

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 31 número 38 del libro
correspondiente.

Sevilla, 10 OCT. 1988

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alicia Lafitte



FOTOMORFOGÉNESIS DE PHYCOMYCES

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Biotecnia
de la Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor
en Biología, por el Licenciado

LUIS MARÍA CORROCHANO PELÁEZ

Sevilla, 4 de octubre de 1988

Director y ponente

E. Cerda Olmedo

Enrique Cerdá Olmedo

Catedrático de Genética de la
Universidad de Sevilla

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Depositado en el Dpto. de Genética
de la Facultad de Biología
de esta Universidad desde el día 10-X
hasta el día 28-X

Sevilla 28 de OCTUBRE de
EL DIRECTOR DE DEPARTAMEN

E. Cerda Olmedo

T.D.
154





TD
154

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral FOTOMORFOGENESIS
DE PHYCOMYCES

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Luis Grodzianu
Pérez

Sevilla, a 9 de MARZO de 1995

A mi familia

A Eva

ÍNDICE

RESUMEN Y CONCLUSIONES	1
INTRODUCCIÓN	4
CAPÍTULO PRIMERO: MORFOGÉNESIS DE <u>PHYCOMYCES</u>	8
Introducción	8
El organismo	8
Regulación del desarrollo de los esporangióforos de <u>Phycomyces</u>	11
Resultados	14
Forogénesis en la oscuridad	14
Fotoforogénesis	18
Periodo de competencia a la luz en la forogénesis de <u>Phycomyces</u>	19
Discusión	21
CAPÍTULO SEGUNDO: FOTOMORFOGÉNESIS DE <u>PHYCOMYCES</u>	24
Introducción	24
Fotorrespuestas del macróforo	26
Fotorrespuestas del micelio	28
Resultados	30
Discusión	39
Sensibilidad de la forogénesis a la luz azul ...	39
El periodo de competencia a la luz	42
CAPÍTULO TERCERO: ESPECTROS DE ACCIÓN DE LA FOTOMORFOGÉNESIS DE <u>PHYCOMYCES</u>	45
Introducción	45
El fotorreceptor	45
El espectro de acción	45
Espectros de acción y fotorreceptores de <u>Phycomyces</u>	46
Resultados	49
Discusión	53

CAPÍTULO CUARTO: MUTANTES DE <u>PHYCOMYCES</u> ALTERADOS	
EN LA FOTOMORFOGÉNESIS	56
Introducción	56
Mutantes alterados en las fotorrespuestas	
del esporangióforo	56
Mutantes alterados en la carotenogénesis	58
Resultados	60
Fotoforogénesis de los mutantes <u>mad</u>	60
Fotoforogénesis de los mutantes <u>car</u> y <u>pic</u>	63
Discusión	67
 DISCUSIÓN GENERAL	 70
 APÉNDICE: MATERIAL Y MÉTODOS	 73
Estirpes	73
Métodos de cultivo	75
Medio de cultivo	75
Inoculación	75
Condiciones de incubación	75
Cuantificación de la forogénesis	
y del crecimiento miceliar	76
Iluminación de los cultivos	77
Medición de la luz	78
Análisis matemático	78
 BIBLIOGRAFÍA	 80
 AGRADECIMIENTOS	 87

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La producción de los cuerpos fructíferos (esporangióforos) de Phycomyces está regulada por la luz (fotoforogénesis). En esta Tesis hemos definido unas condiciones experimentales que nos han permitido obtener respuestas morfogénicas graduales, cuantitativas y ajustables a una función algebraica. Hemos caracterizado la fotoforogénesis de la estirpe silvestre de Phycomyces y de diversas estirpes alteradas en el fototropismo de los esporangióforos y en la biosíntesis del beta-caroteno. A la luz de los resultados obtenidos concluimos que:

1. El aumento en la densidad de siembra de esporas, la hermeticidad de los cultivos y la falta de asparragina en el medio de cultivo inducen la microforogénesis e inhiben la macroforogénesis.

2. En las condiciones recomendadas, sólo se forman esporangióforos al tercer y cuarto día de edad del cultivo.

3. La iluminación de los cultivos inhibe la microforogénesis y estimula la macroforogénesis.

4. Los cultivos son competentes a la luz entre las 32 y las 68 horas de edad y la máxima respuesta se obtiene iluminando a las 48 horas de edad.

5. La iluminación continua con luz azul induce respuestas morfogénicas con un solo componente cuyo umbral es, aproximadamente, 10^{-8} W m^{-2} .

6. Los destellos azules aplicados a los dos días de edad inducen respuestas con dos componentes cuyos umbrales son, aproximadamente, 10^{-4} y 1 J m^{-2} .

7. La diferencia entre las formas de las curvas obtenidas con iluminación continua y con destellos se debe a la falta de sincronía y a la brevedad de los periodos de competencia de los micelios inoculados en cada caja de Petri. El periodo de competencia de cada micelio es de unas pocas horas, mucho más corto que el del cultivo.

8. La fotoforogénesis sigue la ley de Bunsen-Roscoe o de la reciprocidad de la respuesta con estímulos que duran entre 12 y 12000 segundos, por lo menos.

9. Los espectros de acción de los dos componentes de las dos respuestas se parecen entre sí y a los de las otras fotorrespuestas de Phycomyces, pero existen diferencias significativas que indican que los fotorreceptores no son idénticos.

10. Las mutaciones en los genes madA y madB desplazan el umbral de las dos fotorrespuestas cien y diez mil veces, respectivamente. Las mutaciones en estos genes producen un efecto multiplicativo cuando están en el mismo genomio.

11. Los mutantes en los genes madC a madH no tienen alterada la fotosensibilidad de ninguna de las dos fotorrespuestas.

12. Ni la superproducción de beta-caroteno (mutaciones en los genes carS y carD) ni las mutaciones en los genes picA, picB y carC alteran la fotosensibilidad de ninguna de las dos fotorrespuestas.

13. El beta-caroteno y el producto del gen carA (pA) son necesarios para la fotoforogénesis. Su ausencia tiene un efecto multiplicativo sobre las mutaciones en los genes madA y madB.

14. Proponemos como hipótesis de trabajo que el sistema de fotorrecepción para la fotoforogénesis está compuesto por flavinas, los productos de los genes madA y madB y el complejo beta-caroteno-pA, que funcionaría como pigmento antena en un agregado macromolecular.

INTRODUCCIÓN

El hecho de que una sola célula, el cigoto, dé lugar a un ser vivo tan complejo como el que lee estas líneas ha fascinado durante mucho tiempo a los científicos. El problema esencial consiste en entender cómo pueden tener aspectos y funciones diferentes células con la misma información genética.

La biología del desarrollo ha reunido muchas descripciones, desde el nivel macroscópico hasta el molecular. Sin embargo, para entender el desarrollo no basta una descripción de lo que ocurre. Es necesario conocer como actúan e interaccionan los elementos implicados y de que manera se toman las decisiones que dan lugar al proceso de desarrollo. La genética permite investigar las interacciones moleculares que ocurren en un proceso de desarrollo sin saber la identidad de los elementos implicados. El aislamiento de mutantes permite, además, identificar los auténticos elementos involucrados en un proceso de desarrollo y descartar los que son consecuencia del proceso en sí. La combinación de la genética con las nuevas técnicas de la biología molecular está demostrando ser fundamental para comenzar a entender estos problemas.

El éxito de esta tarea dependerá del organismo con el que estemos trabajando. No creo que exista un organismo modelo para investigar la biología del desarrollo. Sin embargo, podemos esperar que lo que aprendamos del desarrollo de un organismo nos dará ideas y nuevos enfoques que puedan ser aplicados al desarrollo de otros organismos.

Es conveniente que el organismo objeto de estudio crezca en medios de cultivo químicamente definidos y sea accesible al mayor número posible de técnicas genéticas y bioquímicas.

Existen problemas de desarrollo en todos los seres vivos, desde el ensamblaje de un virus hasta la compleja embriogénesis de los vertebrados superiores. El científico elegirá el organismo en función del tipo de problema que pretenda resolver. El mejor ejemplo de un organismo elegido para investigar las bases del desarrollo es el pequeño nematodo Caenorhabditis elegans. Este animal de un milímetro de longitud tiene un fácil manejo en el laboratorio, crece rápidamente y se obtienen mutantes y se analizan genéticamente con gran facilidad (Brenner 1974). Un individuo hermafrodita adulto tiene un sistema nervioso formado por 350 de sus 808 células somáticas (Edgar 1980). El número tan pequeño y fijo de células favoreció la elección de este organismo para investigar el desarrollo del sistema nervioso.

Se han investigado organismos multicelulares que son complicados en su desarrollo. Sin embargo, muchos problemas básicos pueden ser también estudiados en organismos más sencillos y que son manipulados genéticamente con más facilidad. De entre ellos, los hongos son organismos muy simples que tienen un desarrollo con estadios definidos: germinación de las esporas, construcción de cuerpos fructíferos, sexualidad etc. El ser eucariotas facilita extender los resultados obtenidos al desarrollo de otros eucariotas más complejos. La mayoría de los hongos son capaces de crecer en medios definidos, su genética está más o menos desarrollada, según el organismo, y se están comenzando a aplicar en ellos los métodos de la Genética Molecular (Timberlake 1985, Bennett y Lasure 1985).

Entender el desarrollo de los hongos en general nos puede ayudar a comprender problemas muy básicos de la Biología. La espora durmiente es una célula inactiva. ¿Cómo se bloquea el metabolismo celular?, ¿mediante qué mecanismo se inactiva la transcripción génica?. La activación de la espora por diversos factores ambientales supone la puesta en marcha de todo el metabolismo celular para dar lugar al organismo adulto.

¿Cuál es el mecanismo molecular responsable de la activación de la espora?, ¿qué mecanismo permite la activación génica?, ¿cómo se regula todo el proceso?.

Tras un periodo de crecimiento vegetativo, el organismo "decide" esporular. Para ello, una célula o segmento celular desarrolla el cuerpo fructífero. Este contiene o sostiene a las esporas, formas de resistencia y dispersión. La esporulación es un claro ejemplo de desarrollo celular. ¿Qué factores desencadenan este proceso?; diferentes grupos de genes parecen activarse para construir el cuerpo fructífero, ¿cuál es el mecanismo molecular de la activación génica que da lugar al desarrollo celular?, ¿es este mecanismo análogo a los responsables de otros procesos de desarrollo de organismos superiores?.

La mayoría de los hongos tienen reproducción sexual. Esto requiere, generalmente, la producción de estructuras especializadas que favorezcan la unión de los gametos y la supervivencia del cigoto. Al igual que la esporulación, la reproducción sexual es un claro ejemplo de desarrollo celular. En los hongos heterotálicos la respuesta sexual está dirigida por sustancias químicas, las "hormonas sexuales". Además de las preguntas sobre el desarrollo celular surgen muchas otras sobre la reproducción sexual en sí: ¿Cómo saben dos núcleos que son de distinto sexo?, ¿cómo se produce la fusión nuclear y la posterior meiosis?. El carácter casi universal de la reproducción sexual augura un evidente interés a la resolución de estos problemas.

Por todo lo expuesto, el desarrollo de los hongos es un atractivo modelo para investigar problemas fundamentales de la biología del desarrollo. Pese al gran avance de la genética en muchos hongos ascomicetos (Neurospora crassa, Aspergillus nidulans y Saccharomyces cerevisiae) poco se ha avanzado en la genética de su desarrollo. Honrosas excepciones son las investigaciones sobre el fenómeno del cambio de sexo en Saccharomyces cerevisiae (Nasmyth 1982), y sobre la regulación del ciclo celular en Saccharomyces cerevisiae y

Schizosaccharomyces pombe (Nurse 1985). También es de destacar el trabajo realizado sobre la genética de la esporulación en Aspergillus nidulans (Timberlake 1987, Timberlake y Marshall 1988).

Los hongos como modelo para la investigación del desarrollo no han sido aún utilizados en todas sus posibilidades. Intentando completar este vacío, nos hemos propuesto utilizar un hongo filamentoso, Phycomyces blakesleeanus, con la esperanza de utilizarlo como modelo para la Biología del Desarrollo.

Phycomyces es capaz de crecer con rapidez en medios definidos a temperatura ambiente y es accesible a la gran mayoría de los métodos bioquímicos y genéticos. Su biología ha sido ampliamente revisada en dos ocasiones (Bergman et al. 1969, Cerdá Olmedo y Lipson 1987a).

Tras una etapa de crecimiento vegetativo, Phycomyces construye unas hifas aéreas especializadas (los esporangióforos) para soportar el esporangio que contiene las esporas vegetativas. Existen dos tipos de esporangióforos de distinto tamaño, los macróforos y los micróforos, y su iniciación está regulada por la luz. El desarrollo de los esporangióforos (forogénesis) en Phycomyces es un claro ejemplo de diferenciación celular regulado por un factor ambiental, la luz.

El objeto de esta Tesis es investigar la regulación por la luz de la producción de esporangióforos en Phycomyces. Nuestro objetivo a largo plazo es entender el fenómeno de la regulación del desarrollo en este eucariota, con la esperanza de que lo que aprendamos en Phycomyces nos ayude a solucionar otros problemas del desarrollo de otros organismos.

CAPÍTULO PRIMERO

MORFOGÉNESIS DE PHYCOMYCES

INTRODUCCIÓN

El organismo

Phycomyces blakesleeanus Burgeff es un hongo filamentosos que pertenece a la familia Mucoráceas, orden Mucorales y clase Zigomicetos. Phycomyces tiene un ciclo de vida asexual y otro sexual que están caracterizados por profundos cambios morfológicos (revisados recientemente por Cerdá Olmedo y Lipson 1987b). Los ciclos de vida de Phycomyces aparecen descritos en la figura 1.

El ciclo de vida asexual comienza a partir de una espora, generalmente multinucleada, que dará lugar al micelio. Las esporas germinan tras añadir acetato y propionato, entre otros productos químicos, o tras un choque térmico (generalmente a 48°C durante 10 minutos). La biología de la germinación de las esporas de Phycomyces ha sido revisada extensamente por Van Laere et al. (1987). Tras la activación y al incubarla a una temperatura adecuada (generalmente 22°C), la espora se hincha. A las cinco horas el crecimiento esférico cambia a un crecimiento localizado que dará lugar a uno, dos y a veces tres tubos de germinación. Estos crecen y se ramifican para dar lugar a un micelio. Las hifas del micelio no están tabicadas, por lo que todo el micelio es una célula multinucleada (cenocito).

Tras una etapa de crecimiento, comienza la reproducción vegetativa. El micelio produce unas pequeñas protuberancias (primordios) que dan lugar a unas hifas aéreas (esporangióforos). Tras una fase de crecimiento apical, cada esporangióforo desarrolla una pequeña bolita (esporangio) con esporas en

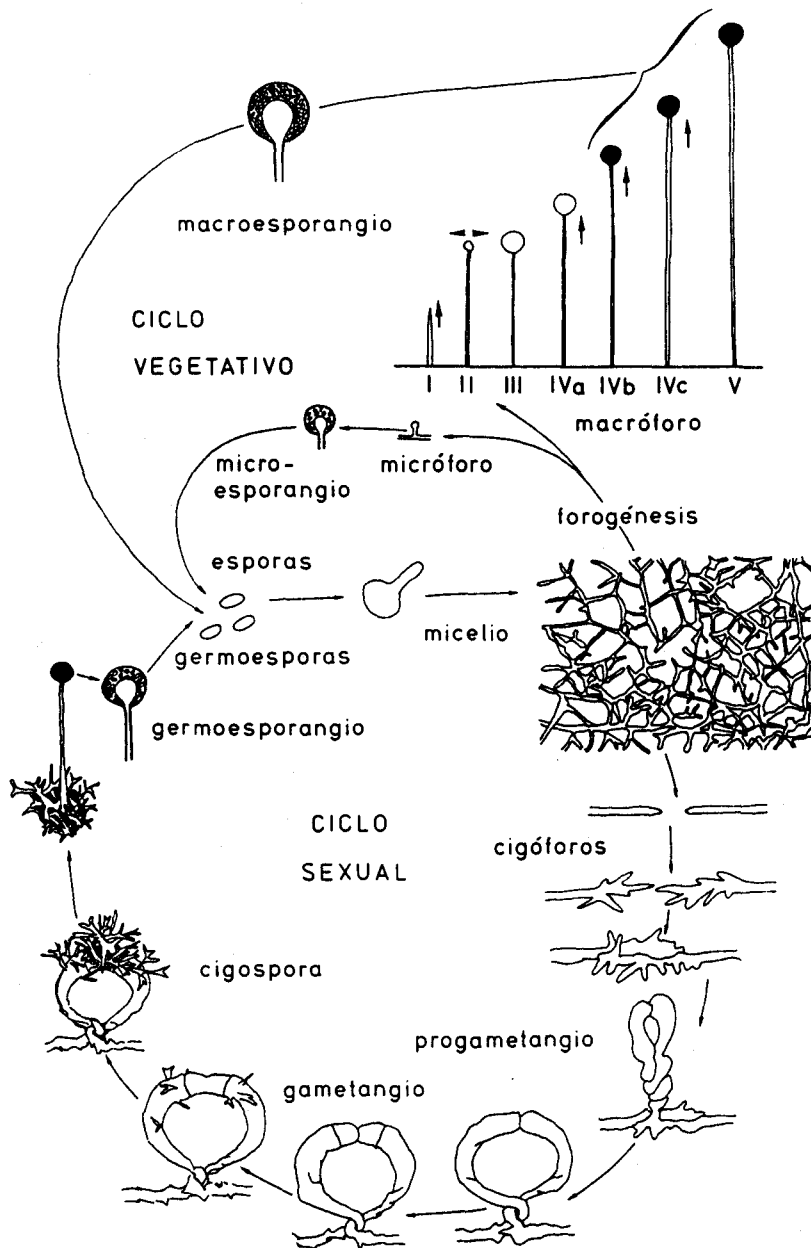


Figura 1. Ciclos de vida de *Phycomyces*. En la figura se muestran las distintas etapas del desarrollo de los esporangióforos y de la formación de la cigospora.

su interior. Durante el desarrollo de los esporangióforos (forogénesis) se producen intensas corrientes citoplásmicas que llevan nutrientes y productos de reserva al esporangióforo (Delbrück y Galle 1978).

Existen dos tipos de esporangióforos de distinta longitud, macróforos y micróforos, originados a partir de primordios morfológicamente diferentes (macro- y microprimordios) (Thornton 1972, 1975). Los macróforos miden alrededor de 100 mm y tienen un peso seco de unos 120 μ g (Gruen 1959). Su esporangio es de unos 500 μ m de diámetro con unas cien mil esporas en su interior. Los micróforos, por el contrario, tienen alrededor de 1 mm de longitud y sostienen un esporangio de unos 100 μ m de diámetro con unas mil esporas (Gutiérrez Corona y Cerdá Olmedo 1985).

Las corrientes citoplásmicas que se producen durante la forogénesis llevan varios cientos de miles de núcleos hasta la punta del esporangióforo donde se va a formar el esporangio. Una vez allí, los núcleos se empaquetan formando las esporas que serán liberadas al ser tocado el esporangio maduro. El desarrollo de los macróforos consta de cinco estadios que se caracterizan por cambios en la velocidad de crecimiento y en la dirección de giro del esporangio (Figura 1).

Los macróforos cambian la velocidad y la dirección de su crecimiento en respuesta a estímulos ambientales. Un aumento o un descenso en la intensidad de la luz producen, respectivamente, un aumento o un descenso transitorio en la velocidad de crecimiento del esporangióforo (fotomecismo). La iluminación con luz asimétrica induce un fototropismo positivo. El esporangióforo crece en contra de las corrientes de aire (anemotropismo) y en contra de la gravedad (gravitropismo) y evita objetos cercanos alejándose de ellos sin llegar a tocarlos (evitación). La velocidad de crecimiento del esporangióforo varía al introducir en el aire ciertos productos químicos (quimiomecismo) y al colocar o quitar una cajita

alrededor del esporangióforo (claustromecismo). Las fotorrespuestas del macróforo han sido revisadas por Galland y Lipson (1987b) y las respuestas a otros estímulos por Shropshire y Lafay (1987).

Las estirpes de Phycomyces pertenecen al sexo (+) o al (-), sin ninguna diferencia morfológica entre sí. La reproducción sexual requiere el desarrollo de estructuras especiales que se esquematizan en la figura 1. La sucesión morfológica en el ciclo sexual de Phycomyces ha sido revisada por Cerdá Olmedo y Lipson (1987b) y la fisiología sexual por Sutter (1987).

Regulación del desarrollo de los esporangióforos de Phycomyces

La iniciación de los esporangióforos de Phycomyces es el cambio más aparente en su ciclo de vida. El organismo decide, en un determinado momento, iniciar la reproducción vegetativa y desarrollar los primordios que darán lugar a los esporangióforos. Este proceso morfogénético está regulado por varios factores, entre los que podemos destacar la disponibilidad de nutrientes, la aireación de los micelios, la temperatura, el AMPc, el ácido indolacético (auxina) y la luz. El desarrollo de los esporangióforos de Phycomyces ha sido revisado por Galland y Ootaki (1987).

Podemos decir, en general, que los factores que limitan el crecimiento miceliar limitan también la producción de macróforos y estimulan la de micróforos. La falta de zinc en el medio de cultivo impide el desarrollo del micelio y que se produzcan esporangióforos (Hilgenberg y Hofmann 1977). El aumento de la concentración de glucosa en el medio favorece el crecimiento miceliar y el de los esporangióforos (Rudolph 1958). Una reducción en la concentración de nitrógeno (asparagina) y/o una disminución de la temperatura de incubación reduce el crecimiento del micelio, inhibe la macroforogénesis y estimula la microforogénesis (Thornton 1972, Ortiz Castellanos y Gutiérrez Corona 1988). Las altas densidades de

siembra dan lugar a micelios con abundantes micróforos y pocos macróforos (Rudolph 1958, Gutiérrez Corona y Cerdá Olmedo 1985). Esto se debe a que disminuyen los nutrientes disponibles por espora, ya que la microforogénesis se reprime al añadir medio fresco a estos cultivos (Rudolph 1958).

La falta de aireación de los cultivos favorece la microforogénesis e inhibe la macroforogénesis sin afectar al crecimiento miceliar. La acumulación de CO₂ parece ser parcialmente responsable de este efecto (Russo et al. 1981, Gutiérrez Corona y Cerdá Olmedo 1985).

Se ha investigado el efecto sobre la forogénesis de algunas moléculas conocidas por su papel como mediadores de la acción hormonal en diversos organismos. El retinol y el retinal no producen ningún efecto sobre la forogénesis de la estirpe silvestre de Phycomyces. Sin embargo, eliminan la hipersensibilidad de la forogénesis de algunos mutantes de Phycomyces a una atmósfera cerrada (Galland y Russo 1979b). La auxina, ácido indolacético, induce macróforos mayores y más numerosos cuando se añade a cultivos de tres días de edad (Hilgenberg et al. 1980). La adición de AMPc al medio de cultivo inhibe la macro- y microforogénesis (Russo et al. 1980, Gutiérrez Corona y Cerdá Olmedo 1985). Sin embargo, el dibutiril-AMPc afecta a la macroforogénesis pero no a la microforogénesis (Gutiérrez Corona y Cerdá Olmedo 1985).

