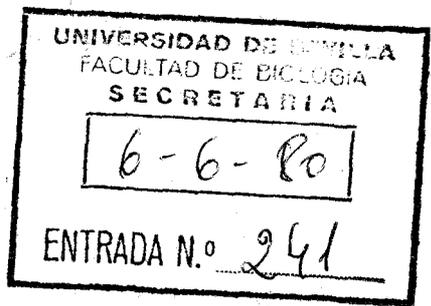


T.D.
28



R. 4053

GENETICA DE *PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS*

Trabajo realizado en el Departamento de Genética,
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para
optar al grado de Doctor en Biología, por la Licen-
ciada

M. ISABEL GONZALEZ RONCERO

M.º Isabel González

Sevilla, Junio de 1980

Director y Ponente

R. Cerda Olmedo

Profesor Enrique Cerda Olmedo
Director del Departamento de Genética

T.D. 28



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA

BIBLIOTECA

T0
28

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral Genética de *Pleurococcus*
blekesleanus

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado:

M. Isabel González

Córdoba Sevilla, a 6 de Abril de 1995

A mis padres

RESUMEN

En esta Tesis se ha investigado la inducción, expresión y detección de mutaciones en *Phycomyces* y se ha estudiado la carotenogénesis a través del análisis genético por recombinación de los varios tipos de mutantes existentes. Se concluye que:

1. Entre las condiciones de cultivo estudiadas, la producción de esporas es máxima cuando se siembran alrededor de 10^5 esporas en medio nutritivo. La recolección de esporas debe hacerse entre seis y ocho días después de haber inoculado los cultivos.

2. El tratamiento con nitrosoguanidina es más efectivo si la activación de las esporas se hace inmediatamente antes del mismo que si se hace después.

3. Algunos núcleos se dividen a las dos horas de haber activado las esporas; la división nuclear no es sincrónica entre los núcleos de una misma célula ni entre las células de un cultivo.

4. Los tratamientos con nitrosoguanidina se deben hacer con esporas recién activadas. Para maximizar el número absoluto de mutantes inducidos en una población de esporas se deben aplicar dosis que conduzcan a una supervivencia del 20%. Cuando se desee maximizar la frecuencia de mutantes inducidos entre los supervivientes, se debe aumentar la dosis en lo posible; en este caso se recomienda la exposición a 100 $\mu\text{g/ml}$ de nitrosoguanidina durante 10 minutos, que conduce a una supervivencia del orden del 3%.

5. Las células con mutaciones *dar* inducidas necesitan un largo período de crecimiento en ausencia de 5-deazarriboflavina, mayor de seis horas, para hacer efectiva la resistencia al inhibidor. Es muy conveniente, por tanto, permitir un ciclo vegetativo completo (reciclar) a las esporas tratadas para que se expresen estas mutaciones y otras similares que hayan podido ser inducidas y para eliminar supervivientes defectuosos.

6. El reciclado de esporas tratadas puede hacerse sembrando unas 10^5 esporas viables por caja, con buenas perspectivas de encontrar mutantes entre las esporas que se cosechen.

7. Cuando en un mismo cultivo se siembran muchas esporas de una estirpe y pocas de otra, se suele encontrar selección a favor de las esporas minoritarias.

8. Se ha diseñado una técnica genética que permite seleccionar una mayoría de esporas funcionalmente uninucleadas y aumentar así la frecuencia de mutantes recesivos detectados.

9. Las mutaciones *carA* y *mad*, responsables del fenotipo blanco ciego de algunos mutantes, afectan a genes independientes situados en distintos cromosomas, relativamente próximos a los centrómeros respectivos.

10. Las mutaciones *car-113* y *carI131*, que bloquean la estimulación de la carotenogénesis por la vitamina A y otros productos químicos, afectan a dos genes independientes; la primera de ellas afecta pro-

bablemente al gen *carA*. Los dobles mutantes *carA carI* son de color blanco y no estimulables por vitamina A.

11. Las mutaciones *carA* y *carS* afectan a genes distintos, que se encuentran ligados en el mismo cromosoma a una distancia del 34% de recombinación. Los dobles mutantes *carA carS* son amarillos y su carotenogénesis no es fotoinducible.

12. Las mutaciones *carB* y *carA* afectan a genes distintos, muy próximos en el mismo cromosoma.

En consecuencia, las dos funciones estructurales conocidas de la carotenogénesis (deshidrogenasa del fitoeno y ciclasa del licopeno) y una función reguladora (transporte de sustratos) dependen de un pequeño segmento del genomio, otra función reguladora (repressor) depende de un segmento algo alejado en el mismo cromosoma, y una función intermediaria de la estimulación química es genéticamente independiente de las anteriores.

INDICE DE MATERIAS

RESUMEN	1
INDICE DE MATERIAS	4
INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE TABLAS	9
INTRODUCCION	
CICLO DE VIDA	13
<i>Ciclo asexual</i>	13
<i>Ciclo sexual</i>	16
MATERIAL GENETICO	18
MUTAGENESIS	18
<i>Mutaciones inducidas por la nitro-</i> <i>soguanidina</i>	18
<i>Selección de esporas uninucleadas</i> <i>y búsqueda de mutantes recesivos</i> <i>en Phycomyces</i>	20
CRUZAMIENTOS EN PHYCOMYCES	23
<i>Meiosis</i>	23
<i>Clasificación de las tétradas</i>	24
<i>Cruzamientos realizados en Phyco-</i> <i>myces</i>	26
CAROTENOGENESIS	28
<i>Funciones estructurales</i>	30
<i>Funciones reguladoras</i>	31
<i>Mutantes insensibles a la estimula-</i> <i>ción por agentes químicos</i>	32
MATERIALES Y METODOS	
ESTIRPES	35
METODOS DE CULTIVO	39
<i>Medios de crecimiento</i>	39
<i>Inoculación</i>	41
<i>Condiciones de cultivo</i>	42
<i>Reciclado y recolección de esporas</i> ..	42

PROPORCION DE NUCLEOS EN HETEROCARIONTES ..	43
FOTOINDUCCION	43
ANALISIS DE CAROTENOIDES	44
CRUZAMIENTOS	44
MUTAGENESIS	44
BUSQUEDA Y CARACTERIZACION DE MUTANTES	45
TINCION DE NUCLEOS	46
<i>Soluciones utilizadas en esta tincion</i>	47
RESULTADOS Y DISCUSION	
CAPITULO I	
OBSERVACIONES PRELIMINARES	49
I.1. <i>Producción de esporas</i>	49
I.2. <i>Activación de esporas para el tratamiento mutagénico</i>	52
I.3. <i>Número de núcleos en esporas y su variación durante la germinación</i>	53
CAPITULO II	
MUTAGENESIS	58
II.1. <i>Relación entre dosis de nitrosoguanidina y efectos letales y mutagénicos</i>	58
II.2. <i>Efecto de la germinación en la mutagénesis</i>	59
II.3. <i>Expresión de mutaciones recesivas</i>	63
II.4. <i>Selección de células funcionalmente uninucleadas</i>	63
II.5. <i>Determinación de la densidad de siembra adecuada para el reciclado</i>	66

Discusión

1. <i>Letalidad e inducción de mutaciones</i>	70
2. <i>Expresión de mutaciones</i>	71
3. <i>Detección de mutaciones recesivas</i>	72
4. <i>Reciclado de esporas</i>	73

CAPITULO III

ANALISIS GENETICO POR RECOMBINACION	75
III.1. <i>Análisis genético de los mutantes blancos ciegos</i>	75
III.2. <i>Análisis genético del fenotipo I.</i>	77
III.3. <i>Análisis genético de los fenotipos A y S</i>	80
III.3.a. <i>Cruzamiento de una estirpe de fenotipo A por una de fenotipo S</i>	80
III.3.b. <i>Cruzamiento de una estirpe de fenotipo AS por una silvestre</i>	82
III.4. <i>Análisis genético de los fenotipos B, R y A</i>	84

Discusión

1. <i>Mutantes blancos ciegos</i>	88
2. <i>Fenotipo I</i>	89
3. <i>Fenotipos A y S</i>	90
4. <i>Fenotipos B, R y A</i>	91

BIBLIOGRAFIA	94
--------------------	----

AGRADECIMIENTOS	103
-----------------------	-----

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida asexual de *Phycomyces blakesleeanus*. 1
- Figura 2. Ciclo de vida sexual de *Phycomyces blakesleeanus*. 1
- Figura 3. Esquema general de la biosíntesis de carotenos. 2
- Figura 4. Producción de esporas por caja de medio GAELA y PALA en función de la densidad de siembra. 5
- Figura 5. Promedio de núcleos por célula durante la germinación de esporas activadas e incubadas en medio nutritivo. 5
- Figura 6. Supervivencia y frecuencia de revertientes Nic^+ tras el tratamiento de esporas S102 (*nicA101*) con nitrosoguanidina, en función de la dosis (concentración molar de nitrosoguanidina por tiempo de tratamiento). 6
- Figura 7. Número de revertientes Nic^+ de la estirpe S102 (*nicA101*) por cada 10^6 viables y por cada ml de cultivo, en función de la supervivencia al tratamiento con nitrosoguanidina. 6
- Figura 8. Frecuencia de mutantes Dar^R inducidos en la estirpe S102 (*nicA101*) en función de las horas de incubación antes de nitrosoguanidina. 6

- Figura 9. Frecuencia de mutantes Dar^R inducidos en la
estirpe B142 en función de las horas de incu-
bación después de nitrosoguanidina.64
- Figura 10. Aspecto de los micelios procedentes de ger-
moesporas del germoesporangio "a".....86
- Figura 11. Aspecto de los micelios procedentes de ger-
moesporas del germoesporangio "b".86

INDICE DE TABLAS

TABLA I.	Relaciones de ligamiento en <i>Phycomyces</i>	27
TABLA II.	Estirpes de <i>Phycomyces</i> utilizadas en esta Tesis.	36
TABLA III.	Estirpes heterocariontes de <i>Phycomyces</i> utilizadas en esta Tesis.	38
TABLA IV.	Esporas producidas en cajas con distintos medios de cultivo sembradas con 10^5 esporas de la estirpe silvestre NRRL1555.	49
TABLA V.	Esporas producidas en un cultivo de la estirpe silvestre NRRL1555 en medio GAELA en función de los días de crecimiento.....	50
TABLA VI.	Efectos letal y mutagénico de la nitrosoguanidina en la estirpe S102, según se activen las esporas inmediatamente antes o después del tratamiento.....	53
TABLA VII.	Distribución del número de núcleos en esporas recién activadas e incubadas el tiempo indicado tras la activación.	55
TABLA VIII.	Estimación del número de esporas que pueden reproducirse en una misma caja de Petri.	68
TABLA IX.	Estimación del número de esporas que pueden reproducirse en una misma caja de Petri.	69

TABLA X.	Análisis de tétradas en cruzamientos de diversas estirpes blancas ciegas por la silvestre UBC21.	76
TABLA XI.	Análisis genético del fenotipo I y del fenotipo A.	79
TABLA XII.	Cruzamiento entre una estirpe de fenotipo A y una de fenotipo S.	81
TABLA XIII.	Cruzamiento entre una estirpe de fenotipo AS y una silvestre.	83
TABLA XIV.	Situación de <i>carB</i> respecto de <i>carRA</i>	87

INTRODUCCION

Phycomyces blakesleeanus es un hongo en el que se están estudiando procesos biológicos de gran interés. Es un eucarionte fácilmente manejable en el laboratorio y relativamente poco complejo, en el sentido de que su genomio contiene sólo unas seis veces más ADN que el de la bacteria *Escherichia coli*.

Tiene unas respuestas sensoriales muy variadas y complejas, por lo que se presta para estudios de comportamiento. Su morfología y sus ciclos de vida asexual y sexual son relativamente variados e implican una serie de influencias ambientales e interacciones intercelulares, que hacen interesantes las investigaciones sobre diferenciación y desarrollo. Los estudios de síntesis de β -caroteno y su regulación disponen de una colección de mutantes coloreados muy bien caracterizados.

El cultivo de *Phycomyces* en medios sólidos o líquidos no presenta dificultades especiales. Los estudios genéticos de recombinación y complementación son factibles, aunque no con la rapidez y sencillez de otros hongos. La naturaleza multinucleada de los micelios y el comportamiento nuclear durante el ciclo asexual hacen a *Phycomyces* particularmente apropiado para estudios de complementación cuantitativa.

El enfoque genético para la investigación de los problemas biológicos exige disponer de mutantes apropiados. En *Phycomyces* la obtención de mutantes se ve dificultada por la naturaleza multinucleada de todas las fases del ciclo vegetativo, incluyendo las esporas: las mutaciones recesivas no se expresan cuando un núcleo es mutante y los demás silvestres. El presente trabajo está dedicado, en parte, a la investigación

y puesta a punto de métodos de inducción, detección y aislamiento de mutaciones recesivas en las esporas multinucleadas de *Phycomyces*.

Por otro lado, hemos abordado el proceso de la carotenogénesis en *Phycomyces* usando sistemáticamente como técnica el análisis genético por recombinación.

CICLO DE VIDA

El género *Phycomyces* pertenece a la clase Cigomicetos, al orden Mucorales y a la familia Mucoráceas. Su micelio es unicelular, multinucleado y con hifas ramificadas. Tiene un ciclo de vida sexual y otro asexual.

Ciclo asexual

El ciclo asexual (Fig. 1) comienza con la germinación de una espora. Aproximadamente el 99% de las esporas vegetativas son multinucleadas y el 83% contienen 3-4 núcleos (Heisenberg y Cerdá Olmedo, 1968).

Las esporas permanecen viables durante mucho tiempo, aunque no se den las circunstancias adecuadas para la germinación. Cuando se siembran esporas en medios nutritivos sólo el 3%, aproximadamente, de ellas germina espontáneamente (Sommer y Halbsguth, 1957; Rudolph, 1961). Se conocen métodos físicos y químicos que inducen

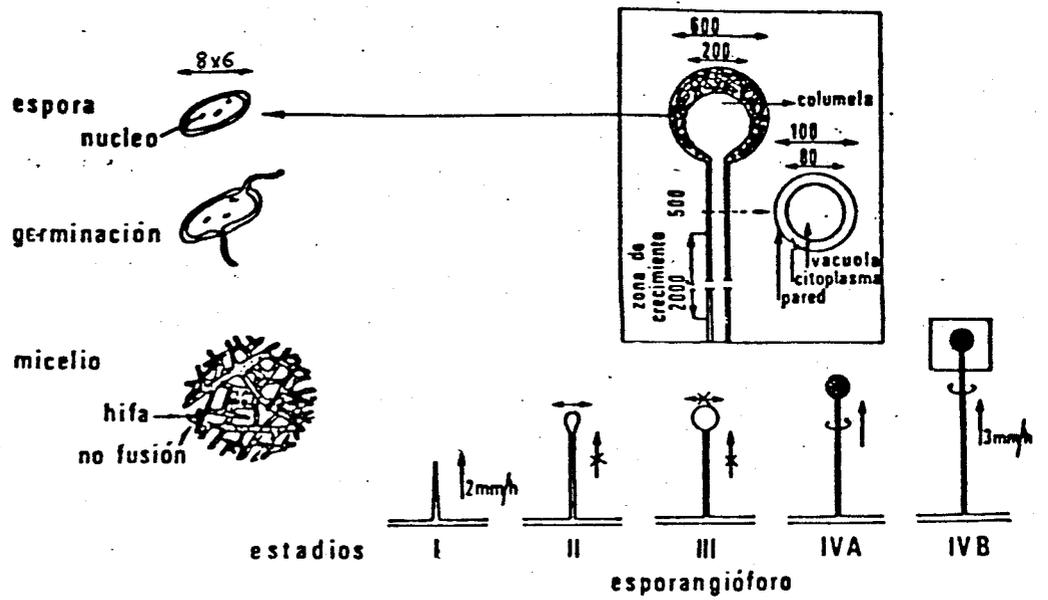


Figura 1. Ciclo de vida asexual de *Phycomyces blakesleeenanus*. Las dimensiones típicas de las principales estructuras están dadas en μm .

la germinación en la mayoría de las esporas sembradas en medios nutritivos. Normalmente se usa el calentamiento durante 15 minutos a 48°C por ser fácil y muy efectivo (Halbsguth y Rudolph, 1959; Rudolph, 1960). Los procesos de activación y germinación de las esporas han sido objeto de numerosos estudios morfológicos y bioquímicos (Rudolph y Furch, 1970; Keyhani et al., 1972; Malhotra y Tewari, 1973; Marouf y Malhotra, 1976; Furch y Pambor, 1978; Van Assche et al., 1978; Pambor, 1979).

Después de su germinación las esporas producen un micelio ramificado, con hifas cilíndricas multinucleadas. Este micelio y el número de núcleos contenidos en él crecen ilimitadamente. En todo el ciclo de vida los núcleos se dividen por elongación y constricción sin pérdida aparente de la membrana nuclear (Robinow, 1957; Franke y Reau, 1973).

A los 2-3 días de crecimiento en condiciones apropiadas, el micelio comienza a emitir hifas aéreas llamadas esporangióforos. Dichos esporangióforos atraviesan distintos estadios de desarrollo (Errera, 1884; Gruen, 1959). Tras un período de crecimiento (estadio I) el esporangióforo diferencia un esporangio apical (estadio II), dentro del cual se forman las esporas por una tabicación de porciones de citoplasma (estadio III). Cada esporangio puede tener unas 10^5 esporas. A continuación el esporangióforo crece durante mucho tiempo con parámetros muy constantes (estadio IV); en este estadio se han hecho la mayoría de los estudios del comportamiento (Bergman et al., 1969; Foster, 1977; Delbrück y Cerdá Olmedo, 1977; Cerdá Olmedo, 1977).

Ciclo sexual

En *Phycomyces* existen dos tipos sexuales, denominados (+) y (-), que son indistinguibles morfológicamente y contribuyen simétricamente al proceso sexual.

Un esquema del ciclo sexual está detallado en la figura 2. El proceso sexual se inicia al aproximarse hifas de distinto sexo. A través de una compleja serie de etapas morfológicas y fisiológicas cada uno de los parentales diferencia una célula multinucleada, el gametangio. Los gametangios de sexo opuesto se funden para formar una cigospora, estructura esférica de color negro y considerable tamaño (0.5-1 mm), rodeada por abundantes espinas ramificadas (Blakeslee, 1904; Sutter, 1975; O'Donnell et al., 1976; Tewari y Malhotra, 1976).

