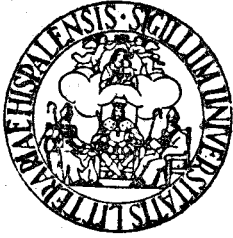


MEDINA PRECIOSO



— 191 —

COMPLEMENTACION CUANTITATIVA
ENTRE MUTANTES DEL COMPORTA-
MIENTO EN PHYCOMYCES

JUAN RAMÓN MEDINA PRECIOSO

R. 18 599

TD/5.19



Trabajo que presenta, para optar al título de
Doctor en Ciencias, Sección de Biológicas, el
Licenciado D. Juan Ramón Medina Precioso.

Sevilla, Junio de 1975

~~J. R. Medina~~

DIRECTOR Y PONENTE:

Profesor D. Enrique Cerdá Olmedo.
Catedrático de Genética

E. Cerdá Olmedo

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

SECRETARIA CIENCIAS

26-5-75

ENTRADA N.º 188

COMPLEMENTACION CUANTITATIVA ENTRE
MUTANTES DEL COMPORTAMIENTO
EN PHYCOMYCES

POR

JUAN RAMÓN MEDINA PRECIOSO

A D. José, que me enseñó a leer
y escribir.

INTRODUCCION

¿POR QUE PHYCOMYCES?

El comportamiento de los seres vivos es antiguo y fascinante objeto de estudio para los biólogos. Actualmente, junto a los problemas clásicos en este campo, se está investigando su base metabólica, lo que requiere el empleo de técnicas nuevas de carácter bioquímico, biofísico y fisiológico. Nos interesan en especial las técnicas genéticas, que pretenden identificar los componentes hereditarios, descubrir los genes implicados y establecer sus relaciones formando un mapa de los canales Informativos del organismo.

En los organismos superiores median tantos pasos entre los genes y los rasgos elementales del comportamiento, que el efecto individual de cada gen se desdibuja. La variación fenotípica continua resultante sólo puede ser estudiada por métodos de genética cuantitativa, que únicamente nos informan sobre parámetros estadísticos sin realidad biológica concreta.

Ante esta dificultad conviene investigar modelos celulares sencillos, en los que en principio es posible una disección molecular completa del comportamiento, con la esperanza de que los seres más complejos sigan esquemas moleculares, al menos, parecidos. En esta línea, se está estudiando el comportamiento de las bacterias Escherichia coli (principalmente su quimiotaxis) (1,2,3) (6) y del hongo Phycomyces blakesleeanus.

El esporangióforo de Phycomyces es una célula gigante, cilíndrica, erecta en el aire, que reacciona al menos a cuatro variables ambientales: luz, presión, gravedad y un gas desconocido que fabrica el hongo. Las cuatro variables regulan la velocidad y dirección de crecimiento del esporangióforo. La luz afecta además a la cantidad de β -caroteno sintetizada por el micelio y a la distribución de esporangióforos en éste.

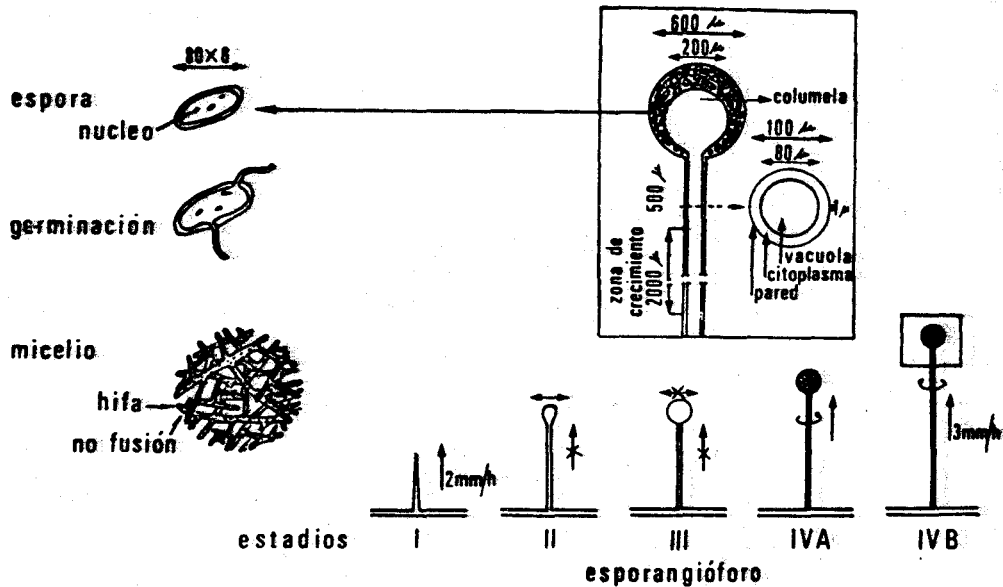
Al menos los canales fototrópico y autoquimiotrópico están dotados de mecanismos de adaptación, con lo que la respuesta a ambos estímulos depende no sólo de las variables ambientales sino también del estado fisiológico del organismo. Sometido a la estimulación simultánea de varios canales el esporangióforo responde unitariamente a todos ellos; debe estar dotado de un mecanismo integrador de los diferentes canales. En ausencia de estímulos ambientales el crecimiento del esporangióforo es regulado por señales internas provenientes del metabolismo.

Nos encontramos, por tanto, cuatro elementos clásicos del comportamiento: recepción de diferentes clases de señales, integración de los estímulos subjetivos a que dan lugar, interacción con señales internas provenientes del mismo organismo ("motivación") y respuesta. No conviene exagerar las semejanzas con el comportamiento animal; tanto en aspectos generales (ausencia de memoria y de capacidad de aprendizaje, ausencia de diferenciación celular, etc.) como en aspectos más concretos ambos sistemas son muy diferentes. Baste decir que en Phycomyces no existen los ubicuos cambios de potencial de membrana tan importantes en las células nerviosas.

CICLO DE VIDA

Phycomyces blakesleeanus (Kunze, 1823) es un hongo verdadero. Bergman et al. (1969) (7) hicieron una revisión detallada de su comportamiento y su fisiología. Sobre su posición taxonómica veáse (78) y (5) y sobre su genética (23).

Es posible cultivarlo en medio sólido químicamente definido, donde presenta (Figura 1) el siguiente ciclo



CICLO ASEJUAL DE PHYCOMYCES

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

asexual: un espora elipsoidal, que contiene de 1 a 7 núcleos, germina emitiendo 2 o 3 hifas cilíndricas no tabicadas, que crecen por su ápice ramificándose sin fusionarse y formando un micelio que avanza unos 2 cm/día. Los núcleos se dividen por elongación y constricción sin pérdida de la membrana nuclear (44). A los 2 o 3 días el micelio emite esporangióforos, hifas aéreas, cilíndricas, no ramificadas, de unas 100 μm de diámetro, que atraviesan los siguientes estadios (48):

I. - El esporangióforo crece verticalmente, a 1 o 2 mm/h. Su pared no gira.

II. - Deja de crecer y su extremo va engrosando dando una esfera apical coloreada: el esporángio.

III. - Durante varias horas no hay ensanchamiento apical ni crecimiento vertical ni giro del esporangióforo. En el interior del esporángio, que ha quedado separado por una pared trasversal o columela, aparecen numerosas vacuolas que crecen y se funden, formando surcos que separan porciones de citoplasma con varios núcleos, porciones que se rodean de fuertes paredes dando las esporas vegetativas. Cada esporángio contiene unas 10⁵ esporas.

IVa. - Comienza de nuevo el crecimiento vertical, acelerando lentamente hasta 3 mm/h. La pared del esporangióforo gira (63) en contra de las agujas del reloj, visto desde arriba. El esporángio se ennegrece.

IVb. - A los 90 minutos de reiniciarse el crecimiento el giro se invierte, pasando al mismo sentido de las agujas del reloj con una velocidad angular constante de unos 12°/min. Los experimentos fisiológicos se hacen con esporangióforos IVb, que pueden llegar a superar los 20 cm de altura, aunque generalmente son más cortos debido a problemas de estabilidad mecánica.

El ciclo asexual está esquematizado en la Figura 1.

COMPORTAMIENTO DE PHYCOMYCES

Ya hemos mencionado las variables ambientales a las que responde Phycomyces y el tipo de respuestas que da. Pasemos revista a estos sentidos:

Geotropismo: los esporangióforos presentan geotropismo negativo. Si los colocamos horizontalmente comienzan a girar, tras una latencia de 30 a 180 minutos, y finalmente su dirección de crecimiento coincide con la vertical. Si los colocamos verticalmente y los sometemos a fuerzas centrífugas perpendiculares a su eje, cambian su dirección de crecimiento hasta que coincide con la de la resultante de los vectores centrífugo y gravitatorio (75). En todos los casos el sentido de crecimiento en el equilibrio es opuesto al de la resultante de todas las fuerzas que actúen sobre el esporangióforo.

La velocidad angular del giro es aproximadamente proporcional a la fuerza efectiva estimulante, es decir, al producto de la fuerza por el seno del ángulo que forma con el eje longitudinal del esporangióforo. Así, la

velocidad inicial del tipo silvestre sometido a la gravedad es de $0.3^\circ/\text{min}$. si el ángulo es de 90° ; de $0.17^\circ/\text{min}$ si se reduce a 45° y de $0.08^\circ/\text{min}$. cuando alcanza 20° . (35) (33). El tipo silvestre tarda unas 12 horas en alcanzar la vertical a partir de la horizontal. El mutante C5 tiene velocidades 3 veces mayores para los mismos ángulos, y su latencia es de tan sólo 10 minutos (Bergman *et al.*, 1969). Tal proporcionalidad entre fuerza efectiva y velocidad angular no se mantiene por encima de 2 g (Dennison, comunicación personal), lo que puede deberse tanto a las características del sistema estímulo-respuesta como a dificultades técnicas, en especial las limitaciones de resistencia mecánica del esporangióforo y la gran influencia que las corrientes de aire (autóquimiotropismo) por pequeñas que sean, tienen sobre los tropismos.

No se conoce el receptor gravitatorio. No se trata de la deformación de la pared celular, puesto que los esporangióforos sumergidos en aceite fluorocarbonado (FC43) de densidad 1.87, mayor que la del citoplasma, aún presentan el tropismo. No se han encontrado estatólitos diferenciados. Se ha especulado con la presión que la vacuola, al flotar, ejercería sobre la pared celular.

