia al tipo de mutación, seguidas de una letra mayúscula que indica el gen a que pertenece y de un número de aislamiento: *car* designa mutaciones que afectan a la síntesis de carotenoides; *mad*, a la respuesta fototrópica; *pic*, a la fotoinducción de carotenoides; *nic*, a la síntesis de ácido nicotínico. El tipo sexual al que pertenece se expresa como (+) ó (-).

El origen de cada estirpe se indica dando la estirpe original y el mutágeno utilizado para obtenerla (NG = N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) o bien las estirpes parentales separadas por el signo x para indicar cruzamiento.

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

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Origen y observaciones</u>
NRRL1555	(-)	Estirpe silvestre patrón
B142	(+)	Cruzamientos realizados por el Prof. A. Pérez Eslava, isogénica con NRRL1555
C2	<i>carA5</i> (-)	de NRRL1555, NG
C21	<i>madA7</i> (-)	de NRRL1555, NG
C47	<i>madA35</i> (-)	de NRRL1555, NG
C59	<i>madC51</i> (+)	de NRRL1554, NG
C109	<i>madB101</i> (-)	de NRRL1555, NG
C111	<i>madB103</i> (-)	de NRRL1555, NG
C112	<i>madB104</i> (-)	de NRRL1555, NG
C114	<i>madB106</i> (-)	de NRRL1555, NG
C141	<i>carA5 madC51</i> (-)	C59 x C2
C149	<i>madD120</i> (-)	de NRRL1555, NG
C304	<i>madB103 nicA101</i> (+)	de C262 c C111
L51	<i>madA7 madB103</i> (-)	de C303 x C21
S120	<i>car-114</i> (-)	de NRRL1555, NG insensible a vit. A
S252	<i>pic-1</i> (-)	de NRRL1555, NG
S253	<i>pic-2</i> (-)	de NRRL1555, NG
S278	<i>pic-1</i> (+)	B142 x S252
S283	<i>carA5 carS42 nicA101</i> (-)	C242 x C115
S290	<i>madB103 pic-1</i> (-)	S252 x C304

MEDIOS DE CULTIVO

Se usaron los siguientes medios para cultivar a *Phycomyces*:

Medio mínimo GA. Glucosa, asparragina, sales (Heisenberg and Cerdá Olmedo, 1968).

Medio GAEL. Igual que el medio GA más 1 g/l de extracto de levadura.

Medio agar patata. 1 l de extracto de 200 g de patatas, 20 g de glucosa y 15 g de agar suplementado con 0,25 mg de tiamina. En algunos casos se utilizó sacarosa en vez de glucosa.

Medio mínimo SIV. Glucosa, asparragina y sales (Sutter, 1975).

Medio inductor de enanos. Es un medio mínimo con muy escaso nitrógeno (2,33 $\mu\text{g/ml}$ Asn) (Thornton, 1973).

Estos medios se usan en matraces de Erlenmayer de vidrio transparente (25 ml de medio en matraces de 250 ml ó 50 ml de medio en matraces de 500 ml) o, solidificados con 15 g de agar Analema, en cajas de plástico transparente (25 ml de medio en cajas de 8,5 cm de diámetro).

Cuando se quiere obtener crecimiento colonial se acidifica el medio hasta pH 3,3 añadiendo ClH 1 N.

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

Azul de metileno. Al medio de cultivo ya autoclavado se añade una alícuota de una solución concentrada acuosa de azul de metileno de modo que quede a una concentración final en el medio de 30 μM .

Quinacrina. Se añade una alícuota de una solución acuosa concentrada y esterilizada por filtración al medio de cultivo para que quede a una concentración final de 0,18 mM. El producto utilizado se vende comercialmente con el nombre de "Atebrin" (Gurr, High Wycombe, Inglaterra).

Vitamina A. El acetato de retinol (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) emulsificado según Eslava et al. (1974) se añade al medio ya autoclavado en las concentraciones deseadas.

METODOS GENERALES

Las esporas empleadas como inóculos, fueron activadas por calentamiento durante quince minutos a 48°C (Rudolph, 1960).

Los cruces se realizaron como se detalla en Torres Martínez (1978).

Para mutagenizar esporas se utilizó el procedimiento número 2 de mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina descrito por Bergman et al. (1973) que emplea un tratamiento de 30 minutos y una concentración del mutágeno de 0,1 mg/ml.

La determinación del sexo de una estirpe se realizó observando la aparición o no de reacción sexual y zigosporas en el frente de contacto con una estirpe patrón; para ello, ambas estirpes se cultivan en la misma caja con agar patata a 15°C.

La ceguera para el fototropismo se determinó en un cajón con el fondo de cristal iluminado desde abajo según Bergman et al. (1973).

FOTOCAROTENOGENESIS

Cada caja de cultivo con agar GAEL se inoculó con un fragmento de micelio (aproxim. 1 mm²) y se incubó a 22°C durante 4 días. Se determinó peso seco de micelio y contenido de β -caroteno siguiendo el procedimiento descrito por De la Guardia et al. (1971), expresándose los resultados en μ g de β -caroteno por gramo de materia seca, abreviado ppm.

Seis cajas de cultivo se colocaron dentro de cajas (31,5 x 19 x 8,5 cm) enteramente opacas excepto por una de sus caras mayores, que se encontraba cubierta con planchas de polimetacrilato de metilo ("Plexiglas", Plexi, Valencia, bajo licencia Röhn, Darmstadt). Estas planchas eran transparentes (número de catálogo 10), grises (número 365), u opacas (número 190); para obtener diversas intensidades luminosas se emplearon diversos grosores de planchas grises. Seis de estas cajas paralelepípedicas se colocaron bajo una fuente luminosa blanca (una batería de 5 tubos fluorescentes Sylvania F40 T121D de 120 cm de longitud) en una habitación termostaticada a 22°C. La intensidad de la luz azul bajo la batería de luces es de 1,32 W/m² y ésta será la intensidad utilizada en todos los casos en que no se mencione otra.

MEDIDAS DE INTENSIDADES LUMINOSAS

Para medir la intensidad luminosa se usó un fotodiodo de silicio Pin-10DB/541 (United Detector Technology, Santa Mónica, California) conectado directamente a un microamperímetro. El fotodiodo produce una corriente que es proporcional a la intensidad de la luz incidente.

Para la luz azul, medida a través de un filtro 5-61 (Corning Glassworks, Corning, N.Y.) se usó como respuesta del fotodiodo 0,19 amperios/watio, que es la correspondiente a la luz monocromática de 470 nm.

En algunos casos la intensidad luminosa se midió con un Radiant Flux Meter 8330A y un Radiant Flux Detector 8334A (Hewlett Packard, Palo Alto, California).

La intensidad de luz roja se determinó con el fluorómetro a través de un filtro rojo (polimetacrilato de metilo nº 52, Plexi) y un filtro anticalórico (KG1 Schott, Mainz). Juntos, transmitían principalmente luz entre 600 y 800 nm.

Las intensidades menores de 10^{-3} W/m², obtenidas mediante la interposición de filtros neutros de polimetacrilato de metilo, no se pudieron medir directamente. Se determinó la absorbancia media de cada plancha de polimetacrilato de metilo entre 420 y 500 nm en un espectrofotómetro Beckman, modelo Acta III. Se encontró experimentalmente que la absorbancia de dos planchas superpuestas no era exactamente la suma de las absorbancias de cada una por separado, sino 0,1 unidades de densidad óptica menor. Se calculó la absorbancia A_n

de un conjunto de n planchas por la fórmula

$$A_n = \sum_{i=1}^{i=n} A_i - 0,1 \times (n - 1), \text{ donde } A_i \text{ es la absor-}$$

bancia de la plancha i . Se consideró que la intensidad se reduce a un factor 10^{A_n} al colocar el conjunto de n planchas. Nótese que los valores resultantes representan una extrapolación sin confirmación experimental directa.

FOTOCAROTENOGENESIS CON AZUL DE METILENO

Se inocularon matraces de medio líquido SIV ó GA con o sin azul de metileno (30 μ M), con 10^4 esporas activadas por ml de medio. Se colocaron en cajas de cartón cubiertas con planchas rojas de polimetacrilato de metilo (número 52), que excluyen la radiación de menos de 590 nm (su transmitancia a 450 nm es $\sim 1\%$). Se incubaron bajo la batería citada en el apartado anterior o bajo una lámpara Sylvania Tew 1500 W L209.

En este último caso, que daba las intensidades mayores, se instalaron entre lámpara y cultivos varias planchas de vidrio transparente y una capa de 4 cm de agua y se utilizó un ventilador para disipar el calor; aun así la temperatura de los cultivos sobrepasó a veces los 22°C. Los matraces testigo se mantuvieron en las mismas condiciones, pero envueltos en papel de aluminio.

FOTODIFERENCIACION

Se inocularon cajas de cultivo con medio de Thornton con fragmentos de micelio, se colocaron en cajas

opacas cubiertas con diversos grosores de planchas grises de polimetacrilato de metilo o con una plancha opaca, y se incubaron a 11°C bajo un tubo fluorescente blanco Osram L15W/10-2 de 40 cm de longitud. A los 17 días se contaron los esporangióforos normales ("gigantes") y enanos aparecidos en cada caja de cultivo.

FOTOINHIBICION DEL CRECIMIENTO

Se inocularon matraces con medio SIV, con o sin quínacrina con 10^3 esporas/ml y se incubaron a 22°C bajo la batería de tubos fluorescentes citada anteriormente. Los testigos no iluminados se envolvieron en papel de aluminio.

RESULTADOS

FOTOINDUCCION DE CAROTENOIDES

Relación entre el contenido de β -caroteno y la intensidad luminosa

La exposición a la luz incrementa el contenido de β -caroteno en *Phycomyces*. La figura 5 muestra la cantidad de β -caroteno presente al cabo de cuatro días de incubación de la estirpe silvestre NRRL1555 bajo diferentes intensidades luminosas.

Hasta cierto umbral de intensidad luminosa (del orden de 10^{-5} W/m²), el contenido de β -caroteno es el mismo que en la oscuridad. Por encima del umbral hay una relación aproximadamente lineal entre el logaritmo del contenido en β -caroteno y el logaritmo de la intensidad. Estos resultados confirman y extienden los de Eslava, 1973; Bergman et al., 1973). Cabe esperar que, a intensidades suficientemente elevadas, la respuesta se sature y aun disminuya, pero en estos experimentos no se ha podido llegar a tales intensidades.

Fotocarotenogénesis en mutantes mad

Se ha estudiado la fotocarotenogénesis en estirpes defectuosas en el fototropismo, portadoras de mutaciones en los genes *madA* y *madB*.