La cigospora madura (estadio S₈) permanece durmiente durante varios meses. Colocada sobre una superficie húmeda termina por germinar, produciendo un germoesporangióforo, dotado de un germoesporangio en cuyo interior hay algunos miles de germoesporas. Estas estructuras se parecen a las del ciclo asexual, por lo menos morfológicamente. Las germoesporas pueden germinar dando un micelio vegetativo normal.

Muchos mutantes con alteraciones en la ruta de síntesis del β -caroteno son incapaces de dar reacción sexual completa. Esto es comprensible en el caso de mutantes que no fabrican β -caroteno, porque el β -caroteno es precursor de los ácidos trispóricos, que son mensajeros químicos en la reacción sexual (Bu'Lock et al., 1974; Sutter, 1975, 1977), y de las esporopoleni-

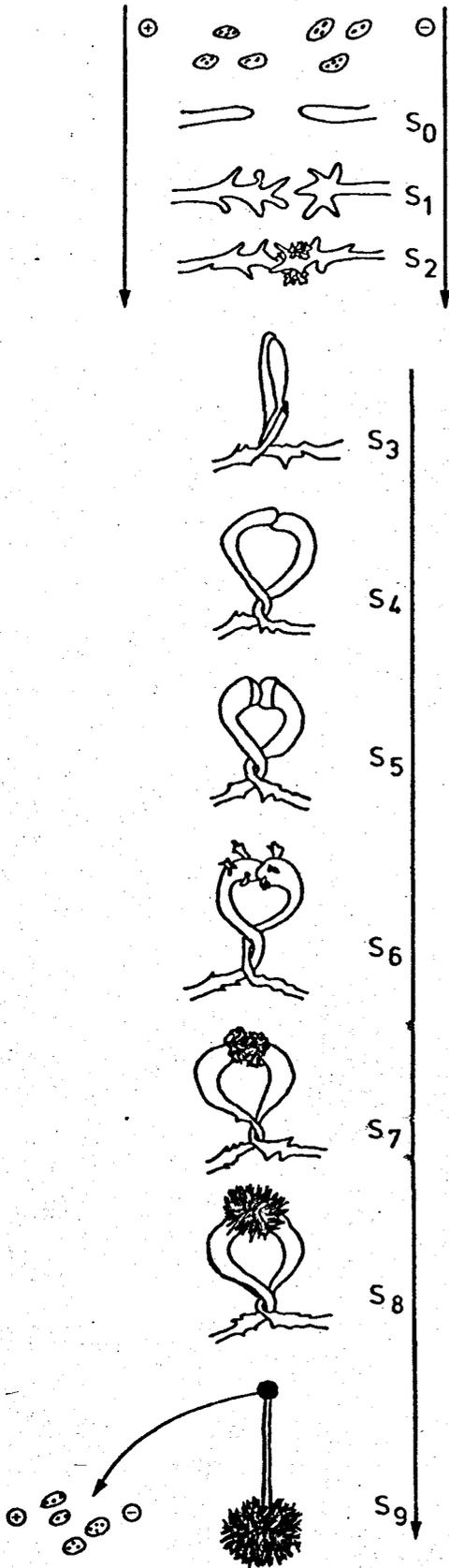


Figura 2. Ciclo de vida sexual de *Phycomyces blakesleeianus*. Las distintas etapas del ciclo sexual se denominan de S₀ a S₉ (Sutter, 1975).

- S₀ = hifas asexuales
- S₁ = cigóforos separados
- S₂ = cigóforos apareados
- S₃ = cigóforos alargados y aéreos
- S₄ = progametangios
- S₅ = tabicación y delimitación de gametangios y suspensores
- S₆ = desarrollo de espinas sobre los suspensores
- S₇ = fusión de los gametangios
- S₈ = desarrollo de la pared negra de la cigospora
- S₉ = germinación

nas de la pared de la cigospora (Gooday et al., 1973). Esta explicación no justifica, sin embargo la incapacidad sexual de los mutantes superproductores de β -caroteno ni de otros mutantes de la regulación de la carotenogénesis. La incompetencia sexual es una grave dificultad para el estudio genético de la carotenogénesis, desarrollado en esta Tesis.

MATERIAL GENETICO

La cantidad de ADN que contiene cada núcleo es de 1.9×10^{10} dáltones (o sea, 3×10^7 pares de nucleótidos) (Dusenbery, 1975). Se trata de un genomio pequeño en comparación con el de otros eucariontes.

No se conoce el número de cromosomas por núcleo. Los resultados de los estudios de ligamiento, que indican la independencia de casi todos los pares de marcadores investigados, sugieren un número elevado de cromosomas. La situación podría no ser muy diferente a la de la levadura, que tiene sus 1.9×10^7 pares de bases (Bicknell y Douglas, 1970) repartidos en 17 cromosomas.

MUTAGENESIS

Mutaciones inducidas por la nitrosoguanidina

La N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (nitrosoguanidina) es un agente alquilante monofuncional. Desde que se conocen sus propiedades mutagénicas (Mandell

y Greenberg, 1960) se usa rutinariamente en los laboratorios por su gran capacidad de inducir mutaciones sin causar una elevada letalidad (Adelberg et al., 1965; Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968).

Las mutaciones inducidas por la nitrosoguanidina son revertidas casi siempre por ella misma y por otros agentes mutagénicos que producen cambios de bases. La nitrosoguanidina induce fundamentalmente transiciones GC → AT (Prakash y Sherman, 1973; Coulondre y Miller, 1977) pero también induce la transición opuesta, AT → GC, transversiones, e incluso desfases (Yournon et al., 1969). Presumiblemente por su acción recombinogénica, induce también grandes deleciones (Ishii y Kondo, 1975).

La frecuencia máxima de mutaciones inducidas por la nitrosoguanidina en un gen determinado se alcanza si el mutágeno se aplica en el momento en que el gen se está replicando (Cerdá Olmedo et al., 1968).

En bacterias la frecuencia de mutantes alcanza rápidamente un máximo y se mantiene constante a partir de entonces, mientras que la letalidad aumenta monótonamente con la dosis (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968; Jiménez Sánchez y Cerdá Olmedo, 1975). En *S. cerevisiae* se alcanza una frecuencia máxima de mutantes entre los supervivientes a una determinada dosis de tratamiento, pero si se continúa el tratamiento, se obtiene una frecuencia de mutantes menor (Schwaier, 1965; López Calderón, 1980). Este resultado inesperado se atribuye a la coexistencia de subpoblaciones celulares diferentemente sensibles a la mutagenicidad y a la letalidad de la nitrosoguanidina.

La abundante literatura sobre la nitrosoguanidina puede consultarse en varias revisiones (Neale, 1976; Kimball, 1978; Cerdá Olmedo y Ruiz Vázquez, 1979).

Los primeros mutantes de *Phycomyces* con nitrosoguanidina fueron obtenidos en 1966 (Edgar y Goodgal y E.T. Young, resultados no publicados). Entre los primeros mutantes estudiados están los que afectan la carotenogénesis (Meissner y Delbrück, 1968; Heisenberg y Cerdá Olmedo, 1968) y el comportamiento (Bergman et al., 1973).

Selección de esporas uninucleadas y búsqueda de mutantes recesivos en Phycomyces

La expresión de mutaciones recesivas (auxotrofías, ciertas resistencias a drogas y muchas otras mutaciones) exige que todos los núcleos de la célula lleven la mutación. Es improbable mutar simultáneamente todos los núcleos de una célula multinucleada. Por tanto la búsqueda de mutaciones recesivas sólo es posible con células uninucleadas.

Las conidias de *Neurospora crassa* son multinucleadas (1 a 10 núcleos), pero se han descubierto

condiciones de cultivo en que sólo se producen microconidias uninucleadas y mutantes que producen microconidias uninucleadas en todas las condiciones (Tatum et al., 1950).

Menos del 1% de las esporas vegetativas de *Phycomyces* son uninucleadas (Heisenberg y Cerdá Olmedo, 1968). El cambio de condiciones de cultivo afecta muy poco a la distribución de núcleos por espora (Reau, 1972; Cerdá Olmedo, inédito) y no lleva en ningún caso conocido a producir una fracción importante de esporas uninucleadas. En estas condiciones el aislamiento de mutantes recesivos espontáneos requiere fuerte selección, gran número de esporas y que los mutantes buscados no sean muy raros.

Después de un tratamiento con nitrosoguanidina, según estimaciones teóricas, el 37% aproximadamente de las esporas supervivientes son funcionalmente uninucleadas (Cerdá Olmedo y Reau, 1970) y según datos experimentales el 25% (Zabala, 1974). Esto supone un aumento muy considerable de la proporción de uninucleadas en la población total de esporas. Este aumento se debe a la acción letal de la nitrosoguanidina sobre los núcleos de las esporas de *Phycomyces*.

Las esporas uninucleadas se pueden purificar físicamente por fraccionamiento de la población de esporas en un gradiente de sorbitol (Reau, 1972); con dicho método se consiguen fracciones en que el 86% de las esporas son uninucleadas. Este método no serviría en el caso de esporas recién tratadas con nitrosoguanidina, ya que se espera que la mayoría de las esporas uninucleadas hayan muerto y que las funcionalmente uninucleadas contengan físicamente varios núcleos, por lo que la separación física no sería efectiva.

En este trabajo se ha puesto a punto un método de enriquecimiento en esporas funcionalmente uninucleadas, basado en técnicas genéticas.

Para optimizar las condiciones de inducción y detección de mutaciones recesivas se ha utilizado como modelo de la resistencia a 5-deazarriboflavina (DARF), un análogo de la riboflavina muy tóxico para *Phycomyces*. Las mutaciones *dar* confieren resistencia a la deazarriboflavina inactivando las permeasas responsables de la entrada de dicho compuesto en la célula; estas mutaciones son muy recesivas, ocurren todas en un mismo gen nuclear y su frecuencia espontánea es muy alta (Delbrück y Ootaki, 1979). La expresión de las mutaciones *dar* requiere la síntesis de nuevas permeasas de la riboflavina; por tanto, el fenotipo de la célula no refleja necesariamente su genotipo, sino el genotipo existente durante la síntesis de las permeasas.

En esta Tesis se han investigado algunos aspectos de la inducción y la expresión de mutaciones *dar*.

CRUZAMIENTOS EN *PHYCOMYCES*

Meiosis

Como ya hemos visto anteriormente, durante el ciclo sexual los dos gametangios parentales funden y dan lugar a una cigospora; cada cigospora recibe así numerosos núcleos de cada parental. La germinación de la cigospora produce varios miles de germoesporas, la mayoría de ellas con dos a cuatro núcleos.

Burgeff, usando una serie de diferencias genéticas espontáneas, investigó la relación entre los núcleos parentales y los de las germoesporas. Propuso la hipótesis de que un solo núcleo diploide, formado por la fusión de un núcleo parental de cada sexo, sufre meiosis y da cuatro productos haploides, que después de muchas divisiones mitóticas forman los núcleos de las germoesporas (Burgeff, 1915, 1928).

Las investigaciones recientes indican que las germoesporas contenidas en cada germoesporangio son, en la mayoría de los casos, el producto de una sola meiosis, pero a veces proceden de dos o más meiosis. Los núcleos parentales no pasan directamente (apogámicamente) a la descendencia. La duración de la dormancia depende sobre todo de las estirpes que intervienen en el cruzamiento, a través de una determinación poligéni-

ca, pero también depende de factores externos, como la temperatura de incubación. Cuando se cruzan parentales poco isogénicos, se suelen obtener muchos germoesporangios estériles o con pocas germoesporas viables, y en este último caso, lo más frecuente es que falten algunos de los productos de la meiosis. Las germoesporas, aunque multinucleadas, son casi siempre homocarióticas. Esto se debe a que derivan de protoesporas, con un solo núcleo, que sufre mitosis durante la maduración de las esporas. El número de germoesporas en cada germoesporangio es variable, pero suele ser del orden de diez mil (Cerdá Olmedo, 1975; Eslava et al., 1975a; Eslava et al., 1975b).

Clasificación de las tétradas

Los procedimientos de análisis genético en hongos pueden consultarse en textos especializados (Esser, 1967; Fincham, 1979).

Los productos de una sola meiosis constituyen una tétrada. Cuando se consideran dos marcadores genéticos determinados, las tétradas se clasifican en ditipos parentales, que contienen sólo genotipos parentales, ditipos recombinantes, que contienen sólo genotipos recombinantes, y tetratipos, que contienen las cuatro combinaciones posibles, las dos parentales y las dos recombinantes. Llamamos DP, DR y T a las frecuencias de cada uno de los tres tipos obtenidas en un cruzamiento.

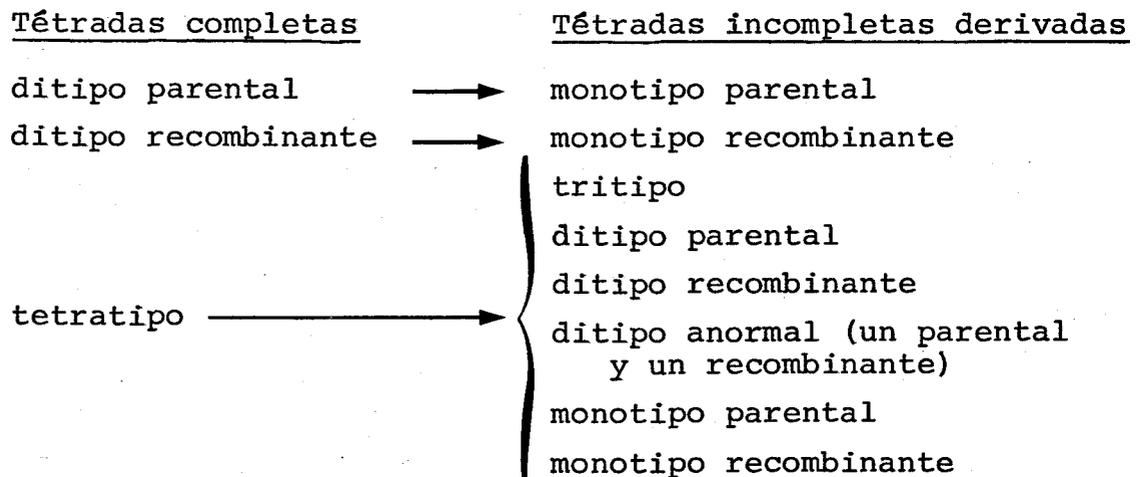
Cuando DP no difiere de DR, los marcadores están determinados por genes independientes, pero si DP es

mayor que DR, están determinados por genes ligados. En el caso de genes independientes la frecuencia de T indica la proximidad de los genes a sus centrómeros; basta con que uno sólo de los genes esté lejos de su centrómero para que T sea alta.

En el caso de genes ligados, la distancia entre ambos se calcula aplicando la fórmula:

$$\text{distancia} = \% \text{ recombinación} = \frac{\text{DR} + \text{T}/2}{\text{DP} + \text{DR} + \text{T}} \times 100$$

Con cierta frecuencia aparecen tétradas incompletas, en las que faltan uno o más de los cuatro productos meióticos. Las tétradas incompletas derivan de las completas según el siguiente esquema.



Los ditipos parentales y recombinantes obtenidos como tétradas incompletas derivadas de los tetratipos son indistinguibles de los ditipos parentales y recombinantes obtenidos como tétradas completas.

Cuando la frecuencia de tétradas incompletas es muy alta, es imposible aplicar los métodos de análisis de tétradas. En este caso nos hemos contentado con clasificarlas en tétradas incompletas "sin recombinación" (monotipos parentales) y tétradas incompletas "con recombinación" (las demás).

Cuando la frecuencia de tétradas incompletas es baja, se han asignado a los tres grupos de tétradas completas, considerando los monotipos parentales como ditipos parentales, los monotipos recombinantes como ditipos recombinantes y los trítipos y ditipos anormales como tetratipos.

Cruzamientos realizados en Phycomyces

El análisis genético en *Phycomyces* es más difícil que en otros hongos; se requieren varios meses para analizar un cruzamiento y el análisis de tétradas aisladas requiere un trabajo a veces desproporcionado para los resultados obtenidos.

Hasta el momento no se conoce el número de grupos de ligamiento de *Phycomyces*, aunque se han encontrado algunos casos de ligamiento entre genes. Se ha investigado el ligamiento entre los marcadores, *carA*, *nicA*, *leu*, *pur*, *fur*, *sexo*, *madA*, *madB*, *madC*, *madD*, *madE* y *madG* (Eslava et al., 1975a, 1975b, 1976 y no publicado); *carA* y *carR* (Torres Martínez et al., en prensa); *nicA*, *dar*, *sexo*, *carA*, *carB*, *carR*, *carI*, *carS*, *car-113* y *madC* (González Roncero, no publicado y esta Tesis); *madA*, *madB*, *madC*, *madD*, *madE*, *madF* y *madG* (Lipson, no publicado).

TABLA I

Relaciones de ligamiento de *Phycomyces*, según resultados de esta Tesis y de las referencias citadas en el texto. "O" indica estrecho ligamiento; "I", independencia; los ligamientos parciales se indican con el correspondiente porcentaje de recombinación.

Sexo	<i>carRA</i>	<i>carB</i>	<i>car-113</i>	<i>madaA</i>	<i>madaB</i>	<i>madaC</i>	<i>madaD</i>	<i>madaE</i>	<i>madaG</i>	<i>nicaA</i>	<i>leu</i>	<i>fur</i>
<i>carRA</i>	I											
<i>carB</i>	I	O										
<i>car-113</i>	I	O	O									
<i>carI</i>		I	I	I								
<i>carS</i>		34	I	I								
<i>madaA</i>	I	I	I	I								
<i>madaB</i>					I							
<i>madaC</i>	I	I	I	I	I	I						
<i>madaD</i>	I	I	I	I	I	I	I					
<i>madaE</i>	~9	I	I	I	I	I	I	I				
<i>madaF</i>					I	I	I	I	I	I		
<i>madaG</i>	I				I	I	I	I	I			
<i>nicaA</i>	I	I	I	I	I			I	I			
<i>leu</i>	I	I	I	I				I	I	I		
<i>fur</i>	I	I	I	I	I	I	I	14	I	I	I	I
<i>pur</i>	I	I	I	I	I			I	I		I	I
<i>dar</i>	I								I		I	
Sexo	<i>carRA</i>	<i>carB</i>	<i>car-113</i>	<i>madaA</i>	<i>madaB</i>	<i>madaC</i>	<i>madaD</i>	<i>madaE</i>	<i>madaG</i>	<i>nicaA</i>	<i>leu</i>	<i>fur</i>

Los resultados de estos trabajos están sumariados en la Tabla I. Como se puede observar en ella, *madE* y *sexo* están ligados; *madD* y *fur* están ligados entre sí pero no a los anteriores; *carR*; *carA*, *car-113* y *carB* están muy estrechamente ligados entre sí, con *carS* ligado débilmente a ellos; los demás genes estudiados son independientes entre sí y de los tres grupos citados.