Presión mecánica: Las variaciones de presión que el esporángio ejerce sobre el esporangióforo provocan cambios transitorios en la velocidad de crecimiento de signo contrario a la variación de la presión (7). Si colocamos un esporangióforo hacia abajo y suspendemos una carga de su esporángio, se obtiene una disminución transitoria de su velocidad de crecimiento; al quitar la carga se obtiene un aumento transitorio de la velocidad. Las respuestas tienen una latencia de 2 minutos y perduran otros 5 minutos. Son, por tanto, mucho más rápidas que el geotropismo observable en las mismas condiciones (40).

La carga mínima detectable es de 0.5 mg y la respuesta máxima (reducción de la velocidad a la mitad) se consigue a partir de 1 mg. (40).

El hecho de que la respuesta sea transitoria, es decir, que la velocidad retorne a su valor inicial aunque el estímulo siga presente indica que el sistema está dotado de un mecanismo de adaptación.

El estímulo biológico probablemente sea la deformación de la pared celular más que el peso mismo (35). La pared del esporangióforo es muy elástica (69). Una pesa de 8 mg causa una elongación de 0.2 mm en un esporangióforo de 80 mm. El 93% de la elongación es reversible. Al quitar la pesa el esporangióforo vuelve prácticamente a su longitud inicial en menos de 30s (68). El crecimiento no se detiene aunque colguemos pesas de hasta 8mg. La curva elongación-peso no es lineal en todo su rango aunque sí en el intervalo 0.5 a 1 mg. En ese intervalo la gráfica peso-respuesta tiene la misma forma que la elongación-respuesta. El tamaño de la respuesta, en ese intervalo, es proporcional al peso.

La aplicación de una fuerza lateral al esporangio provoca un giro pasivo debido a la elasticidad del esporangióforo, seguido de una vigorosa reacción trópica (5°/min.) de sentido opuesto al del giro pasivo. Esta respuesta trópica puede ser reducida a respuestas de crecimiento si consideramos que el lado al que se aplica la fuerza se estira y por tanto disminuirá su velocidad de crecimiento, mientras que el lado distal se contrae y acelerará su crecimiento. La suma de las respuestas de crecimiento, de signos contrarios, presentes en cada mitad del esporangióforo sería la responsable del giro del mismo.

En general los tropismos de Phycomyces se pueden explicar por la distribución asimétrica de respuestas de crecimiento locales, lo que evita postular mecanismos de percepción de la dirección del estímulo.

La respuesta de crecimiento es la unidad fisiológica de comportamiento en Phycomyces. Presenta las mismas características frente a las diferentes clases de estímulos y si bien por sí misma carece de valor adaptativo lo adquiere al servir de base a un tropismo.

Respuestas de evitación de objetos: La introducción del esporangióforo en un tubo capilar o su colocación entre dos objetos simétricos, a una distancia menor de 5 mm, provoca una respuesta positiva de crecimiento, esto es, un aumento transitorio y simétrico de la velocidad de crecimiento, precedido de un período latente de unos 3 minutos (53) (55).

No se conoce la naturaleza del estímulo biológico. La respuesta ocurre en completa oscuridad y con iluminación, en cualquier posición del esporangióforo respecto a la gravedad, no depende del color ni de la naturaleza ni de las propiedades de la superficie del material acercado, no se debe a acciones electrostáticas ni a radiaciones, y ocurre también en ambiente saturado de humedad.

El viento influye notablemente en las respuestas; aún corrientes de sólo 1 cm/min. interfieren con la respuesta.

La hipótesis más admitida y verosímil es la de que el hongo emite un gas estimulante del crecimiento. En ausencia de obstáculos el gas difunde en las cercanías del hongo, en presencia de barreras no puede difundir libremente con la consiguiente elevación de su concentración que se traduciría en un aumento de la velocidad de crecimiento; cualquier disminución de su concentración, subsiguiente a corrientes de aire, traería consigo una disminución de velocidad.

La presencia de un único objeto a menos de 5 mm del esporangióforo origina, tras un corto período de latencia, una reacción trópica en la que el hongo se aleja del objeto.

La velocidad de giro disminuye al aumentar la distancia del esporangióforo al objeto, siendo de 2°/min. cuando la distancia es de 1 mm.

La respuesta trópica es afectada por corrientes de aire que por sí solas no bastarían para desencadenarla. La desaparición de las corrientes de aire conduce a la desaparición del tropismo. Por tanto la respuesta trópica exige la presencia de un objeto cercano y la existencia de corrientes de aire, aún muy pequeñas.

El mecanismo de este tropismo también se entiende en términos de respuesta locales de crecimiento: un objeto cercano dificultaría la difusión del gas y lo protegería, al menos parcialmente, de las corrientes de aire; en consecuencia el gas se acumularía en el lado proximal del esporangióforo, activando su crecimiento y originando el tropismo.

Respuestas a la luz: La luz afecta a la velocidad y dirección del crecimiento, a la cantidad de carotenoides sintetizados por el micelio (fotoinducción) y a la distribución de esporangióforos en el mismo (fotoiniciación).

Fotoiniciación de esporangióforos: Sometido el micelio a una intensidad luminosa constante, la distribución de esporangióforos es uniforme e independiente del valor absoluto de la intensidad. Sometido a un ciclo luz-oscuridad (p. ej., 1 hora luz: 23 horas oscuridad), las zonas del micelio en crecimiento activo durante el período de luz presentan una densidad de esporangióforos mayor que las demás (8). El número total de esporangióforos no cambia; se trata de una redistribución espacial en respuesta al programa de iluminación.

Fotoinducción de carotenoides: El micelio del tipo silvestre es de color amarillo por acumular β -caroteno (47). Se han aislado mutantes que acumulan productos precursores del β -caroteno. Estos mutantes han sido clasificados por Ootaki (62) en grupos de complementación:

Genotipo	Fenotipo
Silvestre	Color amarillo, acumula β -caroteno, incrementa hasta 10 veces su contenido en β -caroteno en presencia de vitamina A.
carA	Color blanco, no acumula carotenoides, acumula β -caroteno en presencia de vitamina A.
carB	Color blanco, acumula grandes cantidades de fitoeno, no acumula β -caroteno en presencia de vitamina A.
carR	Color rojo, acumula grandes cantidades de licopeno, no acumula β -caroteno en presencia de vitamina A.
carAcarR	Color blanco, no acumula carotenoides, ligero incremento del contenido en licopeno en presencia de vitamina A.

La luz estimula la síntesis de β -caroteno en Phycomyces (67). El tipo silvestre acumula unos 30 μ g de β -

caroteno por g de materia seca en la oscuridad y unos 600 bajo luz intensa (41).

Respuesta de crecimiento: la velocidad de crecimiento de un esporangióforo sometido a iluminación constante en el tiempo y simétrica en el espacio es constante e igual a unas 50 $\mu\text{m}/\text{min}$. Esta velocidad no depende de la intensidad luminosa.

Un cambio espacialmente simétrico de la intensidad luminosa provoca un cambio en la velocidad de crecimiento (42) (43) como el descrito en la Figura 2. El esporangióforo fue sometido durante mucho tiempo (más de 45 minutos) a una cierta intensidad luminosa I_0 y a continuación la intensidad luminosa fue elevada bruscamente a un valor I , 6310 veces mayor. La intensidad I se mantuvo durante 30s antes de bajar bruscamente a su valor inicial I_0 . La línea recta paralela al eje del tiempo representa la velocidad del esporangióforo antes del pulso. También puede ser interpretada como la velocidad que tendría el esporangióforo de no haber variado en ningún momento I_0 . La otra línea representa la velocidad instantánea del esporangióforo después del pulso ($v=f(t)$). Las áreas comprendidas entre cada una de las dos líneas y el eje del tiempo representan los espacios recorridos por el esporangióforo no estimulado y el estimulado respectivamente. No hay diferencia entre el valor medio de ambas áreas si se repite el experimento numerosas veces y se promedian los resultados. Por tanto, la línea recta representa también la velocidad media del esporangióforo durante la respuesta ($v=v_m$).

Podemos dividir la respuesta de crecimiento en 3 fases:

1- Período de latencia, durante el cual la velocidad no varía. Dura unos 3 minutos.

2- Fase de velocidad instantánea mayor que la media. Dura unos 10 minutos. La velocidad sube rápidamente, decrece suavemente y tiene una estructura sinusoidal de variación.

3- Fase de velocidad instantánea menor que la media. Dura entre 15 y 30 minutos.

No hay diferencia entre las estructuras finas de las respuestas a la luz y a los objetos cercanos por lo que es la estructura fina debe resultar del mecanismo efector más que del sistema fotosensible.

Llamamos tamaño de la respuesta, T , a la superficie de la zona rayada en la figura. Vendría dado por:

$$T = \int_{t_1}^{t_2} v_i dt$$
, donde v_i es la diferencia entre la velocidad

instantánea, v , y la media, v_m , y t_1 y t_2 los instantes inicial y final de la fase 2. El tamaño de la respuesta se mide en cm^2 . Tiene el mismo signo que la variación de intensidad luminosa, es decir positivo si $I > I_0$ y negativo en caso contrario (12). T es independiente de la velocidad media de cada esporangióforo en particular y de la temperatura en el rango de 10 a 25°C. En el rango presaturante de estimulación, y supuesto que I_0 haya per

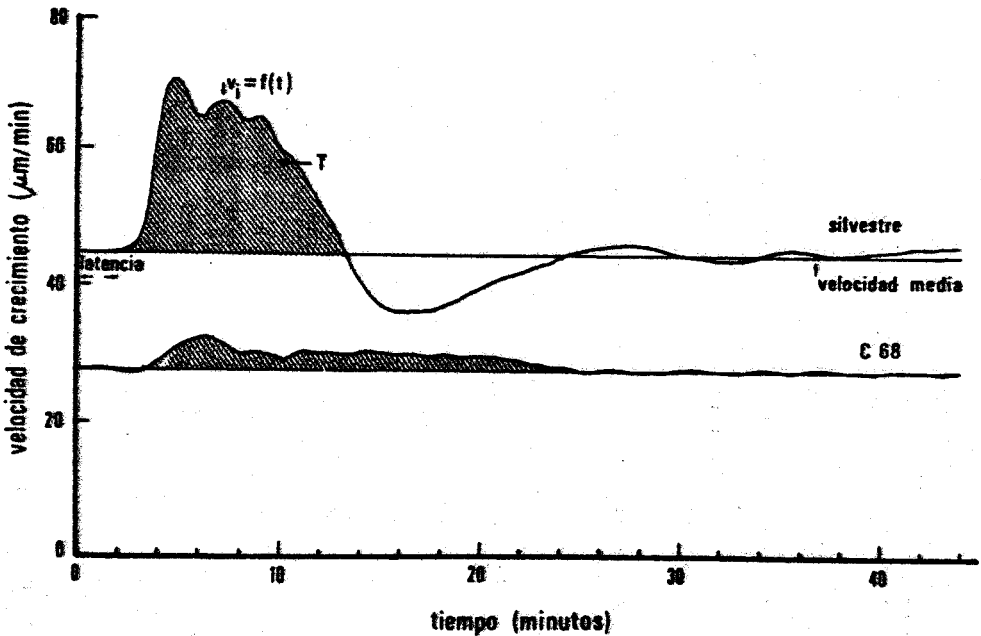


Figura 2. Respuesta de crecimiento en el tipo silvestre y en un mutante, C68, de clase 2, cuya V_M se ha dibujado $20 \mu\text{m}/\text{min}$ por debajo de su valor real.

manecido constante al menos durante los 45 minutos anteriores a la presentación del estímulo, el tamaño de la respuesta es directamente proporcional a lt/l_0 (31) si t , el tiempo de exposición, es menor de 1 minuto y a $\ln(l/l_0)$ si t se hace muy largo, es decir, si tras su incremento l permanece constante. En este caso, la forma de la respuesta también varía, desapareciendo prácticamente la fase 3 y siendo más lento el decrecimiento en la 2. Si en vez de estímulos pulsiformes o en escalón, sometemos al esporangióforo a un programa de iluminación consistente en sucesivos cambios de l , el tamaño de la respuesta varía de forma compleja con el programa aplicado.