La luz es el regulador morfofogenético más interesante y el más estudiado en los últimos años. En determinadas condiciones de cultivo la luz estimula la macroforogénesis e inhibe la microforogénesis. Bergman (1972) utilizaba cultivos en tubos que sometía a tratamientos de una hora de luz y veintitrés de oscuridad. Con este método observaba una gran producción de macróforos en el lugar donde estaba el frente miceliar en el momento de la iluminación. El método desarrollado por Thornton (1973) utiliza unas precarias condiciones de cultivo (baja temperatura y poco nitrógeno) que favorecen la microforogénesis y bloquean casi completamente la macroforogénesis. La iluminación continua de los cultivos estimula la macroforogénesis e inhibe la microforogénesis.

Otros sistemas experimentales aprovechan el efecto que una atmósfera cerrada tiene sobre la forogénesis. Russo (1977) cultivaba un número variable de viales inoculados con esporas de Phycomyces en un vaso de precipitado invertido y sellado con parafina. En estas condiciones casi no aparecen macróforos si se incuban los viales en oscuridad. Un destello azul a las 50 horas de crecimiento es suficiente para estimular la macroforogénesis. Este método favorece la microforogénesis en oscuridad; sin embargo no se ha comunicado ningún resultado al respecto.

Existe otro método basado en una antigua observación hecha por Grehn (1932): cuando el micelio se cubre con una fina capa de aceite de parafina la macroforogénesis se inhibe y la microforogénesis se estimula sin afectar al crecimiento miceliar. Gutiérrez Corona y Cerdá Olmedo (1985) desarrollaron este método realizando estimaciones cuantitativas de la forogénesis al cubrir el micelio con agua, agar o cualquier otro gel acuoso. También en estas condiciones, la luz estimula la macroforogénesis e inhibe la microforogénesis.

La regulación del desarrollo de los esporangióforos de Phycomyces por la luz (fotoforogénesis) es un interesante problema de desarrollo que aún no ha sido investigado con la profundidad que merece. La fotoforogénesis nos permite, además, abordar problemas básicos de la visión que son investigados con dificultad en otros organismos. Creemos que la falta de investigaciones detalladas sobre la fotoforogénesis se debe, en parte, a los problemas prácticos de los métodos experimentales disponibles. Para investigar el efecto de la luz sobre la forogénesis es necesario que en oscuridad el número de macróforos sea mínimo y el de micróforos máximo, de manera que la luz tenga un efecto lo más evidente posible. En este capítulo se investigan varios de los factores ambientales que afectan la forogénesis. El objeto es diseñar un método experimental que permita investigar con comodidad y de una manera repetitiva la fotoforogénesis de Phycomyces.

RESULTADOS

Forogénesis en la oscuridad

La producción de esporangióforos (número de micróforos y peso de macróforos por caja) es independiente de la densidad de inoculación hasta 10^4 esporas por caja; las densidades más altas inhiben enormemente la macroforogénesis y estimulan la microforogénesis (Figura 2). Aunque el número total de micróforos por caja aumenta con la densidad de siembra, el número de micróforos por espora inoculada disminuye desde varios miles (con unas 10 esporas por caja) hasta menos de uno (con 10^7 esporas por caja). La producción de macróforos disminuye absoluta y relativamente. A baja densidad de siembra (unas 10 esporas por caja), se puede estimar que cada colonia produce unos 120 macróforos.

El hermetismo estimula la microforogénesis e inhibe la macroforogénesis (Figura 2). Para conseguir el cerramiento hermético se sella con papel de parafina un recipiente de 2.4 litros que contiene dos cajas de Petri.

Como consecuencia de estos resultados, decidimos realizar el resto de los experimentos de esta Tesis con cultivos no herméticos inoculados con 10^5 esporas por caja. Las cajas de Petri no se apilaron para mantener una aireación constante.

En estas condiciones, el desarrollo de los esporangióforos es sincrónico (Figura 3). Los esporangióforos aparecen al tercer día, alcanzan sus valores máximos al cuarto día y los mantienen al menos otros seis días. Por consiguiente, en todos los demás experimentos, la forogénesis se estimó en cultivos de cuatro días de edad.

A baja densidad de siembra aparecen grandes macroesporangios con unas 10^5 esporas cada uno. En nuestras condiciones (10^5 esporas por caja), los macroesporangios son mucho más pequeños y contienen solamente 1380 ± 460 esporas cada uno.

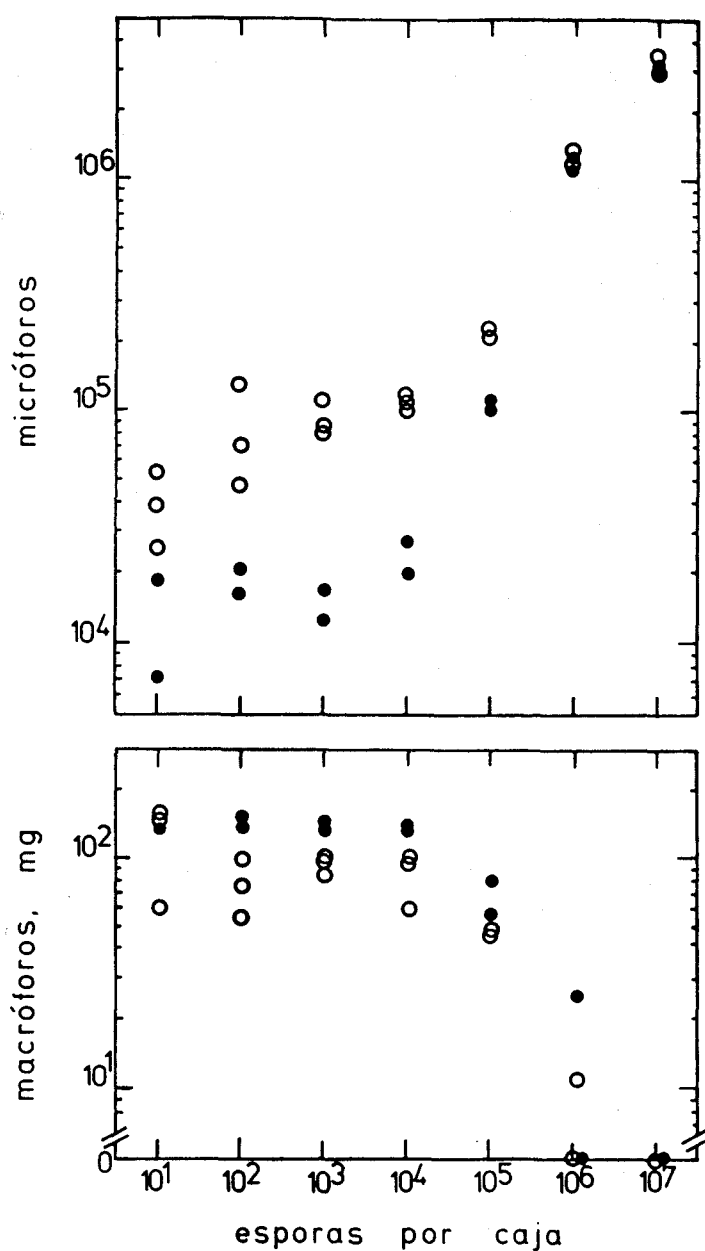


Figura 2. Efecto de la densidad de siembra sobre la forogénesis de Phycomyces. Se determinó el número de microóforos y el peso seco de los macroóforos en cultivos herméticos (O) y no herméticos (●) inoculados con el número de esporas indicado en abscisas e incubados durante siete días en oscuridad. Los símbolos de este capítulo representan la media de dos experimentos independientes.

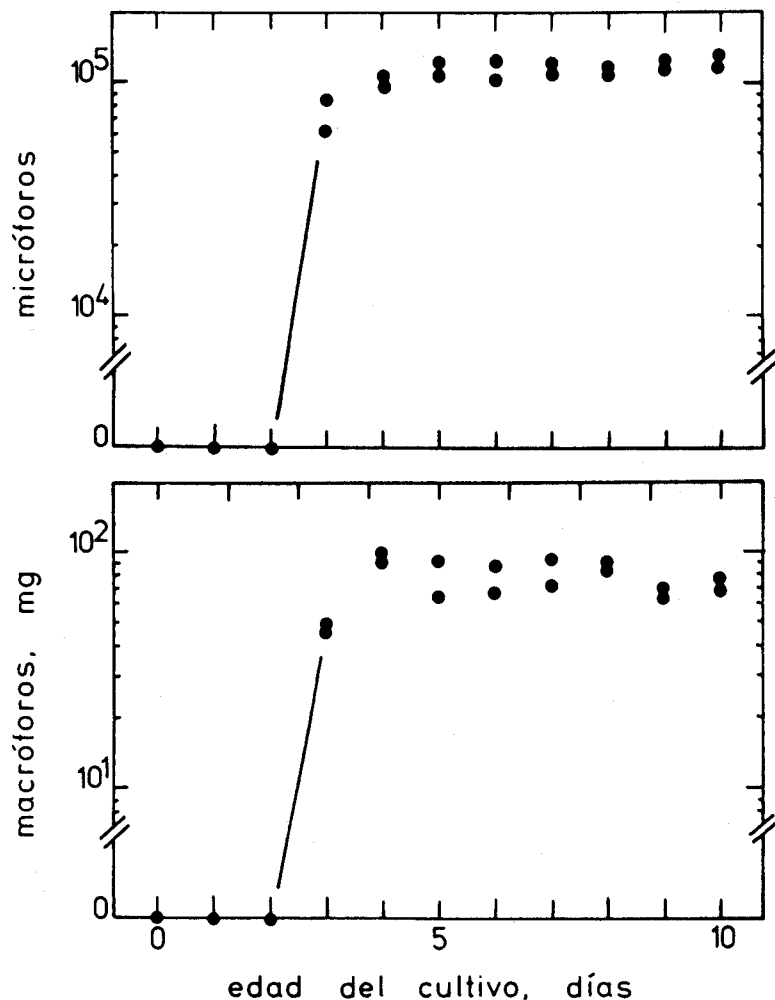


Figura 3. Forogénesis de *Phycomyces* en el tiempo. Los microforos y los macroforos se determinaron en cultivos no herméticos inoculados con 10^5 esporas e incubados en oscuridad durante el tiempo indicado en las abscisas.

Los microesporangios que están en la punta de los microforos contienen unas 10^3 esporas cada uno (Gutiérrez Corona y Cerdá Olmedo 1985).

Como en todos los seres vivos, el suministro de nitrógeno determina el crecimiento y la reproducción (Figura 4). La microforogénesis se inhibe a concentraciones de asparragina

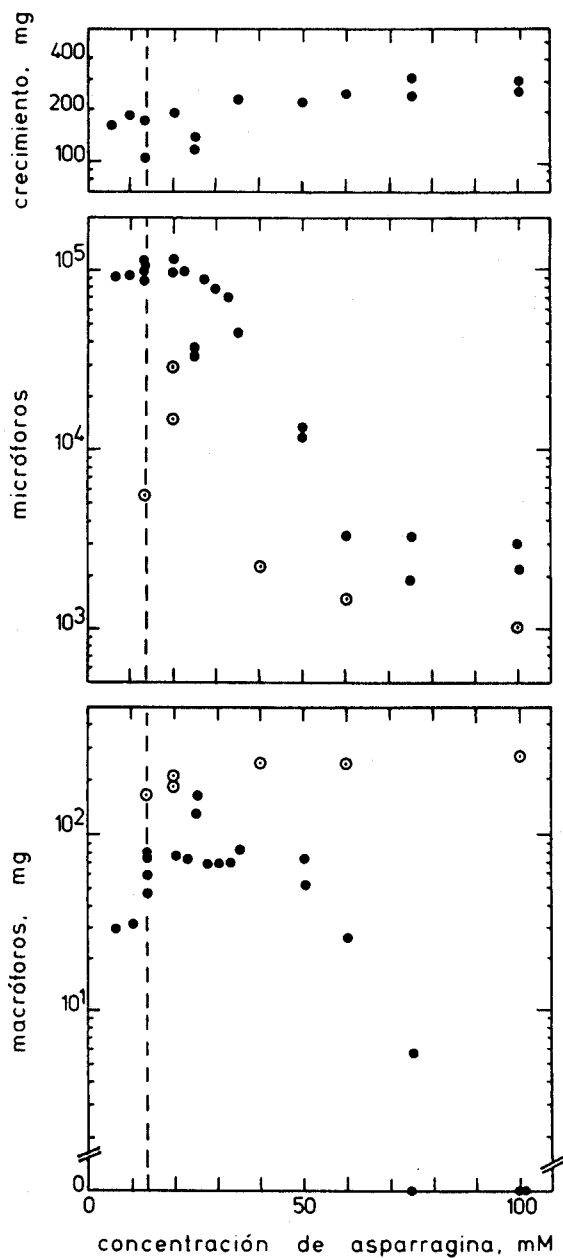


Figura 4. Efecto de la concentración de L-asparragina sobre la forogénesis de Phycomyces. La forogénesis se determinó en cultivos no herméticos (●) y abiertos (⊙) incubados en oscuridad. La concentración de asparragina utilizada normalmente en los medios de cultivo (13.3 mM) se indica por la línea discontinua.

mayores de 30 mM. La macroforogénesis es máxima alrededor de 25 mM y disminuye a concentraciones mayores en cultivos normales no herméticos. Esta inhibición no aparece en cultivos "abiertos" (incubados sin tapaderas en una caja de 14 litros). La concentración de asparagina usada normalmente en el medio mínimo, 13 mM (2 g l^{-1}), es apropiada para nuestros experimentos.

Fotoforogénesis

En condiciones normales la luz inhibe la microforogénesis y estimula la macroforogénesis (Tabla 1). El análisis de la varianza de los experimentos (Sokal y Rohlf 1979) indica que la mayor parte de la variabilidad de los resultados ocurre entre experimentos independientes y solamente una fracción menor (17-27 %) entre réplicas del mismo experimento. Es, por consiguiente, preferible realizar repeticiones independientes de los experimentos más que aumentar el número de cajas dentro de cada experimento.

=====
 Tabla 1. Forogénesis de cultivos cultivados cuatro días en luz blanca (0.6 W m^{-2}) o en oscuridad. Resultados de once experimentos independientes con dos réplicas cada uno.

	Media	Desviación típica	Varianza entre experimentos (%)
Oscuridad			
micróforos ^a	105000	12000	83
macróforos ^b	60	21	73
Luz			
micróforos ^a	0	0	
macróforos ^b	124	23	81

^a número por caja

^b mg de peso seco por caja

=====

Periodo de competencia a la luz en la forogénesis de Phycomyces

La iluminación permanente no es esencial para inhibir la microforogénesis y estimular la macroforogénesis. El periodo de competencia a la luz se determinó transfiriendo cultivos de la oscuridad a la luz o viceversa (Figura 5). La luz produce efectos morfogenéticos cuando se da durante cualquier momento del periodo de competencia, desde las 32 hasta las 68 horas (contadas desde el momento de la inoculación). La tabla 2 confirma la alta competencia a la luz de los cultivos de 32 a 68 horas de edad.

El periodo de competencia a la luz se definió posteriormente iluminando durante cuatro horas cultivos que se incubaron el resto del tiempo en la oscuridad (Figura 6). La máxima respuesta se da en cultivos de 44 y 48 horas de edad.

=====
 Tabla 2. Periodo de competencia a la luz de la forogénesis. Micróforos y macróforos de cultivos de cuatro días de edad iluminados durante los periodos indicados. Media y su desviación típica de los resultados de dos experimentos independientes con dos réplicas cada uno.

Periodo de iluminación (horas)	Micróforos (número por caja)	Macróforos (mg de peso seco por caja)
0 - 96	0 ± 0	105 ± 15
32 - 68	0 ± 0	97 ± 17
Ninguna	107000 ± 9900	61 ± 12

=====

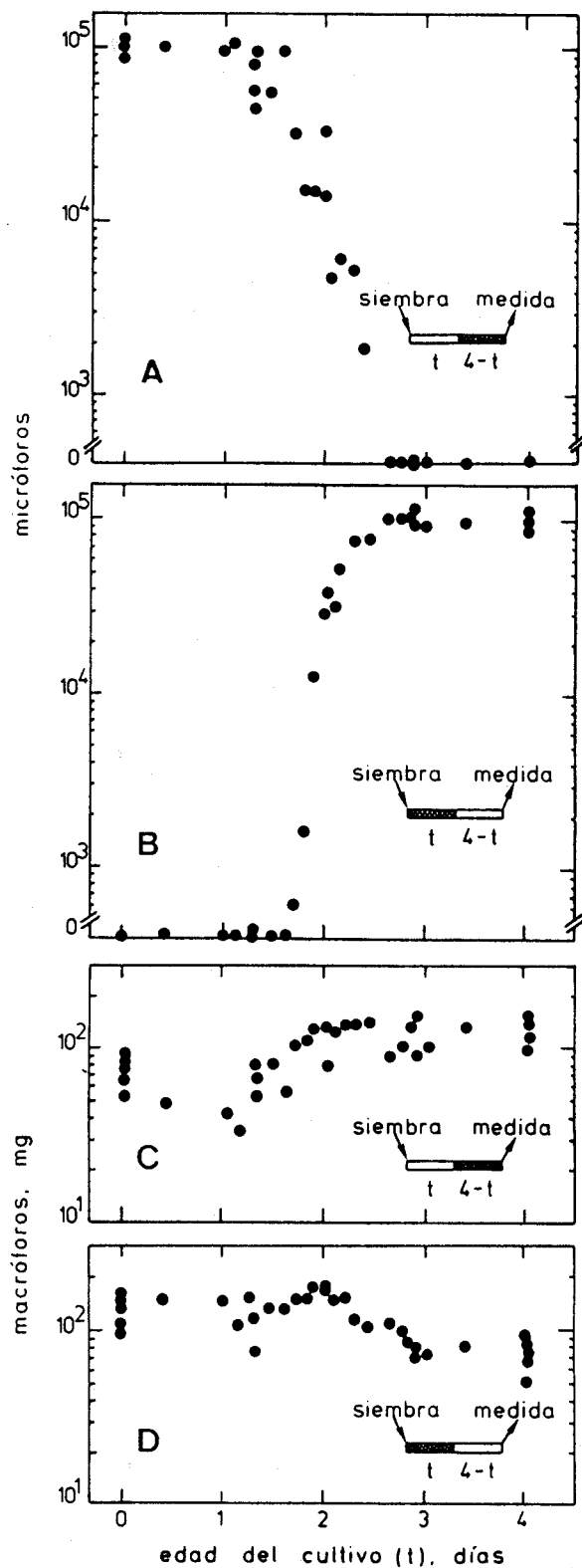


Figura 5. Periodo de competencia a la luz de la forogénesis de Phycomyces. La forogénesis se determinó en cultivos de cuatro días de edad que se transfirieron de la luz a la oscuridad (A y C) o de la oscuridad a la luz (B y D) a la edad que indica el eje de abscisas.

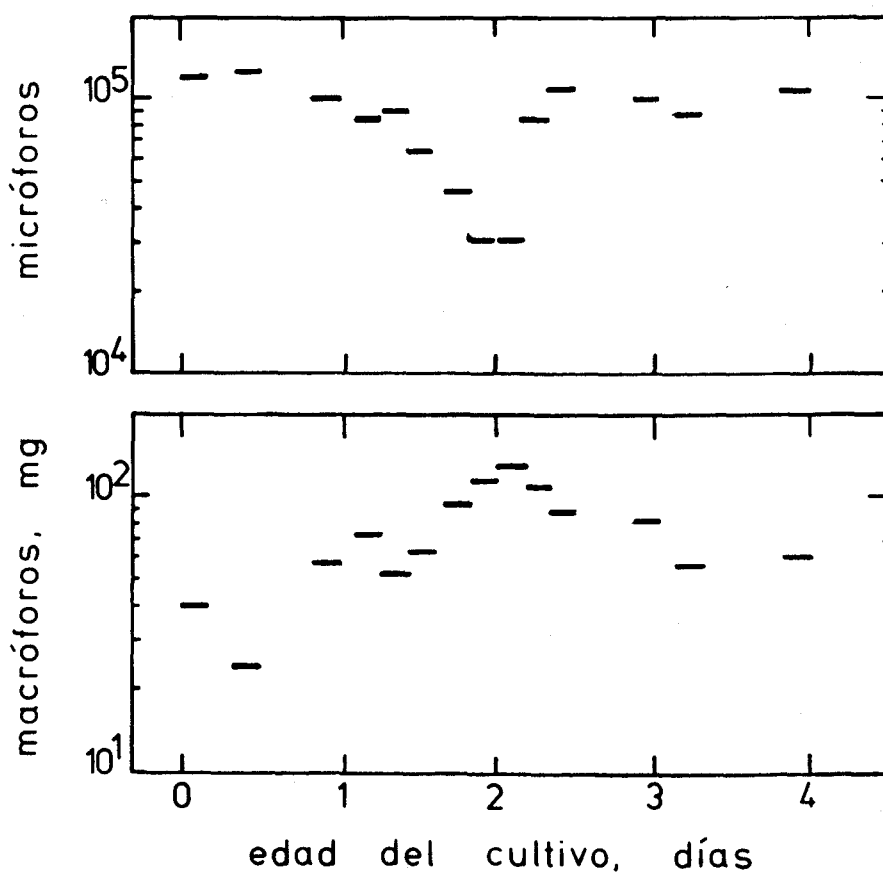


Figura 6. Periodo de competencia a la luz de la forogénesis de Phycomyces. La forogénesis se determinó en cultivos de cuatro días de edad que habían sido expuestos a la luz durante las cuatro horas que indican las líneas horizontales.

DISCUSIÓN

El desarrollo de los esporangióforos de Phycomyces depende de la iluminación y las condiciones de cultivo. En este capítulo hemos examinado los efectos de distintas variables ambientales sobre la forogénesis de Phycomyces. Los resultados nos han permitido definir unas condiciones apropiadas para la investigación de los efectos de la luz sobre el desa-

rollo de Phycomyces. El nuevo protocolo permite un crecimiento de los cultivos rápido y vigoroso y una suficiente reproducibilidad de los resultados. El método consiste en inocular 25 ml de agar mínimo en cajas de Petri con 10^5 esporas activadas por calor, incubar durante cuatro días a 22°C las cajas y contar el número absoluto de micróforos y desecar y pesar los macróforos.

Muchos estímulos hacen variar a la macro y microforogénesis en direcciones opuestas, pero no existe una tasa fija de intercambio entre ellas: un macróforo no substituye a un número determinado de micróforos. Aunque ambos fenómenos morfogénéticos estén relacionados, el conocimiento de uno no permite predecir exactamente el otro. Esto aparece particularmente claro en los resultados de las figuras 4 y 5. Nos encontramos, en consecuencia, con dos efectos separados de la luz.

No es sorprendente, desde un punto de vista adaptativo, que la oscuridad, la alta densidad de siembra, la falta de ventilación y la escasez de nitrógeno favorezcan la microforogénesis. En nuestras condiciones experimentales los macro y microesporangios no difieren mucho en el número de esporas, pero la construcción de los macróforos requiere un mayor gasto de material y energía. Phycomyces aparentemente toma la luz y la ventilación como señales de que los complejos mecanismos que guían a los macróforos tendrán la oportunidad de llevar las esporas a cielo abierto y por tanto, en términos económicos, que la inversión en macróforos puede ser rentable. En ausencia de estas señales, prevalece la microforogénesis.

Los efectos morfogénéticos de cada variable dependen de los valores de las otras variables. Así, el hermetismo es decisivo si hay mucha asparragina. Esto se entiende si el cerramiento causara la acumulación de un metabolito volátil abundantemente excretado por el denso micelio que crece en medio rico (Russo 1977; Galland y Russo 1979b).