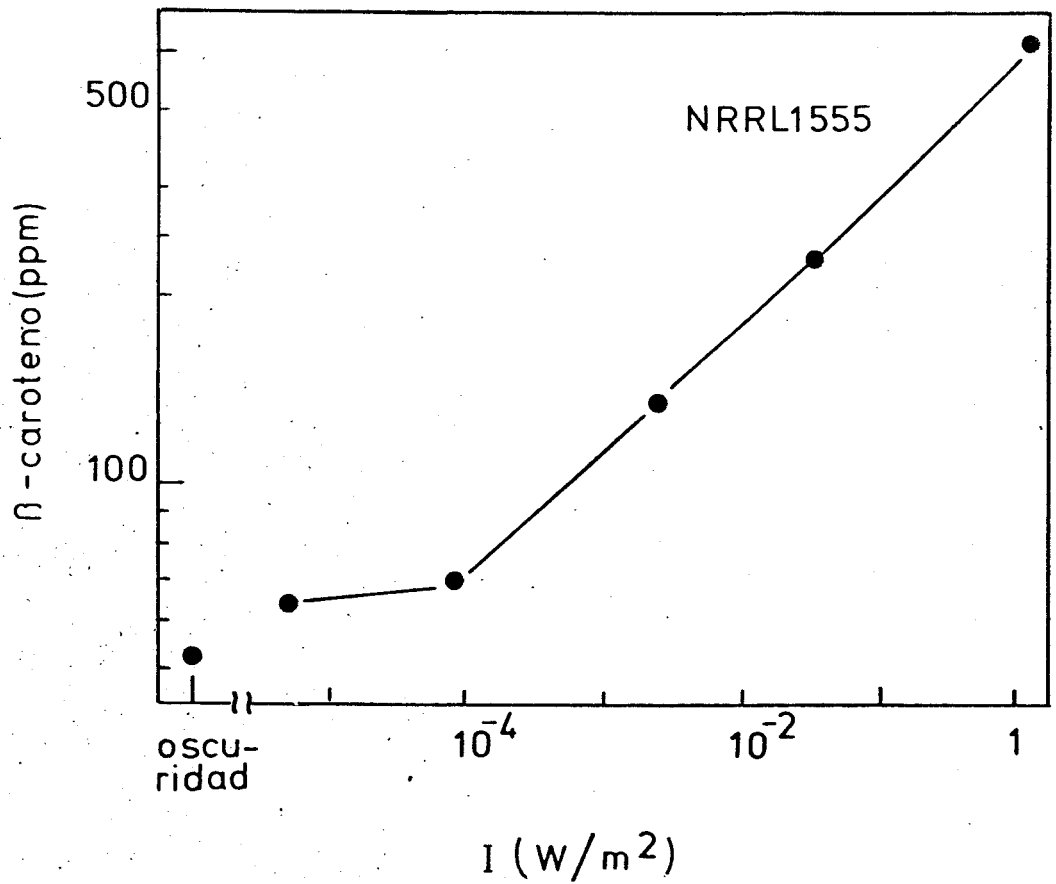


Figura 5. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno (ppm) de la estirpe silvestre NRRL1555 en función de la intensidad luminosa.

Los mutantes en el gen *madB*, C109 y C111, responden a distintas intensidades luminosas como se muestra en la figura 6.

Las curvas de respuesta a la intensidad son las mismas del silvestre, pero desplazadas a intensidades más altas. Para dar las mismas respuestas que el silvestre, C111 requiere unas 26 veces más luz y C109, unas 14 veces. Los umbrales respectivos se encuentran correspondientemente incrementados.

Las estirpes C21 y C47, con mutaciones en el gen *madA*, responden a la intensidad de luz como se observa en la figura 7.

La curva de C21 tiene el aspecto general de la del silvestre, pero la pendiente es algo mayor. El umbral es unas 30 veces el umbral del silvestre, pero a altas intensidades la diferencia de respuestas es pequeña.

C47 responde siempre menos que el silvestre, pero la diferencia es poco importante; en cada caso exige una intensidad luminosa 4 veces mayor que el silvestre para igualar su respuesta.

La estirpe L51 doble mutante *madA madB*, obtenida por E. Lipson mediante el cruzamiento apropiado, presenta la fotoinducción de carotenos notablemente disminuida. A intensidades de luz ($1,23 \text{ W/m}^2$) en que las estirpes C21 y C111, poseedoras de las mismas mutaciones *madA* y *madB* por separado, incrementan 9 y 5 veces el valor de la oscuridad, el doble mutante sólo fotoinduce 2 veces.

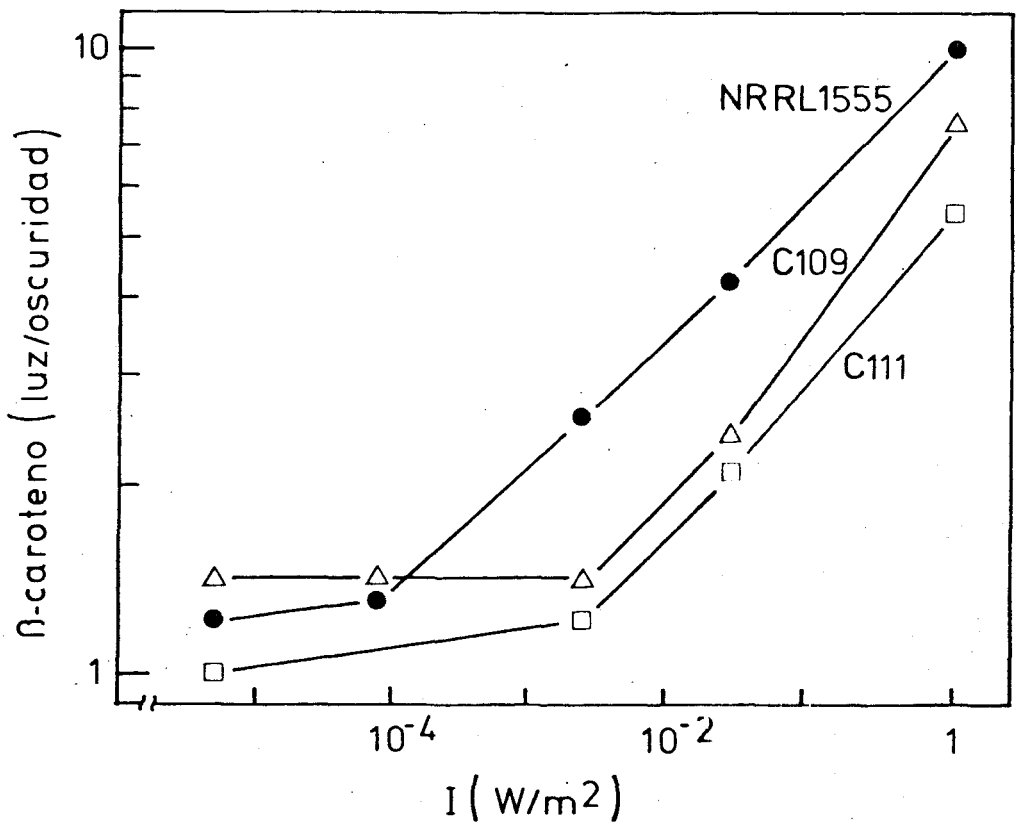


Figura 6. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno de los mutantes *madB*, C111 y C109, y la estirpe silvestre NRRL1555 a distintas intensidades luminosas, en relación con el contenido en la oscuridad.

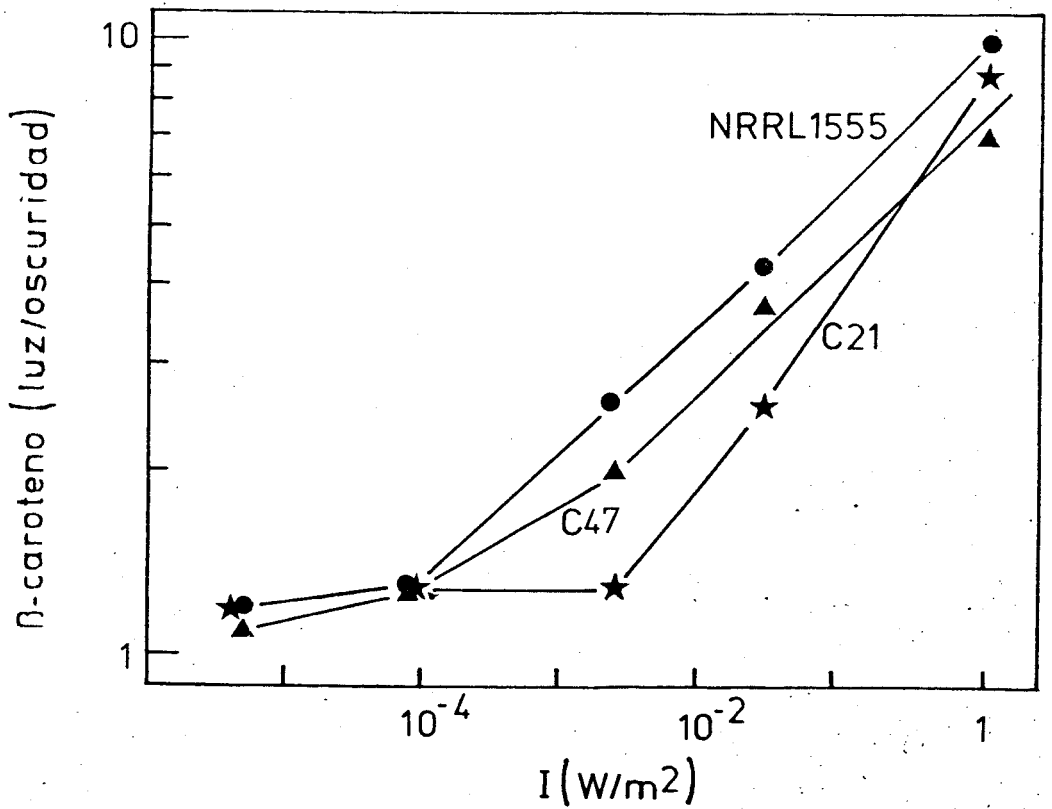


Figura 7. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno de los mutantes *madA*, C21 y C47, y la estirpe silvestre NRRL1555 a distintas intensidades luminosas, en relación con el contenido en la oscuridad.

La producción de β -caroteno en la oscuridad varía poco entre estas estirpes (Tabla II). Las diferencias pueden deberse a pequeñas variaciones en el medio y circunstancias ambientales tanto como a posibles diferencias genéticas. Para evitar estas pequeñas variaciones y medir verdaderamente la fotoinducción, las gráficas de las figuras indican el contenido relativo de β -caroteno respecto de muestras mantenidas en la oscuridad.

TABLA II. Contenido de β -caroteno (ppm) de estirpes silvestre y mutantes cultivadas en oscuridad.

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>β-caroteno</u>
NRRL1555	(-)	52
C111	<i>madB103</i> (-)	61
C109	<i>madB101</i> (-)	54
C21	<i>madA7</i> (-)	39
C47	<i>madA35</i> (-)	56
L51	<i>madA7 madB103</i> (-)	40

Aislamiento y caracterización de mutantes pic

Para investigar la existencia de genes cuyos productos estén implicados en la fotocarotenogénesis se buscaron mutantes que exhibieran color normal en la oscuridad, pero menos pigmentación que el tipo silvestre en la luz.

Las esporas de la estirpe silvestre NRRL1555 se trataron con nitrosoguanidina, se incubaron a 22°C bajo luz blanca y se observaron a los 4-5 días, aislándose las colonias más claras.

Algunas de las colonias obtenidas resultaron ser heterocariontes con núcleos silvestres y núcleos mutantes *carA* o *carB* y se reconocieron por la segregación de colonias blancas y amarillas tras sembrar sus esporas en medio GAEL ácido. Otras colonias presentan una reducción de la carotenogénesis tanto en la luz como en la oscuridad, por bloqueo o represión parcial de la ruta. Estos tipos de mutantes no interesan en este trabajo.

Se aislaron dos estirpes, designadas S252 y S253, que crecen normalmente, pero fotoinducen menos que el silvestre (Tabla III). Las mutaciones responsables de la conducta de estas estirpes se denominaron *pic-1* y *pic-2*, respectivamente.

TABLA III. Contenido de β -caroteno, en luz blanca y en la oscuridad, de la estirpe silvestre y los mutantes *pic*.

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>β-caroteno</u>	
		<u>luz</u>	<u>oscuridad</u>
NRRL1555	(-)	464	52
S252	<i>pic-1</i> (-)	206	46
S253	<i>pic-2</i> (-)	220	44

Se comprobó que eran normales fototrópicamente, iluminándolos desde abajo en un cajón con el fondo de cristal. Como testigos se usaron estirpes silvestres y mutantes *madB*, con fototropismo defectuoso.

Con respecto a la estimulación de la carotenogénesis por vitamina A, la estirpe S253 se comporta igual que el silvestre mientras que S252 es parcialmente insensible; su respuesta a distintas concentraciones de vitamina A se muestra en la figura 8.