Los resultados experimentales pueden ser explicados unitariamente si admitimos que:

- La intensidad luminosa afecta a una variable fisiológica interna, A , (31) que evoluciona según la relación:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{l-A}{b} \quad (24) \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde b es una constante de tiempo aproximadamente igual a 5 minutos. A tiene las mismas dimensiones que l .

- Para cualquier programa de iluminación,

$$v_i = k \frac{(l-A)}{A}$$

donde K es una constante que se mide en cm/min . La expresión adimensional

$$\frac{l-A}{A} \quad \text{es el estímulo subjetivo instantáneo, } S_i.$$

Definimos S , el estímulo subjetivo total recibido en el tiempo t , como:

$$S = \int_0^t S_i dt. \quad S \text{ se mide en minutos.}$$

De la primera ecuación resulta,

$$dt = \frac{bdA}{l-A}, \quad S = \int_0^{A_t} S_i dt = \int_0^{A_t} \frac{l-A}{A} dt = \int_{A_0}^{A_t} \frac{l-A}{A} \times \frac{bdA}{l-A} = b \int_{A_0}^{A_t} \frac{dA}{A} \\ = b \ln \left(\frac{A_t}{A_0} \right) \quad \text{Ecuación (2).}$$

Las ecuaciones que relacionan estímulo y respuesta se reducen a:

$$v_i = KS_i, \quad T = \cdot KS.$$

Veamos como esta teoría explica los experimentos anteriores:

En el caso de un estímulo en escalón,

$$\frac{dA}{l-A} = \frac{dt}{b}, \quad \int_{A_0}^{A_t} \frac{dA}{l-A} = \frac{dt}{b}, \quad \text{y puesto que, en este caso, } l \text{ es constante,}$$

se cumple que;

$$\ln \frac{1-A}{1-A_0} = -\frac{t}{b}, \quad 1-A = (1-A_0)e^{-\frac{t}{b}} \quad \text{Ecuación (3)}.$$

La ecuación anterior significa que A tiende exponencialmente a 1, si éste permanece constante. En consecuencia,

$$\lim_{t \rightarrow \infty} A = 1 \quad \text{Ecuación (4)}.$$

Queda explicada la transitoriedad de la respuesta aún frente a estímulos de duración ilimitada; cuando A sea muy parecido a 1, será $v \sim 0$.

El estímulo total recibido en esta clase de experimentos será, según las ecuaciones (2) y (4),

$S = b \ln \frac{1}{1-A_0}$ conforme se encuentra experimentalmente.

En el caso de un estímulo pulsiforme, precedido de un largo período de I_0 constante, podemos considerar que A no varía durante el experimento dado lo pequeño del tiempo de exposición. En consecuencia, S_i sería constante mientras durara el pulso e igual a:

$\frac{1-A_0}{A_0}$. Por otra parte, $A \sim I_0$, dada la constancia de I_0 antes de la estimulación, luego:

$$S_i = \frac{1-I_0}{I_0}, \quad \text{y al ser } S_i \text{ constante:}$$

$$S = S_i dt = S_i t, \quad \text{y como } I_0 \text{ es pequeño frente a 1:}$$

$$S = \frac{1t}{I_0}, \quad \text{de acuerdo con los datos experimentales.}$$

Cuando sometemos al esporangióforo a una serie de cambios sucesivos de iluminación, la teoría predice que obtendremos una respuesta de crecimiento compleja, resultante de la superposición de las respuestas a cada valor de I del A correspondiente.

Puesto que el acercamiento exponencial de A a 1 origina la transitoriedad de la respuesta, podemos considerar que la variación de A es un mecanismo adaptador del esporangióforo a estímulos duraderos y que A es una medida del nivel de adaptación en cada momento (64).

La teoría predice satisfactoriamente los resultados de otras situaciones experimentales, como el aumento permanente de la velocidad de crecimiento en respuesta a intensidades exponencialmente crecientes (experimentos de "sol naciente"), lo que confirma que la transitoriedad de la respuesta no se debe a agotamiento de sustratos necesarios para el crecimiento ni a saturación del sistema. Esta conclusión se ve reforzada por el hecho de que el esporangióforo pueda crecer durante más de una hora con velocidades del orden de $1.5 v_m$ (43) en respuesta a una subida repentina de la intensidad luminosa por encima de $10 \mu W/cm^2$. No se sabe por qué el mecanismo de regulación del crecimiento no funciona en esta situación.

Además del mecanismo de adaptación, el esporangiófo

ro tiene otro que regula el tamaño de la respuesta. La curva $T = f(S)$ tiene dos zonas, una en la que T crece rápida y casi linealmente con S y otra en la que T no crece más, aunque lo baje S . Se cumple aproximadamente que:

$$T = T_{\max} \frac{S}{S + S_m}$$

donde T_{\max} es la respuesta máxima y S_m el estímulo que produce una respuesta mitad de la máxima (43).

La teoría predice que, en la oscuridad, A debería decaer hacia 0 y, en consecuencia, T debería crecer ilimitadamente. La predicción no se cumple. Los resultados experimentales sugieren que A tiene un mínimo, A_d , alcanzado el cual la posterior permanencia en la oscuridad no se traduce en un aumento de T . Este mínimo es unas 40 ó 50 veces mayor que el umbral fototrópico (43).

La respuesta de crecimiento tiene una latencia de unos tres minutos. La latencia depende de la temperatura y de la intensidad luminosa. Se reduce a la mitad si la temperatura aumenta nueve grados centígrados, lo que sugiere que viene, al menos parcialmente, determinada por una reacción enzimática. Para estímulos cortos se cumple que :

$$\ln \frac{I}{A} = \frac{K}{L - 2.3}$$

donde L es la latencia en minutos (14).

La adaptación plantea algunos interrogantes cuyas soluciones aún no se conocen. En primer lugar, no se conoce la base molecular del mecanismo de adaptación. Castle propuso un mecanismo de adaptación en que A depende de la concentración de un precursor necesario para el crecimiento (22). Esta hipótesis explica de manera muy sencilla muchas de las propiedades cuantitativas descritas, pero contradice el resultado de los experimentos de "sol naciente".

En segundo lugar, no sabemos si cada canal tiene su propio mecanismo adaptador o si la adaptación se produce tras la integración de los estímulos subjetivos. La identidad entre las estructuras finas de las respuestas a la luz y al hipotético gas activador sugieren mecanismos de adaptación comunes a estos dos canales. El geotropismo posiblemente carezca de adaptación.

En tercer lugar, no sabemos si, sometido a una estimulación asimétrica el esporangióforo se adapta globalmente a alguna función del conjunto de los estímulos o bien las distintas partes del esporangióforo tienen distintos niveles locales de adaptación (39). Experimentos de estimulación sucesiva en dos planos perpendiculares parecen apoyar la idea de adaptación local, aunque la cuestión necesita más datos experimentales. La hipótesis de Castle (21) es compatible con la existencia de adaptación local si los precursores del crecimiento difunden rápidamente.

Fototropismo: El cambio de una iluminación simétrica a otra asimétrica provoca una variación en la dirección de crecimiento del esporangióforo. A longitudes de onda superiores a 300 nm gira su dirección de crecimiento hasta aproximarse a la de mayor intensidad luminosa; a longitudes de onda más cortas se aleja de ella. La dirección final de crecimiento no coincide exactamente con la de mayor luminosidad: existe una desviación lateral, que es normalmente de 9° pero que por debajo de $0.04 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ aumenta al disminuir I , llegando a provocar fototropismo negativo en las proximidades del umbral, aún con luz azul. Hay, además, una desviación vertical, debida al geotropismo.

El fototropismo va precedido de un período de latencia que por debajo de $0.04 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ aumenta al disminuir I . Si se cambia la distribución luminosa y además se aumenta el flujo total se obtienen una respuesta trópica y otra de crecimiento simultáneas, cuyas latencias coinciden (13). El giro fototrópico se produce aunque no cambie el flujo total recibido por el esporangióforo (19) (Por ejemplo, adaptándolo a cierta intensidad bilateral y luego apagando una de las luces y duplicando la intensidad de la otra), pero en este caso la latencia es mayor (20).

La respuesta trópica no es transitoria; el giro se mantiene mientras dure la asimetría luminosa (38). Sin embargo, el mecanismo adaptador se halla implicado; si adaptamos el esporangióforo a una intensidad bilateral y luego lo sometemos a una unilateral mucho más baja, el giro va precedido de una latencia extra durante la cual el nivel de adaptación pasa de la intensidad alta a la baja. No son iguales los valores del nivel local de adaptación de las zonas directamente iluminada y no iluminada, lo que confiere distintas reactividades a ambas zonas. Así, al subir o bajar la intensidad estimulante durante un tropismo se produce una inversión pasajera de la respuesta (20).

Durante el fototropismo la velocidad media de crecimiento del esporangióforo no varía. Se trata de una redistribución del crecimiento en el espacio, no de una variación de su valor absoluto. La velocidad de giro depende de la relación geométrica entre la luz y el esporangióforo y de la intensidad luminosa (38). Manteniendo constante la primera, la velocidad de giro aumenta con la intensidad en el rango 10^{-7} a $0.04 \mu\text{W}/\text{cm}^2$; a partir de $0.04 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ la velocidad de giro se hace constante e independiente de I hasta $110 \mu\text{W}/\text{cm}^2$; por encima de este último valor decrece rápidamente y se anula al llegar a $320 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, posiblemente debido al blanqueo del pigmento receptor. Manteniendo constante la intensidad luminosa, la velocidad de giro decrece si lo hace el ángulo entre el haz luminoso y el eje del esporangióforo. El decrecimiento es muy rápido para ángulos menores de 30° , aunque la sensibilidad persiste por debajo de 10° .