La competencia a la luz es un fenómeno de desarrollo con

una precisa pauta temporal. Los cultivos son competentes 32 a 68 horas después de la inoculación, justo antes de la aparición de los esporangióforos en los controles en oscuridad. La iluminación durante cuatro horas en el momento óptimo (44-48 horas) reduce el número de micróforos al 30 % de lo observado en la oscuridad (Figura 6). La razón de que no desaparezcan todos los micróforos es la asincronía en los periodos de competencia de los micelios inoculados, como se verá en el capítulo segundo.

CAPÍTULO SEGUNDO

FOTOMORFOGÉNESIS DE PHYCOMYCES

INTRODUCCIÓN

Entre los factores que controlan la forogénesis, la luz da al investigador las mejores ventajas experimentales. El estímulo se aplica y se elimina con la facilidad con que se conecta y desconecta una lámpara. No existen problemas para controlar el tiempo de estímulo, que aparece y desaparece casi instantáneamente. Es muy fácil modificar la calidad, la cualidad y la dirección de la luz, y los métodos de medida disponibles permiten controlar con precisión el número de fotones aplicados.

La luz controla el desarrollo de muchos organismos. La fotoforogénesis de Phycomyces es solo un ejemplo de la gran variedad de pautas de desarrollo reguladas por la luz que existen en la naturaleza. La fotomorfogénesis es un problema clásico de la fisiología vegetal que ha sido revisado recientemente en dos volúmenes de la "Encyclopedia of Plant Physiology" (Shropshire y Mohr 1983).

Para la mayoría de los organismos la luz es una fuente de información. Como tal, la luz determina la pauta de desarrollo de las plantas. En oscuridad, la plántula invierte sus reservas energéticas sobre todo en un crecimiento longitudinal que lleva los primordios foliares hasta la luz. En la luz, la plántula desarrolla hojas y todo el sistema fotosintético, incluyendo las clorofilas y otros pigmentos accesorios. La luz contiene una información posicional que permite mejorar la efectividad de la fotosíntesis controlando la dirección del crecimiento y la posición de las hojas. Muchos movimientos de cloroplastos inducidos por la luz permiten

mejorar la fotosíntesis del organismo. La luz informa, además, sobre las condiciones ambientales. Muchas plantas se guían por la duración de los días y de las noches para inducir la floración en épocas favorables del año. En muchas plantas la luz induce el movimiento de las hojas y la apertura de las flores por motivos ecológicos.

La luz también induce pautas de desarrollo en los hongos, generalmente la esporulación (Gressel y Rau 1983, Kumagai 1988). El hongo utiliza la luz como señal que indica que la dispersión de sus esporas será más eficaz. En algunos casos, como en Phycomyces, la luz es uno de los estímulos que guían a los esporangióforos al aire libre, donde es más fácil la dispersión de las esporas. La fotoinducción de la esporulación completa el papel de la luz en la fisiología de los esporangióforos.

La fotoinducción de la biosíntesis de carotenos en muchos hongos parece proteger al organismo de altas intensidades de luz (Rau y Schrott 1987). La gran mayoría de estas fotorrespuestas morfogénicas se induce con luz azul.

El fotorreceptor de la fotomorfogénesis de las plantas es el fitocromo. Este pigmento existe en dos formas fotoconvertibles que absorben en el rojo y en el rojo lejano, donde la fotosíntesis es más eficaz. Existe mucha información sobre la estructura molecular del fitocromo y su mecanismo de acción (Shropshire y Mohr 1983, Smith y Holmes 1984, Schäfer y Briggs 1986, Rüdiger 1987, Cordonnier 1987).

La investigación de la fotomorfogénesis en los hongos en vez de en las plantas tiene varias ventajas. El fotorreceptor de la luz azul, pese a su ubicuidad en la gran mayoría de los grupos filogenéticos, no ha sido identificado aún. La investigación de su naturaleza molecular debe ser más fácil en los hongos, que carecen de otros pigmentos como el fitocromo y las clorofilas. Además, las plantas tienen complicadas estructuras tridimensionales, pero los hongos que se usan

para estas investigaciones crecen prácticamente en dos dimensiones, lo que facilita las mediciones de la luz incidente, y sus micelios son muy translúcidos y delgados, lo que permite la iluminación homogénea.

Las fotorrespuestas de Phycomyces están muy relacionadas entre sí. Las investigaciones sobre la fotoforogénesis de Phycomyces permitirán integrar la regulación del desarrollo de este organismo dentro de su complejo sistema sensorial. La disponibilidad del análisis genético debe ayudarnos a conseguir este propósito.

A continuación resumimos la fotofisiología de Phycomyces para poder relacionar la fotoforogénesis con las otras fotorrespuestas de este organismo.

Fotorrespuestas del macróforo

El esporangióforo crece hacia una fuente de luz azul (fototropismo positivo) y modifica su velocidad de crecimiento cuando se cambia la intensidad de la luz ambiental (fotomecismo). La fotobiología del esporangióforo ha sido revisada recientemente por Galland y Lipson (1987b).

La iluminación continua y lateral del esporangióforo induce el crecimiento hacia la fuente de luz hasta que se equilibran el fototropismo y el gravitropismo. Se obtiene como resultado un ángulo de equilibrio fotogravitrópico (Figura 7). La respuesta es gradual y dispone de un enorme intervalo de intensidades activas, desde 10^{-9} hasta 10 W m^{-2} de luz azul, lo que atrajo inicialmente a los investigadores del fototropismo de Phycomyces (Delbrück y Reichardt 1956). El esporangióforo tiene un mecanismo de adaptación que le permite manejar el enorme intervalo de intensidades a las que puede reaccionar.

La velocidad de giro es otro de los parámetros del fototropismo investigados en detalle. La figura 7 representa la relación entre velocidad de giro e intensidad. Se observan dos componentes cuyos umbrales son 10^{-7} y 10^{-4} W m^{-2} .

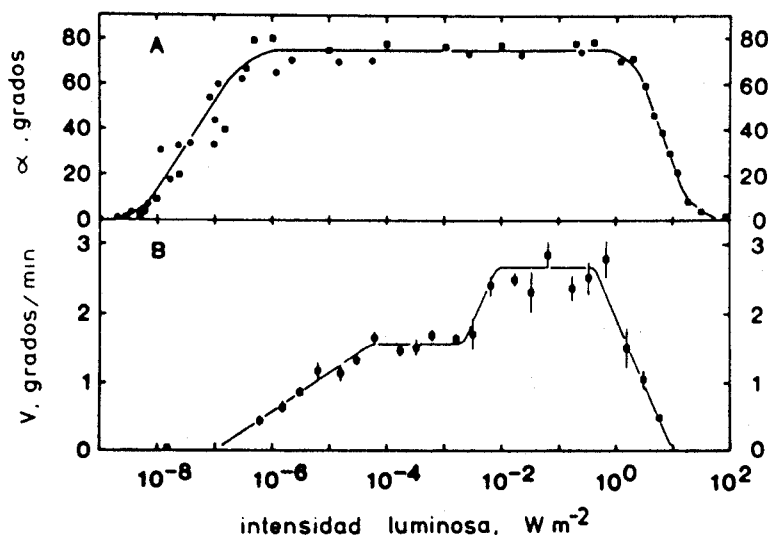


Figura 7. Respuesta fototrópica de los macróforos de Phycomyces. (A) Angulo de equilibrio fotogravitrópico (α) que se obtiene tras iluminar lateralmente los esporangióforos con luz azul de la intensidad que se indica en abscisas. (B) Velocidad de giro fototrópico (V). Los esporangióforos se iluminaron bilateralmente con luz azul de distintas intensidades y posteriormente se expusieron a luz azul unilateral de la misma intensidad para medir la velocidad de giro. La figura ha sido tomada de Galland y Lipson (1987b).

El fototropismo de los esporangióforos también se induce con destellos azules. La sensibilidad depende del estadio de desarrollo, ya que los esporangióforos en estadio I tienen el umbral a $10^{-7} J m^{-2}$ y los que están en el estadio IVb lo tienen a $3 \times 10^{-5} J m^{-2}$.

El fotomecismo tiene un intervalo de sensibilidad entre 10^{-8} y $10 W m^{-2}$. El umbral del fotomecismo cuando se dan destellos de 450 nm a esporangióforos adaptados a la oscuridad es $10^{-6} J m^{-2}$.

Cuando se cumple la ley de Bunsen-Roscoe, o de la reciprocidad, se obtiene la misma respuesta siempre que el producto entre intensidad y duración del estímulo (en la luz,

el número total de fotones) se mantenga constante. El cumplimiento de la ley de la reciprocidad para duraciones del estímulo muy largas indica que existe algún tipo de memoria en la cadena de transducción sensorial que acumula los fotones capturados por el fotorreceptor. El cumplimiento de esta ley para tiempos de estímulo cortos indica que el fotorreceptor es único y simple.

El fototropismo y el fotomecismo cumplen la ley de la reciprocidad entre 0.06 y 64 segundos. Sin embargo, la reciprocidad se rompe con destellos que duran menos de 0.06 segundos.

Fotorrespuestas del micelio

Aunque las fotorrespuestas del esporangióforo han sido las más estudiadas de Phycomyces, el micelio tiene también un amplio repertorio.

Quizás la más aparente fotorrespuesta miceliar sea la fotoinducción de la biosíntesis de beta-caroteno. El micelio de Phycomyces tiene un color amarillo pálido en la oscuridad debido a la acumulación de beta-caroteno (40 $\mu\text{g/g}$ de peso seco). La iluminación continua con 1 W m^{-2} de luz azul incrementa diez veces la concentración de beta-caroteno. La carotenogénesis de Phycomyces ha sido revisada recientemente por Cerdá Olmedo (1987a).

En iluminación continua, el umbral de la fotocarotenogénesis es 10^{-5} W m^{-2} de luz azul (López Díaz y Cerdá Olmedo 1980). La respuesta a destellos de duración variable tiene una cinética con dos componentes (Jayaram et al. 1979). E.R. Bejarano (comunicación personal) ha estimado los umbrales de los dos componentes en 10^{-4} y 1 J m^{-2} de luz azul.

Jayaram et al. (1979) investigaron la ley de la reciprocidad en la fotocarotenogénesis y demostraron que se cumple para el primer y el segundo componente al menos en los intervalos de 2 a 16 y de 30 a 120 minutos, respectivamente.

La luz afecta a la actividad de varias enzimas de Phycomyces. La actividad de la deshidrogenasa del alcohol disminuye al cultivar Phycomyces en presencia de luz (Garcés y Medina 1985). Algunas enzimas del metabolismo del carbono también sufren cambios en sus actividades según exista o no luz durante el crecimiento (Sandmann y Hilgenberg 1978, 1980, Rodríguez Aparicio et al. 1987).

Varios autores han mencionado el papel de la luz como regulador de la forogénesis (véase el capítulo primero), pero se han hecho pocas investigaciones detalladas, y para esto se han aplicado los métodos de Thornton (1973) y de Russo (1977). El propio Thornton (1975) investigó el efecto de la luz sobre las diferentes estructuras que aparecen en el desarrollo de los esporangióforos. Los esporangióforos se desarrollan a partir de primordios que se forman en las hifas vegetativas. Existen dos clases de primordios de diferentes tamaños. La luz inhibe la formación de microprimordios y estimula la de los macroprimordios. Los macroprimordios dan lugar invariablemente a macróforos; los microprimordios se desarrollan en micróforos en oscuridad, pero la luz permite a algunos de ellos desarrollarse como macróforos. Con este método, López Díaz y Cerdá Olmedo (1981) descubrieron que la fotoforogénesis es más sensible que el fototropismo (umbral menor de 10^{-9} W m⁻²). Sin embargo, las dificultades experimentales de este método no han permitido una exacta determinación del umbral.

Russo (1977) estimó que, en sus condiciones experimentales, el umbral de la fotomacroforogénesis es 6×10^{-4} J m⁻².

En el capítulo primero hemos descrito un nuevo método para investigar la fotoforogénesis de Phycomyces. En este capítulo se describen algunos parámetros fotobiológicos obtenidos con este método y se comparan con las de otras fotorrespuestas de Phycomyces.

RESULTADOS

La figura 8 muestra el efecto de la iluminación continua con luz azul sobre la forogénesis de Phycomyces. Las dos respuestas tienen el umbral aproximadamente a 10^{-8} W m⁻². La iluminación estimula la macroforogénesis. El efecto máximo se alcanza con 10^{-3} W m⁻² y las intensidades mayores son menos efectivas. La iluminación inhibe la microforogénesis y la hace desaparecer por completo cuando la intensidad supera 10^{-3} W m⁻². La luz roja no tiene efecto sobre la forogénesis, lo que permite utilizarla para las manipulaciones de los cultivos en oscuridad.

La iluminación continua no es necesaria para obtener un efecto morfogénético. En el capítulo primero (Figura 6) determinamos que la máxima respuesta se da a las 48 horas de edad. Los efectos morfogénéticos de destellos luminosos de dos minutos aplicados a micelios de 48 horas de edad dependen de la exposición luminosa siguiendo funciones de dos componentes (Figura 9). De ahora en adelante llamaremos primer componente al que aparece iluminando con baja exposición y segundo componente al que aparece iluminando con alta exposición. Ambos componentes son sigmoidales cuando los efectos morfogénéticos se representan en función del logaritmo de la exposición luminosa. Sus umbrales son, aproximadamente, 10^{-4} y 1 J m⁻² de luz azul.

En ambos componentes, la exposición saturante es unas 100 veces mayor que la umbral. Esto nos permitió hacer la regresión de los resultados experimentales a la función descrita en el apéndice. En cada componente sigmoidal de la función, el punto de inflexión corresponde a una exposición diez veces menor que la que da 91 % de la respuesta máxima y diez veces mayor que la que da 9 % de la respuesta máxima. Las pendientes en los puntos de inflexión están en proporción constante (58 %) con el nivel de saturación.

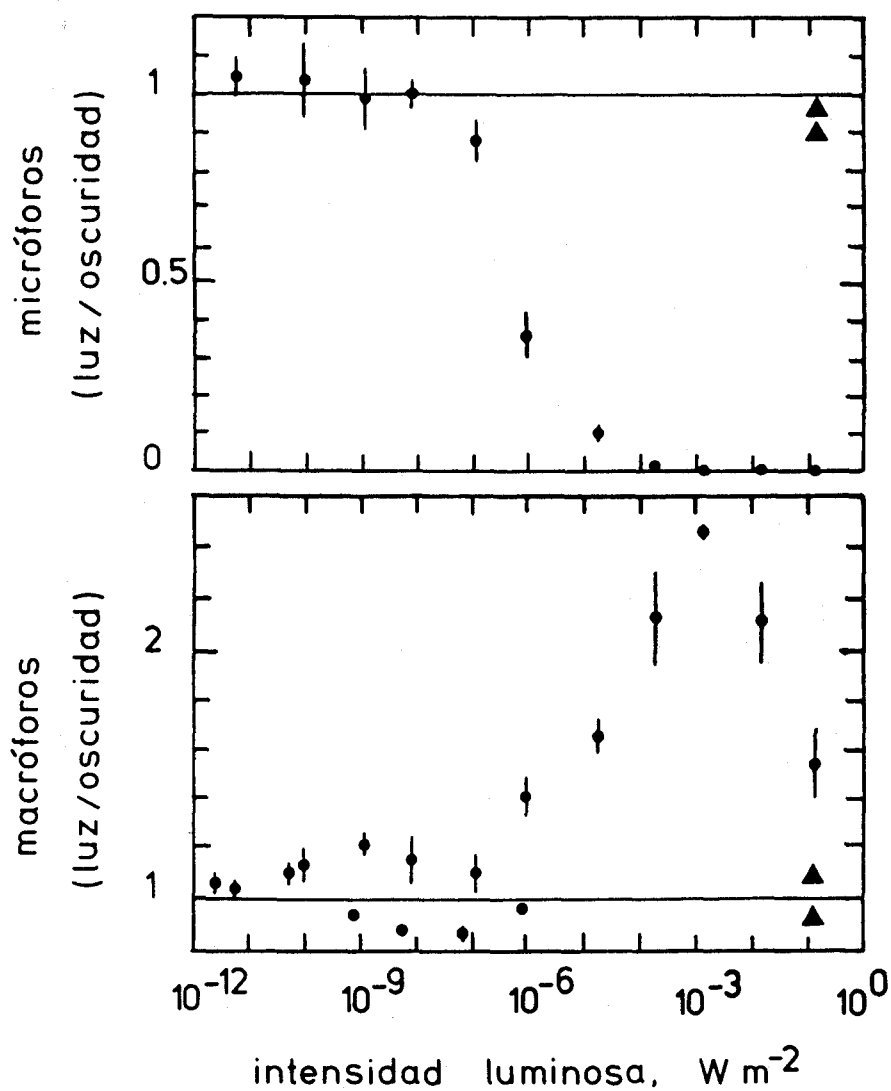


Figura 8. Efecto de la iluminación continua sobre la forogénesis de *Phycomyces*. La forogénesis se estimó en cultivos que habían crecido durante cuatro días bajo luz azul. Los triángulos indican micelios iluminados con luz roja. Los resultados de cada experimento de esta y las siguientes figuras se representan como el cociente de los esporangióforos que se obtienen con luz y la media de los que se obtienen en cuatro cultivos mantenidos en oscuridad. Los símbolos representan la media y su desviación típica de los resultados de cuatro a seis experimentos independientes.

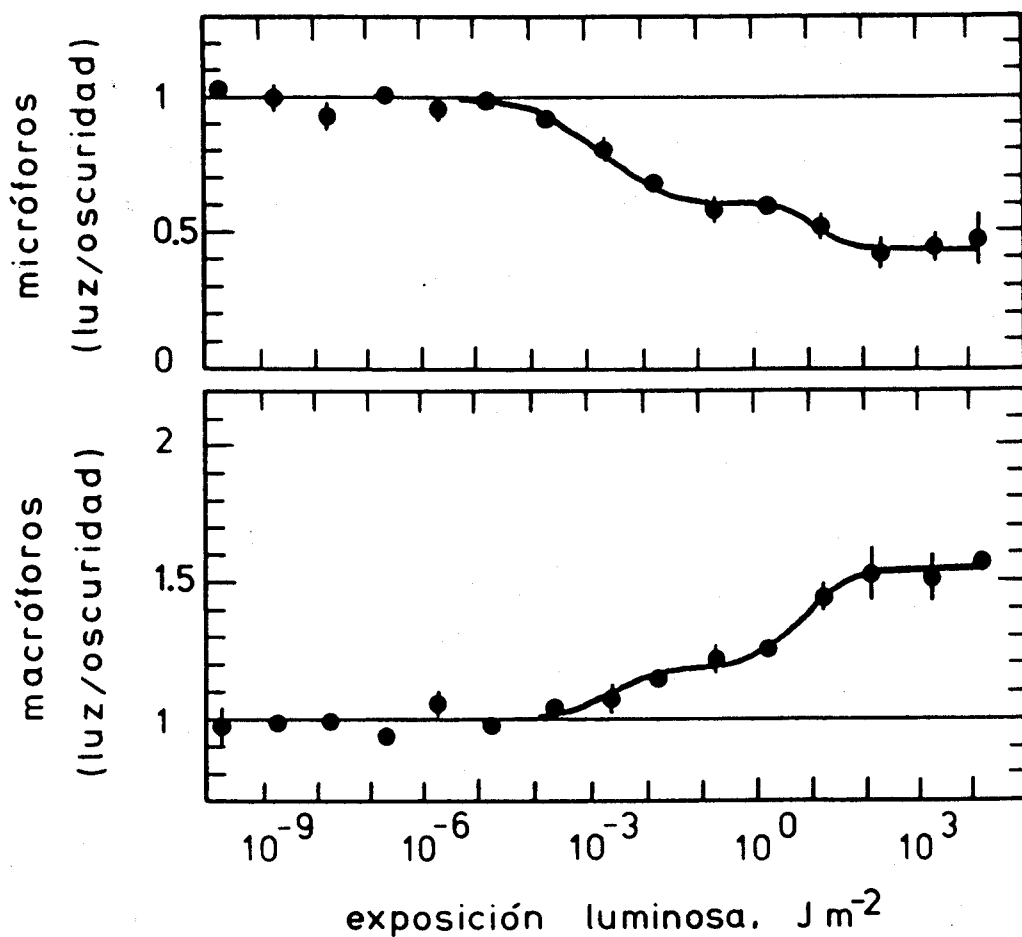


Figura 9. Efecto de destellos azules sobre la forogénesis de Phycomyces. Los símbolos representan la media y su desviación típica de los resultados de diez experimentos independientes. Para obtener $10^4 J m^{-2}$ hubo que iluminar durante 20 minutos en vez de los 2 minutos usuales. La línea continua se obtuvo ajustando los resultados a la función descrita en el apéndice.

Investigamos la ley de la reciprocidad con exposiciones iguales a los puntos de inflexión de cada componente para detectar mejor los cambios en las respuestas. La tabla 3 muestra la reciprocidad de la fotoforogénesis en el intervalo de tiempo ensayado.

Tabla 3. Verificación de la ley de la reciprocidad para la fotoforogénesis a 486 nm. Los valores de los macróforos y los micróforos son los cocientes entre los resultados experimentales y los respectivos controles no iluminados. Los resultados son la media y su desviación típica de los resultados de cuatro experimentos independientes

Intensidad mol m ⁻² s ⁻¹	Duración de la iluminación s	Exposición mol m ⁻²	Macróforos (luz/oscuridad)	Micróforos (luz/oscuridad)
4.91 x 10 ⁻⁶	12	5.9 x 10 ⁻⁵	2.50 ± 0.18	0.33 ± 0.05
4.91 x 10 ⁻⁷	120	5.9 x 10 ⁻⁵	2.38 ± 0.16	0.40 ± 0.04
4.91 x 10 ⁻⁸	1200	5.9 x 10 ⁻⁵	2.50 ± 0.21	0.30 ± 0.05
4.37 x 10 ⁻¹⁰	12	5.2 x 10 ⁻⁹	1.59 ± 0.07	0.65 ± 0.07
4.37 x 10 ⁻¹¹	120	5.2 x 10 ⁻⁹	1.46 ± 0.14	0.67 ± 0.05
4.37 x 10 ⁻¹²	1200	5.2 x 10 ⁻⁹	1.58 ± 0.11	0.65 ± 0.10

Las curvas que describen la fotoforogénesis dependen de las condiciones de iluminación. Las curvas obtenidas con iluminación continua tienen un solo componente mientras que las obtenidas con destellos tienen dos (Figuras 8 y 9). Esta diferencia entre la forma de las curvas podría reflejar las características del sistema fotorreceptor en condiciones de equilibrio (iluminación continua) y de no equilibrio (destellos), o no ser más que un artefacto del método experimental empleado. La solución a este dilema es esencial para entender correctamente el funcionamiento del sistema fotorreceptor que controla la forogénesis de Phycomyces. A continuación exponemos una serie de hipótesis que hemos formulado para intentar explicar este fenómeno.

Hipótesis 1. Aunque la iluminación de los cultivos jóvenes (menores de 32 horas) no induce respuestas morfogénicas (Figuras 5 y 6), podría alterar las características del sistema fotorreceptor y permitir al primer componente saturar

la respuesta, lo que impediría detectar el segundo componente. Esto no sería una novedad en Phycomyces, ya que la iluminación durante el crecimiento modifica la sensibilidad de las fotorrespuestas de los macróforos (consultar la introducción de este capítulo). La figura 10 muestra, sin embargo, que la sensibilidad de los micelios iluminados con luz blanca durante las primeras 32 horas de edad coincide con la de los micelios mantenidos durante todo ese tiempo en oscuridad.