Las dos estirpes S252 y S253 fueron cruzadas por la estirpe B142, un tipo silvestre de sexo opuesto.

Para determinar la probabilidad de diferenciar visualmente los fenotipos *pio* y silvestre, se hicieron experimentos de reconstitución mezclando esporas de B142 (+) y S252 o S253. La distinción a simple vista del fenotipo de S252 respecto del silvestre es muy clara: se sembraron esporas de B142 y S252 en proporción 1:7 en 2 cajas de medio GAEL ácido y se incubaron 3 días bajo luz blanca a 22°C; se escogieron diez colonias como normales para la fotoinducción según su color y se comprobó su sexo; las diez eran, en efecto, de sexo (+), y por tanto B142.

Por el contrario, S253 se distingue mal a simple vista del tipo silvestre: en cajas sembradas en la misma forma que para S252, resultó imposible diferenciar colores y, al intentarlo, se aislaron indistintamente colonias de ambos sexos y, por tanto, de ambos genotipos.

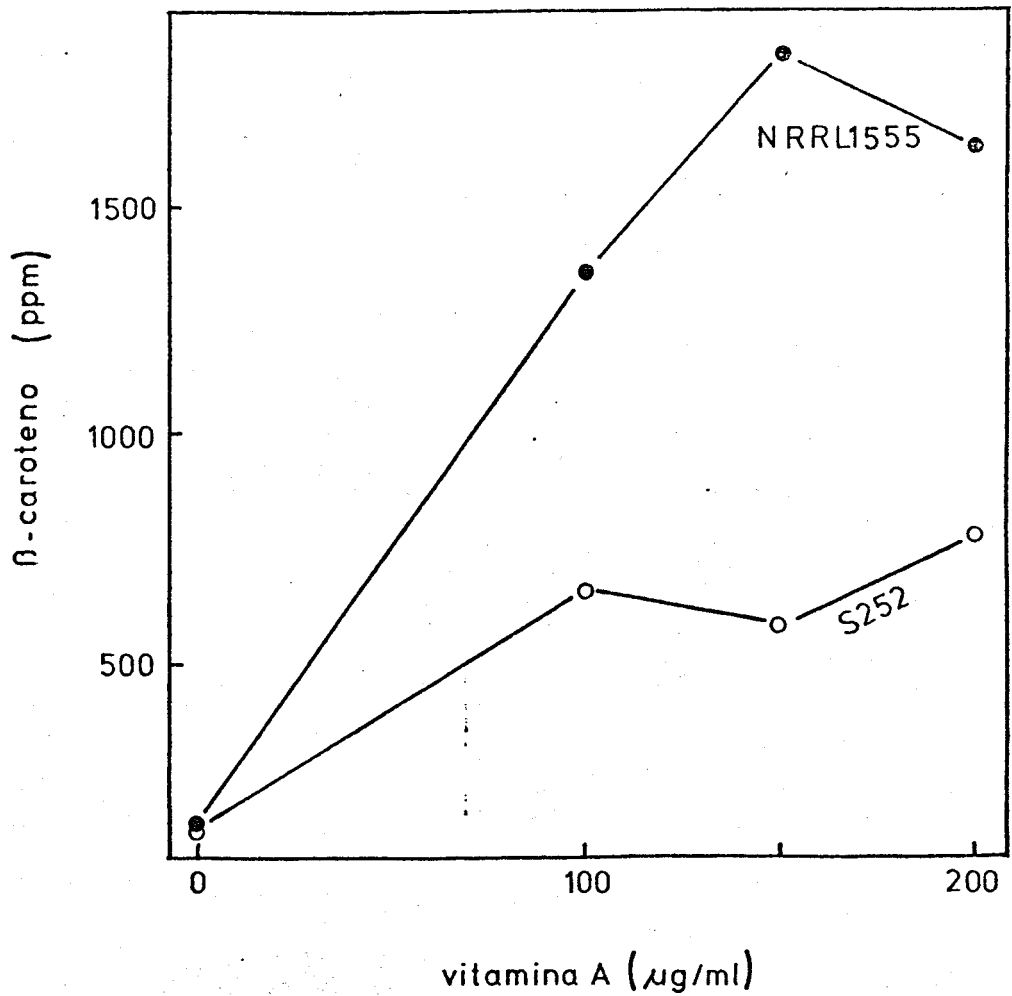


Figura 8. Contenido de β -caroteno de la estirpe mutante S252 (*pic-1*) y de la estirpe silvestre cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de vitamina A.

El cruzamiento S252 x B142 dió abundante número de zigosporas de tamaño muy pequeño, que germinaron a los 135 días de la inoculación de los parentales.

Aproximadamente la mitad de las zigosporas que germinan son fértiles y dan lugar a germoesporas viables (de 15 germoesporangios analizados individualmente, 7 fueron fértiles y el resto estériles). Entre la descendencia procedente de 250 zigosporas, aproximadamente la mitad presentan la fotoinducción defectuosa típica de S252, lo cual confirma que S252 contiene una sola mutación, *pic-1*, implicada en la fotocarotenogénesis. Entre esta mitad se aisló un recombinante *pic-1* (+) designado por S278 y confirmado por análisis cuantitativo.

El cruzamiento S253 x B142 dió abundantes zigosporas, que, tras una dormancia de 135 días, produjeron germoesporangios en su mayor parte estériles (70%). No se consiguió ningún análisis útil de la descendencia, ante la dificultad de distinguir los fenotipos mutante y silvestre.

Curvas de respuesta a la intensidad en mutantes pic

La figura 9 muestra el contenido de β -caroteno en función de la intensidad luminosa para los mutantes S252 (*pic-1*) y S253 (*pic-2*).

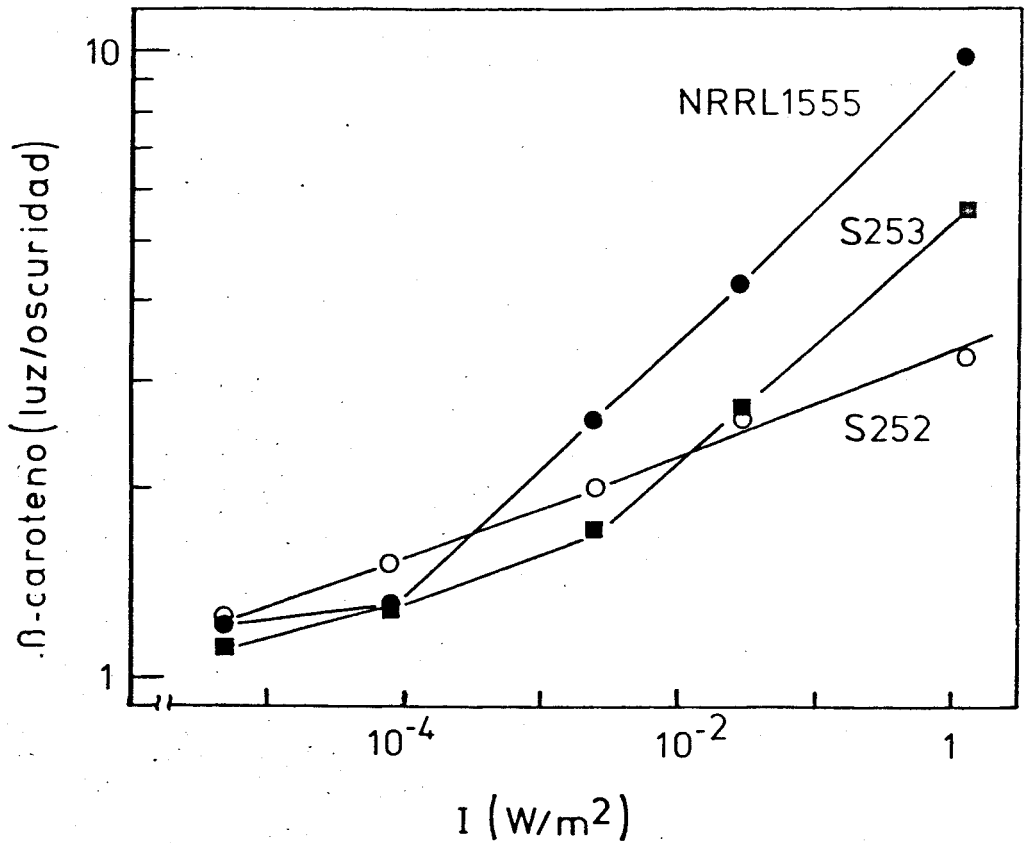


Figura 9. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno de los mutantes S252 (*pic-1*) y S253 (*pic-2*) y la estirpe silvestre NRRL1555 a distintas intensidades luminosas, en relación con el contenido en la oscuridad.

La estirpe S253 tiene una curva de respuesta a la intensidad de aspecto semejante a la del silvestre y los mutantes *madA* y *madB*; requiere unas 10 veces más luz que el silvestre para alcanzar los mismos contenidos de β -caroteno.

Por el contrario, la curva de fotoinducción de S252 en función de la intensidad luminosa tiene un aspecto muy distinto de la del silvestre: el umbral es aproximadamente el mismo, pero es mucho menor la respuesta a cada intensidad luminosa por encima de la umbral.

Obtención de dobles mutantes madB pic

Ni los mutantes *pic* ni los mutantes *madB* o *madA* carecen totalmente de fotocarotenogénesis. Los mutantes *mad* son ciegos para el fototropismo, pero no los mutantes *pic*.

Para observar el efecto de la presencia, en un mismo genomio, de una mutación de cada tipo, se hicieron los cruzamientos C304 x S252 y C304 x S253; la estirpe C304 tiene el genotipo *madB103 nicA101* (+). En ambos cruzamientos se obtuvieron bastantes zigosporas; el tiempo de dormancia fue de 106 y 95 días, respectivamente.

En el cruzamiento C304 x S252 la mayoría de los germoesporangios fueron estériles; sólo 5 de 19 analizados resultaron fértiles. Se determinaron los fenotipos de las germoesporas estudiando la ceguera para el fototropismo y el color de los micelios incubados bajo luz blanca.

De los 5 germoesporangios fértiles analizados separadamente, 3 daban lugar a germoesporas de dos tipos: ciegas claras y videntes oscuras. Entre las videntes oscuras a veces se podían apreciar diferentes intensidades de pigmentación, pero estas diferencias eran escasas. Los otros dos germoesporangios contenían germoesporas ciegas claras, ciegas oscuras y videntes oscuras. Entre las videntes oscuras se distinguían dos grados, de coloración más y menos intensa.

Uno de estos germoesporangios se analizó cuantitativamente y los resultados se indican en la Tabla IV).

Estos resultados descartan la posibilidad de que la mutación *pic-1* afecte al gen *madB* y sugieren que el gen afectado por la mutación *pic-1* es independiente o al menos no próximo de *madB*.

El resultado más importante de este cruzamiento es el aislamiento de dobles mutantes *madB103 pic-1*, cuya respuesta a la luz aparece en la Tabla V y la figura 10.

Las germoesporas del cruzamiento C304 x S253 produjeron colonias ciegas y videntes para el fototropismo, pero sin diferencias notables a simple vista en cuanto a color. Con ánimo de obtener dobles mutantes *madB103 pic-2*, se aislaron las colonias aparentemente más claras entre las ciegas, pero, tras varios reaislamientos, se comprobó que no fotoinducen menos que la estirpe parental C304. Es posible que el doble mutante buscado no sea muy diferente de los parentales en cuanto a fotoinducción.

TABLA IV. Análisis de 90 de las germoesporas de un solo germoesporangio del cruzamiento C304 x S252.