El esporangi6foro no detecta directamente la direcci6n de la luz incidente: cuando un rayo fino atraviesa el esporangi6foro sin pasar por su eje de simetría (58), el giro no se produce hacia la luz, sino en un plano perpendicular al rayo luminoso y hacia la mitad no iluminada (Figura 3). Esto sugiere que el tropismo se debe a una respuesta de crecimiento diferencial.

Interacciones entre los sentidos:

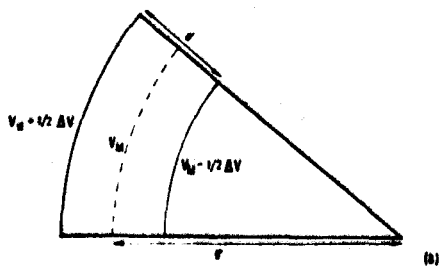
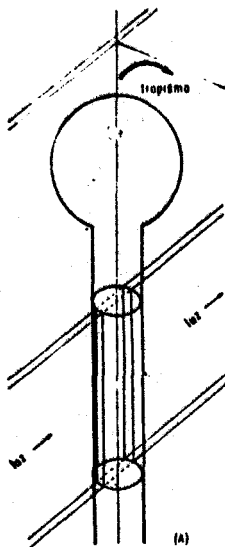
Foto-autoquimiotropismo: Ambos sentidos comparten parcialmente el mecanismo adaptador, como la prueba la identidad entre las estructuras finas de sus respectivas respuestas de crecimiento y lo confirma el que una subida simétrica de la intensidad luminosa durante una respuesta autoquimiotrópica provoque una inversión pasajera del sentido de giro. No obstante, la adaptación del esporangi6foro a una intensidad luminosa alta, de modo que pierda, durante cierto tiempo la capacidad de responder a otras más bajas, no disminuye en absoluto su capacidad de responder a un estímulo autoquimiotrópico, indicio de que hay elementos adaptadores exclusivos del canal fototrópico.

Fotogeotropismo: Todos los experimentos de fototropismo se hacen bajo la gravedad terrestre, de modo que los valores de equilibrio obtenidos no son puramente fototrópicos sino debidos a una interacción fotogeotrópica (37). El geotropismo hace que, en el equilibrio, el esporangi6foro no apunte directamente hacia la zona de mayor luminosidad sino un poco más arriba. El ángulo de equilibrio fotogeotrópico, formado entre el haz luminoso y la dirección de crecimiento en el equilibrio, depende de la intensidad luminosa y de la relación geométrica entre luz y gravedad, pero es independiente de la posición inicial del esporangi6foro. Manteniendo constante I , el ángulo de equilibrio fotogeotrópico disminuye si g lo hace el ángulo formado entre la dirección de la luz y la gravedad, es decir, si aumenta la verticalidad de la fuente luminosa. Con iluminación horizontal el ángulo de equilibrio (Figura 4) es de unos 14° si I es mayor de $0.04 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ y aumenta al disminuir I , llegando a 90° en el umbral fototrópico ($10^{-7} \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Alcanzado el equilibrio, la dirección de crecimiento del esporangi6foro sufre pequeñas oscilaciones que se deben probablemente al retraso de las respuestas respecto a los estímulos. La dirección de equilibrio es, pues, la media alrededor de la cual oscila el esporangi6foro (33).

El umbral fototrópico no varía aunque el esporangi6foro se halle sometido a fuerzas de hasta 4 g; en cambio la desviación del esporangi6foro respecto a la luz aumenta al aumentar la resultante de todas las fuerzas a que se halle sometido.

Mutantes del comportamiento: La interdependencia de los diferentes canales tr6picos no se deduce tan sólo de sus interacciones bajo estimulación simultánea sino también del hallazgo de mutantes que tienen alterados todos los tropismos y del fracaso en aislar todas las clases de mutantes que serían posibles si los canales fuesen

Figura 3. A) Fototropismo al estimular con un rayo fino. El plano de giro es perpendicular al de incidencia de la luz.
 B) Esquema del giro: d es el diámetro del esporangióforo y σ el radio de giro.



independientes. Los mutantes del comportamiento (9) se agrupan por su fenotipo en tres clases:

Clase 1-1 Autoquimiotropismo y geotropismo normales. Umbral fototrópico mayor que el del silvestre. Relación entre ángulo de equilibrio fotogeotrópico y $\log_2 I$ equivalente a una traslación de la del silvestre a intensidades superiores (Figura 4). Fotoiniciación de esporangióforos y fotoinducción de carotenoides reducidas o ausentes.

Clase 1-2 Iguales propiedades que la clase anterior salvo que la fotoiniciación y la fotoinducción son normales.

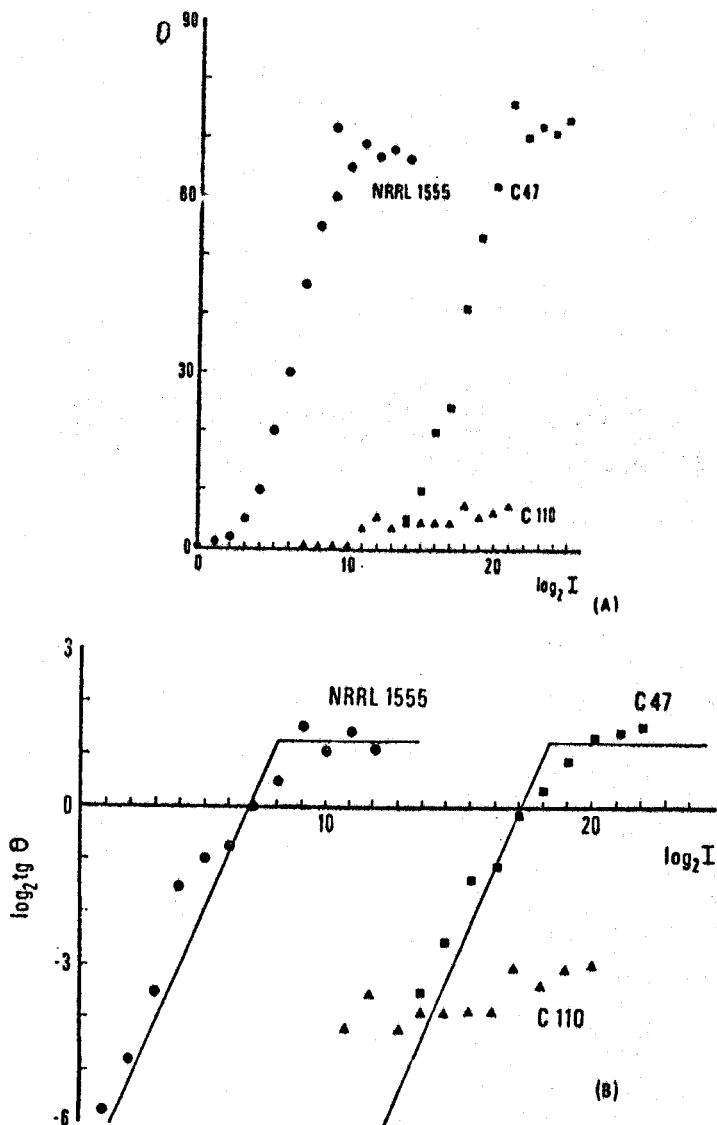
Clase 2 Fotoiniciación y fotoinducción normales. Velocidad de giro menor que la del silvestre para los cuatro tropismos. Como consecuencia, la relación entre ángulo de equilibrio y $\log_2 I$ aparece distorsionada (Figura 4) ya que el esporangióforo no tiene tiempo de alcanzar su valor real de equilibrio en las 5 ó 6 horas que dura el experimento. Que los valores medidos en estos experimentos no son de equilibrio lo prueba el que para diferentes posiciones iniciales del esporangióforo respecto a la luz los ángulos medidos al final del experimento sean diferentes. El umbral fototrópico y los ángulos de equilibrio fotogeotrópico presumiblemente no son diferentes de los del tipo silvestre.

Las tres clases de mutantes pueden explicarse por la red de transductores representada en la Figura 5. Los mutantes de clase 1-1 estarían afectados en el foto receptor o en transductores específicos que participan en todas las respuestas a la luz; los de clase 1-2 en transductores posteriores a las respuestas de fotoiniciación y fotoinducción; y los de clase 2 en transductores posteriores a la integración de los estímulos subjetivos, por tanto, comunes a los diferentes canales, o en el efector trópico. No se conocen aún mutantes en los transductores específicos de los otros canales ni en los mecanismos efectores de fotoiniciación y fotoinducción.

Las tres clases fenotípicas comprenden cinco grupos de complementación (61), definidos gracias a que los heterocariontes que contienen núcleos de distintos grupos muestran un comportamiento parecido al del silvestre (61). La clasificación genética y fenotípica coinciden, en el sentido de que los mutantes de cada clase complementan con los de las otras y de que todos los mutantes que pertenecen a un mismo grupo de complementación muestran un comportamiento homogéneo. La clase 1-1 comprende dos grupos de complementación, A y B; la clase 1-2, un grupo, C; la clase 2, otros dos grupos, D y E.

Relación entre la respuesta trópica y la de crecimiento: Ambas respuestas se deben al mismo mecanismo fotosensible puesto que tienen el mismo espectro de acción (28); la misma forma de variación de la respuesta en función del valor absoluto de I , la misma

Figura 4. A) Relación entre el ángulo de desviación respecto a la vertical (θ) y la intensidad luminosa en el tipo silvestre (círculos), un mutante de clase 1 (cuadrados) y uno de clase 2 (triángulos).
 B) Relación entre $\log \cot \theta$ y $\log I$ para las mismas estirpes que en A.



latencia y la misma cinética de adaptación. Comparten el mecanismo efector, como lo sugiere el hecho de que los mutantes de clase 2, que giran lentamente, tengan respuestas de crecimiento alteradas, más pequeñas y alargadas en el tiempo que las del tipo silvestre para todas las clases de estímulos (Figura 2). Los mutantes de clase 1-1 y 1-2 tienen respuestas normales en cuanto a la forma pero con umbrales mayores que el del silvestre. Por tanto, hay, en las tres clases de mutantes, una buena correspondencia entre las alteraciones de los tropismos y las de las respuestas de crecimiento. También, la zona sensible es la misma para respuesta de crecimiento y tropismo, y coincide aproximadamente con la zona en crecimiento del esporangióforo.