Hipótesis 2. La iluminación prolongada podría modificar el sistema de fotorrecepción, de manera que el primer componente fuera capaz de saturar la respuesta. Para comprobar esto aumentamos el tiempo de iluminación a 200 minutos. Las curvas que se obtienen en estas condiciones son iguales a las que se obtienen iluminando durante 2 minutos (Figura 11), lo que invalida esta hipótesis. Esta figura demuestra, además, que la fotoforogénesis cumple la ley de la reciprocidad hasta con iluminaciones de 200 minutos.

Hipótesis 3. El primer componente no es capaz de su respuesta máxima a las 48 horas, cuando se aplican los destellos. Si se iluminara en el momento de máxima respuesta, como ocurre en los experimentos con iluminación continua, el primer componente podría ser capaz de saturar la respuesta. Al iluminar a las 48 horas el primer componente produce una pequeña respuesta que no impide observar el efecto del segundo componente. Para confirmar o rechazar esta hipótesis se expusieron micelios de distintas edades a 0.34 y 350 J m^{-2} , que activan al primero y al segundo componentes, respectivamente. En la figura 12 podemos ver que el curso de la competencia a la luz es el mismo para las dos exposiciones utilizadas y que la estimulación debida al primer componente es siempre menor que la del segundo componente.

Las distintas condiciones de iluminación no parecen ser las causantes de las diferencias en la forma de las curvas.

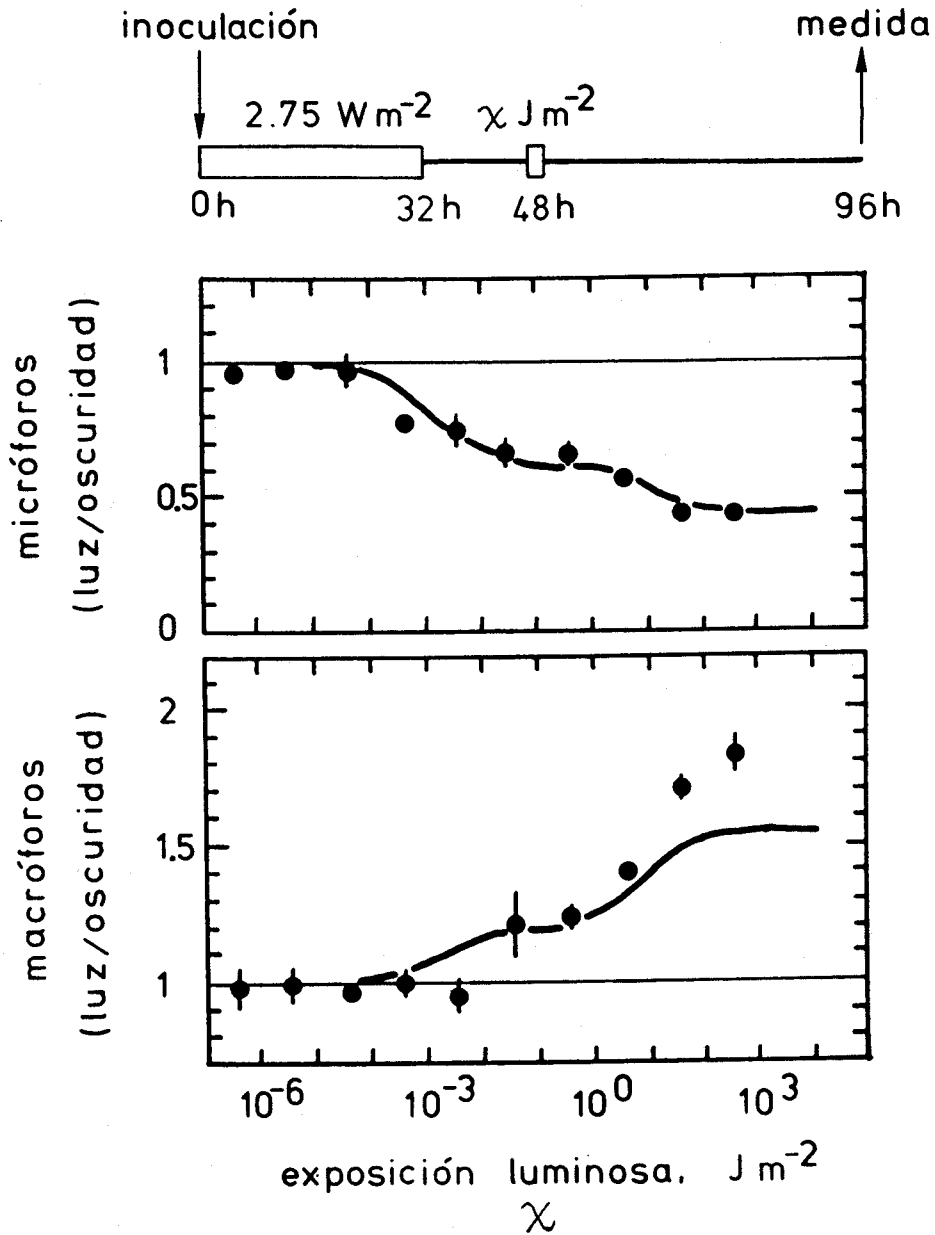


Figura 10. Fotoforogénesis de Phycomyces con preiluminación de los cultivos. Los micelios se iluminaron con 2.75 W m^{-2} de luz blanca durante las primeras 32 horas de edad, continuaron su crecimiento en oscuridad y a las 48 horas se sometieron durante dos minutos a las exposiciones que se indican. Los símbolos representan la media y su desviación típica de los resultados de seis experimentos independientes. La línea continua se tomó de la figura 9 y representa la fotoforogénesis sin preiluminación.

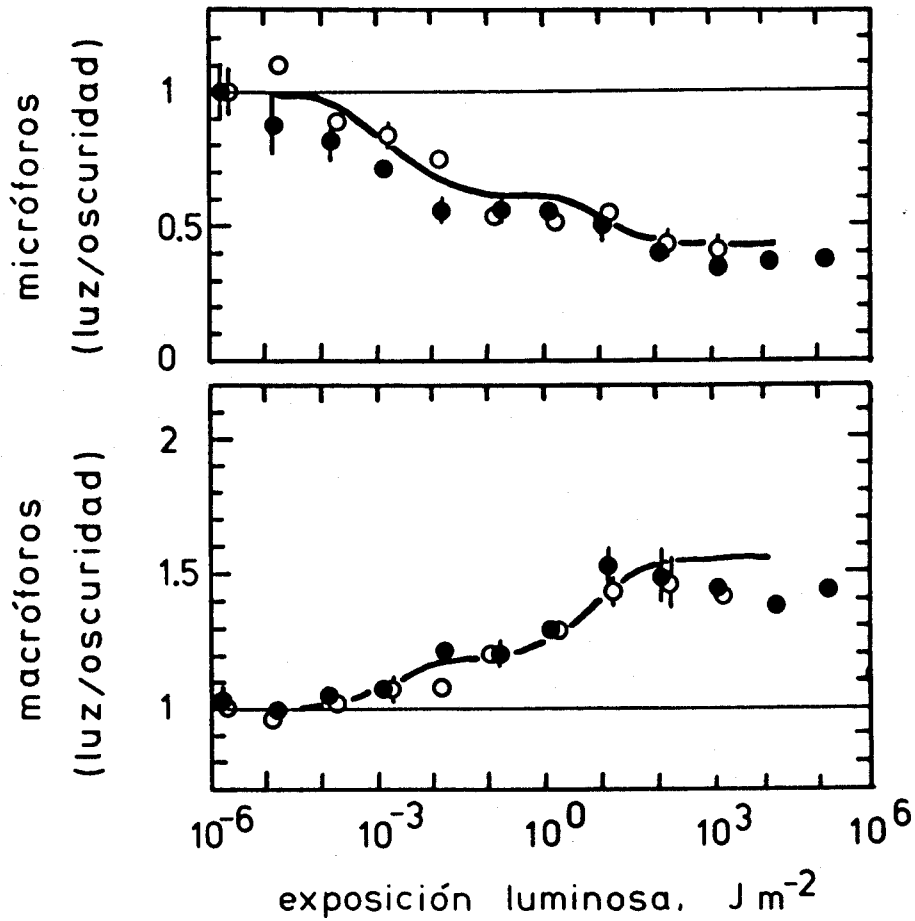


Figura 11. Fotoforogénesis de Phycomyces con destellos azules de 200 minutos de duración. Los micelios se sometieron durante 200 (●) y 2 (○) minutos a las exposiciones indicadas. Los símbolos representan la media y su desviación típica de los resultados de tres experimentos independientes. La línea continua se tomó de la figura 9 y representa la fotoforogénesis con destellos de 2 minutos.

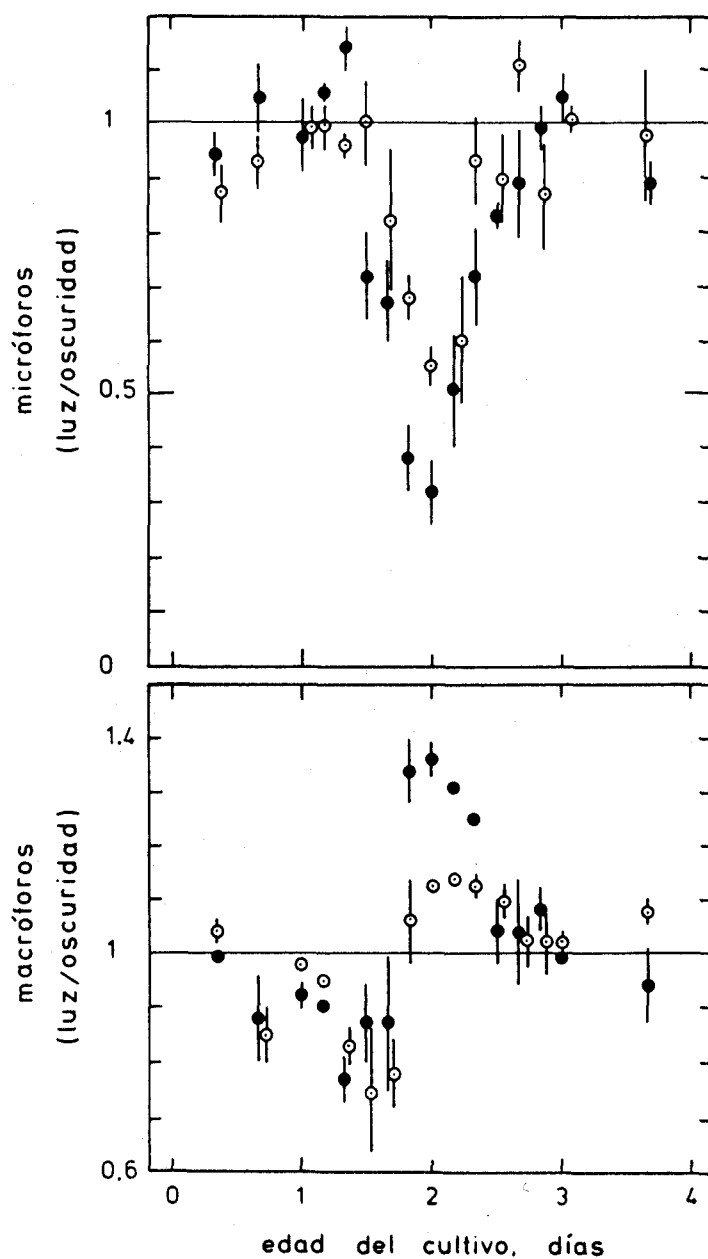


Figura 12. Periodo de competencia de la forogénesis de Phycomyces a destellos azules. Los cultivos crecidos en oscuridad se sometieron durante dos minutos en el momento indicado a exposiciones de 350 (●) y 0.34 (○) J m⁻². Cada símbolo representa la media y su desviación típica de los resultados de tres experimentos independientes.

Hipótesis 4. Los 10^5 micelios presentes en cada caja (o lo que operativamente podríamos llamar "unidades formadoras de esporangióforos") no están perfectamente sincronizados y no todos responden al estímulo luminoso a las 48 horas de edad. La iluminación continua de los cultivos aseguraría que todos los micelios inoculados reciban el estímulo cuando pueden responder a él; el primer componente daría entonces las máximas respuestas detectables y no permitiría la observación de los efectos del segundo componente.

Si la hipótesis fuera cierta, podemos aumentar el número de micelios que reciben luz durante su periodo de competencia a la luz aplicando destellos separados en el tiempo. Dos destellos aplicados sobre el mismo micelio a las 44 y a las 48 horas de edad producen una respuesta mayor que si se dan los mismos fotones a las 48 horas de edad (Tabla 4). Además, las iluminaciones de doce horas tienen un efecto mayor que las de cuatro horas, aunque ambas sean igualmente saturantes (Figura 13). Estas observaciones apoyan la hipótesis de que

=====
 Tabla 4. Efecto del régimen de destellos sobre la microforogénesis. Micróforos de cultivos de cuatro días de edad iluminados a la edad y durante el tiempo que se indica. Media y su desviación típica de los resultados de tres experimentos diferentes.

Edad de iluminación (horas)	Duración de la iluminación (minutos)	Exposición ($J m^{-2}$)	Micróforos (luz/oscuridad)
44 y 48	2	400	0.28 ± 0.02
48	2	400	0.41 ± 0.02
48	4	800	0.36 ± 0.04
44 y 48	2	0.4	0.42 ± 0.03
48	2	0.4	0.58 ± 0.05
48	4	0.8	0.55 ± 0.02

=====

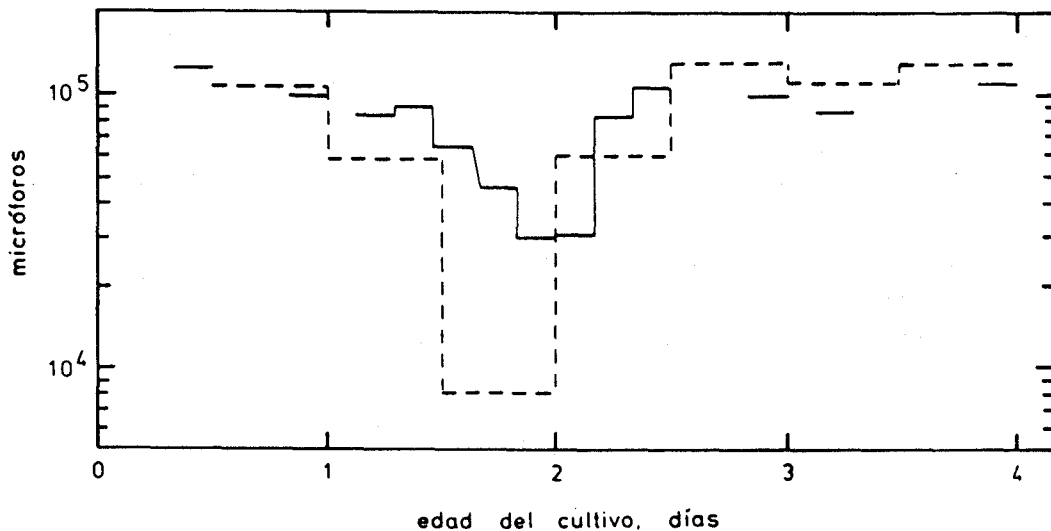


Figura 13. Efecto de la duración de la iluminación sobre la forogénesis. La microforogénesis se estimó en cultivos que se iluminaron con luz blanca durante cuatro horas (línea continua) o doce horas (línea de trazos) a la edad indicada. Los resultados de las iluminaciones de cuatro horas han sido tomados de la figura 6. Cada símbolo representa la media de los resultados de dos experimentos independientes.

las diferencias entre las respuestas a destellos e iluminación continua se deben a que no todos los micelios son competentes a la vez.

DISCUSIÓN

Sensibilidad de la forogénesis a la luz azul

Existen dificultades técnicas para la exacta determinación del umbral de una fotorrespuesta. Algunas son evidentes: una respuesta que siga una función sigmoideal no puede tener, en sentido estricto, un umbral. En estos casos se estima el umbral como la menor exposición que da una respuesta distinta

del ruido. El umbral así estimado depende de la precisión del método empleado para medir la fotorrespuesta. Este mismo razonamiento se puede aplicar cuando comparamos fotorrespuestas distintas. El ejemplo más claro ocurre en el fototropismo de Phycomyces, donde el umbral estimado para el ángulo de equilibrio fotogravitrópico es 10^{-9} W m^{-2} y el de la velocidad de giro del macróforo es 10^{-7} W m^{-2} (Figura 7). Los dos umbrales deberían coincidir, ya que no se obtendría un ángulo de equilibrio si la velocidad de giro fuera cero. La explicación de esto es que entre 10^{-9} y 10^{-7} W m^{-2} la velocidad de giro (en grados por minuto) es tan pequeña que se confunde con el ruido. Sin embargo, tras ocho horas de estimulación se obtiene un ángulo de equilibrio apreciable y medible por encima del umbral.

El umbral de una fotorrespuesta también puede ser alterado por las condiciones de crecimiento y experimentación. El umbral del fototropismo y del fotomecismo del macróforo varían con el estadio del desarrollo y la iluminación durante el crecimiento, respectivamente, como vimos en la introducción de este capítulo.

Por todas estas razones resulta difícil comparar exactamente los umbrales de las fotorrespuestas de Phycomyces. Sin embargo, podemos decir que todas tienen umbrales entre 10^{-9} y 10^{-7} W m^{-2} con iluminación continua y 10^{-7} y 10^{-4} J m^{-2} con destellos. Solo la fotocarotenogénesis parece tener un umbral más alto (López Díaz y Cerdá Olmedo 1980). Sin embargo, trabajos recientes (E.R. Bejarano, comunicación personal) han permitido detectar un componente de escasa amplitud pero de umbral parecido a los de las otras fotorrespuestas de Phycomyces.

El umbral de la fotoforogénesis para iluminación continua estimado con este método es más alto que el que se obtuvo con el método de Thornton (López Díaz y Cerdá Olmedo 1981). Las diferencias en los umbrales se pueden deber a que las distintas condiciones de crecimiento podrían modificar el periodo de competencia a la luz. Los micelios que crecieran más

espacio podrían capturar más fotones y tener, por consiguiente, un umbral más bajo.

La fotomacroforogénesis es máxima bajo iluminación continua de 10^{-3} W m^{-2} . La menor respuesta a intensidades superiores no parece deberse a la fotodestrucción del fotorreceptor que, en el caso del fototropismo, ocurre a intensidades muy altas, por encima de 10 W m^{-2} (Figura 7). La inhibición puede explicarse con los resultados de Thornton (1975) sobre el efecto de la luz en los distintos estadios del desarrollo de los esporangióforos de Phycomyces. La estimulación de la macroforogénesis es la suma del incremento en el número de macroprimordios en el micelio y la fotoconversión de algunos microprimordios para dar lugar a macróforos. Las altas intensidades inhiben la producción de microprimordios y bloquean uno de los componentes de esa suma. El resultado sería un descenso de la macroforogénesis a altas intensidades luminosas, como se observa en la figura 8.

Las respuestas morfogénéticas a destellos tienen dos componentes aditivos, cada uno con una exposición umbral, una exposición saturante (unas cien veces mayor que el umbral) y una respuesta gradual entre ambas. El umbral del componente de alta intensidad es unas diez mil veces mayor que el umbral del de baja intensidad. Estas respuestas con dos escalones se han encontrado también al estudiar la fotocarotenogénesis en el micelio de Phycomyces (Jayaram et al. 1979; Whitaker y Shropshire 1981; E.R. Bejarano, comunicación personal), el fototropismo de los macróforos (Figura 7)(Galland y Russo 1984; Galland y Lipson 1987a), y los cambios en la absorbencia del micelio inducidos por la luz (Trad y Lipson 1987).

Los umbrales de los dos componentes que aparecen en la fotoforogénesis son aproximadamente iguales que los de la fotocarotenogénesis. La sensibilidad absoluta parece ser la misma en la mayoría de las fotorrespuestas de Phycomyces.

La fotoforogénesis de Phycomyces es mucho más sensible a la luz azul que la fotomorfogénesis de los otros hongos en

los que se ha estudiado en detalle. El umbral de la fotoforogénesis de Phycomyces es 10^{-4} J m⁻², mientras que el umbral de la fotoinducción de protoperitecios de Neurospora crassa es 4.2 J m⁻² (Degli-Innocenti et al. 1983). La exposición necesaria para estimular la fotoconidiación al 50 % de la respuesta máxima en Trichoderma es de 1.77 J m⁻² (Gressel y Hartmann 1968), mientras que el punto de inflexión del primer componente está a 2.19×10^{-3} J m⁻² para la fotomacroforogénesis y a 1.6×10^{-3} J m⁻² para la fotomicroforogénesis.

La diferencia en la forma de las curvas que se obtienen con iluminación continua y con destellos parece deberse a la población de micelios que no son competentes a la luz en el momento de la iluminación. La iluminación continua permite que todos los micelios reciban luz en su periodo de competencia y, como consecuencia de esto, el primer componente satura la respuesta e impide detectar el segundo componente. La falta de efecto de la preiluminación de los cultivos sobre la sensibilidad, la contemporaneidad de la competencia a alta y baja exposición y el mantenimiento de la reciprocidad hasta iluminaciones de 200 minutos han permitido desechar otras hipótesis.

El umbral de la fotomicroforogénesis a destellos de 416 nm durante dos minutos es aproximadamente 10 fotones por micrómetro cuadrado (capítulo tres). La reciprocidad de la respuesta se mantiene hasta los 200 minutos, lo que indica que, cerca del umbral, el fotorreceptor es capaz de reaccionar a fotones aislados que llegan uno cada veinte minutos a un área de un micrómetro cuadrado.

El periodo de competencia a la luz

Las respuestas fotomorfogénicas sólo ocurren durante el periodo de competencia a la luz, de unas cuarenta horas de duración. Las curvas que representan la forogénesis tras iluminar los cultivos durante dos minutos a distintas edades tienen forma de campana y alcanzan el máximo a los dos días

de edad (Figura 12). Este periodo de competencia es en realidad el resultado de superponer los periodos de competencia de los 10^5 micelios imperfectamente sincronizados que crecen en cada caja de Petri.

La respuesta a un destello depende del número de micelios competentes en ese momento. El número de esporangióforos que cada micelio aporta a la curva depende de la relación entre el periodo de competencia (t_c) y el intervalo entre los destellos (t_i). Si t_c es igual a t_i , cada micelio podrá responder a uno solo de los destellos aplicados, aquél que caiga dentro de su periodo de competencia. Si el destello es saturante, la suma de las respuestas a cada uno de los destellos debe ser igual a la respuesta máxima posible (la desaparición de los micróforos). Si t_c es igual a nt_i cada micelio podrá responder a cualquiera de n destellos. Esto hace que la suma de las respuestas a cada uno de los destellos será n veces la respuesta máxima.

Este razonamiento se puede formular como:

$$\sum a(t) = t_c / t_i$$

donde $a(t)$ es la respuesta normalizada entre 0 y 1 que se obtiene al aplicar el destello en el momento t ; el valor 0 corresponde a micelios no iluminados y 1 a la desaparición de los micróforos. Es decir $a(t) = 1 - y$ donde y es la ordenada en las figuras 9, 10 y 11, por ejemplo.