<u>Germoesporas</u>	<u>Frecuencia</u>		<u>Fenotipo</u>			<u>Genotipo</u>
	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>fototropismo</u>	<u>fotoinducción en luz blanca</u> <u>color</u>	<u>β-caroteno</u>	
Tipo 1	19	20	ciegas	claras	180	<i>madB pic-1</i>
2	20	27	ciegas	oscuras	-	<i>madB</i>
3	51	53	videntes	oscuras	347	<i>pic-1</i>
4			videntes	muy oscuras	527	silvestre
<i>Testigos</i>						
NRRL1555			vidente	muy oscuras	542	silvestre
C304			ciega	oscura	360	<i>madB</i>

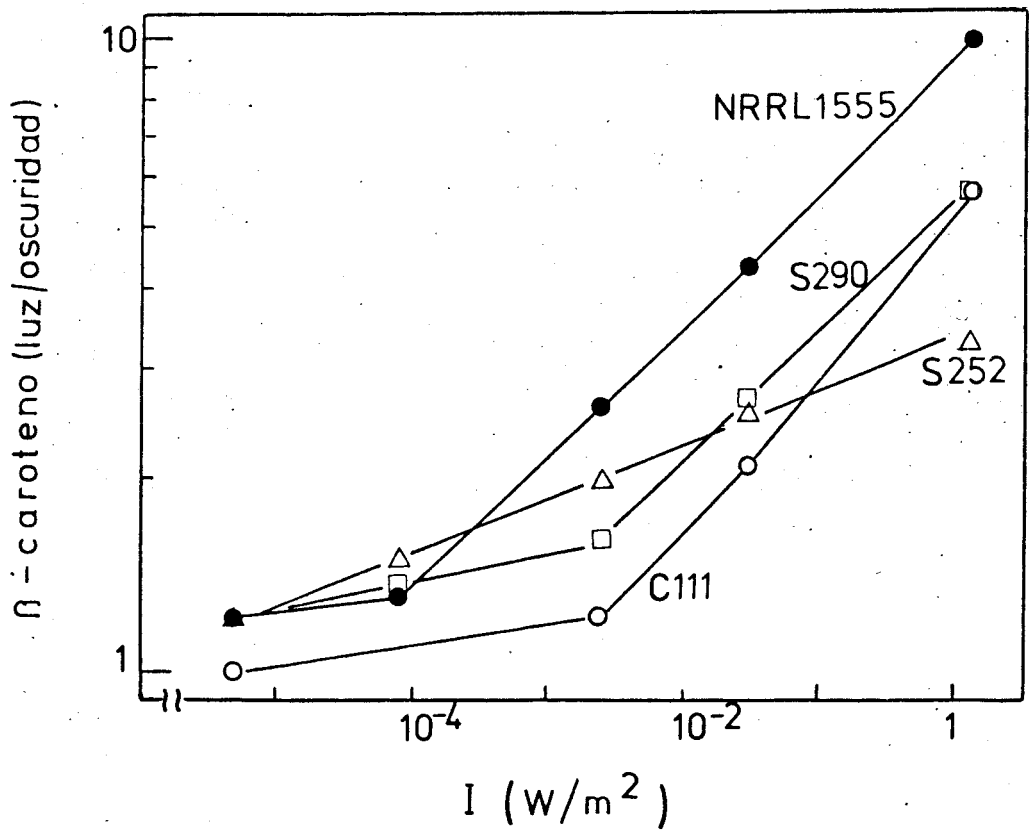


Figura 10. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno de los mutantes S290 (*madB103 pic-1*), C111 (*madB103*), S252 (*pic-1*) y la estirpe silvestre NRRL1555 a distintas intensidades luminosas, en relación con el contenido en la oscuridad.

TABLA V. Contenido de β -caroteno sintetizado a la luz y a la oscuridad por la estirpe silvestre NRRL1555, la estirpe doble mutante *madB pic-1* y las estirpes parentales S252 y C304

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>β-caroteno (ppm)</u>	
		luz	oscuridad
NRRL1555	(-)	459	45
C304	<i>madB103 nicA101</i> (+)	266	59
S252	<i>pic-1</i> (-)	252	38
S290	<i>madB103 pic-1</i> (-)	116	29

Fotocarotenogénesis en mutantes defectivos en la regulación de la carotenogénesis

Se determinó la acumulación de β -caroteno en la luz y en la oscuridad en la estirpe S120, genotipo *car-114*, que es parcialmente insensible a la vitamina A (Tabla V

TABLA VI. Fotoinducción del β -caroteno en la estirpe S120

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>β-caroteno, ppm</u>	
		luz	oscuridad
NRRL1555	(-)	555	74
S120	<i>car-114</i> (-)	471	46

Se concluye que la mutación *car-114* no afecta a la capacidad de fotoinducción.

La estirpe C2, genotipo *carA5* (-), acumula en la oscuridad una pequeñísima cantidad de β -caroteno y una variedad de sus precursores que dan como resultado un complicado espectro de absorción (Fig. 11; a).

Si se cultiva bajo iluminación, el espectro de absorción mantiene su apariencia general, pero cambia algo los valores absolutos (Fig. 11, b), indicando algún grado de fotoinducción. Con los resultados existentes por ahora, no se puede decir si la fotoinducción relativa en C2 es comparable a la del silvestre (diez veces más en luz que en la oscuridad), aunque desde luego en C2 la cantidad absoluta de β -caroteno producida bajo el estímulo luminoso queda muy por debajo de la producida en el silvestre (unas 500 ppm).

No está claro si los mutantes *carS*, que acumulan enormes cantidades de β -caroteno en la oscuridad (unas 2000-4000 ppm), son fotoinducibles (Eslava, 1973; Muriello, 1975). Desde luego, la luz no les estimula a acumular diez veces más, pero no es fácil decir si les estimula a producir 500 ppm más, ya que esta cantidad es pequeña comparada con la presente en la oscuridad y la luz debe destruir los carotenos presentes, en proporción desconocida.

M.I.G. Roncero, después de llevar a cabo el cruce apropiado en este laboratorio, obtuvo la estirpe S283, de genotipo *carA5 carS42* (-), que reúne la mutación estimuladora *carS* y la inhibidora *carA*. En la oscuridad, estas dos instrucciones contradictorias dan lugar a la

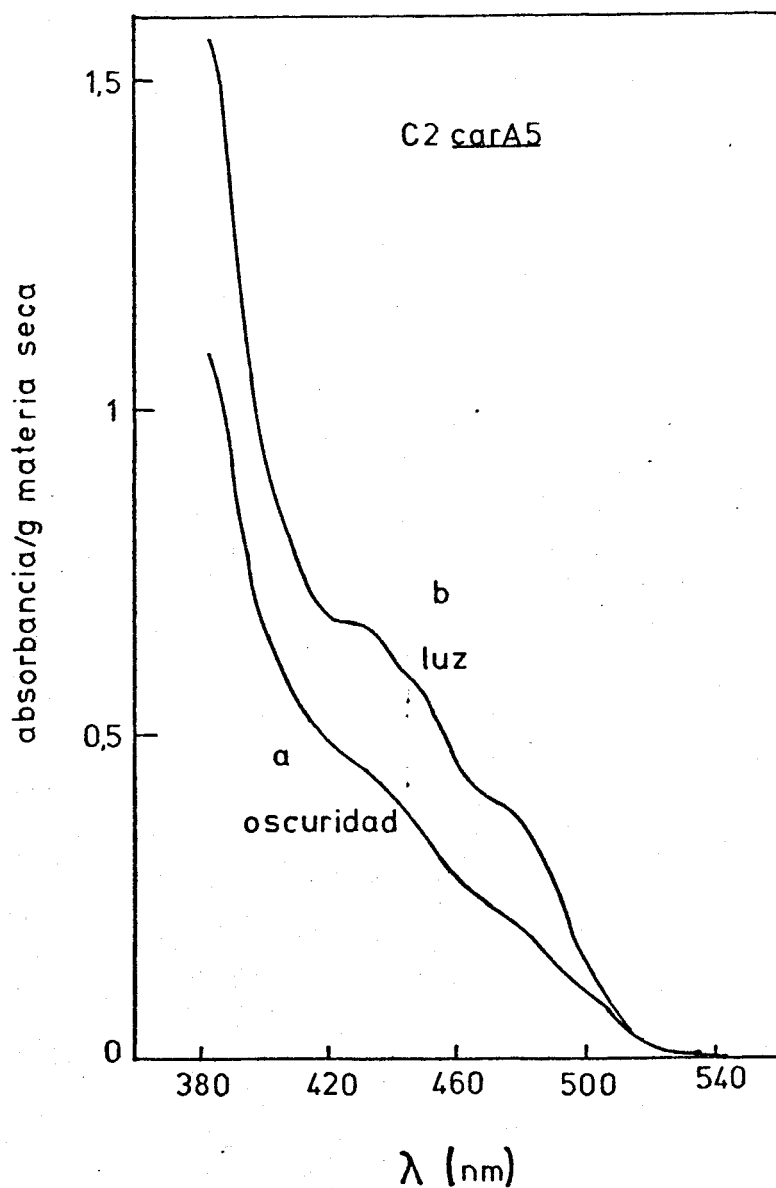


Figura 11. Espectro de absorción en un extracto de la estirpe C2 (*carA5*). a) Absorbancia por gramo de materia seca en micelios incubados 4 días a la luz. b) Absorbancia por gramo de materia seca en micelios incubados 4 días en la oscuridad. Los micelios se rompieron en una mezcla de éter de petróleo y metanol; la fracción de éter de petróleo (que contiene los carotenos) se desecó y resuspendió en hexano antes de obtener el espectro de absorción.

acumulación de unas 100 ppm β -caroteno, cantidad apreciable, algo mayor que la acostumbrada en el silvestre. La curva de respuesta a la luz aparece en la figura 12. Se concluye que el doble mutante *carA carS* es incapaz de fotoinducir la carotenogénesis. El ligero descenso del caroteno a altas intensidades de luz puede atribuirse a la fotólisis. La fotólisis no alcanzaría a contrarrestar en esta estirpe una fotoinducción normal, de 500 ppm β -caroteno, de la misma manera que no alcanza en el silvestre:

Fotoinducción de β -caroteno por luz roja mediante azul de metileno

En *Phycomyces* la luz roja no es efectiva en inducir la carotenogénesis, haya o no azul de metileno en el medio (Tabla VII).

Las diferencias de contenido de β -caroteno son poco importantes y no sistemáticas. Para confirmar que los valores no eran significativamente distintos, se estudió de nuevo la fotoinducción de carotenos por luz roja a dos intensidades diferentes en la estirpe silvestre NRRL1555 incubada en medio GA un número variable de días (Tabla VIII).