Ya que ambos procesos comparten tanto receptores como efectores y sufren alteraciones genéticas concordantes podemos concluir que uno sirve de base al otro, concretamente la respuesta de crecimiento al tropismo, y que ambos deben tener mecanismos moleculares idénticos.

Una comprensión más detallada de la relación entre la respuesta de crecimiento y el fototropismo exige un estudio de la estructura de las zonas sensible y efectora y de sus propiedades ópticas.

Zonas del esporangióforo: en crecimiento, sensible y efectora: El crecimiento de los esporangióforos se halla limitado a una estrecha banda que se extiende desde 0.1 mm por debajo del esporangio hasta unos 3 mm más abajo (18). La zona de crecimiento sintetiza nuevo material sin hacerse ella misma más larga o gruesa. Cada paquete de material sintetizado pasa a la zona inferior, contribuyendo así al crecimiento del esporangióforo. De este modo, la zona de crecimiento va alejándose del suelo, "aupándose" sobre el material que fabrica, sin alejarse del esporangio.

En la zona de crecimiento encontramos (Figura 1), al microscopio electrónico, una membrana celular típica, de unos 8 nm, recubierta por una pared celular de 60 nm (17) que consta de una capa interior de fibrillas de quitina, de unos 20 nm de diámetro, dispuestas horizontalmente, formando anillos alrededor del eje del esporangióforo y más externamente otra capa de fibrillas de quitina orientadas al azar (10). Aunque la refringencia intrínseca de la quitina es escasa su ordenación confiere una clara birrefringencia negativa a la pared de la zona de crecimiento. La zona que no crece tiene birrefringencia positiva, debido a que en ella las fibras de quitina de la capa externa están orientadas verticalmente (16). Ambas zonas están separadas por otra de transición que no muestra birrefringencia. Esta disposición sugiere un elegante mecanismo de crecimiento: las fibras de quitina serían sintetizadas en posición horizontal, de modo que no ocuparían mucha altura, e irían dando la vuelta al esporangióforo y poniéndose verticales, empujando hacia arriba a la zona de crecimiento. Este mecanismo explicaría la naturaleza espiral del crecimiento del esporangióforo: un marcador colocado sobre la zona de creci-

miento describe una espiral hasta que llega a la parte inferior de dicha zona, donde se para respecto del suelo (25).

El esporangio gira a favor de las agujas del reloj unos 12°/minuto. La velocidad angular es máxima en la parte superior de la zona de crecimiento y nula en la zona de contacto con la de no crecimiento (26). Así, a cada elemento de superficie de la pared de la zona de crecimiento le corresponde una determinada velocidad de ascensión y otra de rotación, aproximadamente proporcionales, salvo en la zona inferior donde la elongación se anula antes que la rotación.

Además de la membrana y la pared celular encontramos en la zona de crecimiento una capa de citoplasma de unas 30 μm de espesor, conteniendo numerosos núcleos y mitocondrias, bolsas de lípidos con β -caroteno, gránulos de glucógeno, cristales de ferritina, un retículo endoplásmico bien desarrollado y ribosomas. Mas internamente, una vacuola de 20 μm de radio, que se extiende por toda la longitud del esporangióforo, formada por la unión de numerosas vacuolas más pequeñas, probablemente autofágicas, en cuyo interior se detectan cristales proteicos y desechos celulares. Se ven asimismo fuertes corrientes citoplásmicas (3 $\mu\text{m/s}$) que portan partículas longitudinalmente en ambos sentidos. Malhotra ha descubierto en las proximidades de la pared celular de la zona de crecimiento, estructuras membranosas apiladas que recuerdan los bastones retinianos.

Experimentos con rayos finos (34) (láser, u.v.) demuestran que sólo se obtienen reacciones a estímulos presentados en la zona de crecimiento; la estimulación de otras partes del esporangióforo no obtiene respuesta. La latencia de la respuesta es tanto mayor cuanto más próxima está el punto de estimulación al borde superior de la zona de crecimiento. Los estímulos incidentes en el intervalo sensible 0.1 a 0.5 mm por debajo del esporangio, son almacenados en una estructura que se aleja del esporangio con la velocidad del crecimiento y no comienzan a dar respuesta hasta que no alcanzan la zona efectora, cuyo borde superior se halla 0.5 mm debajo del esporangio, extendiéndose hasta el extremo inferior de la zona de crecimiento. El giro trópico se inicia en la parte superior de la zona efectora y se va alejando del esporangio con la velocidad del crecimiento, de modo que casi todo el tropismo se genera en la parte inferior de la zona de crecimiento, que prácticamente no tiene elongación, y gira sobre su eje muy lentamente. En resumen, los esporangióforos de Phycomyces tienen 3 estructuras implicadas en los tropismos: una de crecimiento y sensible que comienza 0.1 mm por debajo del esporangio, otra de almacenamiento de estímulos que coincide con la anterior y otra efectora que comienza 0.5 mm por debajo del esporangio. La primera y la tercera suben con el esporangio, quedando los estímulos "congelados" en la segunda estructura que no se mueve en relación al suelo.

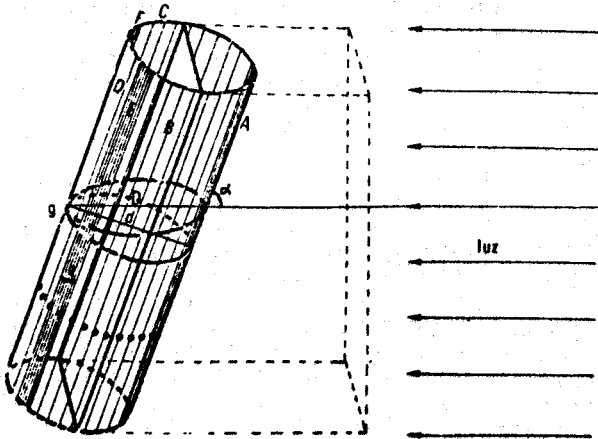
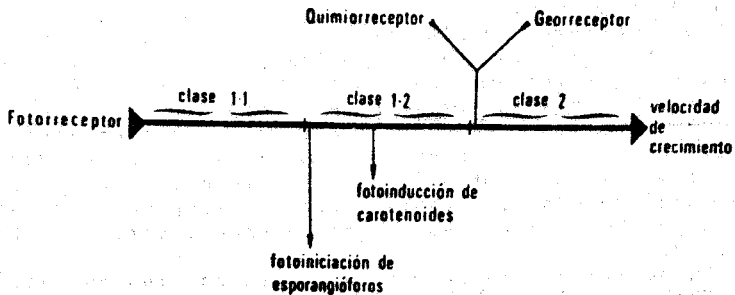
La zona de crecimiento goza de una relativa autonomía metabólica respecto del resto del esporangióforo (45). La inhibición de la glicolisis y de la fosforilación oxidativa en todo el esporangióforo salvo en la zona de crecimiento no impide a ésta seguir creciendo y respondiendo a los estímulos durante más de cuatro horas, hasta que crecimiento y tropismos desaparecen probablemente por agotamiento de sustancias necesarias que son acarreadas desde abajo.

Optica de la zona sensible: El esporangióforo actúa como una lente cilíndrica convergente concentrando los rayos en la parte opuesta a la de incidencia, en cuya pared forman una banda brillante. La forma de esta banda depende del ángulo de incidencia, pero nunca es un arco homogéneamente iluminado, sino que consta de dos bandas estrechas, simétricas, brillantes, de filos muy nítidos y una banda intermedia menos brillante. Esta forma se debe a que los rayos que inciden muy lateralmente sufren una refracción muy fuerte que los envía a la parte contralateral distal donde también llegan los que habiendo incidido más centralmente sufren una menor desviación. En conjunto la banda tiene unos 40° de anchura, de los cuales los 30 centrales están en una relativa penumbra (Figura 6). Al disminuir el ángulo de incidencia el foco se acerca a la célula, y llega a entrar en ella cuando el esporangióforo y el haz forman un ángulo de unos 30° . Por debajo de los 10° el foco se encuentra dentro de la vacuola y apenas hay banda brillante distal.

El esporangióforo, además de refractar, absorbe la luz y la dispersa oponiéndose estos dos últimos efectos al aumento de intensidad local distal provocado por la refracción (32). La densidad óptica del esporangióforo es de 0.1 a 0.2 a 400 nm. En el rango visible, el tipo silvestre muestra el espectro de absorción típico del β -caroteno. La absorción crece al disminuir la longitud de onda y por debajo de 300 nm no llega prácticamente ninguna luz a la zona distal. Esta fuerte absorción en el ultravioleta se debe fundamentalmente al ácido gálico (36), presente en altas concentraciones en la vacuola, y es la responsable del cambio de signo del fototropismo a estas cortas longitudes de onda. Cultivando el tipo silvestre en condiciones que disminuyan o inhiban la síntesis de β -caroteno no se obtienen sensibles variaciones en el espectro de absorción quizás porque la zona sensible, o todo el esporangióforo, acumule carotenoides aunque su concentración se halla reducido mucho en el micelio. Las contribuciones respectivas de la absorción y la dispersión a la atenuación distal se han estudiado con ayuda de mutantes en la síntesis de carotenoides. Los mutantes *carA*, que no acumulan carotenoides, muestran tan sólo un pico a 410 nm, típico del citocromo, y sus densidades ópticas son menores de 0.1, correspondiendo la décima parte a la absorción. Foster (42) concluye que la dispersión es responsable de al menos las tres cuartas partes de la atenuación distal. La atenuación, de todos

Figura 5. Esquema del flujo de los estímulos trópicos en *Phycomyces*. Se indican las zonas en las que están alterados los mutantes.

Figura 6. Distribución de intensidades en el esporangióforo al iluminar unilateralmente. Las distintas zonas (A, B, C, D, E y F) se definen en el texto.



modos, no juega un papel importante en los tropismos. Así Delbrück (34), tras analizar los datos disponibles, concluye que se puede prescindir de ella en primera aproximación.

Modelos del fototropismo: Ha quedado bien establecido que la respuesta de crecimiento y el fototropismo tienen como base el mismo mecanismo fisiológico y molecular. De algún modo, el fototropismo se debe a una acumulación asimétrica de respuestas de crecimiento, la cual provoca un crecimiento más rápido en la parte proximal que en la distal, v. al ser el esporangióforo de diámetro constante, provoca un giro hacia la proximal. Dado un esporangióforo de unos $100\mu\text{m}$ de diámetro bastaría un 10% de diferencia entre las velocidades de crecimiento de las mitades distal y proximal para lograr una velocidad de giro de $3^\circ/\text{min}$.