El periodo de competencia se obtiene de la fórmula anterior:

$$t_c = t_i \sum a(t)$$

Hemos utilizado los resultados de la fotomicroforogénesis que aparecen en la figura 12 para estimar el periodo de competencia de los dos componentes. El intervalo entre destellos es de cuatro horas ($t_i = 4$ h) y $\sum a(t)$ para el primer componente es 1.81. El producto de estos dos valores permite

estimar el periodo de competencia del primer componente en 7.24 horas. De la misma manera, para el segundo componente $\sum a(t)=2.85$. Este valor incluye la respuesta al estímulo del primer componente, cuyo valor hay que restarle para obtener el $\sum a(t)$ debido al segundo componente, que resulta así ser 1.04. El periodo de competencia del segundo componente es 4.16 horas.

Estos resultados indican que el periodo de competencia de cada micelio dura sólo unas pocas horas, mucho menos que el periodo de competencia de la población, que es de unas cuarenta horas. El periodo de competencia de la población coincide para los dos componentes. Sin embargo, en cada micelio no tienen por qué coincidir los dos periodos de competencia. Como el primer componente es saturante, si los periodos de competencia coincidieran, el segundo componente sería indetectable.

CAPÍTULO TERCERO

ESPECTROS DE ACCIÓN DE LA FOTOMORFOGÉNESIS DE PHYCOMYCES

INTRODUCCIÓN

El fotorreceptor

Para que una fotorrespuesta tenga lugar es necesario capturar fotones y pasar la información que contienen a la cadena de transducción sensorial. Las células que reciben y procesan información luminosa necesitan moléculas especializadas, los fotorreceptores, para realizar esta función.

El fotorreceptor suele ser un complejo formado por una o varias cadenas peptídicas y un grupo prostético, que es el encargado de absorber los fotones. El grupo proteico proporciona el entorno molecular apropiado para que el grupo prostético realice su función.

El espectro de acción

Cuando no se sabe cuál es el fotorreceptor responsable de una respuesta biológica, el primer paso hacia su identificación consiste en obtener su espectro de acción. Si se dan ciertas condiciones, el espectro de acción reproduce exactamente el espectro de absorción del fotorreceptor. Esta información ayuda a su caracterización y purificación.

Un espectro de acción representa la eficacia de cada longitud de onda para dar lugar a una fotorrespuesta. La eficacia de cada longitud de onda se define como el inverso de la iluminación necesaria para obtener una determinada respuesta, generalmente el umbral o el 50 % de la respuesta máxima.

El método que hemos expuesto supone que la respuesta depende de un fotorreceptor simple que absorbe un fotón, se excita y, al desexcitarse, modifica al primer elemento de la cadena de transducción. Este modelo predice que las curvas que describen la relación entre el estímulo y la respuesta a distintas longitudes de onda serán paralelas y que todas alcanzarán la misma respuesta máxima. Si esto no ocurre, el sistema de fotorrecepción es complicado (intervienen varios pigmentos, existen ciclos de fotoconversión etc.). Se pueden estudiar modificaciones de este modelo básico mediante espectroscopía de acción, aunque se necesita un análisis matemático detallado para interpretar correctamente el espectro. La espectroscopía de acción ha sido revisada extensamente por Hartmann (1983), Schäfer y Fukshansky (1984) y Galland (1987).

Espectros de acción y fotorreceptores de Phycomyces

Phycomyces ve la luz azul, como muchos otros seres vivos de la mayor parte de los grupos filogenéticos: bacterias, protozoos, hongos, plantas y animales (Senger 1980, 1984, 1987). La mayoría de los espectros de acción son bastante parecidos, con máximos a 450 nm y picos menores alrededor de 425 y 475 nm. Muchos tienen además un máximo alrededor de 370 nm, en la zona del ultravioleta cercano. Las respuestas a la luz azul suelen tener un acusado descenso de la sensibilidad por encima de los 500 nm. Una selección de varios espectros de acción de respuestas a la luz azul aparecen en la figura 14.

Pese a su amplia distribución, se desconoce la naturaleza química de la mayoría de los fotorreceptores de la luz azul. Los carotenoides y las flavinas tienen espectros de absorción parecidos a los espectros de acción de la fotorrespuestas de luz azul (revisiones de Presti 1983 y Song 1987). Las flavinas parecen ser los fotorreceptores de la luz azul en la mayoría de los casos investigados en detalle (Galland y Senger 1988). De hecho, las flavinas son los cromóforos de

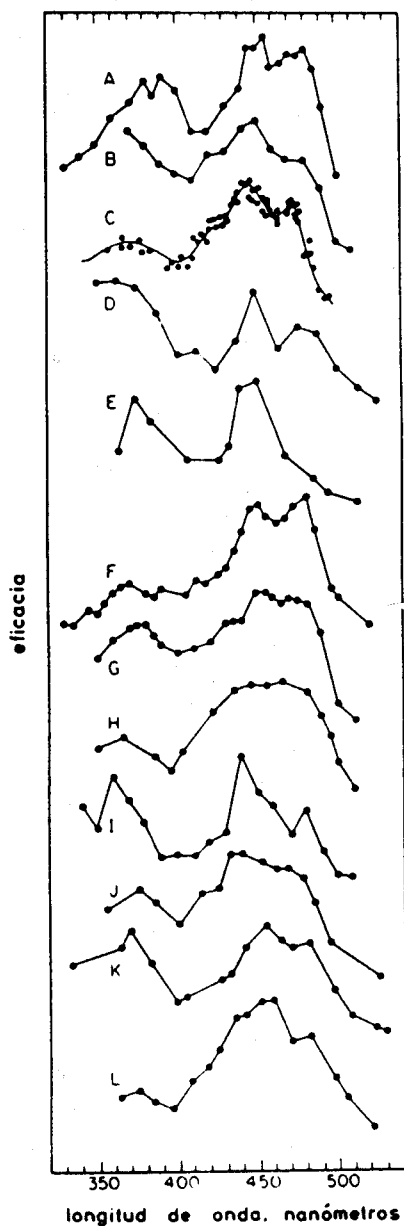


Figura 14. Espectros de acción de respuestas a la luz azul de varios organismos. (A) fototropismo de Phycomyces, (B) fototropismo en el hongo Pilobolus kleinii, (C) fototropismo de los coleóptilos de la planta Avena sativa, (D) fototactismo del protista Euglena gracilis, (E) fototactismo negativo en Physarum nudum, (F) fotocarotenogénesis en el hongo Neurospora crassa, (G) fotocarotenogénesis en Fusarium aquaeductuum, (H) fotocarotenogénesis en la bacteria Mycobacterium, (I) estimulación del desarrollo sexual en el hongo Nectria haematococca, (J) incremento de la respiración en el alga Chlorella, (K) reorganización de los cloroplastos del musgo Funaria, (L) cambio de fase en el ritmo circadiano de salida de la pupa de la mosca Drosophila pseudoobscura. Figura tomada de Presti y Galland (1987).

los únicos fotorreceptores de la luz azul aislados hasta la fecha: las enzimas fotorreactivantes de E. coli, Streptomyces y S. cerevisiae. Los cromóforos identificados son el FADH₂ en E. coli, un derivado de la 5-deazarriboflavina en Streptomyces, y el FAD en S. cerevisiae (Galland y Senger 1988).

El fototropismo y el fotomecismo del esporangióforo tienen espectros de acción muy parecidos (Figura 18). Esto sugiere los mismos fotorreceptores para las dos respuestas. El espectro de acción del fototropismo depende del método empleado para obtenerlo (Galland y Lipson 1985a), lo que sugirió a los autores que el sistema fotorreceptor es muy complejo. Estos datos han sido reexaminados recientemente por Fukshansky y Steinhardt (1987) que creen poderlos explicar asumiendo un fotorreceptor simple pero muy orientado y teniendo en cuenta la geometría del esporangióforo. Hay pruebas de que el macróforo tiene dos fotosistemas con distintos umbrales y respuestas máximas (Galland y Lipson 1987a, Galland y Presti 1987).

Recientemente, E.R. Bejarano (comunicación personal) ha obtenido un detallado espectro de acción de la fotocarotenogénesis de Phycomyces (Figura 18). La fotocarotenogénesis es también la suma de dos respuestas, efectivas a distintas exposiciones luminosas. Los espectros de acción de estos dos componentes se parecen entre sí y a los de las fotorrespuestas del macróforo, pero presentan diferencias significativas que indican que los fotorreceptores de los dos componentes no son idénticos.

Bergman (1972) y Thornton (1973) observaron que en la fotoinducción de la macroforogénesis las longitudes de onda de 380 a 480 nm son más efectivas que las de 500 nm en adelante, pero no se disponía, hasta ahora, de espectros de acción. Esta carencia se debe a que las mediciones de la forogénesis eran incómodas, lentas y poco repetibles. Estos defectos han sido superados por el método descrito en el capítulo primero.

RESULTADOS

Los destellos monocromáticos inducen respuestas con dos componentes como los que se obtienen con destellos azules (Figuras 15 y 16). A 347 y 530 nm no se observó el segundo componente, presumiblemente porque su umbral supera a la emisión de la lámpara usada. Los resultados se ajustaron, según se describe en el apéndice, a la función:

$$y = 1 + ax/(x+b) + cx/(x+d)$$

Esto permitió reducir todos los resultados obtenidos con cada longitud de onda a los cuatro parámetros de la función: las amplitudes (a y c) y las exposiciones en los puntos de inflexión (b y d) de cada componente.

Los valores de las amplitudes de cada componente no dependen de la longitud de onda. La eficacia de cada longitud de onda se definió como el inverso de la exposición en los puntos de inflexión de cada componente. Este parámetro se representó en el eje de ordenadas de los espectros de acción (Figura 17). Los cuatro espectros de acción (del primer y segundo componente de la macro- y microforogénesis) confirman que la fotoforogénesis de Phycomyces está regulada por la luz azul. Los espectros tienen un aspecto similar, con un acusado descenso en la eficacia para las longitudes de onda por encima de 507 nm.

La luz de 606 y 634 nm fue inefectiva, incluso con exposiciones de 4×10^{-4} y 9×10^{-4} moles de fotones m^{-2} , respectivamente. A 575 nm las respuestas fueron tan pequeñas que no permitieron el análisis de los datos y su inclusión en los espectros de acción.

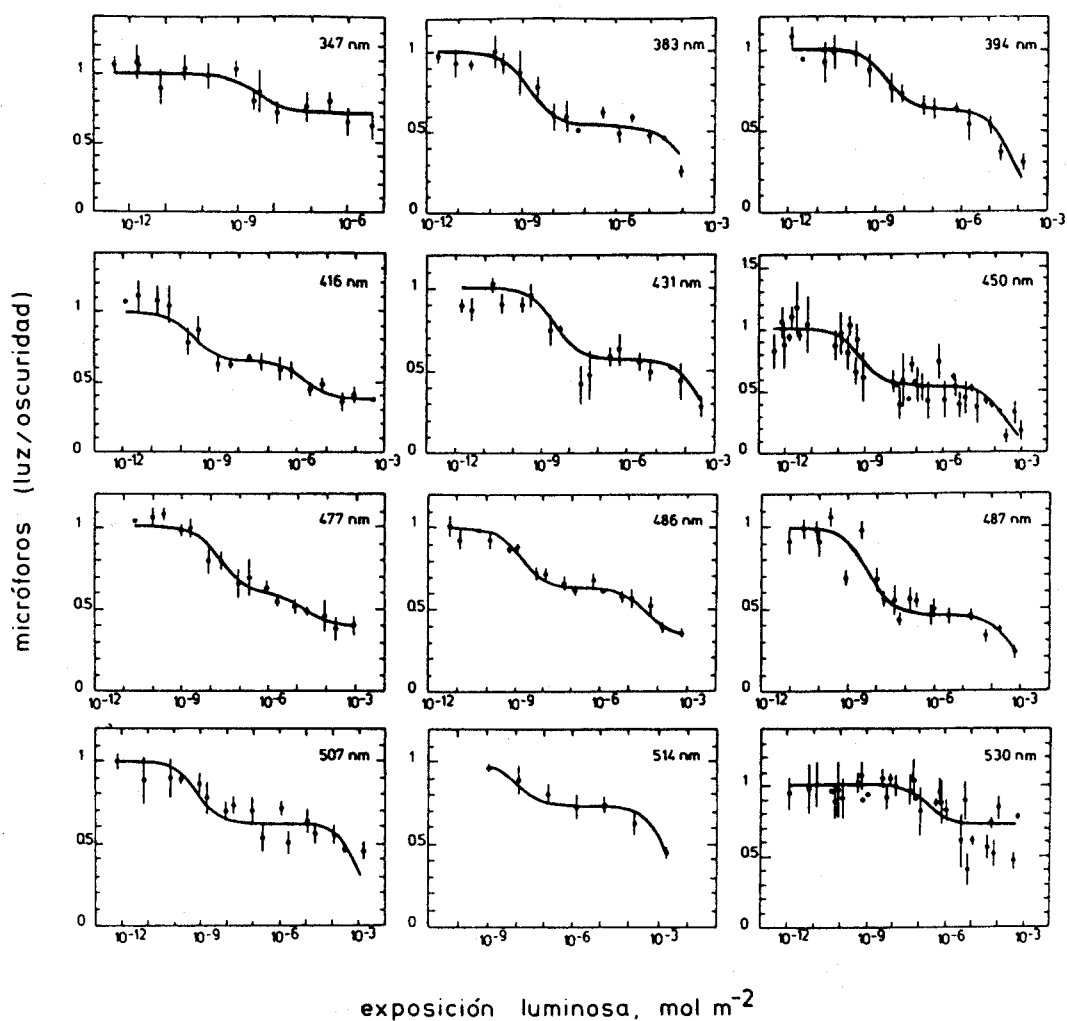


Figura 15. Efecto de destellos monocromáticos sobre la fotomicroforogénesis de Phycomyces. Cada símbolo representa la media y su desviación típica de los resultados de cuatro a seis experimentos independientes. Las líneas continuas indican el ajuste de los resultados a la ecuación del apéndice.

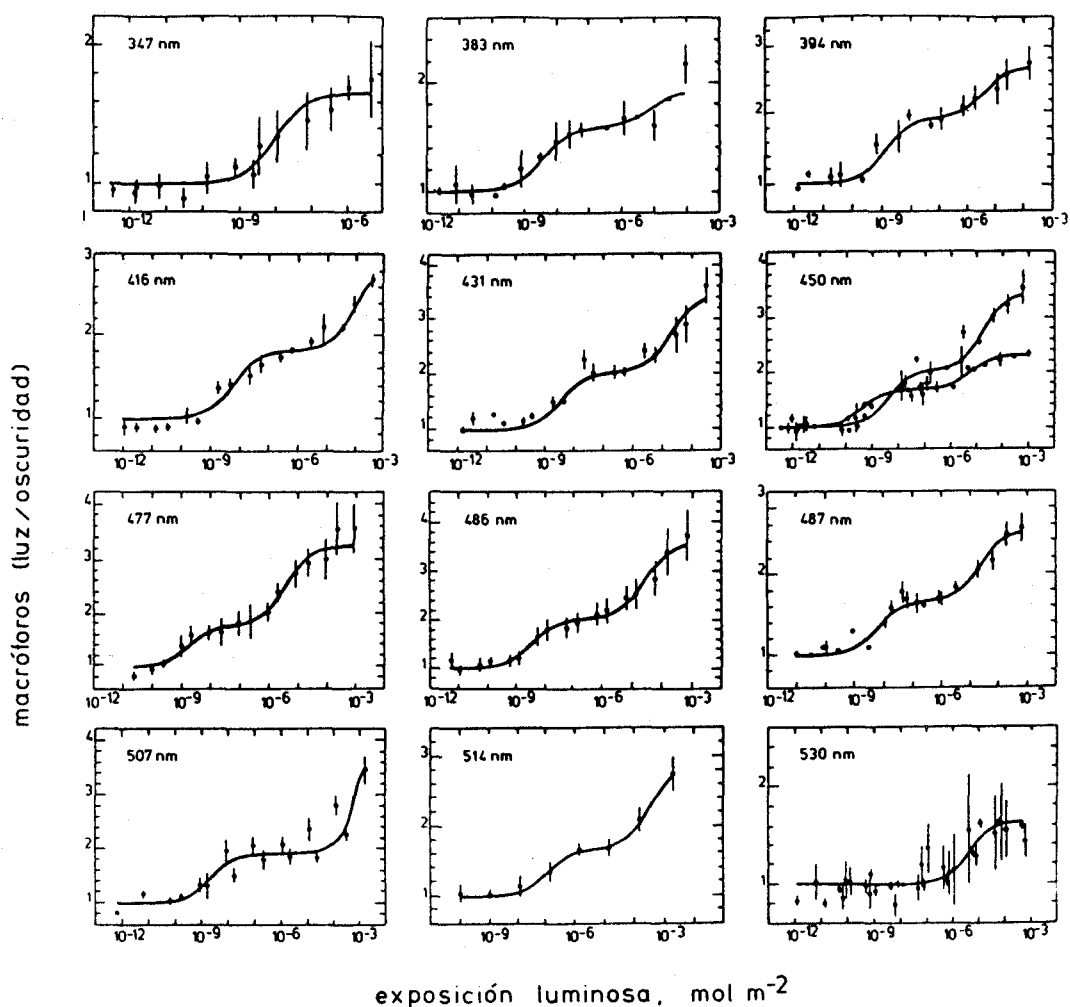


Figura 16. Efecto de destellos monocromáticos sobre la fotomacroforogénesis de *Phycomyces*. Cada símbolo representa la media y su desviación típica de los resultados de cuatro a seis experimentos independientes. Las líneas continuas indican el ajuste de los resultados a la ecuación del apéndice. Las dos líneas de 450 nm representan el ajuste a dos grupos de experimentos independientes.

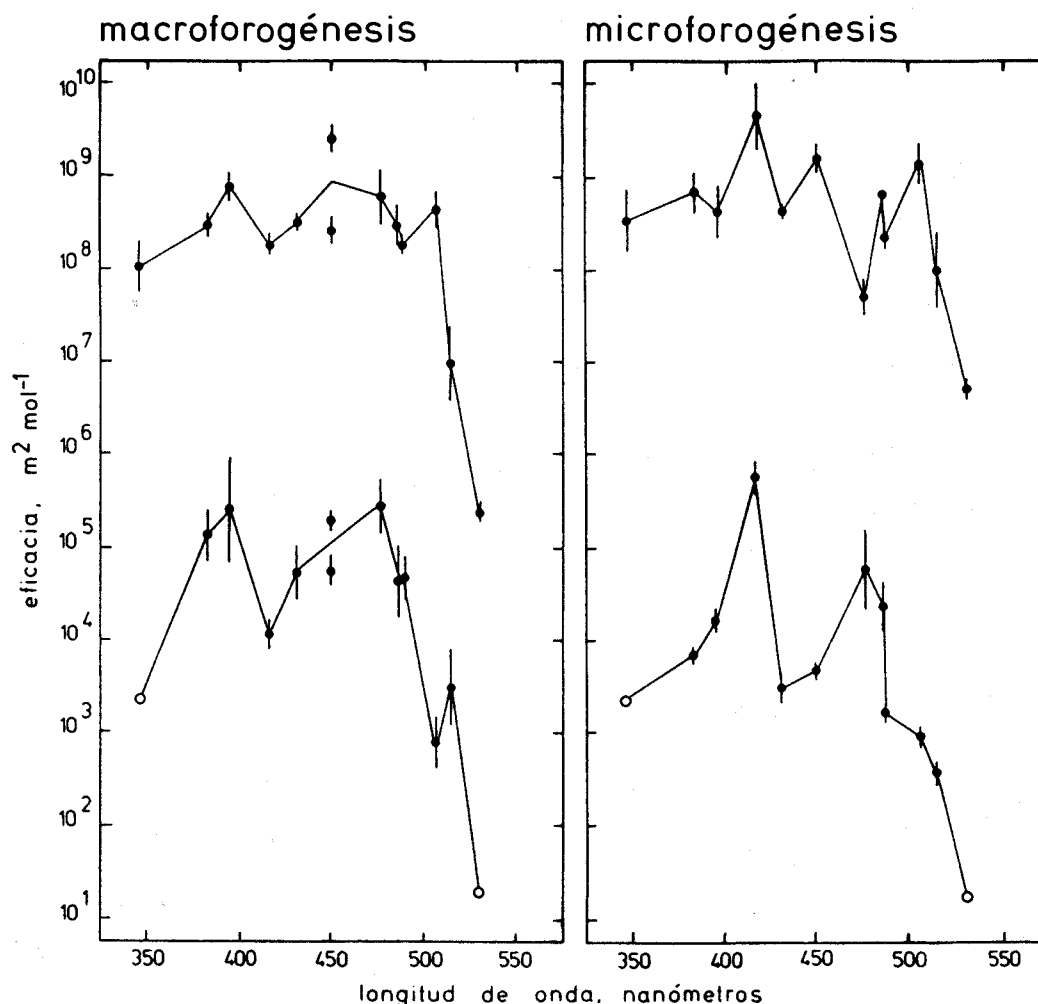


Figura 17. Espectros de acción de la fotoforogénesis de *Phycomyces*. La eficacia está definida como el recíproco de la exposición en el punto de inflexión (mitad del valor máximo) de cada uno de los componentes de cada respuesta. Los círculos blancos representan estimaciones superiores de valores demasiado pequeños para ser medidos.

Existen diferencias significativas entre los espectros de ambas respuestas. El pronunciado máximo a 416 nm que aparece en los dos espectros de la microforogénesis no aparece en ninguno de los de la macroforogénesis. La macroforogénesis es más sensible al ultravioleta cercano (350-400 nm) que la microforogénesis, sobre todo si comparamos los espectros del segundo componente.

También existen diferencias entre los componentes de ambas respuestas, especialmente en la zona de los 500 nm. El primer componente tiene un pico a 507 nm del que carece el segundo componente.

DISCUSIÓN

El umbral de la fotoforogénesis es muy bajo, cercano a 10 fotones por micrómetro cuadrado. Las respuestas se dan con una iluminación muy tenue, menor que la luz de la luna. Nuestra ignorancia de la ecología de Phycomyces hace difícil imaginar el ambiente natural donde esta fotorrespuesta puede haber evolucionado.

Los destellos inducen una respuesta que se puede ajustar a una función con dos componentes. Esto ocurre en todas las fotorrespuestas de Phycomyces investigadas en detalle y sugiere que existen dos fotorreceptores que responden a baja y alta exposición.

Los cuatro espectros de acción tienen el mismo aspecto general, pero tienen respuestas características a ciertas longitudes de onda. Los espectros de la fotomicroforogénesis tienen un máximo a 416 nm que no aparece en los de la fotomacroforogénesis y que no es típico de las respuestas a la luz azul fuera de Phycomyces. Las longitudes de onda alrededor de 500 nm son relativamente más efectivas en los espectros del primer componente que en los del segundo componente. Los picos fotomacroforogénicos a 383 nm son típicos de flavinas. De hecho, los cuatro espectros de acción no excluyen que los fotorreceptores sean flavoproteínas. Los máximos a 416 y 507 nm podrían deberse a cromóforos no flavínicos.

Las diferencias entre los cuatro espectros de acción indican que los fotorreceptores no son idénticos. Los resultados indican que cada respuesta está regulada por dos fotorreceptores que funcionan en distintos intervalos de exposiciones luminosas.