CAROTENOGENESIS

Los micelios y los esporangióforos jóvenes de *Phycomyces* son amarillos porque acumulan β -caroteno. La genética y la regulación de la síntesis de carotenos han sido revisadas recientemente (Cerdá Olmedo y Torres Martínez, 1977, 1979).

La ruta biosintética de carotenos comúnmente aceptada para *Phycomyces* es la misma que la propuesta por Porter y Lincoln (1950) para el tomate y está esquematizada en la figura 3.

La ruta implica varias fases sucesivas: formación del precursor de cinco carbonos, agregación sucesiva de este precursor y sus derivados para formar el primer carotenoide, el fitoeno, cuatro deshidrogenaciones sucesivas que convierten el fitoeno en licopeno y dos ciclaciones sucesivas para formar el β -caroteno. Los primeros intermediarios, hasta el pirofosfato de farnesilo (C15) son comunes a las rutas de los carotenoides y de los esteroides.

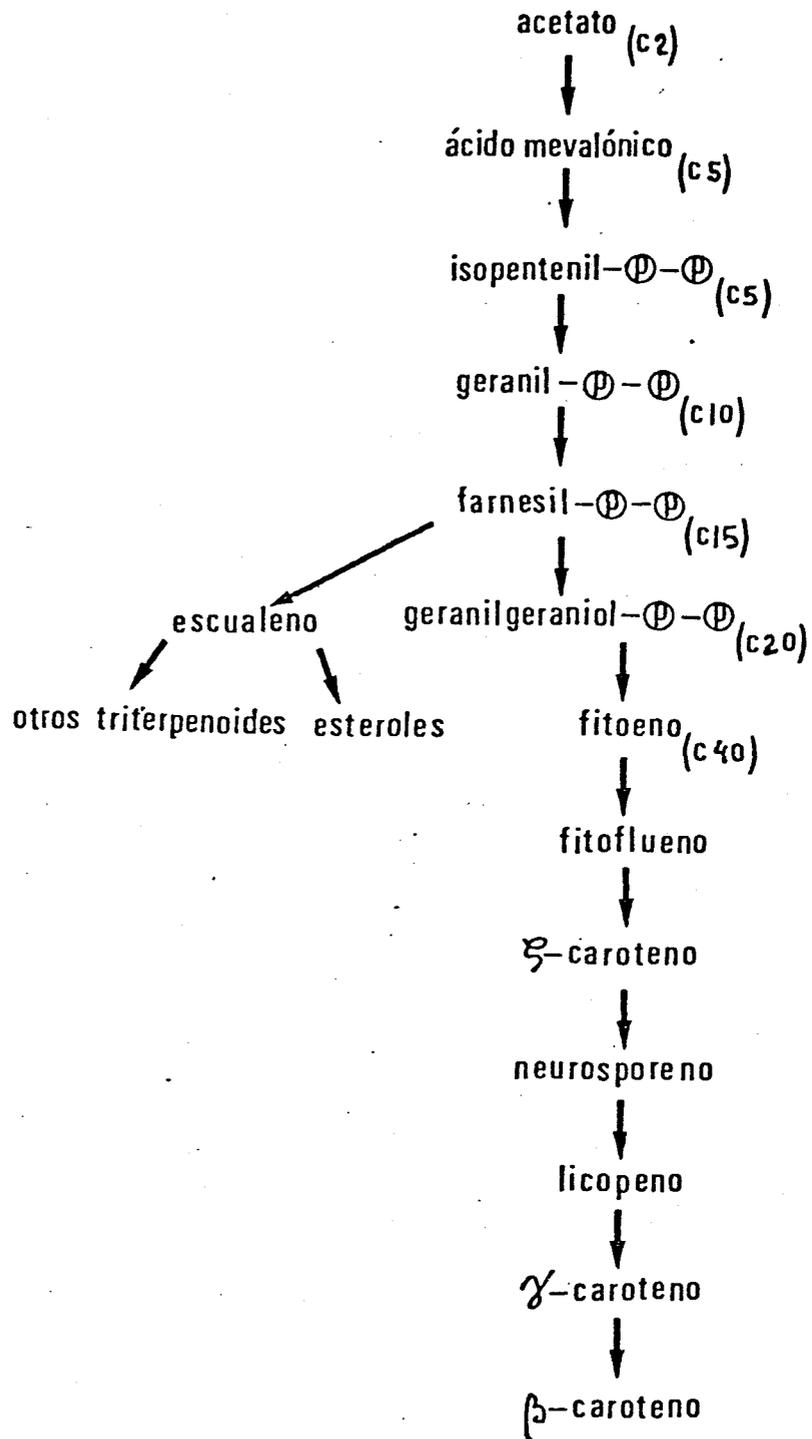


Figura 3. Esquema general de la biosíntesis de carotenos.

Los primeros mutantes afectados en la síntesis de carotenos fueron aislados por Heisenberg en 1967; son relativamente fáciles de encontrar después de un tratamiento mutagénico de las esporas.

Existen tres fenotipos mutantes principales: blanco, rojo y superamarillo. Los mutantes han sido caracterizados bioquímicamente analizando los pigmentos que acumulan y genéticamente por complementación en heterocariontes.

Funciones estructurales

Algunos de los mutantes blancos acumulan fitoeno (Meissner y Delbrück, 1968); las mutaciones correspondientes están todas en el gen *carB* (Ootaki et al., 1973). Las cuatro deshidrogenaciones que convierten el fitoeno en licopeno son realizadas por cuatro ejemplares de la deshidrogenasa del fitoeno, producto del gen *carB* (Eslava y Cerdá Olmedo, 1974; Aragón et al., 1976).

Los mutantes rojos acumulan licopeno (Meissner y Delbrück, 1968); las mutaciones (usualmente llamadas *carR*) responsables de este fenotipo están en el gen *carRA* (Ootaki et al., 1973; Torres Martínez et al., en prensa). La conversión del licopeno en β -caroteno exige dos ciclaciones, que son llevadas a cabo por dos ejemplares de la ciclasa del licopeno, producto del gen *carRA* (De la Guardia et al., 1971).

No existen mutantes que acumulen específicamente otros intermediarios de la ruta.

Funciones reguladoras

La estirpe silvestre acumula aproximadamente 40 ppm de β -caroteno (abreviamos ppm = μg de β -caroteno por gramo de materia seca) en la oscuridad. Muchos mutantes blancos no contienen cantidades importantes de ningún caroteno (aunque pueden contener trazas de β -caroteno y sus precursores). Complementan con los mutantes *carB*, pero no complementan entre sí y muchos no complementan con los mutantes rojos del gen *carRA* (Ootaki et al., 1973). Las mutaciones correspondientes (que usualmente se denominan *carA*) ocurren en el mismo gen *carRA* (Torres Martínez et al., en prensa).

Algunos mutantes blancos del gen *carRA* contienen trazas de β -caroteno (del orden de 1 ppm) y producen considerables cantidades de β -caroteno en presencia de vitamina A y otros productos químicos (Eslava et al., 1974). Estos mutantes tienen ciclasa del licopeno, pero carecen de una función necesaria para el transporte de sustratos a lo largo de la ruta del caroteno (Murillo et al., en prep.). Las mutaciones correspondientes complementan con las mutaciones del mismo gen *carRA* que conducen al fenotipo rojo (Ootaki et al., 1973). Por consiguiente, el gen *carRA* tiene dos funciones distintas, eliminables separadamente por mutación, la ciclación del licopeno y una acción necesaria para el funcionamiento general de la ruta.

Otros mutantes blancos del gen *carRA* contienen trazas de licopeno, no son activables por vitamina A, y no complementan entre sí ni con los demás mutantes, rojos o blancos, del gen *carRA*. Estos mutantes han

perdido simultáneamente las dos funciones del gen *carRA* (Ootaki et al., 1973; Eslava et al., 1974; Torres Martínez et al., en prensa).

Existe otro grupo de mutantes de color amarillo muy intenso, que acumulan hasta cien veces más β -caroteno que el silvestre en las mismas condiciones y están afectados en el gen *carS*. Se piensa que el producto del gen *carS* participa en la regulación normal de la ruta por el producto final. Cuando se inhibe la síntesis de β -caroteno genética (Eslava y Cerdá Olmedo, 1974; Murillo y Cerdá Olmedo, 1976) o químicamente (Olson y Knizley, 1962; Coggins et al., 1970; Eslava et al., 1974) las cantidades de precursores que se acumulan son mucho mayores que la cantidad usual de β -caroteno. Se cree que el producto del gen *carS* participa en la regulación por producto final porque los dobles mutantes *carB carS* no acumulan más fitoeno que los mutantes *carB* (Murillo y Cerdá Olmedo, 1976).

Mutantes insensibles a la estimulación por agentes químicos

Algunos agentes químicos estimulan la carotenogénesis (Reyes et al., 1964; Ninet et al., 1969; Eslava et al., 1974). Entre ellos está la vitamina A, que incrementa la producción de β -caroteno en la estirpe silvestre (unas 50 veces), la de licopeno en mutantes *carR* y la de fitoeno en mutantes *carB* (Eslava et al., 1974; Murillo y Cerdá Olmedo, 1976). Algunos mutantes blancos del gen *carRA*, que han perdido la función reguladora pero no la ciclasa acumu-

lan β -caroteno y se vuelven amarillos en presencia de vitamina A.

Otro agente químico que interfiere con la regulación de la carotenogénesis es la 2-(4-clorofeniltio) trietilamina (CFTA). En presencia de CFTA los micelios del silvestre y de los mutantes blancos del gen *carRA* son anaranjados por acumular licopeno, γ -caroteno y β -caroteno. El nivel de acumulación de los tres pigmentos es menor en el caso del mutante blanco que en el del silvestre, pero en ambos casos la CFTA ejerce sus dos efectos, el inhibidor de la ciclación y el estimulador de la carotenogénesis (Murillo, 1980). Ni los mutantes *carB* ni los mutantes rojos del gen *carRA* son sensibles a la estimulación por CFTA. Los mutantes *carS*, superproductores de β -caroteno, son sensibles a la inhibición de las ciclasas, pero no a la estimulación de la carotenogénesis (Elahi et al., 1975).

Se llaman mutantes de fenotipo I a los que normalmente acumulan el mismo β -caroteno que el silvestre pero responden poco o nada a la presencia de vitamina A (Murillo, 1975). Estos mutantes son también insensibles a la inhibición de la ciclasa por CFTA.

En esta Tesis se han realizado cruzamientos para determinar las relaciones genéticas entre los diversos tipos de mutantes afectados en la carotenogénesis.

MATERIALES Y METODOS

ESTIRPES

Las estirpes de *Phycomyces blakesleeanus* que se han utilizado en este trabajo están indicadas en la Tabla II siguiendo la nomenclatura genética propuesta por Demerec et al. (1966).

Las estirpes se designan con una letra mayúscula según el laboratorio donde fueron obtenidas (B, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin; C, California Institute of Technology, California; H, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; S, Departamento de Genética, Universidad de Sevilla) y a continuación llevan un número de aislamiento.

El tipo sexual se indica con los signos (+) y (-). Los genotipos de los mutantes se indican con tres letras minúsculas, que identifican el proceso biológico afectado por la mutación, y a continuación una letra mayúscula correspondiente al gen afectado o un guión si se desconoce el mismo, y finalmente un número para indicar el alelo. Las mutaciones *car* afectan a la síntesis de carotenoides; las *mad*, a las respuestas fototrópicas; las *nic*, a la síntesis de ácido nicotínico; las *leu*, a la síntesis de leucina; las *dar*, a la sensibilidad a 5-deazarriboflavina.

En la Tabla II se añaden algunos detalles como procedencia, fenotipo y método de aislamiento de las estirpes: "NG", tras tratamiento mutagénico con nitrosoguanidina; "esp.", mutante espontáneo; "X", por recombinación, indicando las estirpes parentales.

TABLA II

Estirpes de *Phycomyces* utilizadas en esta Tesis

Estirpe	Genotipo	Fenotipo y procedencia
NRRL1555	(-)	Silvestre. Colección de Northern Regional Res. Lab., Peoria, IL, USA.
UBC21	(+)	Silvestre. University of British Columbia, Canadá.
B142	(+)	Silvestre, isogénica con NRRL1555. Obtenida por A. P. Eslava.
B36	<i>nicA101</i> (+)	Auxótrofa para ácido nicotínico, isogénica con NRRL1555. Obtenida por A. P. Eslava.
C2	<i>carA5</i> (-)	Blanca; mutante NG de NRRL1555.
C115	<i>carS42 mad-107</i> (-)	Superamarilla ciega; mutante NG de NRRL1555.
C242	<i>carA5 nicA101</i> (+)	Blanca, auxótrofa para ácido nicotínico; a partir de C170 x S102.
H1	<i>leu-51</i> (-)	Auxótrofa para leucina; mutante NG de NRRL1555.
S5	<i>carA51 madC202</i> (-)	Blanca, ciega; mutante NG de UBC24.
S16	<i>carA55 mad-207</i> (-)	Idem.
S18	<i>carA57 madC209</i> (-)	Idem.
S23	<i>carA62 mad-211</i> (-)	Idem.
S28	<i>carA67 mad-216</i> (-)	Idem.
S37	<i>carA76 mad-225</i> (-)	Idem.
S47	<i>carA86 mad-232</i> (-)	Idem.
S48	<i>carA87 mad-233</i> (-)	Idem.
S49	<i>carA89 mad-234</i> (-)	Idem.
S102	<i>nicA101</i> (-)	Auxótrofa para el ácido nicotínico; mutante NG de NRRL1555.

(Cont.)

TABLA II

Estirpe	Genotipo	Fenotipo y procedencia
S105	<i>car-101 carS42</i> <i>mad-107 (-)</i>	Blanca; mutante NG de C115.
S119	<i>car-113 (-)</i>	Insensible a vitamina A; mutante NG de NRRL1555.
S144	<i>carI131 (-)</i>	Insensible a vitamina A; mutante NG de NRRL1555.
S213	<i>dar-52 (-)</i>	Resistente a 5-deazarriboflavina; mutantes esp. de NRRL1555.
S240	<i>carR21 nicA101 (-)</i>	Roja, auxótrofa para el ácido nicotínico; a partir de (C9 * C282) x C247.
S265	<i>carB10 dar-54 (-)</i>	Blanca, resistente a 5-deazarriboflavina; mutante esp. de C5.

TABLA III

Estirpes heterocariontes de *Phycomyces* utilizadas en esta Tesis

Heterocarionte	Genotipo
C2 * S213	<i>carA5</i> (-) * <i>dar-52</i> (-)
C115 * S102	<i>carS42 mad-107</i> (-) * <i>nicA101</i> (-)
S102 * S119	<i>nicA101</i> (-) * <i>car-113</i> (-)
S102 * S144	<i>nicA101</i> (-) * <i>carI131</i> (-)
S102 * S105	<i>nicA101</i> (-) * <i>car-101 carS42 mad-107</i> (-)
S240 * S265	<i>carR21 nicA101</i> (-) * <i>carB10 dar-54</i> (-)

Los heterocariontes que se han utilizado en este trabajo aparecen en la Tabla III, indicando los dos tipos de núcleos presentes en el micelio separados por un asterisco. Todos los heterocariontes han sido obtenidos por la autora de esta Tesis según el método desarrollado por Ootaki (1973).

METODOS DE CULTIVO

Medios de crecimiento

Medio mínimo GA. Contiene glucosa, asparragina y sales (Heisenberg y Cerdá Olmedo, 1968). Se utiliza como medio líquido o como medio sólido, añadiéndole 16 g/l agar.

Agar nutritivo GAEL. Igual que el GA, más 1 g/l de extracto de levadura.

Agar mínimo SIV. Contiene glucosa, 2 g/l asparragina como fuente de nitrógeno, sales y agar (Sutter, 1975).

Agar nutritivo SIVEL. Igual que el medio SIV más 1 g/l de extracto de levadura.

Agar nutritivo sintético SIV. Igual que el medio SIV, suplementado con fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, isoleucina, glicina, lisina, histidina, alanina, valina, serina, prolina, treonina, glutámico, arginina, uracilo, guanina, citosina, adenina y timina (200 µg/ml de cada uno) y ácido nicotínico (1 µg/ml).

Agar completo YEPD. Contiene por litro de medio: 20 g glucosa, 10 g extracto de levadura, 20 g peptona y 16 g agar.

Agar patata. Un litro contiene: el extracto acuoso de 200 g de patatas peladas y hervidas, 20 g de sacarosa, 0.25 mg de tiamina y 16 g agar. Este medio se utilizó en todos los cruzamientos, porque en él se producen el máximo número de cigosporas, y en los cultivos destinados a obtener esporangióforos para la formación de heterocariontes, ya que se producen pocos y robustos esporangióforos, lo que facilita su manipulación.

Agar PAL. Igual que el agar patata más 1 g/l de extracto de levadura.

La tiamina se esterilizó por filtración y se añadió a los medios una vez autoclavados, excepto en el caso de SIV y sus variantes.

Los medios GA, GAEL, SIV, SIVEL, nutritivo sintético SIV, y PAL se utilizaron acidificados con ClH 1 N a pH 3.2, una vez autoclavados, cuando se quiso obtener un crecimiento colonial de los micelios; esta acidificación se indica añadiendo una A al final del nombre del medio.

En algunos casos los medios de cultivo se suplementaron con los siguientes productos químicos.