Dos problemas se plantean:

(1) Debido a la atenuación, la parte distal recibe menos energía luminosa que la proximal: ¿Por qué el giro se realiza hacia la luz y no en su contra?

(2) ¿Cómo una respuesta transitoria de crecimiento puede servir de base a un proceso ilimitado en su duración tal que el fototropismo? De otro modo, ¿Por qué el esporangióforo no se adapta y deja de responder durante las cinco horas que puede durar un experimento de fototropismo?

La solución a la primera pregunta ha sido buscada en la distribución de intensidades luminosas en el interior del esporangióforo. Lo importante no sería el flujo proximal respecto de la distal sino que, de alguna manera, la ventaja focal conferiría una mayor efectividad a la luz distal. Así, el signo del fototropismo se invierte bien a longitudes de onda de 300 nm , cuya absorción es tan fuerte que la zona distal no recibe luz; bien convirtiendo el esporangióforo de convergente en divergente sea por su inmersión en aceites minerales (77) de mayor índice de refracción que el del citoplasma o acercando una lente divergente minúscula (71) al esporangióforo. Ninguno de estos experimentos es totalmente convincente por sí mismo porque queda la duda de si la inmersión no cambiará la fisiología aeróbica del esporangióforo y el acercamiento de lentes complica la cuestión haciendo entrar en juego el autoquimiotropismo. No obstante, dado que todos son concordantes, su conjunto es una fuerte prueba a favor de que la convergencia de los rayos en el lado distal es la responsable del signo del fototropismo a la luz visible. El valor del índice de refracción de un aceite fluorocarbonado, sumergido en el cual, un esporangióforo presenta un enfoque residual que compensa la atenuación distal y por tanto no se observa fototropismo, es, como predice esta teoría, ligeramente menor que el de citoplasma. Como era de esperar, este índice de refracción neutro depende de las distintas atenuaciones que muestran los mutantes en la síntesis de carotenoides.

Se han sucedido las teorías para responder a la primera pregunta. Buder creyó que la luz absorbida en el

lado distal es más efectiva porque la distancia media del receptor estimulado, supuesto presente sólo en la pared, a la línea media del esporangióforo es mayor que en el lado proximal. No obstante, esa acción de palanca no compensaría ni siquiera la pequeña absorción que muestran los esporangióforos. Para Castle (22), que supuso el pigmento distribuido homogéneamente en el interior del esporangióforo, la ventaja provendría del mayor camino óptico recorrido por la luz en el lado distal. Tal clase de ventaja también quedaría inutilizada por la atenuación; de hecho, prescindiendo de la vacuola, conduce exactamente a las mismas ecuaciones que el modelo de Buder. Los autores más modernos están de acuerdo en que lo importante es la alta intensidad obtenida en el filo de la zona iluminada. Pero, si la respuesta dependiera en toda la circunferencia de la iluminación local, habría que imaginar respuestas proporcionales al menos a la segunda potencia de la intensidad; de otro modo, no habría efecto fototrópico neto.

Los modelos más satisfactorios se obtienen cuando no se intenta contestar separadamente a la primera pregunta de la segunda, sino combinando ambas.

Las respuestas a la segunda pregunta caen bajo dos clases generales: las que suponen adaptación media y las que admiten adaptación local.

En la primera clase tenemos el modelo de Bergman et al.(7) que supone que, sometido a una iluminación asimétrica, el esporangióforo se adapta a alguna función de la intensidad media que recibe y las partes que se hallan por encima del nivel de adaptación responden positivamente y el resto negativamente. Esta simplificación puede ser útil en algunos casos pero no puede eludir dos críticas importantes:

1) No explica los efectos de la rotación extrínseca: a favor de las agujas del reloj hace aumentar el ángulo de desviación lateral y disminuir el tropismo. Por contra, el giro extrínseco contra las agujas del reloj hace que aumente el fototropismo. Hay que recordar que el esporangióforo tiene un giro intrínseco en el sentido de las agujas del reloj.

2) La velocidad de difusión del nivel de adaptación, medida experimentalmente, es insuficiente para originar una adaptación media dentro de los tiempos en que los restantes procesos actúan.

En consecuencia debe existir adaptación local más bien que media. En tal caso, no podemos suponer que el esporangióforo se halla adaptado en cada punto a la intensidad allí reinante porque no se observaría ninguna respuesta. Los modelos que postulan adaptación local, es decir, que la adaptación difunde muy lentamente o no lo hace en absoluto, deben suponer también que el nivel de adaptación local se mueve respecto de el de la distribución de luz, de modo que elementos adaptados a cierta intensidad local entren continuamente en zonas de intensidad diferente. Reichardt y Varjú fueron los primeros en señalar que el giro de la pared puede tener un papel en

el fototropismo. Foster (42) ha logrado integrar la distribución de luz, el giro de la pared y la adaptación local en un modelo que explica unitariamente los hechos experimentales. El modelo supone que los receptores giran con la pared. El giro es suficientemente lento para que en parte anterior cada receptor se halle adaptado a la intensidad local y no haya respuesta, mientras que al llegar a la banda distal iluminada intensamente, den respuestas positivas de crecimiento, cuya acumulación origina el giro fototrópico.

El único modelo propuesto hasta el momento para explicar el fototropismo que no intenta relacionarlo con las respuestas de crecimiento es el de Cerdá Olmedo (9). El propósito fundamental de dicho modelo es explicar la dependencia aproximadamente lineal entre el ángulo de equilibrio y el $\log_2 I$ y las distintas variaciones que esta función sufre en las tres clases fenotípicas de mutantes del comportamiento. El modelo postula que el canal luminoso se compone de una serie de transductores lineales y de un filtro logarítmico tras el cual se realiza la integración con los estímulos subjetivos provenientes de los otros canales. A continuación, otra serie de transductores lineales conduce al efector, el cual controla el ángulo de equilibrio. Con este modelo, las distintas clases de mutantes pueden ser explicadas simple y elegantemente como alteradas en la eficacia de la transducción lineal antes y después del filtro logarítmico. En nuestra opinión, el modelo es una super simplificación ya que no es probable que el efector controle directamente el ángulo de equilibrio sino las velocidades locales.

BASE MOLECULAR DEL COMPORTAMIENTO

Recepción: No se conoce la naturaleza de los receptores de ninguna clase de estímulo en Phycomyces. No se conoce la naturaleza del pigmento receptor de la luz. Se ha tratado de identificarlo comparando el espectro de acción con el de absorción de las sustancias más probables (32). El espectro de acción tiene picos a 485, 455, 385 y 280 nm, tanto en el tipo silvestre como en los mutantes que acumulan distintas clases de carotenoides. Es el mismo para la respuesta de crecimiento y el fototropismo (28). Experimentos preliminares demuestran que podría ser igual al espectro de acción para foto-iniciación de esporangióforos, por lo que el pigmento estaría también en el micelio. Es muy parecido al del fototropismo del coleoptilo de avena, iniciación de la síntesis de carotenoides coloreados en N. crassa, en Fusarium aquaeductum y en Mycobacterium (67) y al de consumo de O_2 en Chlorella (65), por lo que se supone que se trata de un mecanismo fotosensible muy antiguo que apareció pronto en la evolución y ha encontrado diversas aplicaciones en bacterias, algas, hongos y plantas superiores. El espectro de acción sugiere un carotenoide o una flavoproteína como pigmento receptor. Por

otro lado (57), parece improbable que los carotenoides estén implicados en la visión, por lo que el candidato más verosímil es una flavoproteína (11). De Phycomyces se han aislado dos flavoproteínas hidrosolubles, con pesos moleculares entre 50.000 y 100.000, que tienen respectivamente FAD y riboflavina-5'-fosfato como grupos prostéticos. Sus espectros de absorción se parecen mucho al de acción. Se han comprobado cambios en la densidad óptica del esporangióforo tras su irradiación con luz de 345 nm de longitud de onda. Los cambios se producen tanto en el tipo silvestre como en mutantes de clase 1-2 o carA, pero los mutantes 1-2, a diferencia del silvestre y de los mutantes carA, no recuperan, tras 8 minutos en la oscuridad, su densidad óptica inicial (66). Se pueden producir cambios similares irradiando una solución de tiamina con FAD, pero no irradiando tiamina sola. La mepacrina, un inhibidor de las flavoproteínas, es más eficaz en inhibir el crecimiento de Phycomyces en la luz que en la oscuridad, siendo estable en ambos casos. Todo esto confirma a las flavoproteínas como los candidatos más probables a pigmento receptor.

El pigmento receptor parece encontrarse en cantidades pequeñísimas, quizá de sólo 3×10^9 moléculas/esporangióforo. Se han hecho muchos intentos infructuosos para localizarlo. Entre los más originales está la centrifugación del esporangióforo usando su propia pared como tubo de centrifuga (76). Ninguna de las capas así logradas presenta una absorción parecida al espectro de acción.

La luz polarizada transversalmente es un 20% más efectiva en el fototropismo que la polarizada horizontalmente (15). Aunque inicialmente se pensó que esa diferencia era debida a diferencias en la reflexión (70) por la pared, reinvestigaciones (51) con mutantes albinos apoyan la idea de que se deben al dicroísmo del pigmento (54). Para ser dicroico un pigmento debe estar orientado y por tanto unido a una matriz sólida. Se cree que el pigmento está en la pared o unido a ella.

Transducción: Las respuestas a la luz no afectan significativamente al consumo de oxígeno ni al contenido en ATP del esporangióforo (72) (73). Los esporangióforos contienen ácido indolacético (49) pero ningún experimento ha revelado hasta el momento un papel del ácido indolacético en las respuestas a la luz o en la regulación del crecimiento (4).

Jan y Forgas encuentran una caída transitoria del 30% en la concentración inicial de AMPe tras un estímulo de 2 minutos. Cohen (27) ha confirmado el decrecimiento transitorio en la concentración de AMPe, que en sus experimentos llegó al 50% al minuto de irradiar. No hay diferencia de concentraciones tras el cultivo en luz u oscuridad continua. La adición a esporangióforos inmersos en fluorocarbono-perfluorotributilamina, donde crecen bien y dan respuestas de crecimiento, de dibutilil-AMPe o teofilina, un inhibidor de la fosfodiesterasa, causa

un decrecimiento transitorio de la velocidad de crecimiento. Además, la zona de crecimiento tiene una actividad adenil-ciclasa ausente del resto del esporangióforo. En resumen, no se tienen pruebas de que el metabolismo del ATP cambie en conexión con las respuestas, de que se consuma más energía ni de que actúe el sistema de la auxina pero se tienen pruebas de que el sistema AMPc - fosfodiesterasa está implicado. Conviene recordar que de la retina se ha aislado una adenil-ciclasa activable por la dopamina y que el AMPc ha sido relacionado con el proceso visual primario en la retina a través de la regulación de la fosfo-diesterasa de los nucleótidos cíclicos. Estas semejanzas entre la retina y la zona de crecimiento de Phycomyces son sugestivas.