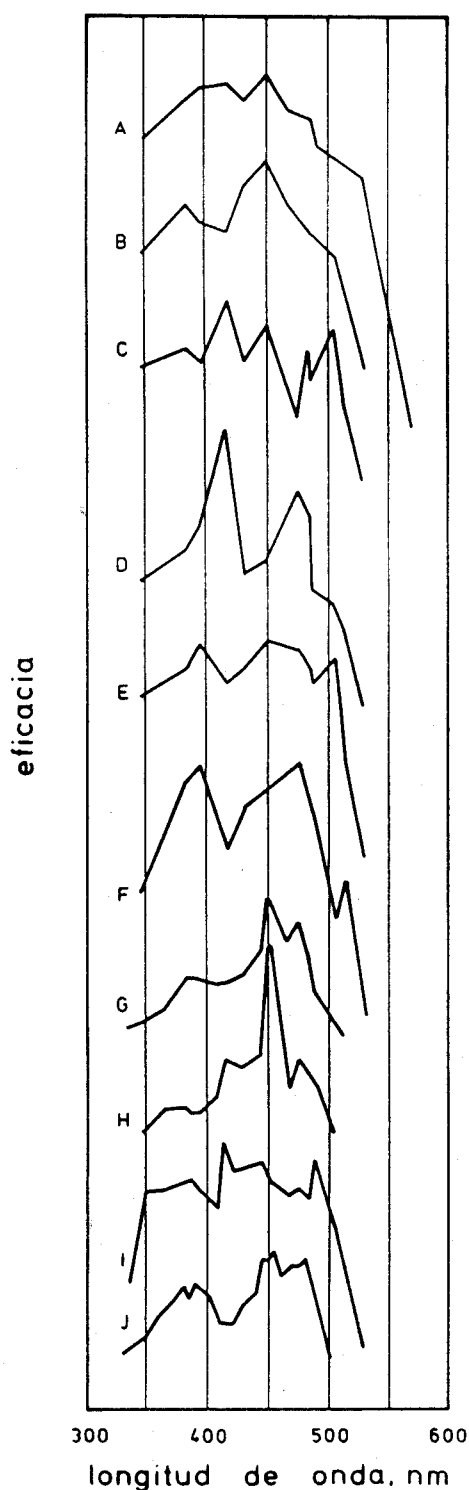


Figura 18. Espectros de acción de las fotorrespuestas de Phycomyces. (A) primer componente y (B) segundo componente de la fotocarotenogénesis, (C) primer componente y (D) segundo componente de la fotomicroforogénesis, (E) primer componente y (F) segundo componente de la fotomacroforogénesis, (G) balance fototrópico cuando la intensidad de la luz de referencia es 10^{-4} W m^{-2} y (H) cuando la intensidad es 10^{-8} W m^{-2} , (I) equilibrio fotogravitrópico y (J) fotomecismo. Los espectros de la fotocarotenogénesis han sido cedidos por E.R. Bejarano y los de las fotorrespuestas del esporangióforo han sido tomados de Presti y Galland (1987).

Los espectros de acción de las fotorrespuestas del micelio y del esporangióforo tienen un cierto aire de familia (Figura 18). Poseen un gran máximo en la zona del ultravio-

leta cercano (380-390 nm) y otros alrededor de 450 y de 480-490 nm. Todos tienen un acusado descenso en la eficacia por encima de los 500 nm.

Algunos espectros de acción poseen máximos característicos. Los espectros del segundo componente de la fotoforogénesis tienen un pico a 507 nm que no aparece en ningún otro espectro. El máximo a 416 nm aparece en los dos espectros de la microforogénesis, en el del primer componente de la fotocarotenogénesis, en el del equilibrio fotogravitropico y en el del balance fototropico cuando la luz de referencia es de baja intensidad. También existe un pico alrededor de 416 nm en el espectro de acción de la inhibición de la germinación de las uredosporas de Puccinia graminis (Calpouzos y Chang 1971).

La espectroscopía de acción permite comparar los fotorreceptores con los que cada una de las fotorrespuestas de Phycomyces responde a un amplio intervalo de exposiciones. Las pocas pero significativas diferencias entre los espectros de acción de las distintas respuestas sugieren que los fotorreceptores de Phycomyces tienen elementos en común, pero no son idénticos.

CAPÍTULO CUARTO

MUTANTES DE PHYCOMYCES ALTERADOS EN LA FOTOMORFOGÉNESIS

INTRODUCCIÓN

El análisis genético de la fotomorfogénesis permite identificar los componentes de la cadena sensorial y establecer las relaciones entre ellos. En Phycomyces es posible la búsqueda de mutantes y su análisis genético (revisión, Eslava 1987), lo que ha permitido encontrar mutantes alterados en las fotorrespuestas del esporangióforo y en la fotocarotenogénesis. La investigación de la fotoforogénesis de estos mutantes nos ayudará a relacionar entre sí las fotorrespuestas de Phycomyces.

Mutantes alterados en las fotorrespuestas del esporangióforo

Estos mutantes se aislaron por su deficiente fototropismo a intensidades luminosas a las que responde perfectamente el silvestre. Su análisis genético ha permitido clasificarlos en ocho genes no ligados, madA a madH (Ootaki et al. 1974, Eslava et al. 1976, López Díaz y Lipson 1983) (Figura 19). Los mutantes en los genes madA, madB y madC no responden en absoluto a bajas intensidades luminosas, pero responden normalmente a otras mayores; sus umbrales son 10^3 , 10^5 y 10^6 veces, respectivamente, mayores que el del tipo silvestre. Los mutantes en los genes madD a madG tienen el mismo umbral que la estirpe silvestre, pero sus respuestas son menores a todas las intensidades luminosas (Bergman et al. 1973). Los mutantes en el gen madH tienen el mismo umbral que el silvestre, pero responden mucho más deprisa (mutantes "hipertrópicos", Lipson et al. 1983).

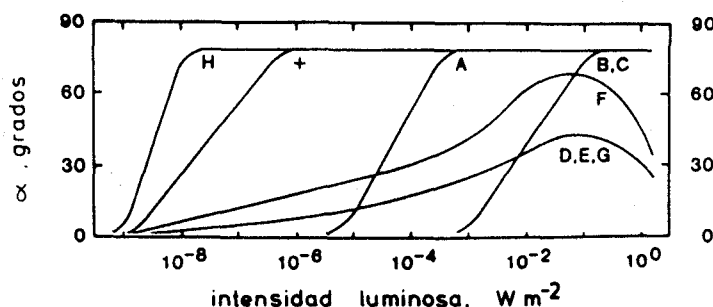


Figura 19. Equilibrio fotogravitrópico de los esporangióforos silvestres y mutantes mad. La figura representa el ángulo (α) formado por los esporangióforos y la vertical tras iluminarlos unilateralmente con luz azul de la intensidad que se indica. Las letras mayúsculas indican el gen mad alterado. La estirpe silvestre se indica por el símbolo +.

Los genes madA, madB y madC actúan en los pasos iniciales de la ruta sensorial, ya que las mutaciones en estos genes no afectan a las otras respuestas del esporangióforo pero sí afectan al fotomecismo y a los mecanismos de adaptación a la luz y a la oscuridad (Galland y Lipson 1987b). Además, los mutantes madB y madC tienen modificado el espectro de acción del equilibrio fotogravitrópico, lo que indica que tienen alterado el sistema de fotorrecepción (Galland 1983, Galland y Lipson 1985b). Los dobles mutantes madA madB y madB madC y el triple mutante madA madB madC son ciegos para el fototropismo (Lipson y Terasaka 1981). El efecto multiplicativo entre estos mutantes sugiere que los productos de estos genes actúan en serie. Datos genéticos (Medina y Cerdá Olmedo 1977 y López Díaz y Lipson 1983) y biofísicos (Poe et al. 1986) sugieren que varios de los productos de los genes mad forman un complejo multimérico.

Las mutaciones en los genes madD a madH alteran todos los tropismos, lo que indica que estos genes gobiernan el crecimiento del esporangióforo.

Los mutantes en los genes madA y madB tienen también alterada la fotocarotenogénesis, aunque en menor grado que el fototropismo (López Díaz y Cerdá Olmedo 1980, Jayaram et al. 1980). El doble mutante madA madB tiene un efecto multiplicativo sobre la fotocarotenogénesis, como ocurre en el fototropismo (Jayaram et al. 1980). El resto de los mutantes mad no tienen alterada esta fotorrespuesta (Bergman et al. 1973, Jayaram et al. 1980).

De los genes mad, solamente los mutantes madA y madB tienen alterada la fotoforogénesis (Bergman 1972, Bergman et al. 1973, Galland y Russo 1979a, López Díaz y Cerdá Olmedo 1981, Lipson et al. 1983). El método empleado por Galland y Russo (1979a) permitió estimar que los umbrales de la fotomacroforogénesis en los mutantes madA y madB son mil y cien mil veces, respectivamente, más altos que el del silvestre. Estas mutaciones ejercen por tanto efectos similares sobre el tropismo y la morfogénesis.

Mutantes alterados en la carotenogénesis

Phycomyces tiene un color amarillo pálido en la oscuridad debido a la acumulación de unos 40 µg por g de peso seco (en adelante ppm) de beta-caroteno. Durante varios años se han aislado mutantes en genes estructurales de la ruta de biosíntesis que acumulan diversos intermediarios. Existe también una amplia colección de mutantes reguladores que acumulan mucho más o mucho menos beta-caroteno que la estirpe silvestre. La carotenogénesis de Phycomyces y sus mutantes ha sido revisada recientemente por Cerdá Olmedo (1985 y 1987a).

Se conocen dos genes estructurales en la ruta de biosíntesis del beta-caroteno. El gen carB determina la deshidrogenasa del fitoeno, que realiza las cuatro últimas deshidrogenaciones de la ruta. Las estirpes con este gen alterado acumulan principalmente el caroteno blanco fitoeno. El extremo carR del gen bifuncional carRA determina la ciclasa del

licopeno que transforma a éste en beta-caroteno. Los mutantes carR acumulan licopeno y son de color rojo.

Existen mutantes que superproducen beta-caroteno. Los mutantes en el gen carS acumulan 3000-5000 ppm de beta-caroteno, mientras que los que tienen alterado el gen carD acumulan unas 1000 ppm. En el lado opuesto de la actividad carotenogénica están los mutantes carC y carA (el otro extremo del gen bifuncional carRA) que acumulan menos beta-caroteno que el silvestre. Las mutaciones en el gen carRA que eliminan a la vez las dos proteínas solo permiten acumular pequeñas cantidades de licopeno.

Las investigaciones sobre la carotenogénesis de Phycomyces han permitido construir un modelo de regulación de la ruta de biosíntesis (Cerdá Olmedo 1987a y Bejarano et al. 1988). El modelo propone que la ruta está regulada por su producto final, el beta-caroteno, que forma un complejo con el producto del gen carS (pS) y bloquea al producto de carA (pA), que es esencial para la carotenogénesis. Los genes carC y carD parecen controlar a carS (L.M. Salgado, comunicación personal).

La iluminación continua de los micelios incrementa la cantidad del beta-caroteno acumulado (ver el capítulo segundo). La fotocarotenogénesis requiere la actividad de varios genes, algunos de ellos compartidos por las otras fotorrespuestas de Phycomyces. Los mutantes en los genes picA, picB (López Díaz y Cerdá Olmedo 1980) y carC (Revuelta y Eslava 1983) parecen tener el mismo umbral que el silvestre, al menos en la región de alta intensidad, pero la respuesta máxima es menor.

Recientes investigaciones (E.R. Bejarano, comunicación personal) han demostrado que la carotenogénesis es fotoinducible en los mutantes en los genes carB, carS y carD, pero no en los mutantes carR, carA y carRA. La ausencia de estimulación en los mutantes carA no se debe a la escasez de beta-

caroteno, ya que tampoco se fotoinducen los dobles mutantes carA carS que acumulan más beta-caroteno que el silvestre. La fotoinducción se investigó iluminando con intensidades muy altas y el método experimental no permitió la estimación de los umbrales. Estos resultados no descartan que los mutantes fotoinducibles no tengan alterada su respuesta a bajas intensidades, pero demuestran que el producto del gen carA es esencial para la fotocarotenogénesis, como ya habían sugerido López Díaz y Cerdá Olmedo (1980).

El beta-caroteno no es esencial para el fototropismo. El fototropismo de dos mutantes carB carR (Presti et al. 1977) y un carA (Bergman et al. 1973), que acumulan muy pequeñas cantidades de beta-caroteno, es tan sensible a la luz azul como el de la estirpe silvestre. Sin embargo, la falta de beta-caroteno altera la fotomacroforogénesis. Los mutantes carA, carB y carR tienen el umbral de la fotomacroforogénesis 100 a 2000 veces más alto que la estirpe silvestre (Galland y Russo 1979a, Gutierrez Corona y Cerdá Olmedo 1988).

En este capítulo describimos la fotoforogénesis de los mutantes mad, car y pic de Phycomyces iluminando con destellos azules. Los resultados nos han permitido añadir nuevos elementos a la ruta de información sensorial de este organismo.

RESULTADOS

Fotoforogénesis de los mutantes mad

Los mutantes madA y madB carecen de fotoforogénesis a bajas intensidades luminosas. La relación entre estímulo y respuesta muestra un solo componente (Figura 20). Los umbrales de la fotomicroforogénesis en los mutantes madA y madB son, aproximadamente, 10^{-2} y 1 J m^{-2} , cien y diez mil veces

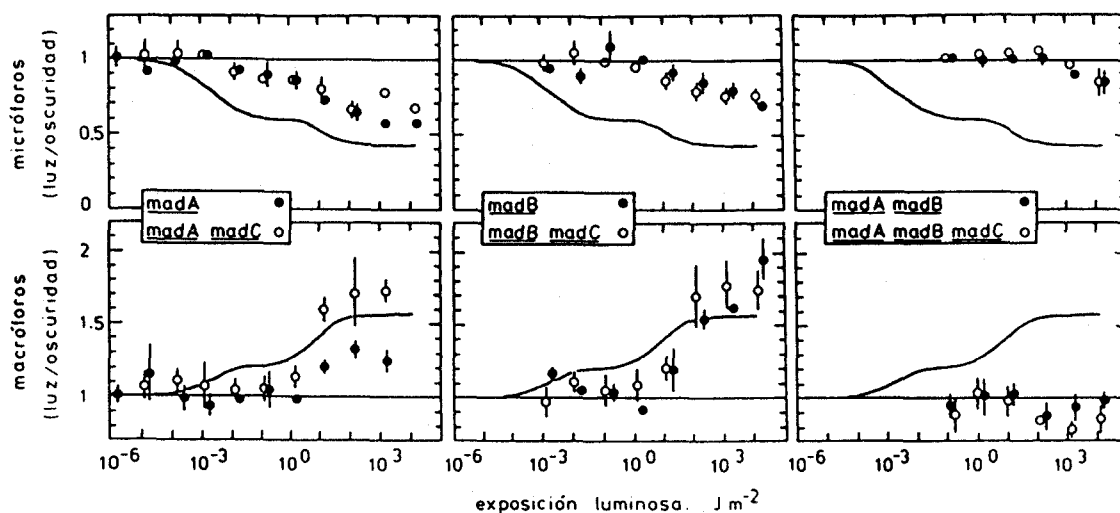


Figura 20. Fotoforogénesis de los mutantes mad. Los símbolos representan la media y su desviación típica de los resultados de cuatro experimentos independientes. Para obtener 10^4 J m^{-2} hubo que iluminar durante 20 minutos en vez de los 2 minutos usuales. La línea continua que aparece en esta y en las siguientes figuras se ha tomado de la figura 9 y representa la fotoforogénesis de la estirpe silvestre. Se utilizaron las estirpes C21 (madA), C111 (madB), L51 (madA madB), L52 (madA madC), L57 (madB madC) y L72 (madA madB madC).

mayores que el del silvestre. Estas mutaciones alteran la fotomacroforogénesis en la misma medida que la fotomicroforogénesis. Las mutaciones madA y madB tienen un efecto multiplicativo cuando están en el mismo genoma, ya que el umbral de la fotomicroforogénesis del doble mutante es 10^2 J m^{-2} (10^6 veces el del silvestre). El efecto multiplicativo de las mutaciones madA y madB también ocurre en la fotomacroforogénesis (Figura 20).

La mutación madC, que sí afecta a las fotorrespuestas del esporangióforo, no tiene efecto por sí sola, ni modifica la respuesta de mutantes madA, madB o madA madB (Figuras 20 y 21).

Las mutaciones en el resto de los genes mad (madC a madH) no alteran la fotoforogénesis (Figura 21).

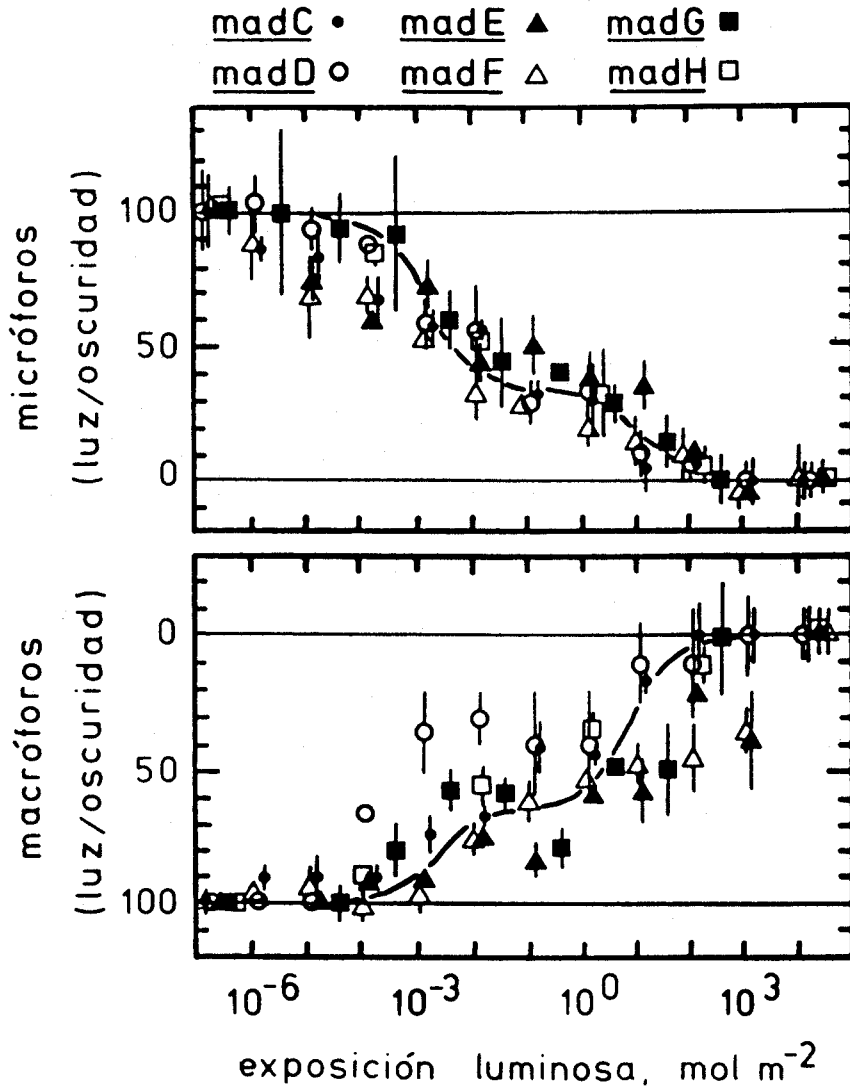


Figura 21. Fotoforogénesis de los mutantes mad. Los símbolos representan la media y su desviación típica de los resultados de cuatro experimentos independientes. En esta figura el número de microfitos y el peso de macrófitos observados en la oscuridad se denomina 100 y los encontrados con la máxima iluminación, 0; los demás resultados se interpolan linealmente entre ambos extremos, cuyos valores absolutos aparecen en la figura 22. Se utilizaron las estirpes L1 (●), C149 (○), C110 (▲), A329 (△), C307 (■) y L83 (□).

Fotoforogénesis de los mutantes car y pic

La macroforogénesis en la oscuridad de los mutantes que tienen alterada la carotenogénesis es muy irregular (Figura 22). El peso seco de los macroforos es muy pequeño y bastante variable, lo que dificulta las estimaciones cuantitativas. En esta sección solamente se muestra la microforogénesis de los mutantes car y pic de Phycomyces; las observaciones de la macroforogénesis sugieren que se comporta como la microforogénesis.

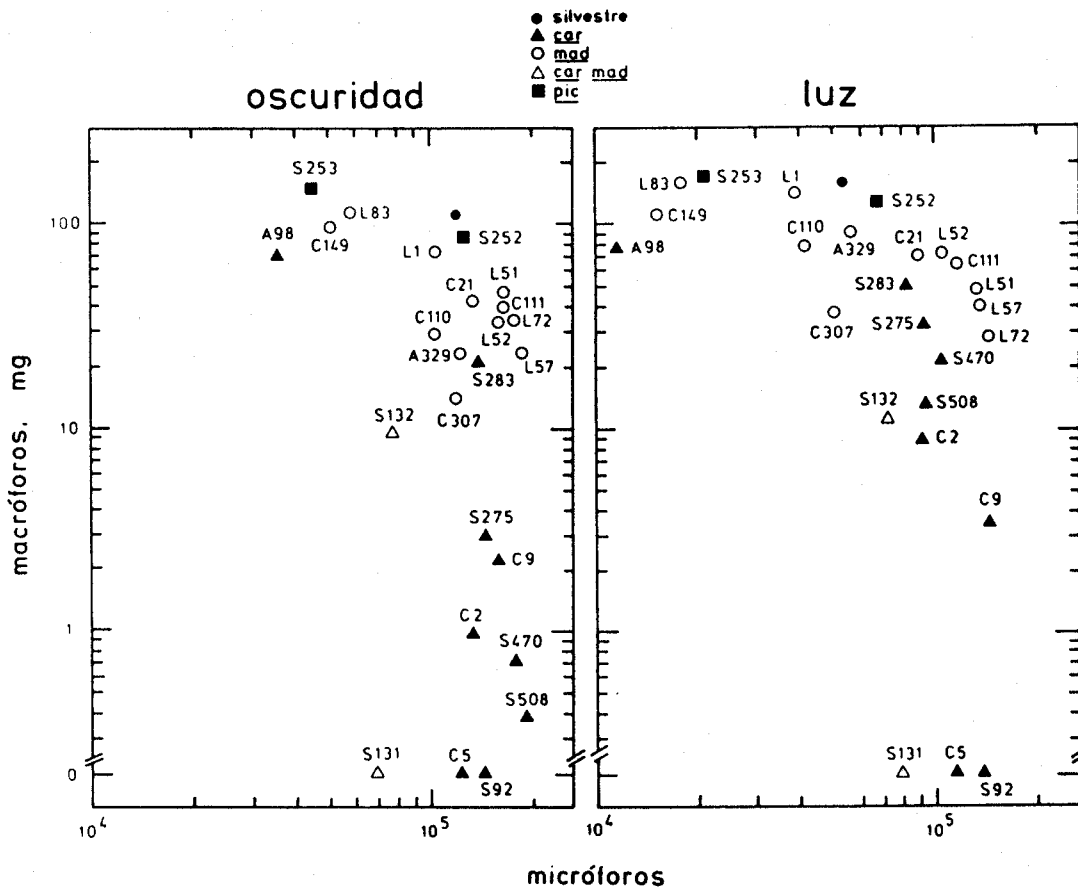


Figura 22. Forogénesis de la estirpe silvestre y los mutantes mad, car y pic en luz y oscuridad. La figura representa el número de microforos y el peso seco de los macroforos de cultivos incubados en oscuridad o sometidos a los dos días de edad a un destello de $1.5 \times 10^4 \text{ J m}^{-2}$ de luz azul, excepto la estirpe silvestre y L1 ($2 \times 10^3 \text{ J m}^{-2}$) y C307, S252, S253 y A98 ($4 \times 10^2 \text{ J m}^{-2}$).