2-(4-Clorofeniltio)trietilamina-HCl se indica en adelante como CFTA. Ha sido proporcionado por el Dr. Henry Yokoyama del Fruit and Vegetable Chemistry Laboratory, Pasadena, California. Se añadió a los medios de cultivo ya autoclavados a una concentración final de 200 µg/ml.

5-Deazarriboflavina se indica en adelante como DARF. Ha sido proporcionada por el Prof. P. Hemmerich, Universität Konstanz (Alemania). Se añadió a los cultivos autoclavados a una concentración final de 1 µg/ml.

Vitamina A. El acetato de retinol (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA) se disolvió en etanol, se emulsificó con monooleato de polioxietilensorbitano ("Tween-80") y se añadió al medio de cultivo autoclavado a una concentración final de 200 µg/ml vitamina A, 0.1% de etanol y 0.5% "Tween-80". Para evitar la descomposición de la vitamina A por la luz, los medios que la contienen se usan enseguida y se preservan de la luz.

Inoculación

Se han empleado dos formas de inoculación de los cultivos. Cuando se emplearon esporas como inóculos, éstas se activaron por calentamiento durante 15 minutos a 48°C (Rudolph, 1960). El título de las suspensiones de esporas se determinó previamente contando colonias viables en medio acidificado.

En otros casos los cultivos se iniciaron con un trozo de micelio de $\sim 1 \text{ mm}^2$ obtenido de un cultivo previo. El trozo de micelio se coloca con unas pinzas en el centro de la caja de Petri.

Condiciones de cultivo

Los cultivos se incubaron normalmente en una cámara termostatzada a 22°C - 23°C y con iluminación continua. Los utilizados para análisis químico de carotenos se mantuvieron en completa oscuridad.

Los cultivos en medio líquido recibieron constantemente aire a presión.

Para determinar el sexo de una estirpe se cultivó en presencia de estirpes indicadoras (Bergman et al., 1969).

La ceguera para el fototropismo se determinó en una caja de paredes opacas iluminadas por un fondo de vidrio (Bergman et al., 1973).

Reciclado y recolección de esporas

En algunos casos fue necesario incubar las esporas, recién tratadas con nitrosoguanidina, para que hicieran un ciclo asexual completo; a este proceso lo llamaremos en adelante "reciclado".

En estos casos y en general para la recolección de esporas se incubaron las esporas durante unos 7 días en cajas de Petri con el medio de cultivo apropiado. Las cajas se iluminaron con luz cenital para que los esporangióforos tropezaran con la tapa y se quedaran adheridos a ella las esporas. Para recolectarlas se lavó esta tapa con 10 ml de agua estéril; cuando se deseaba recolectar más esporas, se lavaron con otros 10 ml de agua el micelio y los esporangióforos. Las esporas recogidas se lavaron centrifugando tres veces a 2000-3000 rpm durante 5 minutos. Las esporas se conservaron en solución acuosa o liofilizadas en suero de vaca en tubos cerrados al vacío, y se mantuvieron en el refrigerador hasta su uso.

PROPORCION DE NUCLEOS EN HETEROCARIONTES

Las proporciones nucleares en micelios heterocarióticos se determinaron a partir de las frecuencias de los diversos tipos de esporas (homocariontes y heterocariontes) producidas por el heterocarionte (Heisenberg y Cerdá Olmedo, 1968).

FOTOINDUCCION

Las cajas recién inoculadas se incubaron a 22-23°C, unas en oscuridad y otras bajo una iluminación fluorescente blanca, que contenía 1.32 W.m^{-2} de luz azul efectiva (definida por su paso a través del filtro 5-61 de Corning Glass Works, Corning, N.Y., USA).

ANALISIS DE CAROTENOIDES

Los cultivos se iniciaron con trozos de micelio y se incubaron durante 4 días a 22°C. La determinación del peso seco y la extracción, separación y determinación de los carotenoides se hizo según De la Guardia et al. (1971); los resultados obtenidos se expresan en ppm, o sea, µg de carotenoide por gramo de materia seca.

CRUZAMIENTOS

Para realizar los cruzamientos se siguió el método descrito en Torres Martínez (1978). Para el análisis de esporas en masa se mezclaron las germoesporas de unos 100 germoesporangios de un mismo cruzamiento en 1 ml de agua estéril y se sembraron distintas alícuotas de esta suspensión en medio mínimo suplementado o no con aditivos según los casos. Para hacer análisis de tétradas, las germoesporas de cada germoesporangio se suspendieron en 1 ml de agua estéril y se sembraron alícuotas en medios de cultivo adecuados.

Con bastante frecuencia, se realizaron análisis de esporas en masa de cruzamientos en que uno de los parentales fue un micelio heterocarionte. La proporción de meiosis en las que participaron cada uno de los tipos de núcleos presentes en el heterocarionte, se determinó, en algunos de estos casos, calculando previamente esta proporción en algunas decenas de tétradas analizadas aisladamente.

MUTAGENESIS

Para inducir mutaciones se usó siempre la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG o nitrosoguanidina). Salvo que se indique otra cosa, unas 10^6 células se

suspendieron en cada ml de tampón citrato-fosfato a pH 7.5, conteniendo 0.1 mg nitrosoguanidina y se expusieron durante 30 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Se observó que la agitación durante el tratamiento mutagénico aumenta considerablemente la letalidad, posiblemente porque las esporas sedimentan durante el tratamiento y quedan menos accesibles al mutágeno, a menos que se agite la suspensión. Después del tratamiento las esporas se lavaron centrifugando y resuspendiendo tres veces en agua, antes de diluirlas y sembrarlas.

BUSQUEDA Y CARACTERIZACION DE MUTANTES

Para la búsqueda de mutantes auxótrofos y termosensibles se sembraron unas cien esporas supervivientes al tratamiento con nitrosoguanidina en cada caja de medio nutritivo y se incubaron a 15°C. A los 3-4 días de la siembra, se trasplantaron las colonias aparecidas a cajas con medio nutritivo, que se incubaron a 15°C, y a cajas con medio mínimo, que se incubaron a 26°C. Las colonias que no crecieron en medio mínimo a 26°C se volvieron a cultivar en ambos tipos de medio y a ambas temperaturas, para determinar auxotrofia, termosensibilidad, o ambas cosas a la vez.

Para la caracterización de auxótrofos se siguió el método descrito por Holliday (1956). Se cultivaron los presuntos auxótrofos en medio SIV suplementado con los compuestos indicados por cada una de las filas y columnas de la tabla siguiente:

	6	7	8	9
1	fenilalanina	isoleucina	valina	guanina .
2	tirosina	glicina	serina	glutámico
3	triptófano	lisina	ácido ni- cotínico	citosina
4	leucina	histidina	prolina	arginina timina
5	uracilo	alanina	treonina	adenina

El crecimiento de un auxótrofo en dos de estas combinaciones indica su requerimiento del compuesto intersección de ambas.

TINCION DE NUCLEOS

Las células (esporas recién activadas o germinulas en crecimiento activo) se centrifugaron y se resuspendieron en 2 ml de "mezcla fijadora" y se mantuvieron en ella durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron y se resuspendieron en ClH 1 N a 60°C y se mantuvieron durante 9 minutos a 60°C. Se enfriaron rápidamente, se lavaron dos veces en agua, se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de reactivo de Schiff donde se mantuvieron durante 4 horas. Se lavaron dos veces consecutivas en agua sulfurosa al 10%, la segunda vez se mantuvieron en ella durante 15 minutos. Se lavaron con agua. Se centrifugaron y resuspendieron sucesivamente en etanol al 50%, 70% y 95% y finalmente se centrifugaron y resuspendieron dos veces en etanol absoluto. Se centrifugaron, se tiró el sobrenadante y se montó un poco del precipitado en Bálamo de Canadá para su observación y conservación.

Soluciones utilizadas en esta tinción:

Mezcla fijadora: a 2.5 ml de ácido acético glacial se le añaden 6,5 ml de solución de formaldehído al 40%, 52 ml de alcohol de 96° y 39 ml de agua destilada.

Reactivo de Schiff: (Se prepara según el método de Gurr). Se hierven 100 ml de agua destilada y se deja enfriar hasta 70°C entonces se les añaden 0.5 g de Fuchsin básica (Allied Chemical), se hierve esta solución y se deja enfriar hasta 50°C. Se le añade 1 ml de ClH concentrado y 1 g de $S_2O_5Na_2$, se deja reposar durante 24 horas en oscuridad. Se le añade 0.25 g de carbón decolorante (carbón activado, Mateson & Co., "Norit A"), se agita un minuto y se filtra dos veces consecutivas por papel Whatman nº 1. El filtrado se conserva bien cerrado y en oscuridad hasta su uso (Haskell y Wills, 1968).

Agua sulfurosa: 10 g de $S_2O_5Na_2$ se completan a 100 ml con agua destilada. Inmediatamente antes de su uso, se mezclan 5 ml de esta solución con 5 ml de ClH 1 N y 90 ml de agua destilada.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I

OBSERVACIONES PRELIMINARES

Estos experimentos previos se propusieron determinar unas condiciones apropiadas para cultivar y mutagenizar esporas de *Phycomyces* pero no constituyen un estudio exhaustivo que considere todas las variables posibles.

I.1. Producción de esporas

Como en este trabajo se han tenido que usar gran número de esporas de *Phycomyces*, preliminarmente se han estudiado algunas condiciones de cultivo (medios, densidades de siembra y días de incubación) que favorecen una mayor producción de esporas.

La Tabla IV muestra la producción de esporas viables en los medios de cultivo más usuales.

TABLA IV. Esporas producidas en cajas con distintos medios de cultivo sembradas con 10^5 esporas de la estirpe silvestre NRRL1555. Se da la media de 2 ó 3 determinaciones.

Medio	Esporas/caja (millones)
SIVELA	181
GAELA	177
YEPD	138
SIVA	128
PALA	27

Como se podía esperar, la producción de esporas es mayor en medio nutritivo que en medio mínimo. En medio PALA se producen pocas esporas, sin duda porque en él se producen pocos y gruesos esporangióforos.

Cuando se estudia la producción de esporas en los medios GAELA y PALA en función de la densidad de siembra, se observa que existe un amplio máximo comprendido entre las densidades de siembra de 5×10^4 y 10^6 esporas (Fig.4). Como ambos son medios ácidos, cuando se siembran pocas esporas no se cubre por completo la superficie de la caja y no se produce el número máximo de esporangióforos.

No conviene dejar las esporas sin cosechar en los cultivos. En la Tabla V se observa que a partir de los 6 días de cultivo, cuando los esporangios han madurado plenamente, el número de esporas viables no sólo no aumenta, sino que incluso disminuye, probablemente por desecación de las esporas en la caja antes de ser recolectadas.

TABLA V. Esporas producidas en un cultivo de la estirpe silvestre NRRL1555 en medio GAELA en función de los días de crecimiento; densidad de siembra, 10^5 esporas/caja.

Tiempo de cultivo	Esporas/caja (millones)
6 días	176
7 días	142
8 días	160
9 días	129
10 días	104

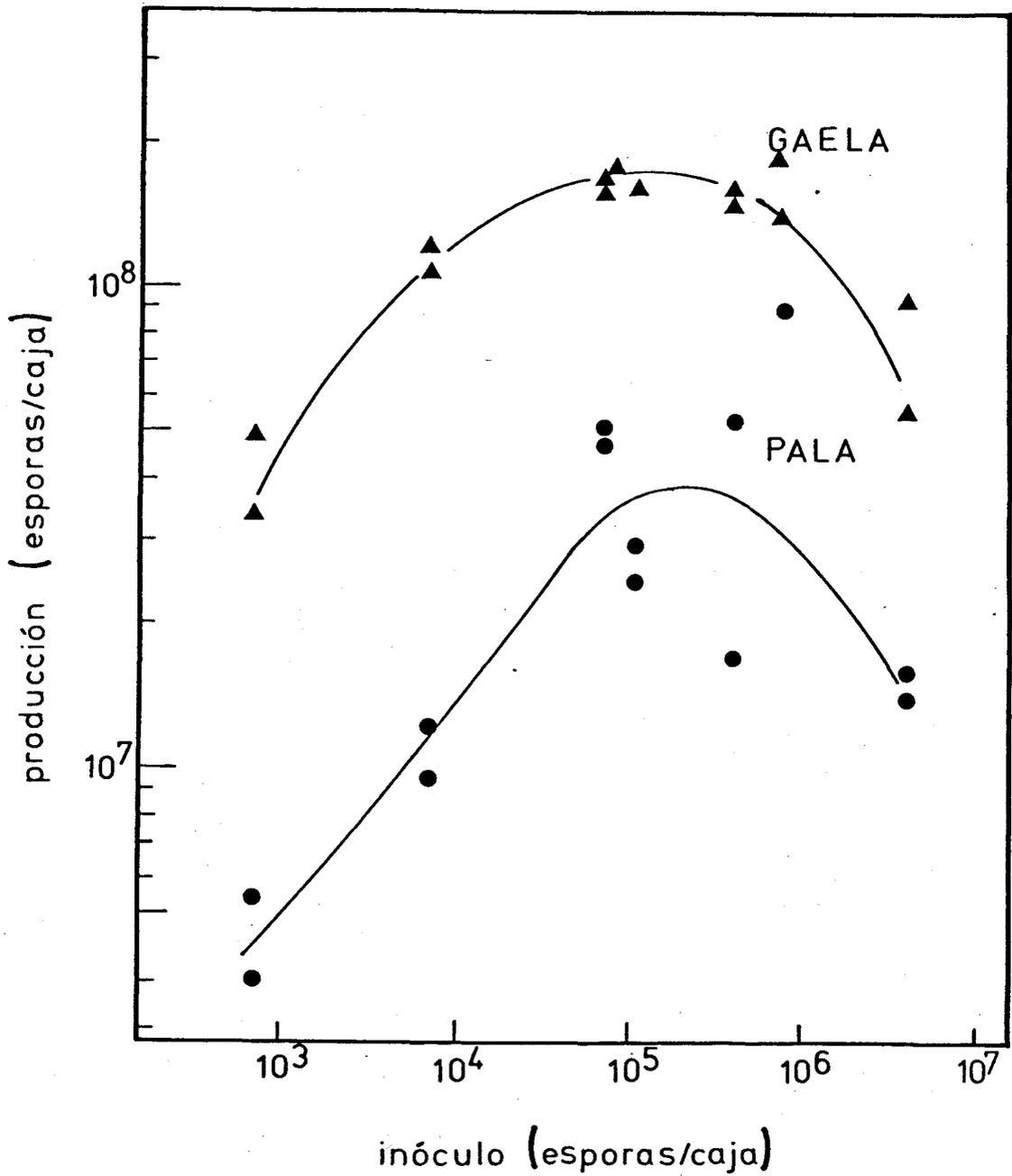


Fig. 4. Producción de esporas por caja de medio GAELA y PALA en función de la densidad de siembra (inóculo).

I.2. Activación de esporas para el tratamiento mutagénico

La activación de las esporas es necesaria para obtener su germinación masiva. Se quiso determinar si es mejor activar las esporas antes o después del tratamiento mutagénico para obtener una mayor frecuencia de mutación.

Se trataron con nitrosoguanidina esporas de una estirpe auxótrofa para ácido nicotínico. Las esporas se calentaron a 48° durante 15 minutos inmediatamente antes o después del tratamiento. Se determinó la frecuencia de revertientes protótrofos entre los supervivientes (Tabla VI). La activación de las esporas antes de la exposición a la nitrosoguanidina parece hacerlas más sensibles a sus efectos letales y mutagénicos. En el resto de este trabajo, por tanto, siempre se han expuesto a mutágenos esporas activadas previamente.

La activación pone en marcha muchos mecanismos celulares (Keyhani et al., 1972; Van Assche et al., 1978; Furch y Pambor, 1978 y Pambor, 1979), y es muy probable que algunos de ellos sean necesarios para la acción del agente mutagénico.

Durante la germinación la membrana plasmática sufre algunas alteraciones (Malhotra et al., 1975) y la célula se vuelve más permeable a sustancias externas (Borchert, 1962); es posible, por tanto, que las esporas activadas sean más permeables a la nitrosoguanidina. También en *Bacillus subtilis* los tratamien-

tos mutagénicos se hacen después de haber preincubado las esporas cierto tiempo para permitir su germinación (McGregor y Sacks, 1976).

TABLA VI. Efectos letal y mutagénico de la nitrosoguanidina en la estirpe S102, según se activen las esporas inmediatamente antes o después del tratamiento.

Expe- rimento	Acti- vación	Supervi- vencia	Protótrofos por 10 ⁶ supervivientes
1	Previa	0.11	152
	Posterior	0.29	77
2	Previa	0.07	262
	Posterior	0.18	101

I.3. Número de núcleos en esporas y su variación durante la germinación

Para comprender los experimentos de mutagénesis, y sobre todo los de búsqueda de mutaciones recesivas, es preciso saber el número de copias de la información genética presentes en cada célula. Los núcleos de *Phycomyces* son haploides, pero las esporas son multinucleadas. Tras la germinación, el número de núcleos debe ser aún mayor. Se quiso determinar el número de núcleos de las esporas y su variación durante el proceso de germinación.

Para ello se tiñeron y contaron los núcleos de esporas recién activadas y de células que habían sido incubadas en medio nutritivo líquido y con aire a presión. Las esporas se habían obtenido incubando la estirpe NRRL1555 en medio nutritivo a temperatura ambiente e iluminación continua. Los resultados aparecen en la Tabla VII y en la Fig. 5. Debe tenerse en cuenta que en las células incubadas más tiempo, los núcleos se tiñen notablemente menos que en las esporas y son más numerosos, por lo que los resultados son menos fiables.

Se observa que la media de núcleos por espora empieza a aumentar a las dos horas de incubación en medio de cultivo, pero no llega a duplicarse hasta después de las seis horas. Por tanto la división nuclear no es sincrónica en todas las células del cultivo. La división tampoco es sincrónica para los núcleos de una misma célula, ya que a las tres horas se observa un claro aumento del número de núcleos por célula, pero no las células con más de ocho núcleos esperadas de la división sincrónica de los núcleos en células de cinco o más núcleos.