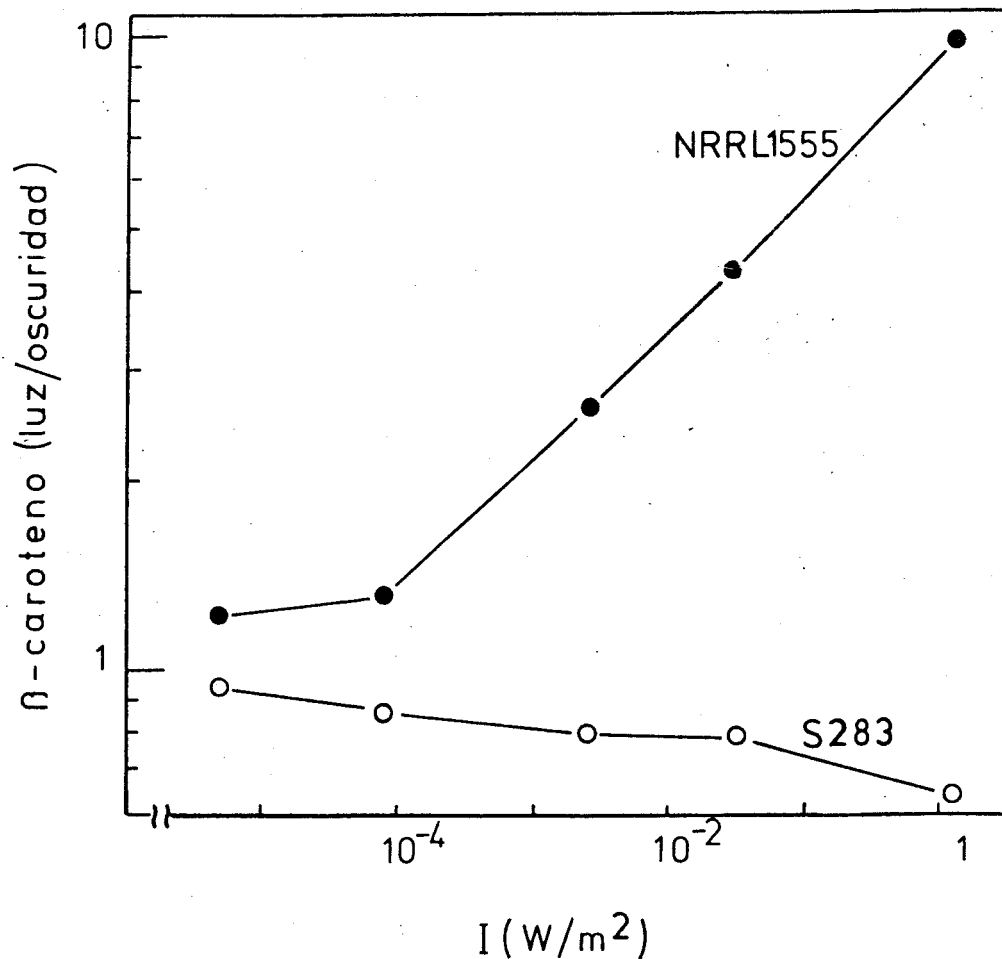


Figura 12. Fotocarotenogénesis. Contenido de β -caroteno de la estirpe S283 (doble mutante *carA carS*) y la estirpe silvestre NRRL1555, a distintas intensidades luminosas, en relación con el contenido en la oscuridad.

TABLA VII. Contenido de β -caroteno (ppm) en micelios incubados durante 7 días en medio SIV, con azul de metileno ($30 \mu\text{M}$) o sin él, e iluminadas continuamente con luz roja (4 W/m^2) o en la oscuridad.

Estirpe	Genotipo	Condiciones iluminación	Azul de metileno	
			SI	NO
NRRL1555	(-)	luz roja	101	107
		oscuridad	62	91
C109	madB101 (-)	luz roja	77	109
		oscuridad	165	
C114	madB106 (-)	luz roja	85	88

TABLA VIII. Contenido de β -caroteno de micelios silvestres de NRRL1555 incubados en medio GA un número variable de días, con o sin azul de metileno ($30 \mu\text{M}$) e iluminado o no con luz roja.

Días	Luz roja (W/m^2)	Azul de metileno	
		SI	NO
3	4	144	173
	0	264	
4	4	164	
	0	384	455
7	4	422	
	0		

4	0,4	91	103
	0	96	
7	0,4	222	334
	0	249	

Los altos contenidos en β -caroteno se deben atribuir a las temperaturas algo elevadas a que dió lugar la fuerte iluminación, a pesar de los esfuerzos para evitarlas. No se observa fotoinducción por luz roja en presencia de azul de metileno.

Hay que señalar que el azul de metileno no penetra apreciablemente en las células de *Phycomyces*: ni los micelios vivos ni sus extractos tienen trazas de coloración azul tras la incubación con azul de metileno.

FOTODIFERENCIACION

En determinadas condiciones ambientales la luz decide la diferenciación de los esporangióforos en dos estados alternativos, "gigante y enano" (Thornton, 1973). Se han determinado por primera vez las relaciones entre intensidad luminosa y respuesta en la estirpe silvestre NRRL1555 (Fig. 13). La luz inhibe la aparición de esporangióforos enanos e induce la de gigantes. La estimulación de gigantes es mucho menos acusada que la inhibición de enanos: a la intensidad más alta utilizada, hay 2300 veces menos enanos que en la oscuridad, pero sólo 26 veces más gigantes. En otras palabras, no hay una interconversión biunívoca de un tipo en otro.

El umbral de intensidad para este efecto es muy bajo, probablemente inferior a 10^{-10} W/m².

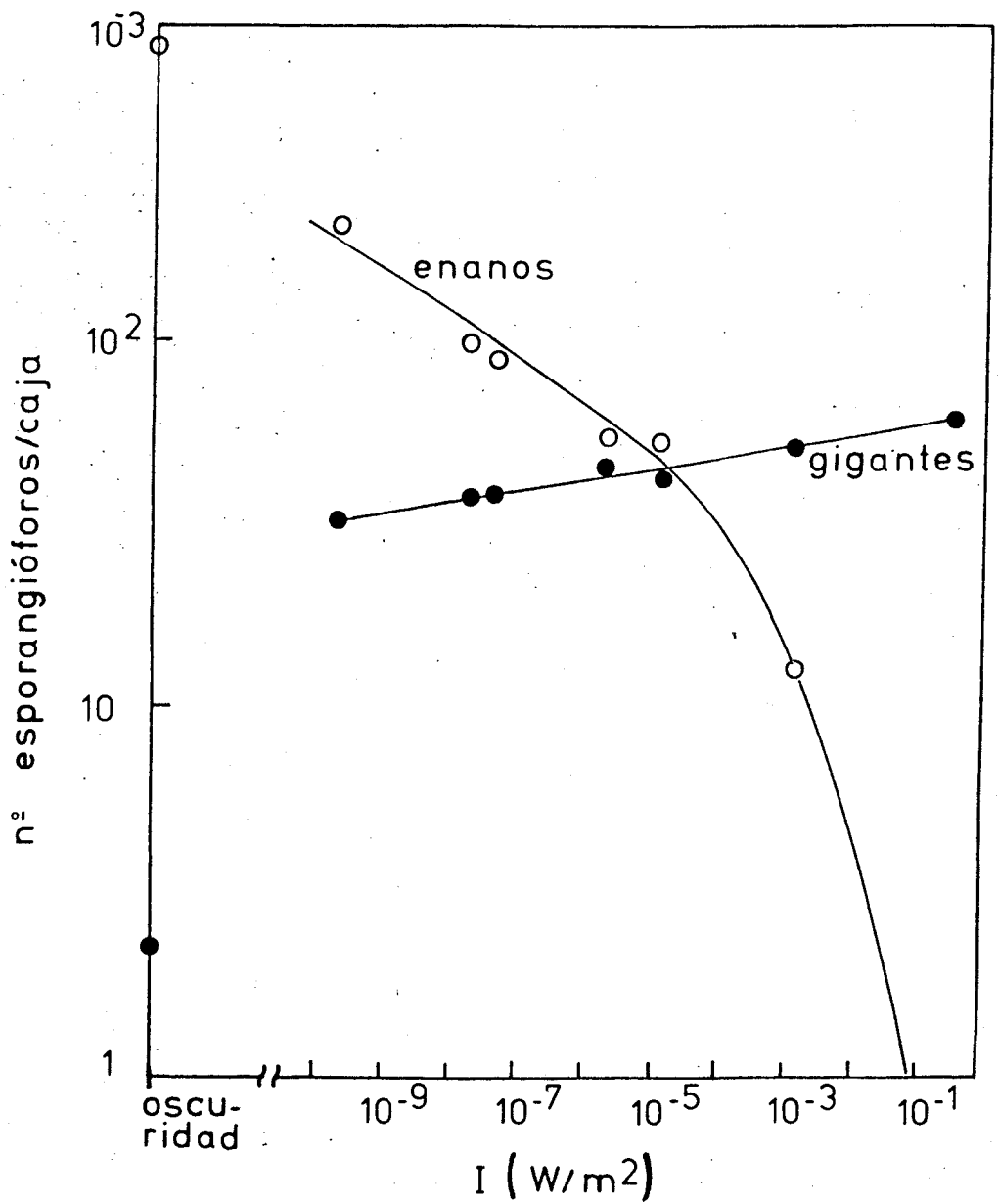


Figura 13. Fotodiferenciación de esporangióforos en la estirpe silvestre. Número de esporangióforos enanos y número de esporangióforos gigantes en función de la intensidad de luz azul.

Fotoiniciación de esporangióforos gigantes en mutantes mad

La figura 14 muestra el número de esporangióforos gigantes en función de la intensidad luminosa en varios mutantes.

El mutante *madB* es ciego para intensidades que ve el silvestre. Su umbral, mucho más alto que el del silvestre, es del orden de 10^{-6} W/m².

La estirpe C21 (mutación *madA7*) no produce esporangióforos gigantes por debajo de 10^{-7} W/m² y produce menos que el silvestre por encima de ese umbral.

La estirpe C141 (mutación *madC51*) produce menos esporangióforos gigantes que el silvestre a todas las intensidades. La misma mutación está presente, en otro fondo genético, en la estirpe C59; los resultados con C59 (no dibujados) fueron bastante más parecidos a los del silvestre que los de C141, lo que sugiere un papel importante para el fondo genético de la estirpe, más que para la mutación *madC* concreta.

Fotoinhibición de esporangióforos enanos en mutantes mad

La figura 15 muestra la producción de esporangióforos enanos en función de la intensidad luminosa. En cada experimento se incluyó la estirpe silvestre NRRL1555 como testigo. Los resultados se dan como el número de esporangióforos enanos relativo al del silvestre en la oscuridad; de esta manera se eliminan las

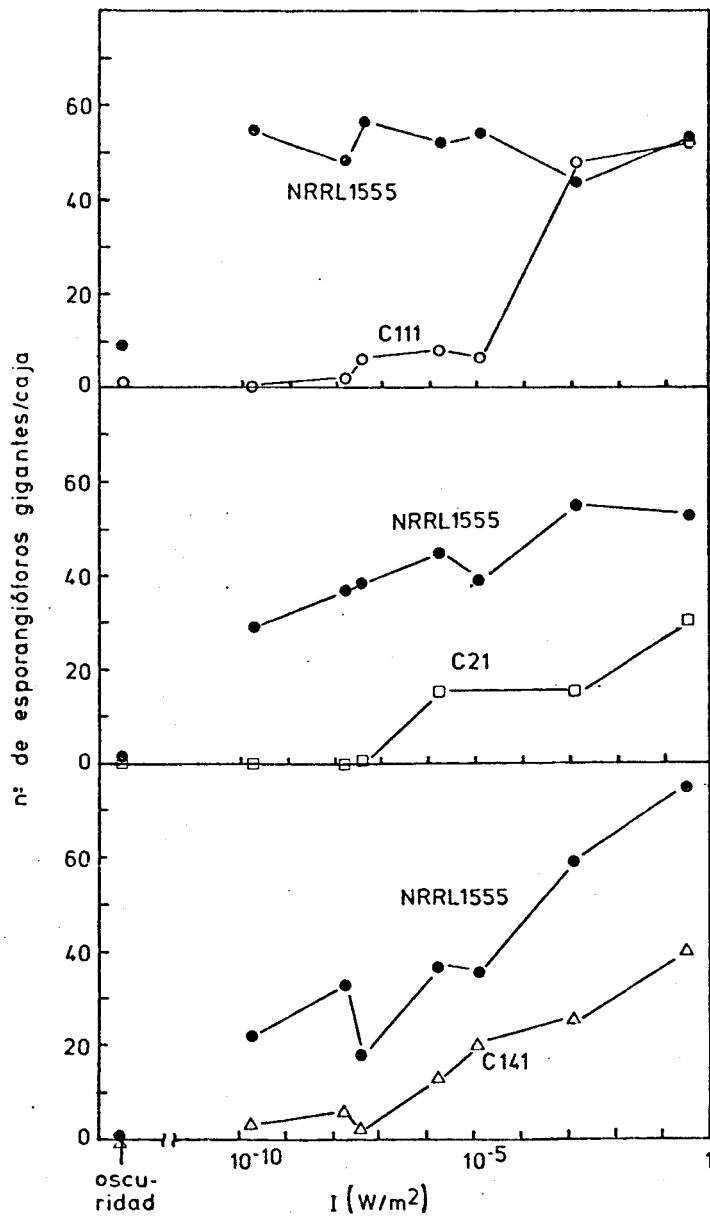


Figura 14. Fotoiniciación de esporangióforos gigantes en mutantes *mad*. Número de esporangióforos gigantes por caja de Petri en función de la intensidad luminosa en la estirpe silvestre NRRL1555 y los mutantes C111 (*madB103*), C21 (*madA7*) y C141 (*carA5 madC51*).