El beta-caroteno es esencial para la fotoforogénesis. Los mutantes carB, carR y carRA no responden a ninguna de la exposiciones empleadas (Figura 23). Estos mutantes no son completamente ciegos para la fotoforogénesis. Los mutantes carB y carRA responden a la iluminación continua, aunque menos que la estirpe silvestre (Tabla 5).

La superproducción de beta-caroteno no afecta a la fotoforogénesis. La fotomicroforogénesis de los mutantes carS y carD es tan sensible a los destellos azules como la de la estirpe silvestre (Figura 24). De la misma manera, las mutaciones en los genes picA, picB y carC tampoco afectan a la fotoforogénesis (Figura 24).

La fotomicroforogénesis del mutante carA tiene el umbral de 1 J m^{-2} , diez mil veces el del silvestre (Figura 25). El efecto de esta mutación sobre la fotoforogénesis no se debe a

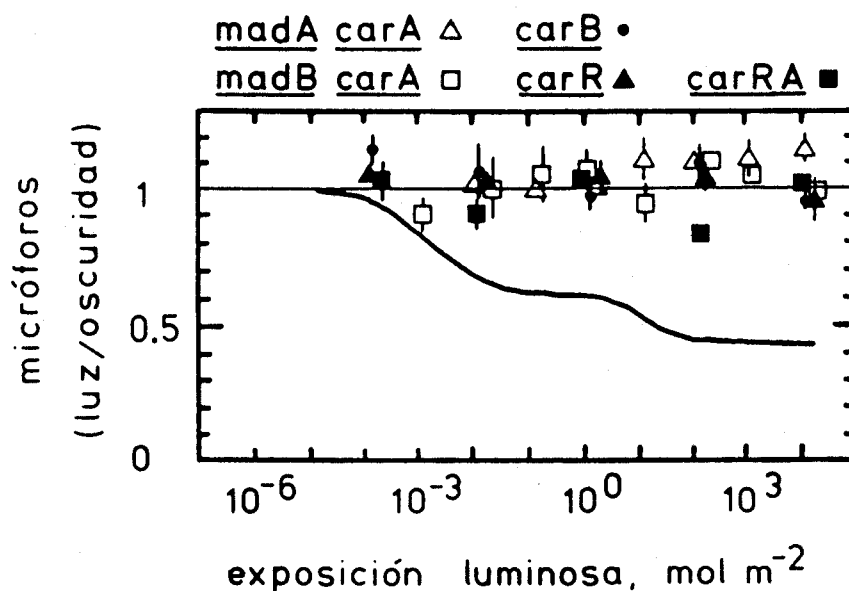


Figura 23. Fotomicroforogénesis de los mutantes carB, carR, carRA, carA madA y carA madB. Los símbolos representan la media y su desviación típica de los resultados de tres experimentos independientes. Para obtener 10^4 J m^{-2} hubo que iluminar durante 20 minutos en vez de los 2 minutos usuales. Se utilizaron las estirpes C5 (\bullet), C9 (\blacktriangle), S92 (\blacksquare), S131 (Δ) y S132 (\square).

=====
 =====

=====
 Tabla 5. Forogénesis de la estirpe silvestre y distintos mutantes de Phycomyces tras cuatro días de crecimiento bajo 2.75 W m^{-2} de luz blanca. Solamente se indica el genotipo relevante. Los resultado son la media y su desviación típica de dos (C5 y S92), tres (S131 y S132) y once (NRRL1555) experimentos independientes. Los resultados de la estirpe silvestre han sido tomados de la tabla 1.

Estirpe	Genotipo		Micróforos ^a	Macróforos ^b
C5	<u>carB</u>	oscuridad	149536 ± 753	0 ± 0
		luz	92064 ± 6028	53 ± 7
S92	<u>carRA</u>	oscuridad	159777 ± 4213	0 ± 0
		luz	50108 ± 3870	108 ± 1
S131	<u>madA carA</u>	oscuridad	69679 ± 8347	0 ± 0
		luz	16220 ± 3108	31 ± 6
S132	<u>madB carA</u>	oscuridad	75282 ± 2483	10 ± 2
		luz	3827 ± 1129	40 ± 5
NRRL1555	silvestre	oscuridad	105000 ± 3618	60 ± 6
		luz	0 ± 0	124 ± 7

a número por caja

b mg de peso seco por caja

=====
 la falta de beta-caroteno. El umbral de la fotomicroforogénesis de dos mutantes dobles carA carS, que acumulan unas 300 ppm de beta-caroteno, es el mismo que el del mutante carA (Figura 25). Esto indica que pA realiza alguna función que es esencial para la fotoforogénesis.

Hemos investigado la relación entre pA y los genes madA y madB determinando la fotoforogénesis de los dobles mutantes madA carA y madB carA. La fotomicroforogénesis de estos dobles mutantes no responde a los destellos azules (Figura 23), aunque sí responden a la iluminación continua (Tabla 5).

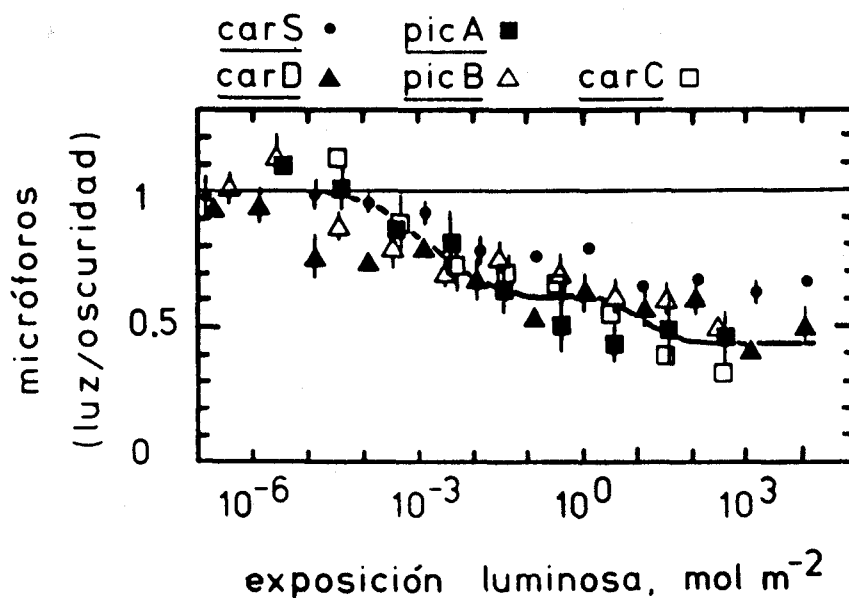


Figura 24. Fotomicroforogénesis de los mutantes carS, carD, picA, picB y carC. Los símbolos representan la media y su desviación típica de los resultados de tres experimentos independientes. Para obtener 10^4 J m^{-2} hubo que iluminar durante 20 minutos en vez de los 2 minutos usuales. Se utilizaron las estirpes S275 (●), S508 (▲), S253 (■), S252 (△) y A98 (□)

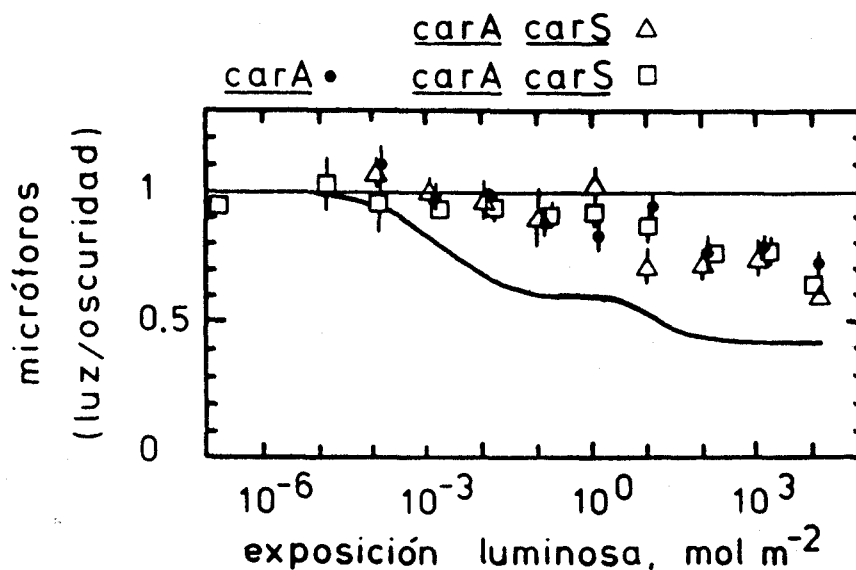


Figura 25. Fotomicroforogénesis de los mutantes carA y carS. Los símbolos representan la media y su desviación típica de los resultados de tres experimentos independientes. Para obtener 10^4 J m^{-2} hubo que iluminar durante 20 minutos en vez de los 2 minutos usuales. Se utilizaron las estirpes C2 (●), S283 (△) y S470 (□).

El efecto multiplicativo de las mutaciones mad y pA indica que estos elementos actúan a través de la misma ruta sensorial.

DISCUSIÓN

Las mutaciones en los genes madA y madB tienen, aproximadamente, el mismo efecto sobre la fotoforogénesis que sobre el fototropismo. La mutación en el gen madA desplaza el umbral de la fotomicroforogénesis a exposiciones cien veces mayores que las del silvestre. La fotomacroforogénesis parece desplazarse en igual magnitud, aunque la determinación de su umbral es menos exacta que la de la microforogénesis. El umbral en el mutante madA está entre los umbrales de los dos componentes del silvestre, lo que indica que la mutación madA modifica el primer componente. Esta mutación también altera el segundo componente, que no se detecta.

El umbral de las dos fotorrespuestas en la estirpe madB coincide con el del segundo componente de la estirpe silvestre. Esto no permite decidir si la mutación elimina específicamente el primer componente, sin afectar al segundo, o afecta a ambos, desplazándolos a intensidades diez mil veces mayores.

Las mutaciones madA y madB tiene un efecto multiplicativo cuando están juntas en el mismo genoma. Esto ocurre también en las fotorrespuestas del esporangióforo (Lipson y Terasaka 1981) y en la fotocarotenogénesis (Jayaram et al. 1980) e indica que los productos de estos genes operan en serie en las etapas iniciales de los tres grupos de respuestas.

Los resultados con el resto de los mutantes mad confirman y completan observaciones anteriores. Los mutantes en los genes madD a madH no están alterados en la fotoforogénesis. Estos mutantes parecen tener afectados los mecanismos de crecimiento del esporangióforo (Bergman et al. 1973) y no es extraño que no tengan alterada ninguna otra fotorrespuesta.

Los mutantes carB y carR son muy deficientes en fotomorfogénesis. Se puede atribuir este efecto a la carencia de beta-caroteno, rasgo común de estos mutantes, y no a un efecto indirecto de las mutaciones en la deshidrogenasa del fitoeno y la ciclasa del licopeno. Esto indica que el beta-caroteno es necesario para que la fotoforogénesis tenga lugar.

Las dos fotorrespuestas miceliarias, fotoforogénesis y fotocarotenogénesis, requieren la presencia de pA. La alteración de la fotoforogénesis en los mutantes carA no se debe a su escasez de beta-caroteno, ya que los dobles mutantes carA carS acumulan apreciables cantidades de beta-caroteno y están igualmente alterados en la fotoforogénesis. El efecto multiplicativo entre la mutación carA y las mutaciones madA y madB indica que la información sensorial para la fotoforogénesis transcurre de una manera lineal entre pA y los productos de los genes mad. La investigación del papel de pA en la carotenogénesis y en las fotorrespuestas miceliarias promete interesantes resultados para el futuro.

Los resultados de este capítulo nos permiten realizar el esquema que aparece en la figura 26. Todas las fotorrespuestas de Phycomyces investigadas en detalle son la suma de dos componentes, tienen umbrales semejantes y sus espectros de acción son parecidos (pero, al menos los de la fotoforogénesis y la fotocarotenogénesis, no idénticos). Estos resultados apoyan la idea de que los fotorreceptores responsables de las fotorrespuestas de Phycomyces tienen elementos en común que les dan cualidades fotobiológicas semejantes. El análisis genético confirma la existencia de estos elementos comunes: los productos de los genes madA y madB, para todas las respuestas, y el beta-caroteno y pA, para las respuestas miceliarias.

La fotoforogénesis puede haber evolucionado del fototropismo a través de la expresión de algunos de los genes mad en el micelio. En tal caso algunos de los finos detalles de la fotoforogénesis pueden no haber sido seleccionados para la

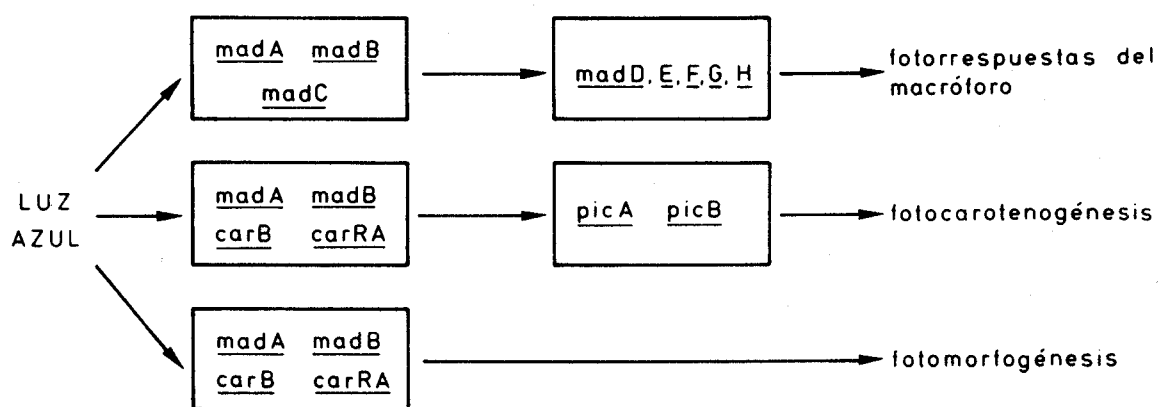


Figura 26. Bases genéticas de la visión de Phycomyces. El esquema recoge los genes cuya alteración modifica la ruta sensorial desde la luz a las distintas fotorrespuestas.

nueva respuesta, sino que representan reliquias de la antigua. Esto podría explicar las complejidades de la fotoforogénesis para los que piensen que una simple respuesta de "todo o nada" pudiera haber sido suficiente.

DISCUSIÓN GENERAL

La forogénesis de Phycomyces es un proceso de desarrollo que da lugar a dos tipos de estructuras definidas, los macróforos y los micróforos. La forogénesis está regulada por varios estímulos externos al organismo. La luz es el regulador de la forogénesis más atractivo para el investigador pues, además de su fácil manejo, promueve otras respuestas fisiológicas en Phycomyces y en muchos otros seres vivos.

El estudio de las condiciones de cultivo (número de esporas inoculadas, concentración de asparagina, aireación de los micelios) nos ha permitido descubrir unas condiciones casi ideales para la investigación de la forogénesis. El método experimental permite obtener en poco tiempo resultados repetibles.

La iluminación de los micelios induce una respuesta morfogénica gradual, cuantificable y ajustable a una función algebraica. El ajuste matemático permite, además, describir las respuestas por los parámetros de la función. Esto ha sido especialmente útil para realizar el espectro de acción de la fotoforogénesis.

El efecto fotomorfogénico máximo se consigue iluminando continuamente los micelios, pero basta la aplicación de destellos a micelios de dos días de edad para obtener una respuesta considerable. La iluminación con destellos separa en el tiempo el estímulo de la respuesta, lo que puede facilitar el análisis detallado de los sucesos moleculares que ocurren tras la fotorrecepción.

Los destellos azules provocan respuestas morfogénicas que se ajustan a una función con dos componentes sigmoidales. Dichos componentes reflejan la acción de dos fotorreceptores que operan en distintos intervalos de exposición luminosa. Muestran una función sigmoidal las respuesta que dependen de

la colisión de dos moléculas. Una hipótesis concreta: la señal morfogenética depende de la colisión de dos moléculas formadas por efecto de la luz. Las dos moléculas pueden ser de la misma o distinta naturaleza química. La concentración de las moléculas reaccionantes es proporcional a la intensidad luminosa; el tiempo disponible para la colisión coincide, al menos aproximadamente, con el de exposición a la luz.

Las diferencias de los espectros de acción de los dos componentes indican que los fotorreceptores responsables son parecidos, pero no idénticos. Podrían tener algunos elementos distintos, o bien simplemente interaccionar de distinta manera con moléculas vecinas.

Las investigaciones de la fotoforogénesis de los mutantes en los genes mad, car y pic permiten proponer una hipótesis más precisa sobre el sistema de fotorrecepción de la fotomorfogénesis de Phycomyces. El fotosistema responsable del primer componente está formado por los productos de los genes madA y madB, mientras que el responsable del segundo componente contiene el producto del gen madA y no sabemos aún si también el de madB. De manera análoga a lo que ocurre en el fototropismo, una o varias flavinas funcionan como cromóforos asociados a estos productos génicos. El producto del gen madC es imprescindible para la alta sensibilidad de las fotorrespuestas del esporangióforo. La mutación de este gen no afecta a las fotorrespuestas miceliales, que, sin embargo, tienen también umbrales muy bajos. Esto indica que debe existir un elemento en los fotosistemas miceliales responsable de su alta fotosensibilidad. La nueva hipótesis atribuye la alta sensibilidad de los fotorreceptores de la fotomorfogénesis al complejo pA-beta-caroteno. Este funcionaría como pigmento antena, canalizando fotones hacia el centro de reacción y aumentando su fotosensibilidad. El papel de los carotenoides como antenas fotosintéticas es bien conocido, y la formación de un complejo entre el beta-caroteno y pA ya ha sido propuesta como parte del mecanismo de regulación de la carotenogénesis (Cerdá Olmedo 1987a, Bejarano et al. 1988).

El elevadísimo umbral de los mutantes que no tienen ni beta-caroteno ni pA implica que el complejo pA-beta-caroteno participa tanto en los fotorreceptores del primer componente como en los del segundo. Estos fotorreceptores no son idénticos entre sí, pero sus diferencias estructurales son desconocidas.

Los resultados obtenidos por el Dr. Bejarano y otros miembros de este Departamento permiten extender estas conclusiones a los fotorreceptores de la fotocarotenogénesis, que también requieren beta-caroteno y el producto de los genes madA, madB y carA. Sin embargo, los fotorreceptores del fototropismo contienen los productos de los genes madA, madB y madC y carecen del complejo pA-beta-caroteno.

APÉNDICE

MATERIAL Y MÉTODOS

ESTIRPES

Las estirpes de Phycomyces utilizadas en este trabajo, su genotipo y su origen aparecen en la tabla 6.

Los nombres de las estirpes constan de una letra que indica el lugar de origen (A, Departamento de Genética de la Universidad de Salamanca; C, Instituto de Tecnología de California; L, Departamento de Física de la Universidad de Syracuse; S, Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla) y de un número de aislamiento. La estirpe silvestre NRRL1555 proviene de la colección del Northern Regional Research Laboratory, USDA, Peoria, Illinois, USA.

El genotipo se indica con tres letras minúsculas que hacen referencia al proceso celular afectado, seguidas de una letra mayúscula que indica el gen y de un número de alelo. Cuando el gen alterado no ha sido definido aún se coloca un guión en lugar de la letra mayúscula. Las mutaciones mad afectan al fototropismo de los macróforos, car a la carotenogénesis, pic a la fotocarotenogénesis, geo al geotropismo, pde disminuye la actividad fosfodiesterasa de AMPc en un 80 %, flp elimina una determinada flavoproteína y nic produce auxotrofia para el ácido nicotínico. El símbolo (-) indica uno de los dos sexos de Phycomyces.

En el origen de cada estirpe se muestra la estirpe original y el mutágeno empleado para su aislamiento (NTG, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina; NQO, óxido de 4-nitroquinolina), así como las estirpes parentales si se obtuvieron a partir de un cruzamiento. Los heterocariontes se designan por el símbolo "*" entre los nombres de los dos núcleos que lo componen.

=====

Tabla 6. Estirpes de Phycomyces utilizadas en esta Tesis.

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
NRRL1555	(-)	silvestre
C21	<u>madA7 pde-1</u> (-)	NRRL1555, NTG
C111	<u>madB103</u> (-)	NRRL1555, NTG
L1	<u>madC119</u> (-)	C264 X C148
L51	<u>madA7 madB103</u> (-)	C303 X C21
L52	<u>madA7 madC119</u> (-)	L2 X C21
L57	<u>madB103 madC119</u> (-)	C303 X C148
L72	<u>madA7 madB103 madC119</u> (-)	L2 X L51
C149	<u>madD120</u> (-)	NRRL1555, NTG
C110	<u>madE102</u> (-)	NRRL1555, NTG
A329	<u>madF48</u> (-)	A56 X C316
C307	<u>madG131</u> (-)	C288 X NRRL1555
L83	<u>madH703</u> (-)	NRRL1555, NTG
S131	<u>madA7 carA158 pde-1</u> (-)	C21, NTG
S132	<u>madB104 carA159</u> (-)	C112, NTG
C2	<u>carA5 flp-701</u> (-)	NRRL1555, NTG
C5	<u>carB10 geo-10</u> (-)	NRRL1555, NTG
C9	<u>carR21</u> (-)	NRRL1555, NTG
S92	<u>carRA91</u> (-)	NRRL1555, NTG
S275	<u>carS42</u> (-)	C242 X (C115 * S102)
S508	<u>card174</u> (-)	S229 X A44
S283	<u>carA5 carS42 nicA101</u> (-)	C242 X (C115 * S102)
S470	<u>carA87 carS42</u> (-)	S200 X (S101 * S236)
S253	<u>picA2</u> (-)	NRRL1555, NTG
S252	<u>picB1</u> (-)	NRRL1555, NTG
A98	<u>carC652</u> (-)	NRRL1555, NQO

=====

MÉTODOS DE CULTIVO

Medio de cultivo

Los experimentos se realizaron incubando las esporas sobre agar mínimo (15 g l^{-1} de agar) con 2 g l^{-1} de L-asparagina·H₂O como fuente de nitrógeno (Cerdá Olmedo 1987b). El medio de cultivo se suplementó con 4 mg l^{-1} de ácido nicotínico para permitir el crecimiento de la estirpe S283, que es auxótrofa para este compuesto.

Inoculación

Los experimentos se iniciaron inoculando 10^5 esporas activadas por choque térmico (48°C durante 15 minutos) en 2 ml de agar de cobertera (agar mínimo con 7 gr l^{-1} de agar). Posteriormente se extendieron sobre cajas de Petri (8.5 cm de diámetro interno) que contenían 25 ml de agar mínimo.

Condiciones de incubación

Los cultivos se incubaron en una habitación termoestabilizada a 22°C durante 4 días.

Para investigar el efecto de la aireación sobre la forogénesis hemos utilizado tres tipos de cultivos:

Cultivos "herméticos": Se inoculan dos cajas de Petri y se colocan en un recipiente de plástico (2.4 litros) sellado con papel de parafina.

Cultivos "no herméticos": Se inoculan las cajas de Petri y se incuban sin apilar.