Efección: Existen dos teorías acerca del mecanismo molecular de variación de la velocidad de crecimiento de los esporangióforos:

1) La variación sería subsiguiente a cambios en la plasticidad de la pared ocasionados por el corte de enlaces químicos en ella. Puesto que una buena parte de la sustancia de la pared es quitina, macromolécula filamentosa, se ha pensado que la quitinasa podría ser el efector. En el esporangióforo existe, efectivamente, una actividad quitinásica. Un mecanismo de este tipo sería mucho más rápido en dar una respuesta trópica que uno como el que a continuación describimos.

2) La variación de velocidad se debería a cambios en la síntesis de pared. El sitio regulable sería, bien directamente las enzimas implicadas en la síntesis de pared, bien alguno de los precursores metabólicos de la misma. La sintetasa de la quitina podría ser la enzima responsable de las respuestas. Las preparaciones de pared celular de Phycomyces sintetizan quitina a partir de UDP-N-acetil-glucosamina. Tal actividad sintética se encuentra en las mismas fracciones que la nucleosidasa, enzima típica de la membrana celular. La autorradiografía muestra que la zona de crecimiento tiene una actividad más alta que el resto, aunque la enzima se halla presente en todo el esporangióforo y en el micelio. La sintetasa no muestra absorción en los experimentos de microespectrofotometría (52) (53) por lo que se supone que no sería activada directamente por la luz, pero las preparaciones de Phycomyces cultivadas durante 2 horas bajo luz azul intensa tienen una actividad sintetasa un 30% más alta que las cultivadas sin luz.

MATERIALES Y METODOS

ESTIRPES

Hemos utilizado las estirpes de Phycomyces blakesleeanus Burgeff que aparecen en la Tabla 4. Cada estirpe se nombra mediante una letra, C o S, según proceda del Instituto de Tecnología de California o del Departamento de Genética de Sevilla, seguida de un número de aislamiento. Su genotipo se escribe a continua-

Tabla 1. Estirpes de Phycomyces blakesleeanus usadas en esta tesis.

Estirpe	Genotipo	Origen	Referencia
NRRL1555	(-)	North Regional Research Lab.	
C2	<u>carA5(-)</u>	NRRL1555	(62)
C9	<u>carR21(-)</u>	NRRL1555	(62)
C47	<u>madA35(-)</u>	NRRL1555	(61)
C59	<u>madC51(+)</u>	NRRL1554	(9)
C68	<u>madD59(-)</u>	NRRL1555	(61)
C142	<u>carA5madC209(-)</u>	C2x659	
S14	<u>carA53madC205(-)</u>	UBC24	(9)
S18	<u>carA57madC209(-)</u>	UBC24	(62)
S57	<u>carA5madC242(-)</u>	C2	
S80	<u>carR21aux(-)</u>	C9	
S131	<u>carA115madA7(-)</u>	C21	
S132	<u>carA116madB104(-)</u>	C112	
S133	<u>carA117madD59(-)</u>	C68	
S134	<u>carA118madE102(-)</u>	C110	

ción mediante las letras car o mad, según se trate de mutantes en la síntesis de carotenoides o en el comportamiento, seguidas de una mayúscula que indica el grupo de complementación a que pertenece y de un número de aislamiento. Finalmente, el sexo de la estirpe se indica mediante un signo, + ó -, entre paréntesis. Los heterocariontes se nombran uniendo mediante un asterisco los nombres de las dos estirpes que lo componen.

MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Phycomyces crece en medios químicamente definidos, tanto sólidos como líquidos con aireación. La composición y modo de preparación de esos medios se detalla en (59) y (46). La estirpe auxótrofa S80, de requerimientos desconocidos, crece bien en medio suplementado con extracto de levadura (1 mg/l).

OBTENCION DE MUTANTES

Las estirpes S131a S134han sido aisladas siguiendo el procedimiento de mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y aislamiento de mutantes de color descrito en (59).

OBTENCION E IDENTIFICACION DE HETEROCARIONTES

Los heterocariontes utilizados fueron obtenidos mediante la técnica microquirúrgica de Ootaki (60), que consiste en cortar los extremos de un esporangióforo de cada estirpe, unirlos por las zonas rotas y recoger las esporas producidas por el esporangióforo, muchas veces heterocarionte, que crece verticalmente a partir de la zona de fusión.

ANALISIS DE CAROTENOIDES

Hemos seguido el protocolo de extracción, identificación y cuantificación expuesto en (46). Básicamente consiste en obtener un extracto en eter, evaporado al vacío, fraccionarlo por cromatografía en columna y obtener el espectro de absorción en hexano de cada fracción.

ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO

Para los experimentos de comportamiento hemos empleado esporangióforos aislados en estadio IVb. Los experimentos de geotropismo, autoquimiotropismo y medición del ángulo alcanzado tras cinco horas de iluminación a diferentes intensidades los hemos hecho como se describe en (9). La técnica consiste en exponer conjuntos de 10 esporangióforos verticales y aislados en estadio IVb a diferentes intensidades luminosas conocidas de luz azul durante un tiempo determinado, para a continuación medir el ángulo de desviación con la vertical y promediar los

resultados. La variación de intensidad se obtiene jugando con la distancia a la fuente luminosa y con filtros de reducción apropiados. Para los experimentos de medición del ángulo α en función del tiempo hemos empleado el siguiente sistema óptico:

Una lámpara de tungsteno (Sylvania 250) colocada en una caja de apertura graduada fue conectada a un sistema eléctrico de voltaje de salida controlable, con lo que la intensidad luminosa era voluntariamente escogida en cada experimento. El haz luminoso pasaba a través de un filtro anticalórico (KH1, Schott, Mainz, Alemania Occidental) y un filtro azul (5-61, Corning Glassworks, N.Y., USA) y una lente colocada a una distancia tal que los rayos de salida formaban un haz paralelo. El haz incidía perpendicularmente al eje de un esporangióforo, colocado verticalmente. El esporangióforo, que había estado en la oscuridad durante media hora, era observado mediante dos telescopios perpendiculares, uno de ellos paralelo a la luz. Cada telescopio va provisto de dos escalas circulares graduadas, una móvil y otra fija, de modo que al seguir el movimiento del esporangióforo girando el eje óptico, la diferencia entre ambas mide el ángulo girado por el esporangióforo, si inicialmente sus orígenes coincidían.

ANALISIS GENETICO

Todos los cálculos de la proporción nuclear de cada heterocarionte a partir de las proporciones de esporas homocariontes y heterocariontes en su descendencia asexual se han hecho según (50) y (59). En todos los casos los marcadores genéticos fueron las mutaciones *carA* y *carR*, que dan fenotipo blanco y rojo, siendo el heterocarionte amarillo por complementación. El análisis genético consiste en dispersar en medio líquido las esporas provenientes del heterocarionte e inmediatamente repartir el medio en 800 tubitos de modo que la media de esporas por tubito sea aproximadamente 1. A los pocos días nuevos micelios han crecido en los tubitos y se anotan los siguientes datos: número de tubitos vacíos, número de tubitos con solo micelio homocarionte de tipo A, con sólo homocarionte de clase B, con ambos y con micelio heterocarionte, haya o no homocarionte además. Se obtiene la media de cada clase de micelios a partir del término 0 de la distribución de Poisson correspondiente y se calcula el P por un método gráfico.

SIMULACION DEL COMPORTAMIENTO

Mediante un ordenador UNIVAC 1108, del Centro de Cálculo de esta Universidad, hemos tabulado las ecuaciones que describen el comportamiento del silvestre y los mutantes.

Los programas empleados han tenido las siguientes características:

Programa 1) El programa tabula la ecuación (1) del modelo matemático, proporcionando los valores de la velocidad angular fotogeotrópica en radianes/segundo, para todos los valores enteros del ángulo de incidencia en grados y las 29 unidades logarítmicas en base 2 por encima del umbral. El programa tabula esa ecuación tanto para el tipo silvestre como para un mutante con E mil veces menor, uno con A_d mil veces mayor y otro con K mil veces menor.

Programa 2) Este programa tabula las ecuaciones (2) y (3) del modelo matemático proporcionando, en primer lugar, los ángulos de equilibrio para cada una de las intensidades del programa anterior, y, en segundo lugar, el tiempo en segundos que tardaría el esporangióforo en alcanzar cada uno de los ángulos enteros comprendidos entre 90° a 1° , a cada una de las intensidades del programa 1. Lo hace tanto para el tipo silvestre como para cada uno de los mutantes mencionados en el programa 1.

Programa 3) Realiza la misma operación que el anterior pero opera con una E calculada a partir de la ecuación:

$$E(p) = pE + (1-p)E/1000.$$

Halla E para todos los valores de p comprendidos entre 0 y 1, variándolos de 0.1 en 0.1. En consecuencia, emite los datos correspondientes a la complementación cuantitativa del comportamiento entre la estirpe silvestre y un mutante con E alterado.

Programa 4) Realiza las mismas operaciones que el anterior pero trabajando con $A_d(p)$ en vez de con E(p).

Programa 5) Tiene la misma forma que los dos anteriores pero calcula la complementación cuantitativa entre el silvestre y un mutante con K alterada. Emite los datos correspondientes a la complementación cuantitativa entre el silvestre y un mutante de clase 2, por tanto.

Los programas 5, 6 y 7 tienen la misma estructura que cualquiera de los tres anteriores y realizan respectivamente las complementaciones entre dos mutantes con E alterado, dos mutantes con K alterado y un mutante con E alterado y otro con K alterado, que corresponden respectivamente a las complementaciones cuantitativas entre dos mutantes de clase 1, dos mutantes de clase 2 y uno de clase 1 y otro de clase 2.

SIMULACION DEL ANALISIS GENETICO

Con objeto de asegurarnos de que las fuentes de variabilidad en el cálculo de la proporción nuclear no afectan, en nuestras condiciones experimentales, de modo importante a las estimaciones que de dicha proporción nuclear obtenemos, hemos simulado el proceso de segregación de diferentes clases de esporas por un heterocarionte y del cálculo de la proporción nuclear del heterocarionte a partir de una muestra de sus esporas.