Los núcleos de las esporas contienen una sola copia del genomio, según se deduce de la frecuencia relativamente alta de inducción de mutaciones (Cerdá Olmedo y Reau, 1970, y esta Tesis). Por tanto la división nuclear debe ir precedida de un período de síntesis del ADN. La duración de este período S, al menos en algunos casos, es menor de dos horas.

Van Assche y Carlier (1973) estudiaron la síntesis de ADN durante la germinación de las esporas midiendo la incorporación de timidina radioactiva en el ADN. No observaron incorporación de timidina hasta 8 horas después de la activación y concluyeron que la síntesis de ADN empieza en ese momento. Estos resulta-

dos no se deben tener en cuenta, ya que los hongos carecen de cinasa de la timidina y por tanto no es posible la incorporación directa de este precursor en el ADN. La incorporación de radioactividad al ADN empieza después de la incorporación a lípidos y otros componentes celulares, es decir, tras la degradación de la timidina y su utilización como fuente de carbono (C. David, resultados no publicados).

TABLA VII. Distribución del número de núcleos en esporas recién activadas e incubadas el tiempo indicado tras la activación. El cuerpo de la Tabla da el número de células con el número de núcleos indicado en la columna de la izquierda.

Núcleos por célula	Tiempo de incubación (horas)					
	0	1	2	3	4	6
1	3	3	3	1	0	0
2	65	60	32	20	10	3
3	191	224	232	131	90	13
4	154	174	183	191	133	38
5	33	33	43	106	121	48
6	4	6	6	40	82	34
7	1	0	1	9	42	30
8	0	0	0	2	14	17
9	0	0	0	0	5	7
10	0	0	0	0	2	6
11	0	0	0	0	1	3
12	0	0	0	0	0	1
13	0	0	0	0	0	0
Nº total de células con- tadas	451	500	500	500	500	200
Promedio de núcleos por espora	3.37	3.38	3.51	4.09	4.80	5.78

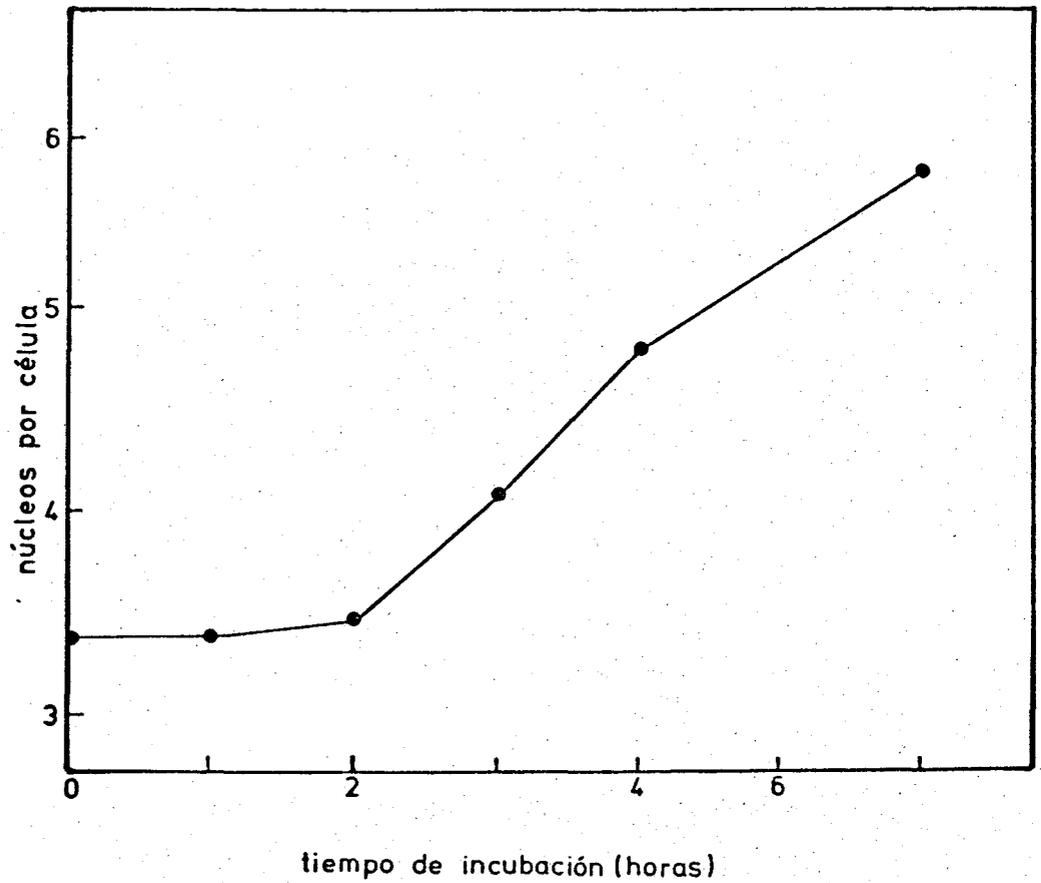


Figura 5. Promedio de núcleos por célula durante la germinación de esporas activadas e incubadas en medio nutritivo. El número de núcleos se indica en escala logarítmica.

Van Assche y Carlier (1973) también concluyeron que algunas divisiones nucleares habrían ocurrido a las dos horas de la activación, aunque pensaron que no iban precedidas de síntesis de ADN.

La distribución de núcleos por espora es muy constante en la estirpe usual de *Phycomyces blakesleeanus* y muy poco sensible a variaciones en los medios y condiciones en que se obtuvieron las esporas (Reau, 1972; Cerdá Olmedo, datos no publicados). Los cálculos realizados a partir de la distribución de núcleos por espora indicada en la Tabla VII son aplicables por tanto a esporas obtenidas en otras situaciones experimentales.

CAPITULO II

MUTAGENESIS

En esta parte del trabajo nos proponemos estudiar la inducción, expresión y detección de mutaciones dominantes y recesivas en *Phycomyces*. Para ello usaremos como agente mutagénico la nitrosoguanidina, como mutación recesiva, la que produce resistencia a 5-deazarriboflavina (Delbrück y Ootaki, 1979) y como mutación dominante, la que produce independencia del ácido nicotínico en la estirpe S102 (Medina, 1977; Zabala, 1974).

II.1. *Relación entre dosis de nitrosoguanidina y efectos letales y mutagénicos*

Las distintas dosis probadas se han obtenido variando la concentración del mutágeno y/o el tiempo de exposición. Se usaron concentraciones de nitrosoguanidina de 100 $\mu\text{g/ml}$ (1.3×10^{-4} M), 50 $\mu\text{g/ml}$ (0.65×10^{-4} M) y 20 $\mu\text{g/ml}$ (0.26×10^{-4} M) y exposiciones de 5, 10, 20 y 30 minutos, combinándolas de todas las formas posibles.

En la figura 6 se observa que la supervivencia y la frecuencia de mutantes dependen de la dosis, o sea, del producto de la concentración de nitrosoguanidina por el tiempo de exposición, y no de los valores concretos de concentración y tiempo empleados. Una reelaboración de los mismos resultados aparece en la figura 7. La frecuencia de mutantes varía de manera aproximadamente lineal con el logaritmo de la supervivencia. Puede observarse que, a diferencia de lo que ocurre en

bacterias, la frecuencia de mutantes aumenta monótonamente, sin llegar a saturarse. El número absoluto de mutantes por ml de suspensión alcanza, sin embargo, un máximo cuando la supervivencia es de aproximadamente 20%.

Se puede adelantar que, si se desea maximizar el número de mutantes inducidos en una población determinada, se deben utilizar dosis que conduzcan a una supervivencia del 20%. Proponemos para ello utilizar 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de nitrosoguanidina durante 20 minutos. Si se desea maximizar la frecuencia de mutantes, entre los supervivientes, se debe aumentar la dosis cuanto sea posible. En la práctica usual, recomendamos 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 10 minutos, que conduce a una supervivencia del orden de 3%.

II.2. *Efecto de la germinación en la mutagénesis*

En los siguientes experimentos las esporas se activaron y se incubaron en medio mínimo líquido durante diversos períodos de tiempo antes de exponerlas al mutágeno. Se estudió la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a 5-deazarriboflavina (DARF).

No se encuentran mutantes resistentes cuando se siembran esporas recién expuestas al mutágeno en un medio que contenga DARF (Fig. 8). En cambio, se encuentran muchos nuevos mutantes si, después del tratamiento, se siembran $\sim 10^5$ esporas viables en medio de cultivo sin DARF, se les permite un ciclo vegetativo completo y se recolectan sus descendientes (a esta operación llamaremos en adelante "reciclado").

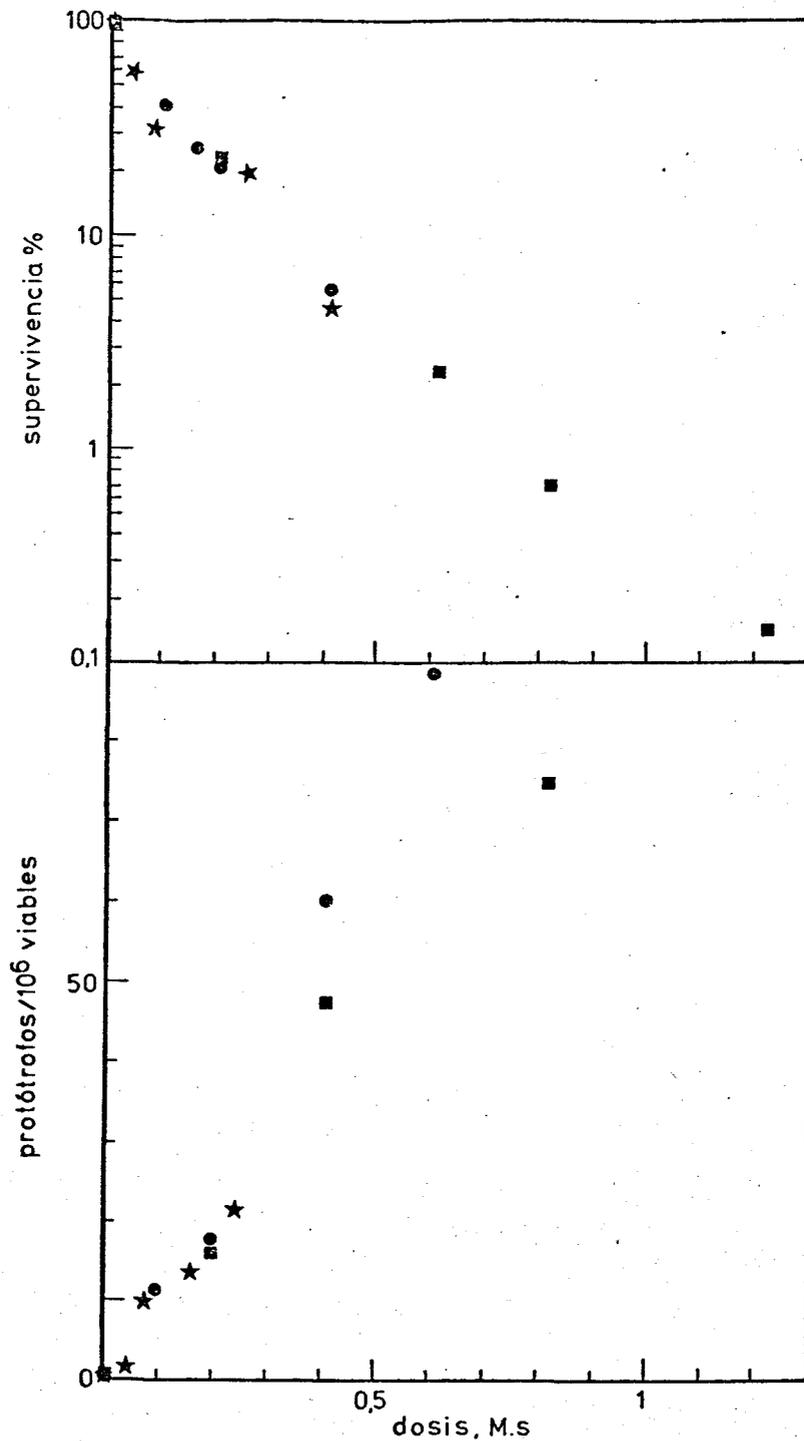


Figura 6. Supervivencia y frecuencia de revertientes Nic^+ tras el tratamiento de esporas S102 (*nicA101*) con nitrosoguanidina, en función de la dosis (concentración molar de nitrosoguanidina \times tiempo de tratamiento). \star , experimentos con 20 μg de nitrosoguanidina por ml; \bullet , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; \blacksquare , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

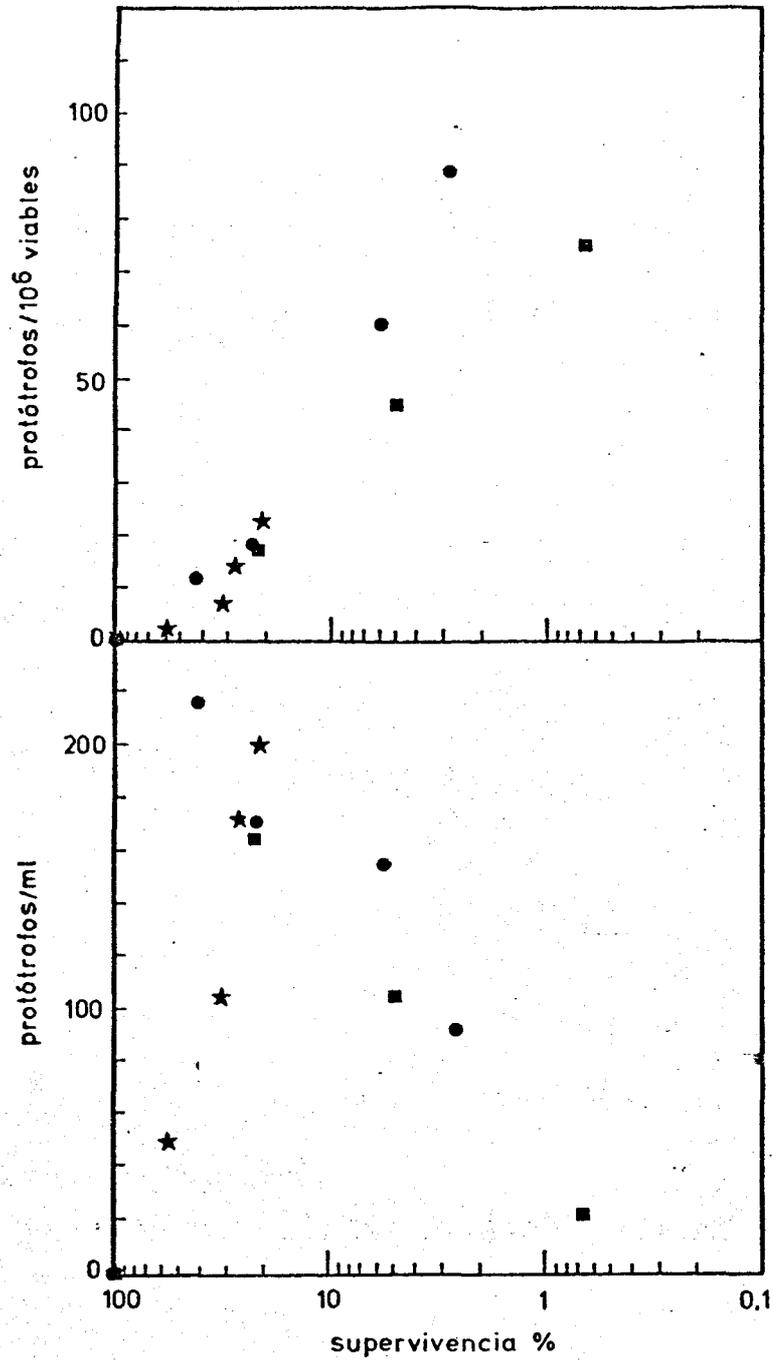


Figura 7. Número de revertientes Nic^+ de la estirpe S102 (*nicA101*) por cada 10^6 viables y por cada ml de cultivo, en función de la supervivencia al tratamiento con nitrosoguanidina. ★, experimentos con 20 μg de nitrosoguanidina por ml; ●, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ■, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

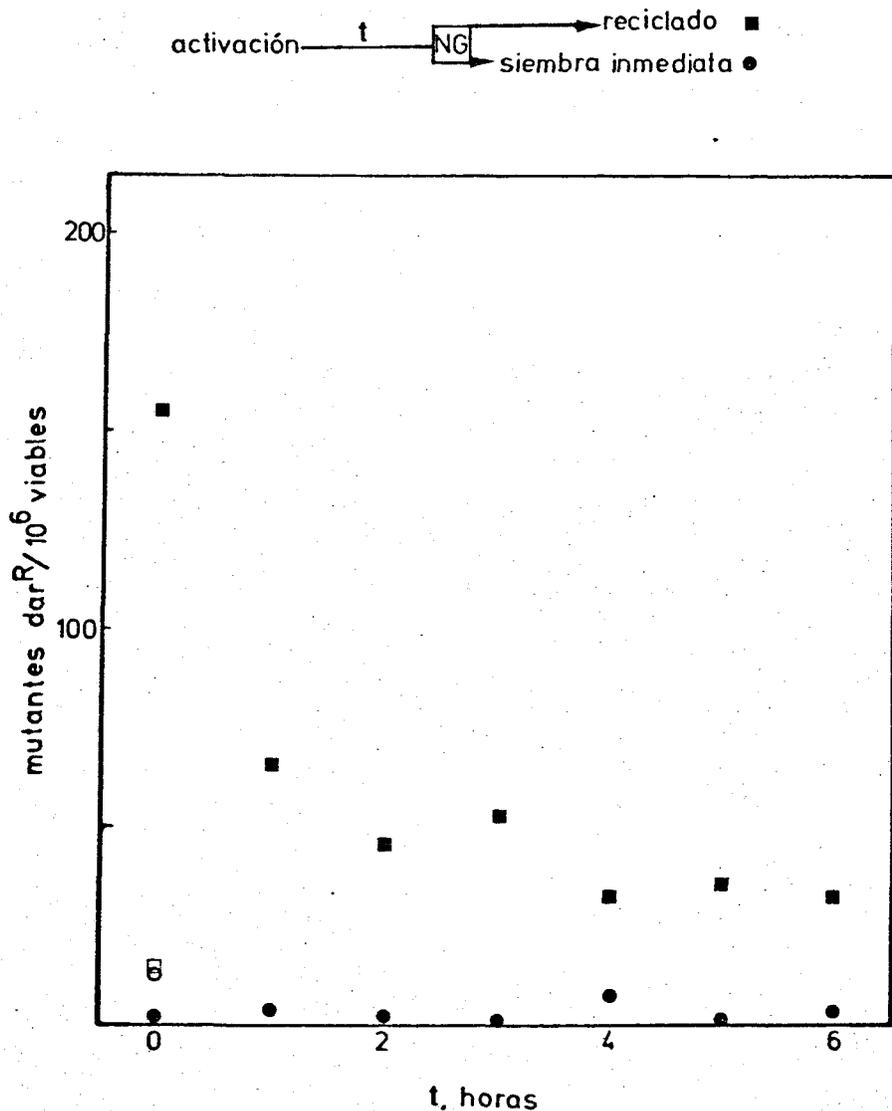


Figura 8. Frecuencia de mutantes Dar^R inducidos en la estirpe S102 (*nicA101*) en función de las horas de incubación antes de nitrosoguanidina. Los símbolos (●) representan la frecuencia de mutantes cuando se siembran en presencia de DARF inmediatamente después del tratamiento; los símbolos (■) es cuando se reciclan $\sim 10^5$ esporas viables en ausencia de DARF y se buscan mutantes entre su descendencia. Los símbolos huecos representan la frecuencia de mutantes espontáneos en ambos casos.