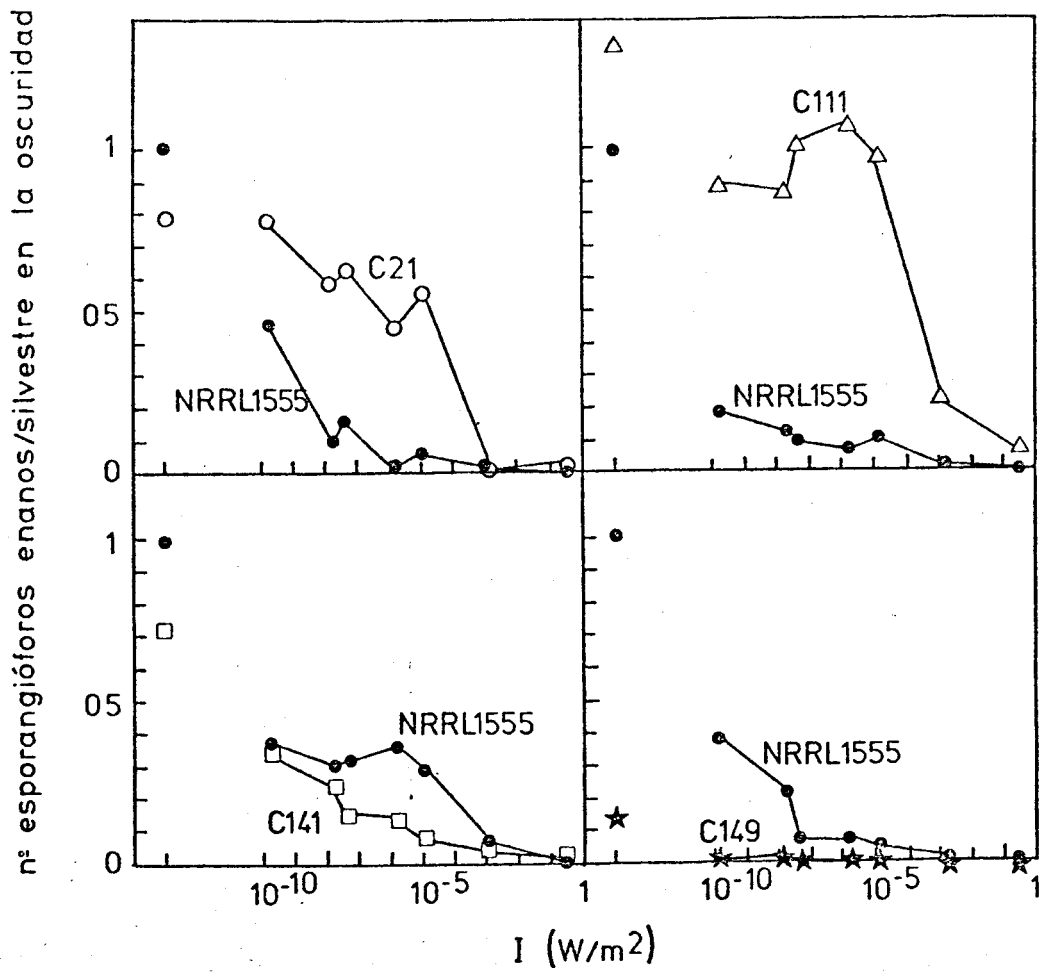


Figura 15. Fotoinhibición de esporangios enanos. Número de esporangios enanos por caja respecto al valor del silvestre en la oscuridad, en función de la intensidad de luz azul, en las estirpes mutantes C111 (*madB103*), C21 (*madA7*) y C141 (*madC51 carA5*). En cada experimento se incluye la estirpe silvestre NRRL1555 como testigo.

variaciones ambientales propias de experimentos tan largos como estos.

Las mutaciones en los genes *mada* y *madB*, que hacen a los esporangióforos ciegos para el fototropismo, hacen los micelios ciegos para la fotoinhibición de esporangióforos enanos. Ambas respuestas son provocadas, sin embargo, por altas intensidades luminosas. La mutación en el gen *madC* afecta al fototropismo pero no a la fotoinhibición. La estirpe C149, portadora de una mutación *madD*, tiene un número de esporangióforos enanos sensiblemente inferior al del silvestre (unas siete veces más pequeño en la oscuridad), pero la fotoinhibición se produce tanto o más que en el silvestre.

FOTOINHIBICION DEL CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE QUINACRINA

La riboflavina y la quinacrina, a altas concentraciones en el medio, inhiben fuertemente el crecimiento de *Phycomyces* cuando se incubaba a la luz, pero apenas lo afectan en la oscuridad (Carlile, 1962).

La figura 16a muestra los pesos secos (mg) por cultivo, de micelios del tipo silvestre y del mutante C109 incubados con 0,18 mM de quinacrina bajo luz blanca o en la oscuridad. La figura 16b muestra los resultados de un experimento similar con el mutante C112.

Tanto los mutantes como el tipo silvestre son fuertemente inhibidos por la combinación de quinacrina y luz.

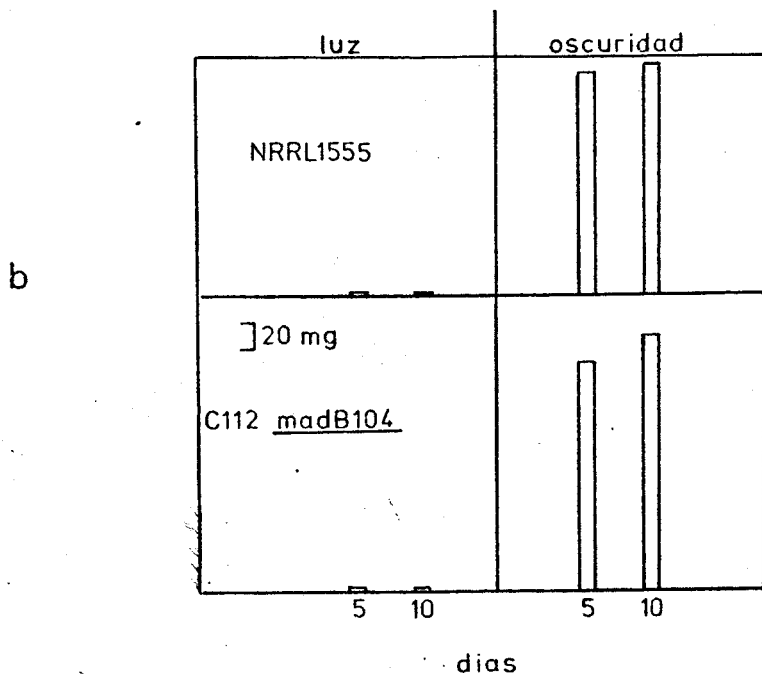
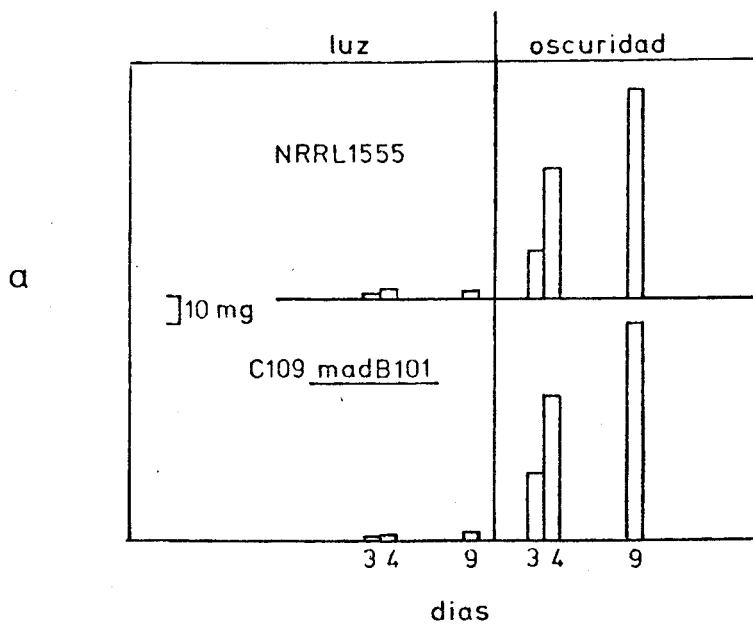


Figura 16. Fotoinhibición por quinacrina. a) Peso seco de micelios de la estirpe silvestre NRRL1555 y el mutante C109 (*madB101*) cultivados con 0,18 mM de quinacrina durante distinto número de días bajo la luz o en la oscuridad. b) Lo mismo para el mutante C112 (*madB104*) y el correspondiente testigo silvestre.

En estos experimentos aparecen de vez en cuando cultivos iluminados que contienen una masa normal de micelio, es decir, no inhibidos por la quinacrina. Estos casos se explican por la frequentísima aparición de mutantes espontáneos con efectos en la permeasa de la riboflavina (Delbrück y Ootaki, en prensa). Estos mutantes no admitirían tan fácilmente la entrada de quinacrina y serían menos inhibidos.

Los mutantes defectuosos en la permeasa de la riboflavina son resistentes a 5-deazarriboflavina, un análogo tóxico de la riboflavina que penetra en las células por la misma permeasa de la riboflavina (Delbrück y Ootaki, en prensa). En consecuencia, la sospecha de que los micelios iluminados no inhibidos por quinacrina tienen una permeasa de la riboflavina algo diferente puede investigarse sembrando sus esporas en un medio que contenga 5-deazarriboflavina (1 $\mu\text{g/ml}$). La capacidad de formar colonias en este medio fue de $5,9 \times 10^{-5}$ para las esporas de un cultivo C112 iluminado y no inhibido, pero sólo de $2,9 \times 10^{-6}$ para las esporas normales. En cuanto a las esporas de un cultivo NRRL1555 iluminado y no inhibido, casi todas fueron capaces de crecer algo en presencia de 5-deazarriboflavina, dando micelios tenues de 2-3 mm de diámetro.

Concluimos, por consiguiente, que los casos esporádicos de crecimiento de cultivos iluminados en presencia de quinacrina se deben a selección de los abundantes mutantes defectuosos en la permeasa de la riboflavina.

DISCUSION

FOTOINDUCCION DE CAROTENOS

La respuesta de la estirpe silvestre

El contenido de β -caroteno sintetizado por *Phycomyces* depende de los valores absolutos de intensidad luminosa a los que se expone el micelio. En el presente trabajo se ha estudiado un amplio intervalo de intensidades luminosas y se ha determinado la intensidad umbral de luz azul, por debajo de la cual el contenido de β -caroteno es el mismo que en la oscuridad. Dicha intensidad umbral, del orden de 10^{-5} W/m² en la estirpe silvestre NRRL1555, es unas diez mil veces mayor que la intensidad umbral, 10^{-9} W/m², para el equilibrio fotogeotrópico (Bergman et al., 1973). No se alcanzó, sin embargo, la saturación de la respuesta, a pesar de haber empleado intensidades muy superiores a las que saturan el fototropismo.

Estas diferencias entre fotocarotenogénesis y fototropismo son congruentes con los diferentes papeles que juegan en la vida del organismo. El fototropismo facilita presumiblemente la dispersión de las esporas guiando al esporangióforo desde el sustrato donde crezca el micelio, al aire libre; la luz, incluso poco intensa, constituye una guía fiable. La mayor parte del β -caroteno parece tener una función fotoprotectora; sería superfluo inducir su síntesis a intensidades bajas que no causan daños.