Cultivos "abiertos": Se inoculan dos cajas de Petri y se incuban sin la tapadera en una caja de madera cerrada (14 litros). Se coloca un vaso de precipitado con 20 ml de agua destilada para evitar la desecación del medio de cultivo.

Los cultivos incubados en iluminación continua se colocaron bajo una batería de lámparas fluorescentes dentro de una caja sin tapadera pero con las paredes y el fondo de cartón negro para evitar las reflexiones de la luz. Para modificar la intensidad de la luz incidente se incubaron dos cajas de Petri dentro de una caja de madera (14 litros) tapada por filtros.

Los destellos se aplicaron a micelios crecidos en oscuridad durante 48 horas colocados en el interior de un compartimento negro opaco. Los cultivos continuaron su crecimiento en oscuridad.

Los cultivos incubados en oscuridad se colocaron en el interior de cajas de cartón (87 litros) protegidos de la luz mediante cartulina y tela opaca.

Las manipulaciones de los cultivos en oscuridad se hicieron con la luz que se obtiene colocando delante de una lámpara filtros de plástico rojo (S10218; Mitsubishi Rayon Co.). Este plástico transmite menos del 1% por debajo de 595 nm. Durante las manipulaciones y las irradiaciones no se destaparon las cajas de Petri.

CUANTIFICACIÓN DE LA FOROGÉNESIS Y DEL CRECIMIENTO MICELIAR

Los micróforos se contaron bajo una lupa binocular (40x). El número total de micróforos por caja se estimó a partir de diferentes áreas tomadas al azar (al menos 200 micróforos en total) contadas a través de un retículo calibrado.

Los macróforos se recogieron de los micelios, se secaron a 105°C durante 14-16 horas y se pesaron. Los macróforos son muy difíciles de contar, pero en nuestras condiciones de trabajo su peso seco es de unos 120 µg (Gruen 1959), lo que puede permitir una estimación del número de macróforos por caja.

El crecimiento miceliar se estimó secando los micelios a 105°C durante 14-16 horas y pesándolos posteriormente.

ILUMINACIÓN DE LOS CULTIVOS

Como fuente de luz blanca utilizamos una batería de cuatro lámparas fluorescentes (Sylvania F40T1210) colocadas sobre un cristal difusor. Los cultivos quedan expuestos a 0.6 W m^{-2} . El experimento de la figura 13 utilizó luz blanca procedente de una lámpara de cuarzo-halógeno (Sylvania FCS, 150 W) colocada en un proyector de diapositivas (Hanimex 2100EF); los cultivos recibieron 10 W m^{-2} .

Para la iluminación continua con luz azul colocamos sobre las cajas de incubación una lámina de plástico azul (Röhm and Haas 2424, Philadelphia, PA, USA; transmisión máxima a 465 nm) y varias láminas de plástico neutro para ajustar la intensidad (Plexiglas G, Röhm and Haas). En estos experimentos utilizamos dos tipos de lámparas: para intensidades mayores de 10^{-6} W m^{-2} usamos lámparas fluorescentes (Sylvania F15T8/CW) y para las menores de 10^{-6} W m^{-2} usamos tres lámparas incandescentes (25 W, Tensor Corp., Brooklyn, NY, USA) conectadas a un transformador con voltaje variable. Los dos tipos de lámparas dieron resultados similares en experimentos realizados a 10^{-6} W m^{-2} .

Los destellos azules se obtuvieron de una lámpara de cuarzo-halógeno (Sylvania FCS, 150 W) colocada en un proyector de diapositivas (Hanimex 2100ER). El rayo de luz pasaba a través de dos filtros térmicos (KG-1; Schott, Mainz, Alemania Occidental), filtros de densidad neutra (tipo NG; Schott) y un filtro azul (5-61; Corning Glass Works, Corning, NY, USA; máxima transmisión alrededor de 440 nm).

Para los destellos monocromáticos utilizamos una lámpara de cuarzo-halógeno (Sylvania EXW, 300 W) en un proyector de diapositivas (Kodak Ektagraphic IIIIE). La luz emitida por la lámpara se ajustó con un transformador de voltaje variable. El rayo de luz pasaba a través del mismo bloque de filtros descrito en el párrafo anterior excepto que el filtro de luz azul se cambió por filtros de interferencia de la longitud de onda deseada (banda de transmisión con una anchura de 9-12 nm; Balzers, Liechtenstein). Los filtros de interferencia

suelen tener un pico secundario de transmisión de luz azul varios órdenes de magnitud por debajo del pico principal. Phycomyces es muy sensible a la luz azul y estos picos secundarios pueden enmascarar la actividad de las longitudes de onda menos efectivas (del ultravioleta cercano, del verde y del rojo). Para eliminar estos picos secundarios colocamos una serie de filtros adicionales al medir las respuestas en estas regiones del espectro: a 347 nm colocamos un filtro que transmite el ultravioleta cercano (UG-11; Schott); a 530 y 575 nm colocamos un filtro opaco para longitudes de onda menores de 530 nm (OG-530; Schott); a 606 y 634 nm colocamos tres filtros de plástico rojo (Sl0218; Mitsubishi Rayon Co.), que transmite menos del 1% por debajo de 595 nm.

MEDICIÓN DE LA LUZ

Las medidas de la luz se hicieron con un fotodiodo de silicio (PIN-10DP/SB y UDT-UV100; United Detector Technology, Hawthorne, CA, USA) conectado a un picoamperímetro (610B y 480; Keithley Instruments, Cleveland, OH, USA). Los fotodiodos se calibraron con un termopar (E4, Eppley Laboratory, Newport, RI, USA) conectado a un microvoltímetro (modelo 197; Keithley Instruments, Cleveland, OH, USA). Las medidas y las calibraciones se realizaron como aparece descrito en Galland y Lipson (1987c).

ANÁLISIS MATEMÁTICO

Los resultados obtenidos al iluminar con destellos se sometieron en un ordenador a una regresión no lineal por el método de los mínimos cuadrados. El ajuste se hizo para la función

$$y = 1 + ax/(x+b) + cx/(x+d)$$

donde x es la exposición; y es el cociente entre la cantidad de esporangióforos obtenidos con luz y sin luz; y a , b , c y d

son parámetros ajustables. Cada uno de los componentes $ax/(x+b)$ y $cx/(x+d)$ da lugar a una hipérbola cuando y es representado en función de x y a una sigmoide simétrica cuando y es representado en función del logaritmo de x , como hemos hecho en este trabajo. Los parámetros a y c son positivos para la macroforogénesis y negativos para la microforogénesis y representan la amplitud ("altura") de cada uno de los componentes. El programa del ordenador proporcionó estimaciones de los parámetros, así como de sus desviaciones típicas (derivadas de los errores experimentales). Los parámetros b y d son las exposiciones en los puntos de inflexión (mitad del valor máximo) de los dos componentes.

Las ordenadas de los espectros de acción se definieron como los recíprocos de b y d . Las barras de error se dibujaron sabiendo que los errores relativos de una cantidad y de su recíproca son iguales.

BIBLIOGRAFÍA

- Bejarano, E.R., Parra, F., Murillo, F.J., Cerdá Olmedo, E. (1988) End-product regulation of carotenogenesis in Phycomyces. Arch. Microbiol. 150, 209-214
- Bennett, J.W., Lassure, L.L. (eds.) (1985) Gene Manipulations in Fungi. Academic Press Inc. Orlando, Florida
- Bergman, K. (1972) Blue-light control of sporangiophore initiation in Phycomyces. Planta 107, 53-67
- Bergman, K., Burke, P.V., Cerdá Olmedo, E., David, C.N., Delbrück, M., Foster, K.W., Goodell, E.W., Heisenberg, M., Meissner, G., Zalokar, M., Dennison, D.S., Shropshire, W. (1969) Phycomyces. Bacteriol. Rev. 33, 99-157
- Brenner, S. (1974) The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics 77, 71-94
- Calpouzos, L., Chang, H.-S. (1971) Fungus spore germination inhibited by blue and far red radiation. Plant Physiol. 47, 729-730
- Cerdá Olmedo, E. (1985) Carotene mutants of Phycomyces. Methods in Enzymology 110, 220-243
- Cerdá Olmedo, E. (1987a) Carotene. En: Phycomyces, pp. 199-221, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Cerdá Olmedo, E. (1987b) Standard growth conditions and variations. En: Phycomyces, pp. 337-339, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Cerdá Olmedo, E., Lipson, E.D. (eds.) (1987a) Phycomyces. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Cerdá Olmedo, E., Lipson, E.D. (1987b) A biography of Phycomyces. En: Phycomyces, pp. 7-26, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Cordonier, M.M. (1987) Recent advances in the study of the protein moiety of phytochrome. En: From photobiophysics to photobiology, pp. 229-244, A. Favre, R. Tyrrell, J. Cadet, eds., Elsevier, Amsterdam
- Degli-Innocenti, F., Pohl, U., Russo, V.E.A. (1983) Photoinduction of protoperithecia in Neurospora crassa by blue light. Photochem. Photobiol. 37, 49-51
- Delbrück, M., Galle, H.K. (1978) Phycomyces blakesleeanus (Mucorales) Vegetative life cycle. Film E 2159 der Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen

Delbrück, M., Reichardt, W. (1956) System analysis for the light growth reactions of Phycomyces. En: Cellular Mechanisms in Differentiation and Growth, pp. 3-44, D. Rudnick ed., Princeton University Press, New Jersey

Delbrück, M., Shropshire, W. (1960) Action and transmission spectra of Phycomyces. Plant Physiol. 35, 194-204

Edgar, R.S. (1980) The genetics of development in the nematode Caenorhabditis elegans. En: The Molecular Genetics of Development, pp. 213-235, T. Leighton y W.F. Loomis eds., Academic Press, New York

Eslava, A.P. (1987) Genetics. En: Phycomyces, pp. 27-48, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Eslava, A.P., Alvarez, M.I., Lipson, E.D. Presti, E.D., Kong, K. (1976) Recombination between mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. Molec. Gen. Genet. 147, 235-241

Fukshansky, L., Steinhardt, A.R. (1987) Spatial factors in Phycomyces phototropism: analysis of balanced responses. J. Theor. Biol. 129, 301-323

Galland, P. (1983) Action spectra of photogeotropic equilibrium in Phycomyces wild type and three behavioral mutants. Photochem. Photobiol. 37, 221-228

Galland, P. (1987) Action Spectroscopy. En: Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms, vol. II, pp. 37-52, H. Senger ed., CRC Press, Boca Raton, Florida

Galland, P., Lipson, E.D. (1985a) Action spectra for phototropic balance in Phycomyces: dependence on reference wavelength and intensity range. Photochem. Photobiol. 41, 323-329

Galland, P., Lipson, E.D. (1985b) Modified action spectra of photogeotropic equilibrium in Phycomyces blakesleeianus mutants with defects in genes madA, madB, madC, and madH. Photochem. Photobiol. 41, 331-335

Galland, P., Lipson, E.D. (1987a) Blue-light reception in Phycomyces phototropism: evidence for two photosystems operating in low- and high- intensity ranges. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 104-108

Galland, P., Lipson, E.D. (1987b) Light physiology of Phycomyces sporangiophores. En: Phycomyces, pp. 49-92, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York

- Galland, P., Lipson, E.D. (1987a) Light calibrations and radiometric units. En: Phycomyces, pp. 375-379, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Galland, P., Ootaki, T. (1987) Differentiation and cytology. En: Phycomyces, pp. 281-316, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Galland, P., Russo, V.E.A. (1979a) Photoinitiation of sporangiophores in Phycomyces mutants deficient in phototropism and mutants lacking beta-carotene. Photochem. Photobiol. 29, 1009-1014
- Galland, P., Russo, V.E.A. (1979b) The role of retinol in the initiation of sporangiophores of Phycomyces blakesleeana. Planta 146, 257-262
- Galland, P., Russo, V.E.A. (1984) Light and dark adaptation in Phycomyces phototropism. J. Gen. Physiol. 84, 101-118
- Galland, P., Senger, H. (1988) The role of flavins as photoreceptors. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1, 277-294
- Garcés, R., Medina, J.R. (1985) Light-dependent decrease in alcohol dehydrogenase activity of Phycomyces. Exp. Mycol. 9, 94-98
- Grehn, J. (1932) Untersuchungen über Gestalt und Funktion des Sporangienträger bei den Mucorineen. I. Entwicklungsgeschichte der Sporangienträger. Jahrb. Wiss. Bot. 76, 93-165
- Gressel, J.B., Hartmann, K.M. (1968) Morphogenesis in Trichoderma: Action spectrum of photoinduced sporulation. Planta (Berl.) 79, 271-274
- Gressel, J.B., Rau, W. (1983) Photocontrol of fungal development. En: Photomorphogenesis. Encyclopedia of Plant Physiology New Series, vol. 16B, pp. 603-639, W. Shropshire y H. Mohr eds., Springer-Verlag, Berlin
- Gruen, H.E. (1959) Growth and development of isolated Phycomyces sporangiophores. Plant Physiol. 34, 158-168
- Gutiérrez Corona, F., Cerdá Olmedo, E. (1985) Environmental influences in the development of Phycomyces sporangiophores. Exp. Mycol. 9, 56-63
- Gutiérrez Corona, F., Cerdá Olmedo, E. (1988) Genetic determination of sporangiophore development in Phycomyces. Develop. Genet. En prensa
- Hartmann, K.M. (1983) Action Spectroscopy. En: Biophysics, pp.115-144, W. Hoppe et al. eds., Springer-Verlag, Berlin

- Hilgenberg, W., Hofmann, F. (1977) Tryptophansynthase in Phycomyces blakesleeianus. Teil II: Tryptophansynthaseaktivität des Pilzes in Abhängigkeit von Lichtbedingungen und vom Zinkgehalt des Kulturmediums. *Physiol. Plant* 40, 235-238
- Hilgenberg, W., Sandmann, G., Hofmann, F. (1980) Der Einfluss von Indol-3-Essigsäure auf das Wachstum von Phycomyces blakesleeianus und deren quantitative Bestimmung im Pilz. *Z. Pflanzenphysiol.* 97, 89-94
- Jayaram, M., Presti, D., Delbrück, M. (1979) Light-induced carotene synthesis in Phycomyces. *Exp. Mycol.* 3, 42-52
- Jayaram, M., Leutwiler, L., Delbrück, M. (1980) Light-induced carotene synthesis in mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. *Photochem. Photobiol.* 32, 241-245
- Kumagai, T. (1988) Photocontrol of fungal development. *Photochem. Photobiol.* 47, 889-896
- Lipson, E.D., López Díaz, I., Pollock, J.A. (1983) Mutants of Phycomyces with enhanced tropism. *Exp. Mycol.* 7, 241-252
- Lipson, E.D., Terasaka, D.T. (1981) Photogeotropism in Phycomyces double mutants. *Exp. Mycol.* 5, 101-111
- López Díaz, I., Cerdá Olmedo, E. (1980) Relationship of photocarotenogenesis to other behavioural and regulatory responses in Phycomyces. *Planta* 150, 134-139
- López Díaz, I., Cerdá Olmedo, E. (1981) Light-controlled phorogenesis and mycelial growth in Phycomyces mutants. *Current Genet.* 3, 23-26
- López Díaz, I., Lipson E.D. (1983) Genetic analysis of hypertropic mutants of Phycomyces. *Molec. Gen. Genet.* 190, 318-325
- Medina, J.R., Cerdá Olmedo, E. (1977) Allelic interaction in the photogeotropism of Phycomyces. *Exp. Mycol.* 1, 286-292
- Nasmyth, K.A. (1982) Molecular genetics of yeast mating type. *Ann. Rev. Genet.* 16, 439-500
- Nurse, P. (1985) Cell cycle control in yeast. *Trends in Genetics* 1, 51-55
- Ootaki, T., Fischer, E.P., Lockhart, P. (1974) Complementation between mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. *Molec. Gen. Genet.* 131, 233-246
- Ortiz Castellanos, M.L., Gutiérrez Corona, F. (1988) The sensitive period for light and temperature regulation of sporangioophore development in Phycomyces. *Planta* 174, 305-308

- Poe, R.C., Pratap, P., Lipson, E.D. (1986) System analysis of Phycomyces light-growth response: double mutants. *Biol. Cybern.* 55, 105-113
- Presti, D.E. (1983) The photobiology of carotenes and flavins. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 36, 133-180
- Presti, D.E., Galland, P. (1987) Photoreceptor biology of Phycomyces. En: Phycomyces, pp. 93-126, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Presti, D.E., Hsu, W.-J., Delbrück, M. (1977) Phototropism in Phycomyces mutants lacking beta-carotene. *Photochem. Photobiol.* 26, 403-405
- Rau, W., Schrott, E.L. (1987) Blue light control of pigment biosynthesis- Carotenoid biosynthesis. En: *Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms*, vol. I, pp. 43-63, H. Senger ed., CRC Press, Boca Raton, Florida
- Revuelta, J.L., Eslava, A.P. (1983) A new gene (carC) involved in the regulation of carotenogenesis in Phycomyces. *Molec. Gen. Genet.* 192, 225-229
- Rodriguez Aparicio, L.B., Rua, J., De Arriaga, D., Soler, J. (1987) Light-induced effects of several enzymes of carbohydrate metabolism in Phycomyces blakesleeanus. *Int. J. Biochem.* 19, 1211-1215
- Rüdiger, W. (1987) Phytochrome: the chromophore and photo-conversion. En: *From photobiophysics to photobiology*, pp. 217-227, A. Favre, R. Tyrrell, J. Cadet, eds., Elsevier, Amsterdam
- Rudolph, H. (1958) Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an den Sporangioophoren von Phycomyces blakesleeanus. *Biol. Zentralbl.* 77, 385-437
- Russo, V.E.A. (1977) The role of blue light in synchronization of growth and inhibition of differentiation of stage I sporangioophore of Phycomyces blakesleeanus. *Plant Sci. Lett.* 10, 373-380
- Russo, V.E.A., Galland, P., Toselli, M., Volpi, L. (1980) Blue light induced differentiation in Phycomyces blakesleeanus. En: *The Blue Light Syndrome*, pp. 563-569, H. Senger, ed. Springer, Berlin
- Russo, V.E.A., Pohl, U., Volpi, L. (1981) Carbon dioxide inhibits sporogenesis in Phycomyces and blue light overcomes this inhibition. *Photochem. Photobiol.* 34, 233-236

Sandmann, G., Hilgenberg, W. (1978) Der lichtabhängige Intermediärstoffwechsel von Phycomyces blakesleeanus Bgff. I Die CO₂-Fixierungsreaktion. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 173, 390-395

Sandmann, G., Hilgenberg, W. (1980) The light-dependent intermediary metabolism of Phycomyces blakesleeanus Bgff. II. Formation and degradation of oxalacetic acid. *Z. Pflanzenphysiol. Bol.* 96. S. 203-210

Schäfer, E., Briggs, W.R. (1986) Photomorphogenesis from signal perception to gene expression. *Photobioch. Photobiop.* 12, 305-320

Schäfer, E., Fukshansky, L. (1984) Action Spectroscopy. En: *Techniques in Photomorphogenesis*, pp. 109-129, H. Smith y M.G. Holmes eds., Academic Press, Londres

Senger, H. ed. (1980) *The Blue Light Syndrome*. Springer-Verlag, Berlin

Senger, H. ed. (1984) *Blue Light Effects in Biological Systems*. Springer-Verlag, Berlin

Senger, H. ed. (1987) *Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms*. CRC Press, Boca Ratón, Florida

Shropshire, W., Lafay, J.F. (1987) Sporangiphore and mycelial responses to stimuli other than light. En: Phycomyces, pp. 127-154, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Shropshire, W., Mohr, H. (eds.) (1983) *Photomorphogenesis*. *Encyclopedia of Plant Physiology New Series*, vol. 16A y B, Springer, Berlin

Smith, H., Holmes, M.G. (eds.) (1984) *Techniques in photomorphogenesis*. Academic Press, Londres

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1979) *Biometria*, H. Blume Ediciones, Madrid

Song, P.-S. (1987) Possible primary photoreceptors. En: *Blue Light Responses: Phenomena and Occurrence in Plants and Microorganisms*, vol. II, pp. 3-17, H. Senger ed., CRC Press, Boca Ratón, Florida

Sutter, R.P. (1987) Sexual development. En: Phycomyces, pp. 317-336, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Thornton, R.M. (1972) Alternative fruting pathways in Phycomyces. *Plant Physiol.* 49, 194-197

- Thornton, R.M. (1973) New photoresponses of Phycomyces. Plant Physiol. 51, 570-576
- Thornton, R.M. (1975) Photoresponses of Phycomyces blakesleeanus: initiation and development of sporangiophore primordia. Amer. J. Bot. 62, 370-378
- Timberlake, W.E. (ed.)(1985) Molecular Genetics of Filamentous Fungi. Alan R. Liss Inc., New York
- Timberlake, W.E. (1987) Molecular genetic analysis of development in Aspergillus nidulans. En: Genetic Regulation of Development, pp. 63-82, W.F. Loomis ed., Alan R. Liss Inc., New York
- Timberlake, W.E., Marshall, M.A. (1988) Genetic regulation of development in Aspergillus nidulans. Trends in Genetics 4, 162-169
- Trad, C.H., Lipson, E.D. (1987) Biphasic fluence-response curves and derived action spectra for light-induced absorbance changes in Phycomyces mycelium. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1, 305-313
- Van Laere, A.J., Van Assche, J.A. y Furch, B. (1987) The sporangiospore: dormancy and germination. En: Phycomyces, pp. 247-279, E. Cerdá Olmedo y E.D. Lipson eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Whitaker, B.D., Shropshire, W. (1981) Spectral sensitivity in the blue and near ultraviolet for light-induced carotene synthesis in Phycomyces mycelia. Exp. Mycol. 5, 243-252

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar aquí mi agradecimiento a todas las personas que, de una manera u otra, me han ayudado a realizar este trabajo:

A Enrique Cerdá Olmedo, por su confianza y apoyo en la realización de esta Tesis, por las horas dedicadas, por enseñarme un poco de todo.

A los compañeros: Juan Ramón, Edu, Paco L., Choni, Andrés, Rafa, Pepe, Isabel, Reyes, Maria José, Javier, Luis Miguel, Curro, Beatriz, Norman, Danka, Tahia, Enca, Cayo, Quique, Juan, Antonio, Pepe Córdoba y Asun. Todos hicieron muy agradables las horas que pasé en el Departamento. A Eduardo, que soportó estoicamente y discutió mis teorías sin piedad. Al Prof. José Ruiz Herrera, por sus comentarios y sugerencias.

A Ed Lipson y, muy especialmente, a Paul Galland, por su hospitalidad en Syracuse y por las horas dedicadas a enseñarme fotobiología.

A Anu Palit, Promod Pratap y Dave Durant, que me ayudaron a realizar el análisis matemático de los resultados.

Al Prof. José Lozano Campoy, del Departamento de Física de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Sevilla, por cederme amablemente el picoamperímetro.

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a Eva por su apoyo, su paciencia y su interés. Su presencia y su estímulo constante han sido fundamentales para el buen término de esta Tesis.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Luis María Corrochano Peláez titulada Fotomorfogénesis de Phycomyces.

acordó otorgarle la calificación de APTO "Cum Laude"

Sevilla, 4 de Noviembre 1988

El Vocá,

J. L. Barbero

El Presidente

El Vocá,

[Signature]

El Secretario,

El Vocal,

[Signature]

El Doctorado,

[Signature]

[Signature]

[Signature]



500586441

FBI E TD-154

586441