La frecuencia de mutantes es máxima cuando se tratan y reciclan esporas recién activadas. La incubación intermedia entre activación y tratamiento no es conveniente para la obtención de mutantes.

II.3. *Expresión de mutaciones recesivas*

Como se ha visto en el apartado anterior, la resistencia a DARF no se expresa inmediatamente después del tratamiento con nitrosoguanidina. Los siguientes experimentos tienen por objeto averiguar cuánto tiempo hay que incubar las células en ausencia de DARF después del tratamiento mutagénico para que se expresen estas mutaciones.

La figura 9 demuestra que una incubación de hasta seis horas es insuficiente para que se expresen las mutaciones inducidas que permiten resistir a DARF ya que tras esta incubación se observa sólo un leve aumento en la frecuencia de estos mutantes, pero un ciclo completo de crecimiento en ausencia de DARF permite obtener abundantes mutantes inducidos. Resultados parecidos se obtuvieron con la estirpe NRRL1555.

II.4. *Selección de células funcionalmente uninucleadas*

Por definición, las mutaciones recesivas no se expresan en células multinucleadas. Prácticamente todas las esporas de *Phycomyces* son multinucleadas (Swingle, 1903; Heisenberg y Cerdá Olmedo, 1968; Reau, 1972); incluso tras el tratamiento con nitrosoguanidina, que

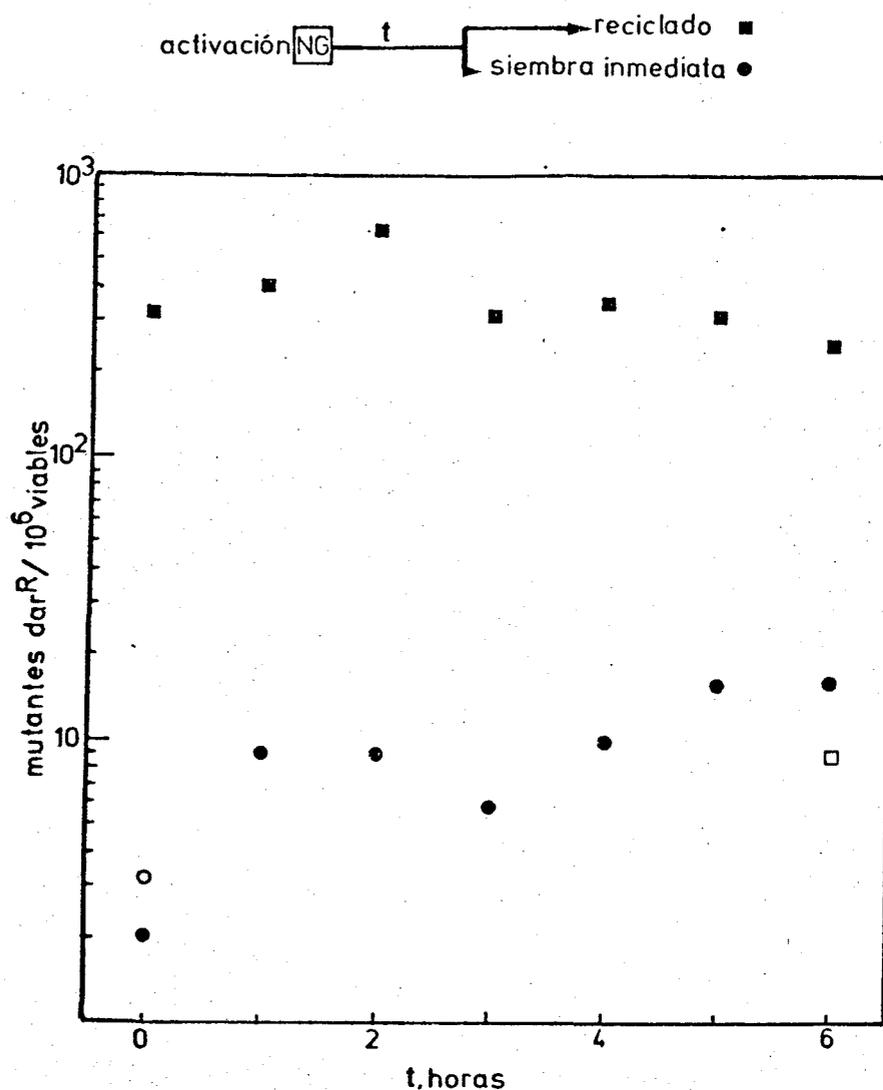


Figura 9. Frecuencia de mutantes Dar^R inducidos en la estirpe B142 en función de las horas de incubación después de nitrosoguanidina. Los símbolos (●) representan la frecuencia de mutantes cuando se siembran en presencia de DARF t horas después del tratamiento. Los símbolos (■) es cuando se reciclan ~10⁵ esporas tratadas y viables en ausencia de DARF y se buscan mutantes entre su descendencia. Los símbolos huecos representan la frecuencia de mutantes espontáneos en ambos casos.

inactiva muchos núcleos, las esporas funcionalmente uninucleadas son sólo el 37% de las supervivientes, según unos cálculos (Cerdá Olmedo y Reau, 1970; Zabala, 1974) y sólo el 25%, según otros.

Se ha diseñado un procedimiento genético para la selección de células funcionalmente uninucleadas, basado en la recesividad de la mutación *dar* y en el reparto aleatorio de los núcleos del micelio durante la formación de las esporas.

Las esporas producidas por un micelio heterocariote C2 * S213, genotipo *carA5* (-) * *dar-52* (-), que contenía aproximadamente un 20% de núcleos S213, se trataron con nitrosoguanidina y se sembraron, a razón de unas 10^6 esporas viables por caja, en cajas de medio nutritivo con DARF. Después de ocho días de incubación a 15°C, se cosecharon y liofilizaron por separado las esporas producidas en cada caja.

Por las razones que veremos en la discusión, creemos que estas esporas funcionalmente uninucleadas supervivientes al tratamiento y son por tanto apropiadas para la búsqueda de mutantes recesivos. En efecto, entre 2000 micelios producidos por estas esporas se encontraron 2 termosensibles y 6 auxótrofos.

Otras muestras de esporas tratadas con nitrosoguanidina se sembraron, más diluídas, en medios con y sin DARF, y se encontró que el 6.3% de los supervivientes eran resistentes a DARF. En otros experimentos similares se encontraron valores homólogos de 9.8% y 14.1%.

Si se realiza el mismo experimento omitiendo DARF, deben crecer todos los supervivientes, cualquiera que sea el número de núcleos funcionales. Se espera que las esporas obtenidas tras el reciclado procedan, en su mayoría, de esporas supervivientes multinucleadas y, por tanto, que expresen con menor frecuencia mutaciones recesivas. Entre 2000 micelios producidos por estas esporas recicladas se encontraron 1 termosensible y 2 auxótrofos. En efecto, parecen encontrarse menos mutantes que en el caso anterior, pero debe tenerse en cuenta que el tamaño de las muestras estudiadas no es suficiente para asegurar que esta diferencia sea significativa ($P = 0.12$, según el test t con transformación angular).

II.5. *Determinación de la densidad de siembra adecuada para el reciclado*

Estos experimentos tienen por objeto determinar el número máximo de esporas que pueden crecer y reproducirse en una misma caja de Petri.

Se sembraron entre 10^2 y 10^6 esporas por caja en varias cajas de medio mínimo con todos los suplementos requeridos. Las esporas provenían de mezclar un pequeño número de esporas de una estirpe con un gran número de esporas de otra, distinguible fácilmente de la anterior. Después de incubar 8 días, se cosecharon separadamente las esporas producidas en cada caja y se determinó la proporción de esporas de la estirpe minoritaria.

La Tabla VIII muestra los resultados de dos experimentos recíprocos, es decir, la estirpe minoritaria usada en uno fue la estirpe mayoritaria en el otro y recíprocamente. Las estirpes usadas llevan auxotrofías distintas para poder detectar sus esporas simplemente seleccionando en medio mínimo con el suplemento adecuado.

En ambos experimentos, el número de cajas en que se cosechan esporas de la estirpe minoritaria está dentro de los números esperados de cajas sembradas con al menos una esporas minoritaria, según la distribución Poisson de esporas por caja, cuya media aparece en la tercera columna. Deducimos, por tanto, que una espóra de cualquiera de las dos estirpes, con cientos de miles de la otra estirpe, tiene una probabilidad muy alta de crecer y reproducirse. Este resultado sugiere que en una misma caja de Petri pueden germinar y reproducirse cientos de miles de esporas.

Al comparar las frecuencias de las esporas de la estirpe minoritaria en la siembra y en la cosecha se observan casi siempre una selección a favor de la estirpe minoritaria, en ambos experimentos recíprocos; esta selección es particularmente notable cuando la estirpe minoritaria es C242.

La Tabla IX muestra los resultados de un tercer experimento similar a los anteriores pero con una estirpe mayoritaria auxótrofa para el ácido nicotínico y una estirpe minoritaria protótrofa.

TABLA VIII. Estimación del número de esporas que pueden reproducirse en una misma caja de Petri (ver texto)

Experimento 1: Estirpe mayoritaria, H1; estirpe minoritaria, C242.

Esporas totales por caja	Siembra		Cosecha	
	Proporción C242	Media de esporas C242 por caja	Cajas con C242	Proporción C242 entre todas las cajas
$2,5 \times 10^2$	$0,5 \times 10^{-2}$	1,2	7/10	$3,9 \times 10^{-2}$
$2,5 \times 10^3$	$0,6 \times 10^{-3}$	1,5	6/10	$1,2 \times 10^{-3}$
$2,8 \times 10^4$	$0,9 \times 10^{-4}$	2,5	10/10	$6,0 \times 10^{-3}$
$2,8 \times 10^5$	$0,6 \times 10^{-5}$	1,7	10/10	$3,0 \times 10^{-3}$

Experimento 2: Estirpe mayoritaria, C242; estirpe minoritaria, H1.

Esporas totales por caja	Siembra		Cosecha	
	Proporción H1	Media de esporas H1 por caja	Cajas con H1	Proporción H1 entre todas las cajas
$0,57 \times 10^3$	$0,67 \times 10^{-3}$	0,4	2/10	$0,06 \times 10^{-3}$
$0,57 \times 10^4$	$0,67 \times 10^{-4}$	0,4	3/10	$0,67 \times 10^{-4}$
$0,72 \times 10^5$	$0,53 \times 10^{-5}$	0,4	4/10	$0,78 \times 10^{-5}$
$0,72 \times 10^6$	$0,53 \times 10^{-6}$	0,4	2/9	$7,67 \times 10^{-6}$

TABLA IX. Estimación del número máximo de esporas que pueden reproducirse en una misma caja de Petri (ver texto)

Experimento 3: Estirpe mayoritaria, S102; estirpe minoritaria, C115.

Esporas totales por caja	Siembra		Cosecha	
	Proporción C115	Media de esporas C115 por caja	Cajas con C115	Proporción C115 entre todas las cajas
$0,91 \times 10^3$	$4,5 \times 10^{-3}$	4,1	10/10	$68,2 \times 10^{-3}$
$0,91 \times 10^4$	$4,5 \times 10^{-4}$	4,1	6/10	$20,4 \times 10^{-4}$
$0,61 \times 10^5$	$7,4 \times 10^{-5}$	4,5	2/10	$2,2 \times 10^{-5}$
$0,61 \times 10^6$	$7,4 \times 10^{-6}$	4,5	3/9	$14,1 \times 10^{-6}$

Los resultados de la primera fila (la menor densidad de siembra) indican como los experimentos anteriores, que todas o casi todas las esporas minoritarias han sido capaces de reproducirse y han sido seleccionadas durante el reciclado, ya que su proporción en la cosecha es mayor que su proporción en la siembra.

En las tres últimas filas (a mayores densidades de la estirpe mayoritaria) sólo 11 de las 29 cajas contienen descendencia C115, o sea, lo esperado según la distribución Poisson si hubieran germinado poco más del 10% de las esporas C115 sembradas. Aún en estas condiciones se observa alguna selección a favor de C115, ya que su proporción en la cosecha suele ser mayor de lo esperado.

Discusión

1. *Letalidad e inducción de mutaciones*

En *Phycomyces* la frecuencia de mutantes entre los supervivientes aumenta con la dosis de nitrosoguanidina sin llegar a saturarse. La letalidad observada con la mayor dosis utilizada fue suficientemente alta para haber mostrado la saturación en la inducción de mutantes, si este fenómeno ocurriera en *Phycomyces* de forma similar a como lo hace en bacterias y en algunos eucariotes como *S. cerevisiae*.

Los resultados de letalidad y mutación indican que todas las esporas son sensibles a los efectos letales y mutagénicos de la nitrosoguanidina, y que no se encuentran subpoblaciones poco sensibles, como ocurre en *S. cerevisiae*.

Los resultados permiten recomendar unas condiciones prácticas convenientes para búsqueda de mutantes, que modifican ventajosamente las que venían siendo habituales (Heisenberg y Cerdá Olmedo, 1968; Cerdá Olmedo y Reau, 1970) y que ya han sido indicadas en Resultados.

La frecuencia máxima de inducción de mutaciones recesivas ocurre en esporas recién activadas y disminuye durante el proceso de germinación, con la incubación post-activación. Estos no parecen ser los resultados esperados si la nitrosoguanidina mutara preferentemente genes en replicación, como hace en bacterias (Cerdá

Olmedo y Hanawalt, 1968; Jiménez Sánchez y Cerdá Olmedo, 1975) y levaduras (Dawes y Carter, 1974; Burke y Fangman, 1975). No hay que suponer, sin embargo, que la nitrosoguanidina actúe en *Phycomyces* del mismo modo que en otros organismos. También podría ser que el gen *dar* se replique inmediatamente después de la activación o que la nitrosoguanidina pueda ejercer su efecto mutagénico algún tiempo después de su aplicación.

La frecuencia de mutantes *dar* disminuye con el tiempo de incubación post-activación de las esporas. Debe tenerse en cuenta que las mutaciones *dar* estudiadas en este trabajo son muy recesivas. La multiplicación de los núcleos durante la germinación dificulta la aparición de células funcionalmente uninucleadas, en las que podría expresarse la mutación.

2. Expresión de mutaciones *dar*

Las mutaciones *dar* no se expresan inmediatamente después de ser inducidas en una célula. Es necesario que la célula mutada crezca en ausencia de DARF y renueve sus estructuras celulares (permeasa de la riboflavina) para que se vuelva resistente. El retraso fenotípico en la expresión de la mutación *dar* refleja que las esporas producidas en micelios silvestres tienen suficientes permeasas activas en su citoplasma para permitir la entrada del inhibidor. Seis horas de crecimiento en ausencia de DARF son insuficientes para renovar las permeasas. Un ciclo vegetativo completo en ausencia de DARF permite, como era de esperar, la expresión de las mutaciones inducidas.

3. Detección de mutaciones recesivas

La escasez de células uninucleadas en el ciclo vegetativo de *Phycomyces* era una grave dificultad para la detección y el aislamiento de mutaciones recesivas. En esta Tesis se ha desarrollado un método genético para seleccionar células uninucleadas y se ha aplicado a la mejora de la búsqueda de mutantes recesivos después del tratamiento de las esporas con nitrosoguanidina.

Las esporas supervivientes al tratamiento que sean funcionalmente uninucleadas crecerán en presencia de DARF si su único núcleo lleva la mutación *dar*. Se han tratado con nitrosoguanidina las esporas producidas por heterocariontes C2 * S213 que contenían un 20% de núcleos S213, portadores de la mutación *dar-52*. El 37% de las esporas supervivientes son funcionalmente uninucleadas, según se ha deducido de otros experimentos en las mismas condiciones (Cerdá Olmedo y Reau, 1970); en este experimento, el 20% de ellas deben ser resistentes. O sea, el 7.4% de las esporas supervivientes.

Las esporas supervivientes que sean funcionalmente multinucleadas sólo crecerán en presencia de DARF si todos sus núcleos son S213, porque la mutación *dar-52* es fuertemente recesiva. Por tanto esperamos que resistan a DARF el $(0.20)^2 = 4\%$ de las esporas supervivientes binucleadas y el $(0.20)^3 = 0.8\%$ de las trinucleadas. Admitiendo que el 56% de las esporas supervivientes son binucleadas y el resto trinucleadas (Cerdá Olmedo y Reau, 1970), esperamos que sean re-

sistentes a DARF por estos conceptos el 2.3% de las esporas supervivientes.

En total esperamos que sean resistentes a DARF un $7.4 + 2.3 = 9.7\%$ de las esporas supervivientes y que un $7.4/9.7 = 76\%$ de éstas sean funcionalmente uninucleadas. Estos cálculos son sólo aproximados, dados los errores probables de los datos usados. Podrían admitirse estimaciones de 7 a 12% para el porcentaje de esporas supervivientes que son resistentes a DARF, lo que concuerda muy bien con los resultados experimentales. Igualmente puede aceptarse que del 70 al 85% de las esporas resistentes son funcionalmente uninucleadas.