Por otra parte, el fototropismo se basa en el fotomecismo, respuesta provocada sólo por *cambios* en la intensidad luminosa, mientras que la fotoinducción de carotenos depende de la intensidad luminosa absoluta.

Además el fototropismo es una respuesta exclusiva de los esporangióforos, mientras que la fotocarotenogénesis se da en otras estructuras del organismo, y muy especialmente en micelios, aunque estén desprovistos de esporangióforos. La fotocarotenogénesis demuestra por tanto que el micelio tiene la capacidad de detectar la luz y reaccionar a ella.

Los más altos contenidos de β -caroteno inducidos por la luz (~ 600 ppm) están lejos de alcanzar el límite potencial de la carotenogénesis. En otros casos, las cantidades de β -caroteno acumuladas por la estirpe silvestre son mucho mayores: 2000 ppm para la vitamina A (Eslava et al., 1974) y 25000 ppm en estirpes de determinado genotipo, en ausencia de estímulos externos (Murillo et al., 1978).

Base genética de la fotocarotenogénesis

Las mutaciones en los genes *madA* y *madB*, que afectan pasos tempranos de la cadena de transducción sensorial del fototropismo, afectan también a la fotocarotenogénesis. Los productos de estos genes deben ser transductores comunes a las dos respuestas. La presencia de los mismos elementos tempranos en las dos cadenas de transducción sensorial sugiere la idea de un fotorreceptor común. No puede excluirse por completo la idea

opuesta de que los mismos elementos transduzcan información procedente de una flavina, en el caso del fototropismo, y de un caroteno, en el caso de la fotocarotenogénesis.

El doble mutante *madA madB* es mucho más defectivo que las estirpes que contienen las mutaciones por separado, tanto para el fototropismo, para el cual es prácticamente ciego (Lipson, comunicación personal), como para la fotocarotenogénesis. Se supone que los productos de ambos genes interaccionan y por tanto el efecto de las mutaciones es cooperativo.

Las curvas de equilibrio fotogeotrópico para los mutantes *madA*, *madB* y *madC*, afectados en pasos tempranos de la cadena sensorial, son idénticas a la del tipo silvestre, pero desplazadas hacia intensidades más altas. Los mutantes afectados en transductores tardíos muestran curvas distintas, con menores respuestas a todas las intensidades (ver figura 3, pág. 14) (Bergman et al., 1973). Por analogía, las curvas de fotocarotenogénesis en función de la intensidad luminosa sugieren que las mutaciones *madA*, *madB* y *pic-2* afectan a pasos tempranos de la cadena sensorial responsable de la fotocarotenogénesis, mientras que *pic-1* afecta a un paso tardío.

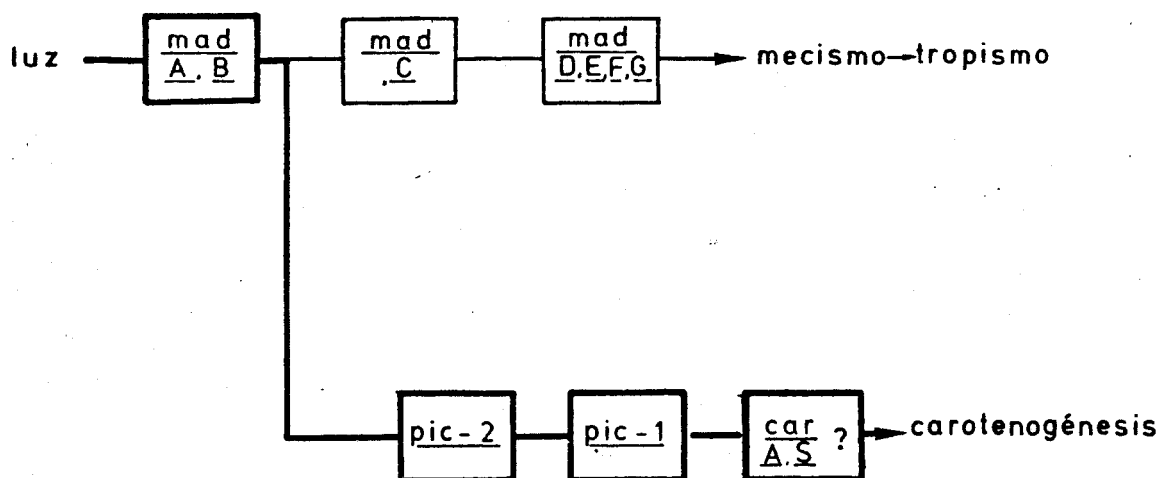
La analogía se extiende a particularidades como el comportamiento de la estirpe C21, que muestra en los dos casos curvas desplazadas con una pendiente algo mayor de lo normal (Bergman et al., 1973 y esta tesis).

El factor de desplazamiento de las curvas de la fotocarotenogénesis en mutantes "tempranos" es de 4 a 30 veces, mientras que en las del fototropismo es de 10^4 a 10^5 veces (Bergman et al., 1973). Estas diferencias excluyen muchas interpretaciones sencillas y tentadoras sobre la función de estos genes, como, por ejemplo, que el gen *madA* determine el fotorreceptor y los mutantes *madA* tengan menos fotorreceptor activo. Las diferencias citadas tienen que ver probablemente con las muy distintas relaciones cuantitativas entre estímulo y respuesta que caracterizan a las dos cadenas sensoriales.

El doble mutante *madB pic-1* no es más defectivo para la fotocarotenogénesis que cualquiera de los dos mutantes sencillos por separado, lo cual indica que las dos mutaciones afectan a una misma cadena sensorial y no a dos cadenas paralelas y aditivas para la fotoinducción de β -caroteno.

El doble mutante *carA carS* es por ahora el único mutante con la fotoinducción bloqueada por completo. La fotoinducción de los mutantes sencillos por separado es difícil de estudiar debido al efecto que estas mutaciones ejercen sobre la carotenogénesis. Una al menos, de las mutaciones *carA* o *carS* afecta la fotoinducción de β -caroteno. Dentro del canal de transducción sensorial sería responsable de un transductor tardío, ya que dichas mutaciones afectan a otras propiedades de la carotenogénesis no relacionadas con la luz.

La ordenación de las mutaciones implicadas en la fotocarotenogénesis dentro de un canal de transducción sensorial se muestra en la figura 17.



— Figura 17. Cadena de transducción sensorial que conecta el estímulo luminoso con las respuestas de fototropismo y fotocarotenogénesis. Ordenación de las nuevas mutaciones implicadas en la transducción para la fotocarotenogénesis.

Jayaram et al. (1979) han descubierto recientemente dos componentes en la fotocarotenogénesis, responsables respectivamente de la respuesta a dosis bajas, que se satura a 20 J/m^2 , y de la respuesta a dosis altas, con la saturación a 1000 J/m^2 . En nuestros experimentos no se detecta la existencia de dos componentes. Hay que tener en cuenta que nuestros experimentos utilizan exposiciones continuas a la luz, mientras que Jayaram et al. hicieron exposiciones cortas.

Los experimentos de fotoinducción por luz roja mediada por azul de metileno, que en *Fusarium aquaeductum* (Lang-Feulner y Rau, 1975) dieron resultado positivo, han resultado negativos en *Phycomyces*, debido probablemente a que el azul de metileno no penetra en la célula. Esto mismo ocurre en *Neurospora crassa* (Rau, comunicación personal).

FOTODIFERENCIACION

Respuesta en el tipo silvestre

El efecto inhibitorio de la luz sobre el desarrollo de esporangióforos enanos es mucho más acusado que el efecto estimulador de esporangióforos gigantes.

No hay una conversión de primordios enanos en gigantes, sino que, además, la luz inhibe el desarrollo de primordios. Los primordios de los esporangióforos enanos y gigantes difieren en su morfogénesis (Thornton, 1975). La inhibición de unos y la estimulación de otros

parecen ser dos respuestas sensoriales distintas, a las que podemos llamar macroforogénesis y microforogénesis.

El umbral, al que no se ha llegado experimentalmente, está por debajo del umbral fotogeotrópico. Desconocemos realmente el umbral absoluto para el fototropismo, porque, mientras nos limitemos a nuestro planeta, sólo podemos medir el umbral de luz en que el fototropismo comienza a compensar al geotropismo. Parece ser, en todo caso, que *Phycomyces* es capaz de responder a intensidades luminosas menores de lo que se creía.

No se conoce el sentido biológico de un umbral tan bajo, ya que no se sabe en qué condiciones se producen esporangióforos enanos y gigantes en la naturaleza. Las condiciones en que hemos observado microforogénesis son particularmente adversas (frío, oscuridad, escasez de nitrógeno) y puede parecer conveniente ahorrar materiales y energía aun a costa de reducir la dispersión de las esporas. La luz hasta muy bajas intensidades, sería una señal favorable en cuanto a la posibilidad de dispersión. La fotodiferenciación tendría así una ventaja selectiva.

La fotodiferenciación de esporangióforos enanos y gigantes como la fotocarotenogénesis, es una respuesta micelial dependiente de intensidades luminosas absolutas.

Los experimentos sobre fotodiferenciación de esporangióforos tropiezan con la dificultad de que la pobreza del medio y la baja temperatura retrasan mucho el crecimiento. Los experimentos duran unas tres

semanas. La larga duración contribuye probablemente a su menor reproducibilidad. Sería conveniente explorar exhaustivamente condiciones ambientales más favorables.

Parace que el contenido de nitrógeno no es muy importante, ya que usando un medio con mil veces más asparragina, se seguían produciendo muchos enanos en la oscuridad.

Base genética de la fotodiferenciación

Las mutaciones en algunos de los genes que afectan al fototropismo también afectan a la fotodiferenciación. Los mutantes *madA* y *madB* son defectuosos en la fotoinhibición de enanos y en la fotoinducción de gigantes y por tanto los productos de los genes *madA* y *madB* participan en ambos canales de transducción.

Para las dos respuestas las mutaciones en dichos genes conducen a una pérdida de sensibilidad; son necesarias intensidades mucho más altas para conseguir la misma respuesta que el silvestre.

Al igual que ocurre con la estirpe silvestre, el umbral de estos mutantes para la fotodiferenciación (entre 10^{-7} y 10^{-5} W/m²) está por debajo del umbral para el equilibrio fotogeotrópico (10^{-5} a 10^{-4} W/m²).

La macroforogénesis de la estirpe C141, con la mutación *madC51*, es algo diferente de la silvestre. La diferencia, que afecta al número de esporangióforos gigantes, se achaca a diferencias en el fondo genético, ya que la misma mutación en un fondo diferente produce

diferencias más pequeñas. Una de estas diferencias podría ser la presencia en el genotipo de C141 de una mutación *carA*, que impide la síntesis de β -caroteno. Galland y Russo (1979), estudiando la macroforogénesis en atmósfera cerrada con exposiciones luminosas de 1 minuto de duración, encontraron que las estirpes carentes de β -caroteno tienen alterada la respuesta en mayor grado cuanto menos β -caroteno residual presentan.

La estirpe C149, con una mutación *madD*, tiene la misma sensibilidad a la luz que el silvestre, pero los números absolutos de esporangióforos enanos, tanto en la luz como en la oscuridad, son muy bajos. Este mutante también tiene un comportamiento especial para la macroforogénesis en atmósfera cerrada (Galland y Russo, 1979), incluyendo disminución de la respuesta para las intensidades más altas.

La determinación de los genes implicados en las dos respuestas, fototropismo y fotodiferenciación, permite establecer la conexión entre las respectivas cadenas de transductores. Como en las demás respuestas miceliares participan en la fotodiferenciación los productos de los genes tempranos, *madA* y *madB* (Fig. 18).