La selección del componente S213 tiene tres ventajas para la búsqueda de mutantes recesivos: (a) aumenta la frecuencia de éstos entre los supervivientes (en la misma proporción que aumenta la proporción de esporas uninucleadas, o sea, de 2 a 3.5 veces), (b) facilita la expresión de las mutaciones y (c) elimina los supervivientes que presentan defectos de crecimiento y reproducción (al exigir un ciclo vegetativo completo, o reciclado, entre la exposición al mutágeno y la búsqueda de los mutantes).

4. *Reciclado de esporas*

Al introducir un ciclo de reciclado debe asegurarse el crecimiento y reproducción de suficientes clones distintos para no eliminar los mutantes buscados. El número de clones a reciclar deberá exceder al inverso de la frecuencia de los mutantes. Más exactamente, si

la frecuencia de mutantes fuera μ deberíamos examinar $\frac{\ln 0.05}{\ln(1-\mu)} \approx 3/\mu$ clones distintos para tener un 95% de probabilidad de encontrarlo. Es importante saber cuántos clones distintos pueden crecer y reproducirse en un medio determinado, por ejemplo, en una caja de Petri.

Los resultados obtenidos indican que es razonable reciclar 10^5 clones por caja. La fiabilidad de este dato depende de posibles efectos de selección. En las Tablas VIII y IX se encuentra muy frecuentemente selección a favor de la estirpe minoritaria. La causa de esta selección podría estar en la relación entre abundancia de un nutriente y número de esporas de la estirpe que lo necesita. Aunque las cantidades utilizadas se suponen suficientes para producir el crecimiento máximo aún de la estirpe mayoritaria, podría ocurrir que las esporas minoritarias estuvieran relativamente mejor nutridas, formaran colonias mayores y produjeran más esporas hijas.

La selección a favor del componente minoritario, de ser general, favorecería el aislamiento de mutantes tras el reciclado, porque los mutantes son siempre relativamente raros.

CAPITULO III

ANALISIS GENETICO POR RECOMBINACION

III.1. *Análisis genético de los mutantes blancos ciegos*

Entre los supervivientes de un tratamiento con nitrosoguanidina no es raro encontrar mutantes blancos y ciegos, que han adquirido estas dos características fenotípicas simultáneamente.

Para determinar si este fenotipo se debe a una sola mutación o a dos mutaciones se cruzaron las estirpes blancas ciegas obtenidas de esta manera por la estirpe silvestre. Si ceguera y blancura se debieran a una sola mutación o a dos mutaciones estrechamente ligadas, no esperaríamos encontrar recombinantes (sólo blancos o sólo ciegos). Anteriormente, Alberto Ferrús había demostrado de esta manera que una de estas estirpes, S18, era portadora de dos mutaciones, una *mad* y otra *carA* (Bergman et al., 1973).

Las cigosporas empezaron a germinar a los 120 días de iniciarse los cruzamientos. Los germoesporangios se analizaron todos aisladamente y se estudiaron cuantitativa y cualitativamente una proporción de las germoesporas contenidas en ellos. La Tabla X indica la frecuencia de cada tipo de tétrada en los cruzamientos realizados.

La frecuencia de tétradas incompletas es muy alta, como era de esperar por la poca isogenicidad de las estirpes que intervienen en el cruzamiento.

TABLA X. Análisis de tétradas en cruzamientos de diversas estirpes blancas ciegas por la silvestre UBC21. Se indica el total de germoesporangios (geg) estudiados, el número de los que resultan estériles y la clasificación de los fértiles según el tipo de tétrada que contenía: DP (ditipo parental), DR (ditipo recombinante) y T (tetratipo); las tétradas incompletas se clasifican en "rec" (con recombinación) o "no rec".

Estirpe blanca ciega	Total geg	Esté- riles	Tétradas				
			Completas			Incompletas	
			DP	DR	T	"rec"	"no rec"
S5	59	12	3	2	0	30	12
S16	26	6	2	2	1	14	1
S18	40	15	6	3	0	12	4
S19	65	23	6	7	0	19	10
S23	27	5	3	5	0	10	4
S28	40	14	0	0	0	1	25
S37			las cigosporas no germinaron				
S47			las cigosporas no germinaron				
S48	44	11	4	8	2	15	4
S49	5	2	0	0	0	0	3

Los seis cruzamientos en que se han obtenido resultados suficientes indican la presencia de dos mutaciones independientes (números parecidos de ditipos parentales y recombinantes) y ambas próximas a sus respectivos centrómeros (muy pocos tetratipos).

En el caso de S28 también parece haber dos mutaciones pero no se encontraron tétradas completas, por lo que no se puede hablar de independencia o ligamiento; en el caso de S49 los resultados son insuficientes para decidir incluso si existen una o dos mutaciones y los cruzamientos con S37 y S47 no dieron cigosporas viables.

Por tanto, en todos los casos en que tenemos resultados suficientes se encuentran dos mutaciones independientes; la responsable de la blancura es una mutación *carA*, porque estas estirpes responden a la vitamina A; la responsable de la ceguera es una mutación *madC*, al menos en el caso de S5 y S18 (Ootaki et al., 1974).

III.2. Análisis genético del fenotipo I

Las estirpes de fenotipo A son blancas y sensibles a la acción de la vitamina A; las estirpes de fenotipo I son amarillas e insensibles a vitamina A.

Para determinar las relaciones de ligamiento entre los alelos responsables de ambos fenotipos, se hicieron cruzamientos entre dos estirpes de fenotipo I y una estirpe de fenotipo A que además era auxótrofa para el ácido nicotínico.

Las estirpes de fenotipo I no forman cigosporas ellas solas; para que cruzaran se les incluyó en heterocariosis con una estirpe silvestre para la carotenogénesis y auxótrofa para el ácido nicotínico.

Aproximadamente a los 120 días de haberse iniciado los cruzamientos empezaron a germinar las cigosporas. Se analizaron separadamente algunos germoesporangios de cada cruzamiento, para determinar si eran estériles y, en caso de ser fértiles, si contenían descendencia de la estirpe de fenotipo I.

Se estudiaron separadamente 10 germoesporangios del cruzamiento 1 (Tabla XI), uno de los cuales fue estéril y en 4 de los 9 restantes intervinieron núcleos I. En el cruzamiento 2 se estudiaron 17 germoesporangios, dos de ellos resultaron estériles y en 6 de los 15 restantes intervinieron núcleos I.

Con el resto de los germoesporangios de ambos cruzamientos se hizo análisis de esporas en masa. Las germoesporas se sembraron en medio mínimo acidificado y suplementado con vitamina A; en este medio se seleccionan sólo las esporas provenientes de meiosis en que intervienen núcleos I y núcleos A, ya que los descendientes de los cruzamientos C242 × S102 tienen que ser auxótrofos para el ácido nicotínico y no crecen en medio mínimo.

Los resultados aparecen en la Tabla XI. Es de notar la producción, en el cruzamiento 1, de recombinantes de fenotipo AI, que como podía esperarse del efecto conjunto de las mutaciones *carA5* y *car-131*, son de color blanco y no se activan en presencia de vitamina A. En el cruzamiento 1 la frecuencia de fe-

notipos recombinantes (48%) es prácticamente igual a la de fenotipos parentales. Esto indica que la mutación *car-131* responsable del fenotipo I en la estirpe S144 y la mutación *carA5* afectan a genes distintos e independientes. La mutación *car-131* afecta presumiblemente a un nuevo gen, que llamamos *carI*; la designación más completa de la mutación será *carI131*.

TABLA XI. Análisis genético del fenotipo I y del fenotipo A

Cruzamiento 1: C242 × (S144 * S102)
Fenotipos A, Nic⁻ × (I * Nic⁻)

Cruzamiento 2: C242 × (S119 * S102)
Fenotipos A, Nic⁻ × (I * Nic⁻)

	1	2
Germoesporancios estudiados	187	185
Germoesporas protótrofas estudiadas	1092	1126
Proporciones:		
Fenotipos A e I (parentales)	0.52	1
Fenotipo AI (recombinantes)	0.20	0.00
Silvestre (recombinantes)	0.28	0.00
Estimación del número de meiosis en que intervinieron núcleos I	75	65

En el cruzamiento 2 no se encontraron recombinantes ni de fenotipo AI ni de fenotipo silvestre. Se estima haber estudiado 65 meiosis diferentes en que cru-

zaron núcleos de fenotipo I por núcleos de fenotipo A. Concluimos que, con probabilidad mayor del 95%, la frecuencia de recombinación entre las mutaciones *carA5* y *car-113* (responsable de este fenotipo I) es menor del 6% (Spiegel, 1974), y muy probablemente sea tan pequeña que ambas mutaciones afecten al mismo gen.

En el mismo cruzamiento 2 se hizo un análisis de tétradas aisladas para las mutaciones *car-113* y *nicA* y se encontró que ambas son independientes. Esto concuerda con la independencia de las mutaciones *carA* y *nicA*, descritas anteriormente (Eslava et al., 1975a).

Las dos mutaciones *car-113* y *car1131*, productoras ambas de un fenotipo I, son independientes entre sí ya que una de ellas está estrechamente ligada a *carA* y la otra es independiente de *carA*.

III.3. Análisis genético de los fenotipos A y S

III.3.a. Cruzamiento de una estirpe de fenotipo A por una de fenotipo S

Las mutaciones *carA* y *carS* parecen estar implicadas en la regulación de la síntesis de β -caroteno. Se quiso determinar si ambas mutaciones afectan a un mismo gen o a dos genes, y en este último caso si son independientes.

Se realizó un cruzamiento entre una estirpe de fenotipo A por una estirpe de fenotipo S. Como las estirpes de fenotipo S son incapaces de formar cigosporas, se hizo un heterocarionte entre la estirpe S y una silvestre para la carotenogénesis (Tabla XII). El

micelio heterocariótico C115 * S102 utilizado contenía un 35% de núcleos C115; se supuso que los núcleos C115 intervinieron en el cruzamiento en la misma proporción.

TABLA XII. Cruzamiento entre una estirpe de fenotipo A y otra de fenotipo S

Cruzamiento: C242 × (C115 * S102)

Fenotipos A, Nic⁻ × (S * Nic⁻)

Germoesporangios estudiados	159
Germoesporas protótrofas estudiadas	637
Proporciones:	
Fenotipo A	0,34
Fenotipo S	0,30
Fenotipo AS + silvestre	0,36
Estimación del número de meiosis en que intervinieron núcleos C115	56

Las cigosporas empezaron a germinar a los 130 días de haberse iniciado el cruzamiento. El análisis de esporas en masa se hizo en medio mínimo. En este medio se seleccionan sólo los descendientes de las meiosis en que hayan intervenido núcleos S, ya que los descendientes del cruzamiento C242 × S102 son auxótrofos para el ácido nicotínico y no pueden crecer en medio mínimo.

La Tabla XII da los resultados del análisis genético realizado. Entre los descendientes de color amarillo se distinguen dos tipos, unos que se comportan en todo como la estirpe silvestre y otros que acumulan

150 ppm de β -caroteno tanto a la luz como en oscuridad. Estos últimos, carentes por completo de fotoinducción de la carotenogénesis, deben ser los dobles mutantes *carA carS* y a su fenotipo lo llamamos AS.

Teniendo en cuenta que se analizaron los productos de unas 56 meiosis de cruzamientos *carA* \times *carS* y que las viabilidades son irregulares, la frecuencia de recombinación del 36%, aunque sugiere que las mutaciones *carA* y *carS* están débilmente ligadas, no excluye convincentemente que sean independientes.

III.3.b. Cruzamiento de una estirpe AS por una silvestre

Se quiso determinar si el fenotipo AS asignado a los micelios amarillos no fotoinducibles en el apartado anterior correspondía en realidad a dobles mutantes *carA carS*. Para ello se cruzó una de las estirpes presuntamente AS obtenida en el cruzamiento anterior por la estirpe silvestre. Si la asignación era correcta, entre la descendencia se deberían encontrar recombinantes que sólo llevaran la mutación *carA* o sólo la mutación *carS*.

A los 150 días de iniciarse el cruzamiento empezaron a germinar las cigosporas. El contenido de cada germoesporangio se analizó separadamente en medio nutritivo. La Tabla XIII muestra los resultados obtenidos en este cruzamiento. Los fenotipos A, S, AS y silvestre se distinguieron con facilidad en la descendencia.

TABLA XIII. Cruzamiento entre una estirpe de fenotipo AS y una silvestre

Cruzamiento: S283 × B36

Fenotipos AS × Nic⁻

Germoesporangios estudiados	127
Germoesporangios fértiles	64
Tétradas completas	56
DP	26
DR	4
T	26
Tétradas incompletas	8
DP	0
DR	1
T	7

La mayor abundancia de ditipos parentales que de ditipos recombinantes demuestra el ligamiento entre *carA* y *carS*. La distancia entre ambos se estima como 0.34, que coincide con la estimación del apartado anterior.

Se observa además una frecuencia alta de tetra-tipos, que indica que al menos una de las mutaciones debe estar situada lejos del centrómero; esta mutación debe ser *carS* porque en el apartado III.1. se encontró que *carA* está relativamente cerca del centrómero.

Estos resultados confirman que los dobles mutantes *carA carS* corresponden al fenotipo "amarillo no foto-inducible" que se había asignado.

III.4. Análisis genético de los fenotipos B, R y A

Se ha demostrado mediante estudios genéticos (Torres Martínez et al., en prensa) que los fenotipos A y R son debidos a mutaciones en un mismo gen *carRA* y por tanto estrechamente ligadas.

Para determinar la situación del gen *carB* respecto de *carRA* se realizó el cruzamiento descrito en la Tabla XIV. Uno de los parentales es un heterocariote entre una estirpe de fenotipo B y una estirpe de fenotipo R; aunque las estirpes B y R son incapaces de cruzar por sí solas, sí lo hacen cuando están ambas en el mismo heterocariote. El otro parental es una estirpe de fenotipo A. Las estirpes de fenotipo R y de fenotipo A llevan ambas el mismo marcador de auxotrofia para el ácido nicotínico.

Las cigosporas empezaron a germinar a los 150 días aproximadamente de iniciarse el cruzamiento. Se hizo análisis de tétradas estudiando separadamente en medio nutritivo el contenido de 82 germoesporangios, de los que 25 resultaron estériles.

De los 44 germoesporangios que contenían descendientes de los núcleos R, sólo uno contenía recombinantes amarillos. Se confirma así el estrecho ligamiento entre las mutaciones responsables de los fenotipos A y R.

Se estudiaron detalladamente los fenotipos de 278 micelios procedentes del germoesporangio que contenía recombinantes amarillos (Fig. 10 y Tabla XIV) y se con-

firmó la homocariosis de éstos. Se concluyó que se trataba de una tétrada tetratipo incompleto, ya que no se encontraron los recombinantes *carA5 carR21*. Es improbable la interpretación alternativa de que los tres parentales hubieran contribuido a la descendencia, los amarillos fueran recombinantes entre B y A, y se hubieran perdido todos los descendientes *carB*, además de los *carA carR*. Los amarillos encontrados son por tanto ejemplo de la baja frecuencia de recombinación entre R y A.

De los 13 germoesporangios con descendientes de núcleos B, sólo uno contenía recombinantes amarillos. Este resultado demuestra el ligamiento entre *carB* y *carA*. Se analizaron 34 germoesporas del único germoesporangio que contenía recombinantes amarillos (Fig. 11 y Tabla XIV) y se confirmó la homocariosis de éstos y el alto contenido en fitoeno de los micelios blancos. Esta tétrada contenía recombinantes amarillos de *carB* y *carA* y representaba el producto simultáneo de dos meiosis, porque los tres productos distintos encontrados no pueden proceder de una sola.

Estos resultados demuestran que las mutaciones *carA*, *carR* y *carB* están situadas muy próximas en el mismo cromosoma.



Figura 10. Aspecto de los micelios procedentes de germspores del germosporangio "a" (ver Tabla XIV). Los micelios rojos demuestran la participación de los núcleos *carR* en el cruzamiento. Los micelios blancos resultaron ser todos *carA*. Los micelios amarillos se cree que son recombinantes entre R y A.



Figura 11. Aspecto de los micelios procedentes de germspores del germosporangio "b" (ver Tabla XIV). Los micelios blancos son todos *carB*; los amarillos se cree que son recombinantes entre B y A.

TABLA XIV. Situación de *carB* respecto a *carRA*

Cruzamiento: C242 × (S240 * S265)

Fenotipos A, *Nic*⁻ × (R *Nic*⁻ * B)

	Núm. total	Tétradas					
		Completas			Incompletas		
		DP	DR	T	DP	DR	T
Germoesporangios con descendientes de S240	44	37	0	0	6	0	1 ^a
Germoesporangios con descendientes de S265	13	8	0	0	4	0	1 ^b

^aGermoesporangio con 5300 germoesporas, de las que se caracterizaron 278, como sigue:

<u>Tipo</u>	<u>Frecuencia</u>	<u>Color</u>	<u>Nic</u>	<u>Respuesta a</u>		<u>Genotipo</u>
				<u>vit. A</u>	<u>CFTA</u>	<u>presunto</u>
1	107	Amarillo	<i>Nic</i> ⁻	+	+	<i>nicA101</i>
2	72	Rojo	<i>Nic</i> ⁻			<i>carR21 nicA101</i>
3	99	Blanco	<i>Nic</i> ⁻	+	+	<i>carA5 nicA101</i>

^bGermoesporangio con 350 germoesporas, de las que se caracterizaron 34, como sigue:

<u>Tipo</u>	<u>Frecuencia</u>	<u>Color</u>	<u>Nic</u>	<u>Respuesta a</u>		<u>Genotipo</u>
				<u>vitamina A</u>		<u>presunto</u>
1	19	Amarillo	<i>Nic</i> ⁻	+		<i>nicA101</i>
2	14	Blanco	<i>Nic</i> ⁻	-		<i>carB10 nicA101</i>
3	1	Amarillo	<i>Nic</i> ⁺	-		silvestre

Discusión

1. *Mutantes blancos ciegos*

En algunos organismos la nitrosoguanidina induce, con cierta frecuencia, mutaciones múltiples en genes que se están replicando simultáneamente. En *Phycomyces* se han obtenido algunos mutantes blancos ciegos tras una sola mutagénesis. Por tanto, podría pensarse que su fenotipo fuese el resultado de una sola mutación, o de dos muy próximas entre sí, o de dos no próximas pero en genes que se replican a la vez.

Los resultados del análisis genético realizado con estos mutantes indican que su fenotipo se debe a dos mutaciones, una *carA* y otra *mad*, independientes entre sí, puesto que recombinan con una frecuencia aproximada del 50%, y ligadas a sus respectivos centrómeros, puesto que la frecuencia de tetratipos es muy baja (del orden del 5%). Esta frecuencia de tetratipos indica que la distancia de estas mutaciones a sus centrómeros debe ser menor del 10% de recombinación, si se aplican los cálculos obtenidos para otros organismos (Finchan, 1979). En algunos cruzamientos (estirpes S28 y S49 por silvestre) los resultados obtenidos son insuficientes para ser concluyentes por sí solos, aunque es muy probable que las conclusiones sacadas para las otras estirpes se puedan hacer extensivas a éstas.

Como las mutaciones que confieren blancura y ceguera están situadas en distintos cromosomas y han sido inducidas al mismo tiempo, cabe la posibilidad de

que afecten a zonas que se repliquen al mismo tiempo, como está descrito que ocurre en *S. cerevisiae* (Dawes y Carter, 1974; Burke y Fangman, 1975).

2. Fenotipo I

Dos estirpes mutantes con el mismo fenotipo (I), cuya carotenogénesis no es estimulable por la vitamina A y el CFTA (Murillo, 1975), han resultado estar mutadas en genes independientes.

La mutación *car-113* de la estirpe S119 es alélica de *carA* o está muy estrechamente ligada a ella. En las meiosis estudiadas no se encontró ninguna colonia de fenotipo recombinante, lo que indica que si *carA* y *car-113* afectan a genes distintos, estos deben encontrarse a menos de un 6% de recombinación. La hipótesis más plausible es que *car-113* sea una mutación de *carA*. En efecto, las mutaciones *carA* de fenotipo blanco afectan a la estimulación de la carotenogénesis por vitamina A (Eslava et al., 1974).

La estirpe S144 es portadora de la mutación *carI* que afecta a un gen independiente de *carA*. El doble mutante *carA carI* presenta el fenotipo que se podía esperar de ambas mutaciones: es de color blanco y no es estimulable por vitamina A. El producto activo del gen I es necesario para la activación por la vitamina A tanto en estirpes silvestres como en mutantes *carA*, y la mutación *carI* tiene el mismo efecto en fondo silvestre que en fondo *carA*.

Según estos resultados la activación de la carotenogénesis por medios químicos depende de al menos dos funciones celulares independientes. Una de ellas es probablemente la determinada por el gen *carRA*, que juega un papel regulatorio general de la carotenogénesis controlando la transferencia de sustratos en los complejos carotenogénicos (Murillo et al., en preparación). La otra es una función nueva, identificada por primera vez en esta Tesis.

3. Fenotipos A y S

Las mutaciones *carA* y *carS*, que alteran la regulación de la carotenogénesis, afectan a genes distintos situados en el mismo cromosoma a una distancia de un 34% de recombinación.

Las estirpes *carA carS* son de color amarillo, pero su carotenogénesis no es estimulable por la luz. Esta asignación se basó en que al cruzar una estirpe *carA* por una estirpe *carS* se obtuvieron proporciones comparables de recombinantes de fenotipo silvestre y de un nuevo fenotipo "amarillo no fotoinducible", que no podían ser otros que los dobles mutantes. Esta asignación fue confirmada al cruzar los presuntos, *carA carS* por la estirpe silvestre y encontrar entre la descendencia segregantes *carA* y *carS*.

La mutación *carA*, que en la oscuridad disminuye la concentración de β -caroteno (Eslava et al., 1974), parece tener un efecto similar cuando se combina con la mutación *carS*: los efectos estimulador y reductor se contrarrestan y resulta un fenotipo muy parecido al sil-

vestre, pero sin fotoinducción de la carotenogénesis como en el silvestre. Parece ser que la mutación *carA* es la responsable de la no fotoinducción de los dobles mutantes *carA carS* (López Díaz y Cerdá Olmedo, en prensa).

4. Fenotipos B, R y A

Parece que los fenotipos A y R están determinados por un solo gen bifuncional (Torres Martínez et al., en prensa). Este gen, *carRA*, ha resultado estar muy próximo al gen *carB*. Los productos de los genes B y R actúan en la síntesis de β -caroteno formando un agregado multienzimático (De la Guardia et al., 1971).

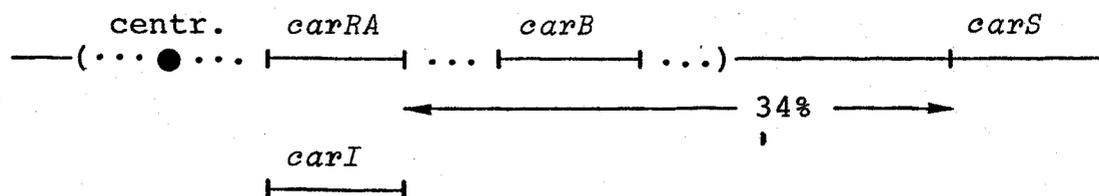
Los mutantes *al-1* y *al-2* de *N. crassa* presentan fenotipos parecidos, respectivamente, a los *carA* y *carB* de *Phycomyces*. Las mutaciones *al-1* y *al-2* también se encuentran muy próximas en el mismo cromosoma (Subden y Threlkeld, 1970).

Los genes multifuncionales y los cúmulos de genes muy próximos no son una peculiaridad excepcional de la biosíntesis de caroteno en *Phycomyces*, sino que se encuentran en otras rutas metabólicas regidas por agregados multienzimáticos, como la utilización del quinato (genes *qa*) y la síntesis de aminoácidos aromáticos (genes *arom*), en *Neurospora crassa*, y la síntesis de histidina (región *his-4*), en *Saccharomyces cerevisiae* (Giles, 1978).

Relaciones de ligamiento entre genes de la carotenogénesis

Los cruzamientos analizados en esta Tesis demuestran que las mutaciones *carA*, *carR*, *carB* y *car-113* están estrechamente ligadas y relativamente próximas al centrómero. Las mutaciones *carR* y *carA* han sido atribuidas a los segmentos proximal y distal, respectivamente, de un gen bifuncional (Torres Martínez y Cerdá Olmedo, en prensa). La mutación *car-113* está presumiblemente en el segmento *carA*. Por el contrario, *carB* debe ser un gen distinto. En el mismo cromosoma, pero a la considerable distancia de 34% de recombinación, está el gen regulador *carS*. El único gen relacionado con la carotenogénesis, pero independiente de este bloque, es *carI*, cuya única mutación identificada por ahora, *carI131*, bloquea la estimulación de la carotenogénesis por vitamina A y otros productos químicos.

El croquis adjunto resume estas relaciones de ligamiento, el paréntesis y los puntos suspensivos indican que se desconoce el orden exacto.



El estrecho ligamiento entre los genes *carRA* y *carB* puede que sea aprovechado para una regulación común, que no puede dejar de existir para explicar los muy distintos niveles a que se puede fijar la carotenogénesis (Murillo

y Cerdá Olmedo, 1975; Murillo et al., 1978), sin indicios de desequilibrio entre las operaciones sucesivas de deshidrogenación y ciclación.

Es interesante que en *Rhodopseudomonas capsulata*, una bacteria en la que se ha iniciado el estudio genético de la carotenogénesis, las mutaciones estudiadas caigan en cinco cúmulos muy próximos, que pueden corresponder a genes y que sugieren un "operón de la carotenogénesis" (Yen y Marrs, 1976).

BIBLIOGRAFIA

ADELBERG, E.A., MANDEL, M. y CHEN, G.C.C. (1965).
Biochem. Biophys. Res. Commun., 18, p. 788.

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

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

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

BICKNELL, J.N. y DOUGLAS, H.C. (1970). J. Bacteriol.,
101, p. 505.

BLAKESLEE, A.F. (1904). Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
40, p. 205.

BORCHERT, R. (1962). Beitr. Biol. Pflanz., 38, p. 31.

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

BURGEFF, H. (1915). Flora, 108, p. 353.

BURGEFF, H. (1928). Z. für induktiu Abstammungs und
Vererbungslehre, 49, p. 26.

BURKE, W. y FANGMAN, W.L. (1975). Cell, 5, p. 263.

CERDA OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. (1968). Mol. Gen.
Genet., 101, p. 191.

- CERDA OLMEDO, E., HANAWALT, P.C. y GUEROLA, N. (1968).
J. Mol. Biol., 33, p. 705.
- CERDA OLMEDO, E. y REAU, P. (1970). Mutat. Res., 9,
p. 369.
- CERDA OLMEDO, E. (1975). Genet. Res. Camb., 25, p. 285.
- CERDA OLMEDO, E. (1977). Ann. Rev. Microbiol., 31, p.535.
- CERDA OLMEDO, E. y TORRES MARTINEZ, S. (1977). En "Avan-
ces de la Bioquímica" (J. Cornudella, C.F. Heredia, J.
Oró y A. Sols, eds.) Salvat S.A. Barcelona.
- CERDA OLMEDO, E. y RUIZ VAZQUEZ, R. (1979) En "Genetics
of Industrial Microorganisms" (O.K. Sebek y A.I. Laskin,
eds.), Washington D.C. Amer. Soc. Microbiol.
- CERDA OLMEDO, E. y TORRES MARTINEZ, S. (1979). Pure &
Appl. Chem., 51, p. 631.
- COGGINS, C.W., Jr., HENNING, G.L. y YOKOYAMA, H. (1970).
Science, 168, p. 1589.
- COULONDRE, C. y MILLER, S.H. (1977). J. Mol. Biol., 117,
p. 577.
- DAWES, I.W. y CARTER, B.L.A. (1974). Nature, 250, p. 709.
- De la GUARDIA, M.D., ARAGON, C.M.G., MURILLO, F.J. y
CERDA OLMEDO, E. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68,
p. 2012.

- DELBRUCK, M. y CERDA OLMEDO, E. (1977). *Genética Microbiana*. Ed. Alhambra, Madrid, p. 298.
- DELBRUCK, M. y OOTAKI, T. (1979). *Genetics*, 92, p. 27.
- DEMEREK, M., ADELBERG, E.A., CLARK, A.J. y HARTMAN, P.E. (1966). *Genetics*, 54, p. 61.
- DUSENBERY, R.L. (1975). *Biochim. Biophys. Acta*, 378, p. 363.
- ELAHI, M., GLASS, R.W., LEE, T.H., CHICHESTER, C.O. y SIMPSON, K.L. (1975). *Phytochemistry*, 14, p. 133.
- ERRERA, L. (1884). *Botan. Z.*, 42, p. 497.
- ESLAVA, A.P. y CERDA OLMEDO, E. (1974). *Plant Sci. Lett.*, 2, p. 9.
- ESLAVA, A.P., ALVAREZ, M.I. y CERDA OLMEDO, E. (1974). *Eur. J. Biochem.*, 48, p. 617.
- ESLAVA, A.P., ALVAREZ, M.I., BURKE, P.V. y DELBRUCK, M. (1975a). *Genetics*, 80, p. 445.
- ESLAVA, A.P., ALVAREZ, M.I. y DELBRUCK, M. (1975b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, p. 4076.
- ESLAVA, A.P., ALVAREZ, M.I., LIPSON, E.D., PRESTI, D. y KONG, K. (1976). *Mol. Gen. Genet.*, 147, p. 235.
- ESSER, K. y KUENEN, R. (1967). "Genetics of fungi", Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

- FINCHAM, J.R.S., DAY, P.R. y RADFORD, A. (1979). "Fungal Genetics", Botanical Monographs, vol. 4, Blackwell Scientific Publications, 4th edition.
- FOSTER, K.W. (1977). Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 6, p. 419.
- FRANKE, W.W. y REAU, P. (1973). Arch. Mikrobiol., 90, p. 121.
- FURCH, B. y PAMBOR, L. (1978). Microbios Lett., 8, p. 71.
- GILES, N.H. (1978). Amer. Naturalist, 112, p. 641.
- GOODAY, G.W., FAWCET, P., GREEN, D. y SHAW, G. (1973). J. Gen. Microbiol., 74, p. 233.
- GRUEN, H.E. (1959). Plant Physiol., 34, p. 158.
- HALBSGUTH, W. y RUDOLPH, H. (1959). Arch. Mikrobiol., 32, p. 296.
- HASKELL, G. y WILLS, A.B. (1968). "Primer of chromosome practice" Oliver and Boyd Ltd., Edinburgh and London.
- HEISENBERG, M. y CERDA OLMEDO, E. (1968). Mol. Gen. Genet., 102, p. 187.
- HOLLIDAY, R. (1956). Nature, 178, p. 987.
- ISHII, Y. y KONDO, S. (1975). Mutat. Res., 27, p. 27.
- JIMENEZ SANCHEZ, A. y CERDA OLMEDO, E. (1975). Mutat. Res., 28, p. 337.
- KEYHANI, J., KEIHANI, E. y GOODGAL, S.H. (1972). Eur. J. Biochem., 27, p. 527.

KIMBALL, R.F. (1978). *Mutat. Res.*, 55, p. 85.

LOPEZ CALDERON, I. (1980). Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

LOPEZ DIAZ, I. y CERDA OLMEDO, E. (1980). *Planta* (en prensa).

MacGREGOR, J.T. y SACKS, L.E. (1976). *Mutat. Res.*, 38, p. 271.

MALHOTRA, S.K. y TEWARI, J.P. (1973). *Proc. R. Soc. Lond.*, 184, p. 207.

MALHOTRA, S.K., TU, J.C. y TEWARI, J.P. (1975). "Regulation of growth and differentiated function in eucaryote cells" (G.P. Talwar, ed.) Raven Press, New York.

MANDELL, J.D. y GREENBERG, J. (1960). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3 p. 575.

MAROUF, B.A. y MALHOTRA, S.K. (1976). *Microbios Lett.*, 1, p. 117.

MEDINA, J.R. (1977). *Genet. Res. Camb.*, 30, p. 211.

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

MURILLO, F.J. (1975). Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

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

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

MURILLO, F.J. (1980). *Plant Sci. Lett.*, 17, p. 201.

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

NINET, L., RENAUT, J. y TISSIER, R. (1969). *Biotech.
Bioeng.*, XI, p. 1195.

O'DONNELL, K.L., HOOPER, G.R. y FIELDS, G. (1976).
Can. J. Bot., 54, p. 2573.

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

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

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

OOTAKI, T., FISHER, E.P. y LOCKHART, P. (1974). *Mol.
Gen. Genet.*, 131, p. 233.

PAMBOR, L. (1979). *Microbios Lett.*, 8, p. 143.

PORTER, J.W. y LINCOLN, R.E. (1950). *Arch. Biochem.
Biophys.*, 27, p. 390.

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

REAU, P. (1972). *Planta*, 108, p. 153.

- REYES, P., CHICHESTER, C.O. y NAKAYAMA, T.O. (1964).
Biochim. Biophys. Acta, 90, p. 578.
- ROBINOW, C.F. (1957). Can. J. Microbiol., 3, p. 791.
- RUDOLPH, H. (1960). Planta, 55, p. 424.
- RUDOLPH, H. (1961). Planta, 57, p. 284.
- RUDOLPH, H. y FURCH, B. (1970). Arch. Mikrobiol., 72, p.175.
- SCHWAIER, R. (1965). Z. Vererbungsl., 97, p. 55.
- SOMMER, L. y HALBSGUTH, W. (1957). Forschungsberichte
des Wirtschafts und Verkehrsministeriums, Nordrhein-
Westfalen Nr. 411.
- SPIEGEL, M.R. (1974). Estadística, Ed. McGraw Hill,
Colombia, p. 162.
- SUBDEN, R.E. y THRESKELD, S.F.H. (1970). Genet. Res., 15,
p. 139.
- SUTTER, R.P. (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72,
p. 127.
- SUTTER, R.P. (1977). "Eukaryotic microbes as model
developmental systems" (D.H. O'Day y P.A. Horgen, eds.),
2, p. 251, Marcell Dekker, New York.
- SWINGLE, D.B. (1903). U.S.D.A. Bureau Plant Ind. Bull.,
37, p. 1.
- TATUM, E.L., BARRATT, R.W., FRIES, N. y BONNER, D.M.
(1950). Amer. J. Bd., 37, p. 38.

TEWARI, J.P. y MALHOTRA, S.K. (1976). *Microbios Lett.*, 2, p. 19.

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

TORRES MARTINEZ, S., MURILLO, F.J. y CERDA OLMEDO, E. (1980). *Genet. Res.* (en prensa).

VAN ASSCHE, J.A. y CARLIER, A.R. (1973). *Arch. Mikrobiol.*, 93, p. 129

VAN ASSCHE, J.A., VAN LAERE, A.J. y CARLIER, A.R. (1978). *Planta*, 139, p. 171.

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

YOURNO, J., BARR, D. y TANEMURA, S. (1969). *J. Bacteriol.*, 100, p. 453.

ZABALA, C. (1974). Tesina, Universidad de Sevilla.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer la colaboración de todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis:

Al Prof. Enrique Cerdá Olmedo, director de esta Tesis, por sus muchas enseñanzas, su dedicación y su gran capacidad científica.

A todos los compañeros que he tenido durante estos años, por su colaboración y sobre todo por su amistad.

A Paco Castillo, Paco Murillo, Isabel López Díaz y Santiago por sus provechosas discusiones y sugerencias.

A Maribel por su muy eficaz e inteligente ayuda en la elaboración de este trabajo.

A Asunción por su gran ayuda técnica.

A la Fundación Juan March y a la Comisión Asesora para la Investigación Científica y Tecnológica por la ayuda financiera.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D.^a María Isabel González Romero
titulada "Genética de *Phycomyces Blakes-*
leeanus"

acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE
"cum laude"

Sevilla, 30 de Junio de 1980

El Vocal.

El Vocal.

El Vocal.

Alarcón

M. del P. E.

B. Valdés

El Presidente.

El Secretario.

El Doctorado

R. Leizaola

J. M. Vela

M.^e Isabel González



500292210

FCC E TO-020

292210.-