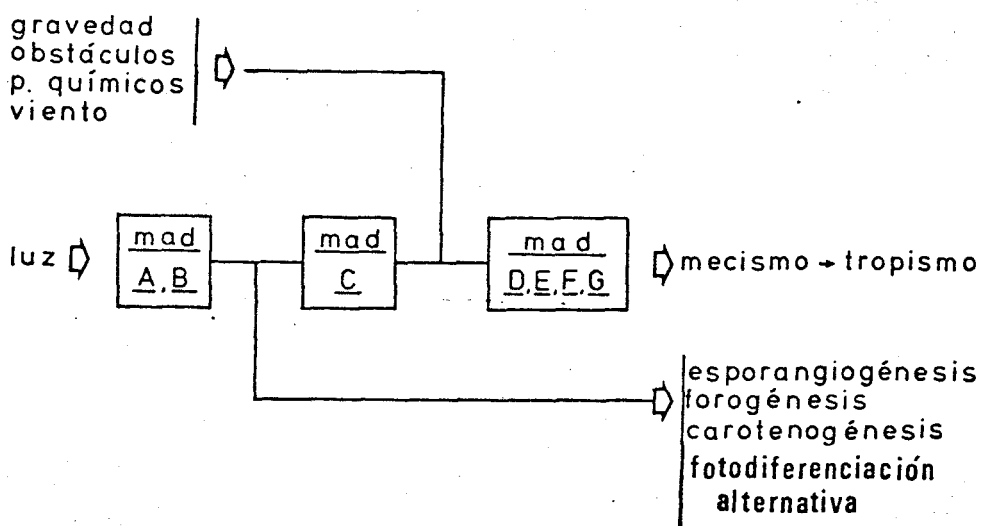


Figura 18. Conexión de la fotodiferenciación con la cadena de transducción sensorial para el fototropismo.

FOTOINHIBICION DEL CRECIMIENTO

La quinacrina, inhibidor de las flavinas (Haas, 1944), produce un efecto sobre la estirpe silvestre notablemente distinto en la luz que en la oscuridad, y este hecho fue interpretado como prueba a favor de que el fotorreceptor es una flavina (Carlile, 1961). Sin embargo todos los efectos causados por la luz no tienen que realizarse obligatoriamente a través de la misma cadena de transductores. Por ejemplo, la luz actuando a través de una molécula fotosensibilizadora podría ocasionar daños a la célula a nivel de la cadena respiratoria, sin relación con el canal de fototransducción.

El hecho de que los mutantes en el gen *madB* no presenten diferencia con el tipo silvestre respecto a la fotoinhibición del crecimiento por quinacrina demuestra que el producto del gen *madB* no interviene en este efecto de la luz. Como el producto del gen *madB* es un transductor temprano, implicado en todos los demás efectos conocidos de la luz en *Phycomyces*, cabe suponer que la fotoinhibición del crecimiento en presencia de quinacrina no está relacionada con el sistema sensorial, sino que tiene lugar a un nivel celular muy distinto.

INTEGRACION DE LAS RESPUESTAS

Una de las respuestas del micelio a la luz, la fotocarotenogénesis, tiene un umbral mayor que el del fototropismo; las otras dos, fotomacroforogénesis y fotomicroforogénesis, menor. Estas diferencias pueden explicarse por el papel que juega cada respuesta en la vida del organismo.

Del estudio de dichas respuestas en los mutantes *mad* se concluye que los genes *madA* y *madB* están implicados también en la transducción sensorial para la fotocarotenogénesis y la fotodiferenciación de esporangióforos. Las mutaciones en estos genes conducen siempre a disminución de la sensibilidad a la luz (curvas desplazadas y umbrales más altos respecto al silvestre). pero esta disminución es cuantitativamente diferente de unas respuestas a otras.

Estos genes, por tanto, deben controlar pasos tempranos, comunes a todos los procesos de transducción fotosensorial y presentes en el micelio como en los esporangióforos.

El gen *madB* no participa en la fotoinhibición del crecimiento por quinacrina. Esta respuesta a la luz no parece, por tanto, estar mediada por la misma cadena de transducción sensorial.

La conexión de la fotodiferenciación con el canal sensorial del fototropismo se hace a un nivel anterior a *madC*, en el mismo punto que las demás respuestas miceliarias.

El hecho de que el mutante *madd*, que se cree que tiene el metabolismo del AMPc alterado (Cohen, 1978) presente ciertas peculiaridades en las respuestas de fotodiferenciación sugiere una posible participación del AMPc en otras respuestas distintas del fototropismo. Esta posibilidad debe ser estudiada más profundamente utilizando otros mutantes y analizando en detalle otras respuestas, como la fotocarotenogénesis.

La fotocarotenogénesis depende también de genes no implicados en el fototropismo. Los mutantes defectuosos en la fotoinducción de carotenos, al igual que los del fototropismo, pueden tener dos tipos de respuestas: desplazada hacia intensidades más altas o reducida a todas las intensidades. Esta similitud entre una respuesta del esporangióforo y otra micelial hace pensar que la estructura y organización de los canales de transducción que transfieren la información desde el fotorreceptor a cada respuesta es la misma en todos los casos.

La luz actúa sobre la carotenogénesis a través de uno al menos de los genes *carA* o *carS*. Estos genes estaban ya implicados en la regulación de la síntesis de carotenos.

Los tropismos, la carotenogénesis y la diferenciación de esporangióforos son procesos importantes para el organismo no relacionados entre sí, y sometidos a una regulación precisa que puede ser afectada por otros agentes distintos de la luz. Es interesante, sin embargo, que la luz afecte a todos ellos a través de un equipo común de transductores, presentes en todo el organismo.

BIBLIOGRAFIA

BERGMAN, K. *Planta*, 107, 53 (1972).

BERGMAN, K., BURKE, P.V., CERDA OLMEDO, E., DAVID, C.N., DELBRUCK, M., FOSTER, K.W., GOODELL, E.W., HEISENBERG, M., MEISSNER, G., ZALOKAR, M., DENNISON, D.S. y SHROPSHIRE, W. Jr. *Bacteriol. Rev.*, 33, 99 (1969).

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

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

BURNETT, J.H. "Chemistry and biochemistry of plant pigments" (editado por T.W. Goodwin) Academic Press, London and New York, 1, 655 (1976).

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

CARLILE, M.J. *J. gen. Microbiol.*, 28, 161 (1962).

CERDA OLMEDO, E. "Handbook of Genetics", ed. R.C. King, Plenum Press, N.Y., 23, 343 (1974).

CERDA OLMEDO, E. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31, 535 (1977).

CERDA OLMEDO, E. y TORRES MARTINEZ, S. *Pure & Appl. Chem.*, 51, 631 (1979).

COHEN, R.J. *Nature*, 251, 144 (1974).

COHEN, R.J. *Plant Sci. Lett.*, 13, 315 (1978).

COHEN, R.J. y ATKINSON, M.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 616 (1978).

DE LA GUARDIA, M.D., ARAGON, C.M.G., MURILLO, F.J. y CERDA OLMEDO, E. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 2012 (1971).

DELBRUCK, M., KATZIR, A. y PRESTI, D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73, 1969 (1976).

DELBRUCK, M. y REICHARDT, W. "Cellular mechanism in differentiation and Growth", Princeton University Press, p. 3 (1956).

DELBRUCK, M. y CERDA OLMEDO, E. "Genética microbiana", Editorial Alhambra, Madrid, 13, 298 (1977).

DELBRUCK, M. y OOTAKI, T. *Genetics*, en prensa.

DEMEREK, M., ADELBERG, E.A., CLARK, A.J. y HARTMAN, P.E. *Genetics*, 54, 61 (1966).

ERRERA, L. *Botan. Z.*, 42, 497; 513; 529; 545; 561 (1884).

ESLAVA, A.P. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica, Valencia (1973).

ESLAVA, A.P., ALVAREZ, M.I. y CERDA OLMEDO, E. *Eur. J. Biochem.*, 48, 617 (1974).

ESLAVA, A.P., ALVAREZ, M.I., LIPSON, E.D., PRESTI, D. y KONG, K. *Molec. gen. Genet.*, 147, 235 (1976).

FOOTE, C.S. *Science*, 162, 963 (1968).

FOSTER, K. Tesis Doctoral, California Institute of Technology (1972).

FOSTER, K.W. *Ann. Rev. Byophys. Bioeng.*, 6, 419 (1977).

FOSTER, K.W. y LIPSON, E.D. *J. gen. Physiol.*, 62, 590 (1973).

FRANKE, W.W. y REAU, P. *Arch. Microbiol.*, 90, 121 (1973).

FURCH, B. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 70, 307 (1978).

FURCH, B. y GOODAY, G.W. *Transactions of the British Mycological Society*, 70, 307 (1978).

GALLAND, P. y RUSSO, V.E.A. *Photochem. and Photobiol.*, 29, 1009 (1979).

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

GRUEN, H.E. *Plant Physiol.*, 34, 158 (1959).

HAAS, E. *J. Biol. Chem.*, 155, 321 (1944).

HARDING, R.W. y SHROPSHIRE, W. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, en prensa.

JAYARAM, M., PRESTI, D. y DELBRUCK, M. *Exp. Mycol.*, 3, 42 (1979).

- KRINSKY, N.I. en "Photophysiology" (editado por A.C. Giese) Academic Press, New York and London, 3, 123 (1968).
- LANG-FEULNER, J. y RAU, W. Photochem. and Photobiol., 21, 179 (1975).
- LIPSON, E.D. Biophys. J., 15, 989 (1975a).
- LIPSON, E.D. Biophys. J., 15, 1013 (1975b).
- MURILLO, F.J. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1975).
- MURILLO, F.J. y CERDA OLMEDO, E. Molec. gen. Genet., 148, 19 (1976).
- MURILLO, F.J., CALDERON, I.L., LOPEZ DIAZ, I. y CERDA OLMEDO, E. Appl. & Environm. Microbiol., 36, 639 (1978).
- OOTAKI, T., FISCHER, E.P. y LOCKHARD, P. Molec. gen. Genet., 131, 233 (1974).
- PRESTI, D., HSU, W.J. y DELBRUCK, M. Photochem. Photobiol., 26, 403 (1977).
- RAU, W. Pure & Appl. Chem., 47, 237 (1976).
- RUDOLPH, H. Planta, 54, 505 (1960).
- RUSSO, V.E.A. Plant Sci. Lett., 10, 373 (1977).
- SUTTER, R.P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 127 (1975).

SUTTER, R.P. "Eukaryotic microbes as model developmental systems (D.H. O'Day and P.A. Horgen, eds.), Marcell Dekker, New York, 2, 251-272 (1977).

THORNTON, R.M. Plant Physiol., 49, 194 (1971).

THORNTON, R.M. Plant Physiol., 51, 570 (1973).

THORNTON, R.M. Ann. J. Bot., 62, 370 (1975).

TORRES MARTINEZ, S. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1978).

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Prof. Enrique Cerdá Olmedo, Director y responsable en gran parte de la realización de esta tesis, por su dedicación y su gran capacidad científica.

A mis compañeros de laboratorio, por la colaboración prestada en tantas ocasiones y sobre todo por su amistad a lo largo de estos años.

A Maribel por su inteligente y eficaz ayuda en la confección de esta tesis y a Asunción por su valiosa ayuda técnica.

A Reyes G. Roncero, E. Lipson y A.P. Eslava por las estirpes S283, L51 y B142 aportadas respectivamente a este trabajo.

A la Fundación Juan March por la ayuda financiera.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha. Para juzgar la Tesis Doctoral de

D.^a Isabel M^a del Pilar López Díaz
titulada "Bases genéticas de las respuestas a la luz
de *Phycomyces Blakesleeanus*".

acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE
cum laude

Sevilla 5 de Noviembre 1979

El Vocal,
José M. Vepa
El Presidente.

El Vocal,
B. Valdez
El Secretario.

El Vocal,
R. Leida Olmedo
EL DOCTORANDO

JMV

B. Valdez

R. Leida Olmedo



500292009

FBI E TD-016

292009-