El programa emplea una subrutina (RANDU) que genera

números pseudoaleatorios, comprendidos entre 0 y 1, y que siguen una distribución uniforme. El programa aplica las series pseudoaleatorias obtenidas por RANDU a la simulación de los diferentes procesos aleatorios que intervienen en el análisis genético. El programa consta de cinco partes principales:

1) Simulación de la extracción de una muestra de tamaño N de esporas, a partir de una población, de tamaño infinito, en la que hay esporas de tres tipos con frecuencias iguales a:

Homocariontes de tipo A, $\sum_i p^i f_i$

Homocariontes de tipo B, $\sum_i (1-p)^i f_i$

Heterocariontes, $1 - \sum_i (p^i + (1-p)^i) f_i$

donde p es la proporción de núcleos de tipo A en el heterocarionte inicial y f_i la frecuencia de esporas con i núcleos. Esta parte del programa realiza el cálculo de las frecuencias de los tres tipos de esporas para diferentes valores de p y elabora una muestra de tamaño N según un proceso en el que la probabilidad de cada espora de pasar a la muestra es igual a la frecuencia de ese tipo de esporas en la población infinita.

2) Simulación del reparto de la muestra recién obtenida en 800 tubitos de modo que la probabilidad de cada espora de ir a un tubito determinado sea "a priori" $1/800$.

3) Análisis y enumeración de las diferentes clases de tubitos según las esporas que contengan, a saber: tubitos con sólo esporas homocariontes con núcleos de tipo A, con sólo esporas homocariontes de tipo B, con ambas y con esporas heterocariontes, haya o no además esporas homocariontes, y número de tubitos vacíos.

4) Cálculo de la media de esporas por tubito a partir del término 0 de la distribución de Poisson de esporas en tubitos y cálculo de la media de cada uno de los tres tipos de esporas por tubito a partir del término 0 de la distribución de Poisson correspondiente. (50).

5) Cálculo de la proporción nuclear del heterocarionte inicial mediante la resolución de las anteriores ecuaciones en p, al igualarlas respectivamente a la media de cada uno de los tres tipos de esporas dividida por la media total de esporas. Cálculo de la suma de las medias de cada uno de los tres tipos de esporas y de la diferencia de la suma con la media general y con la media real, esta última calculada dividiendo el tamaño N de la muestra entre 800.

UNIDADES

Las unidades de intensidad luminosa de Delbrück (7), empleadas frecuentemente en los estudios de Phycomyces, se definen como el logaritmo en base 2 del cociente de dividir entre 10 la intensidad luminosa medida en microvatios por centímetro cuadrado. En esta escala el umbral

del tipo silvestre correspondería a unas -26 unidades. Hemos encontrado incómoda esta escala por lo que hemos medido la intensidad luminosa como el logaritmo en base 2 del resultado de dividir entre $6.71 \cdot 10^8$ la intensidad luminosa medida en microvatios por centímetro cuadrado. En esta nueva escala el umbral del tipo silvestre sería 0 unidades y los umbrales de todos los mutantes del comportamiento números positivos. El rango normal iría de 10 a 27 unidades y el rango total de intensidades eficaces iría de 0 a 32 unidades. El 0 de esta escala corresponde a :

$$0 \text{ unidades} = 149 \cdot 10^{-11} \text{ W/cm}^2.$$

RESULTADOS

COMPORTEAMIENTO DE LOS MUTANTES

Velocidad de giro: Las Figuras 7 y 8 representan el giro de esporangióforos de distintas estirpes, mutantes y silvestre, iluminadas horizontalmente a tiempo 0 cuando se encontraban verticales, tras haber permanecido media hora adaptándose en la oscuridad. El ángulo fue medido cada tres minutos con ayuda de un sistema óptico adecuado (Ver Materiales y Métodos). La intensidad luminosa fue 27 unidades en unos casos y 18 unidades en otros.

De estas y otras observaciones similares se concluye que los mutantes de clase 1-1 y 1-2 se comportan en estos experimentos como el silvestre pero los mutantes de clase 2 giran lentamente a todas las intensidades, distinguiéndose por ello del silvestre y de las otras clases de mutantes. De la segunda figura se deduce que a intensidades cercanas al umbral tanto el silvestre como los mutantes de clase 1 giran más lentamente que a intensidades mayores y alcanzan el equilibrio fotogeotrópico antes.

Angulo alcanzado en cinco horas a diferentes intensidades luminosas: La Figura 9 muestra la media del ángulo alcanzado por diez esporangióforos sometidos a la misma intensidad tras cinco horas de iluminación. La intensidad se varió en un rango de 26 unidades y se obtuvieron datos tanto de la estirpe silvestre como de cinco estirpes perteneciente una a cada uno de los grupos de complementación de los cinco en que se dividen los mutantes del comportamiento. En el tiempo de experimentación el silvestre y los mutantes de clase 1-1 y 1-2 alcanzan sus ángulos de equilibrio pero no los de clase 2. En concordancia con los resultados del párrafo anterior, los mutantes de clase 1-1 y 1-2 se comportan como el silvestre: sus ángulos de equilibrio coinciden si son expuestos a intensidades suficientemente mayores que sus umbrales respectivos. En intensidades próximas al umbral de cada mutante, los mutantes se comportan como el silvestre a intensidades próximas al umbral del silvestre.

También para los mutantes de clase 2 coinciden los resultados de ambos tipos de experimentos: posiblemente no lleguen a alcanzar los valores de equilibrio debido a la lentitud de giro a todas las intensidades.

Figura 7. Relación entre el ángulo de desviación respecto a la vertical (θ) y el tiempo al iluminar con una intensidad de 27 unidades el tipo silvestre, un mutante, C47, de clase 1 y uno, C68, de clase 2.

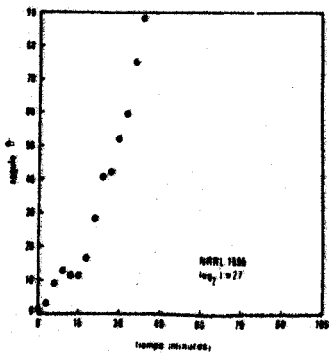
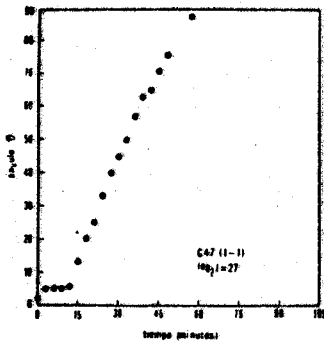
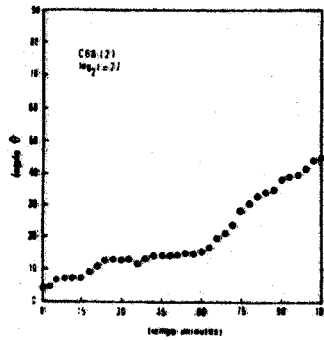


Figura 8. A) Relación entre el ángulo de desviación respecto a la vertical (θ) y el tiempo en dos mutantes de clase 1-2, iluminados con la misma intensidad (27 unidades). C59 tiene un umbral menor que S14.

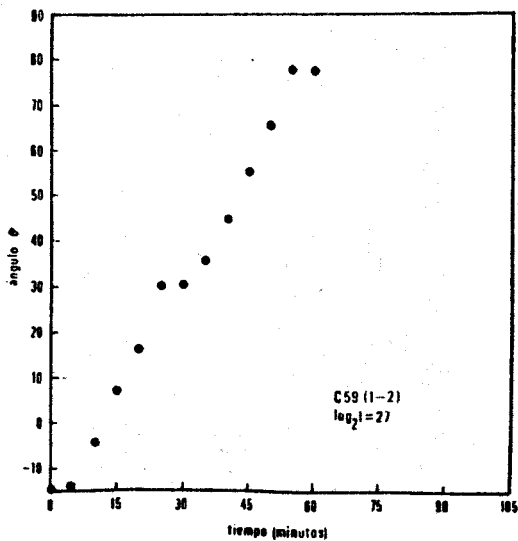
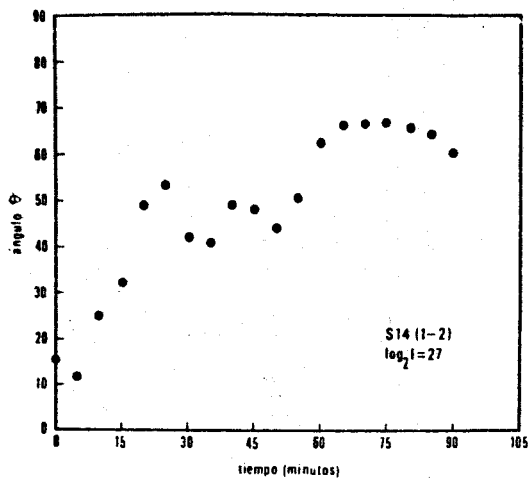


Figura 8. B) Relación entre ángulo de desviación respecto a la vertical (θ) y tiempo en el tipo silvestre y un mutante de clase 1, al iluminarlos con intensidades próximas a sus umbrales respectivos.

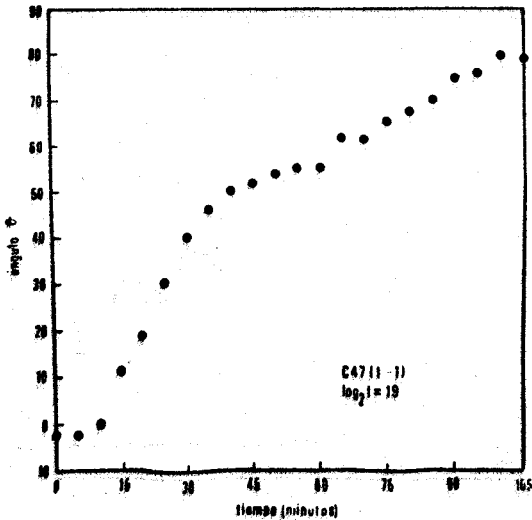
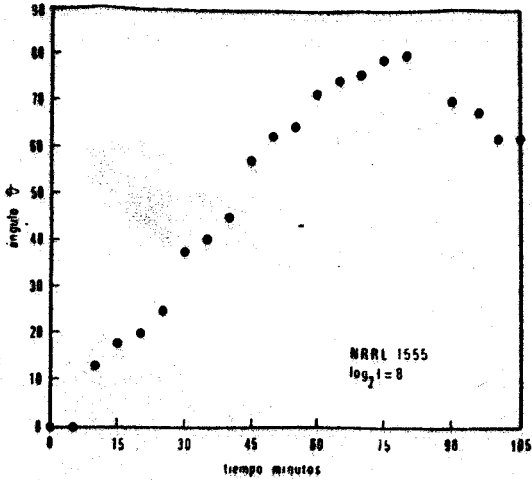
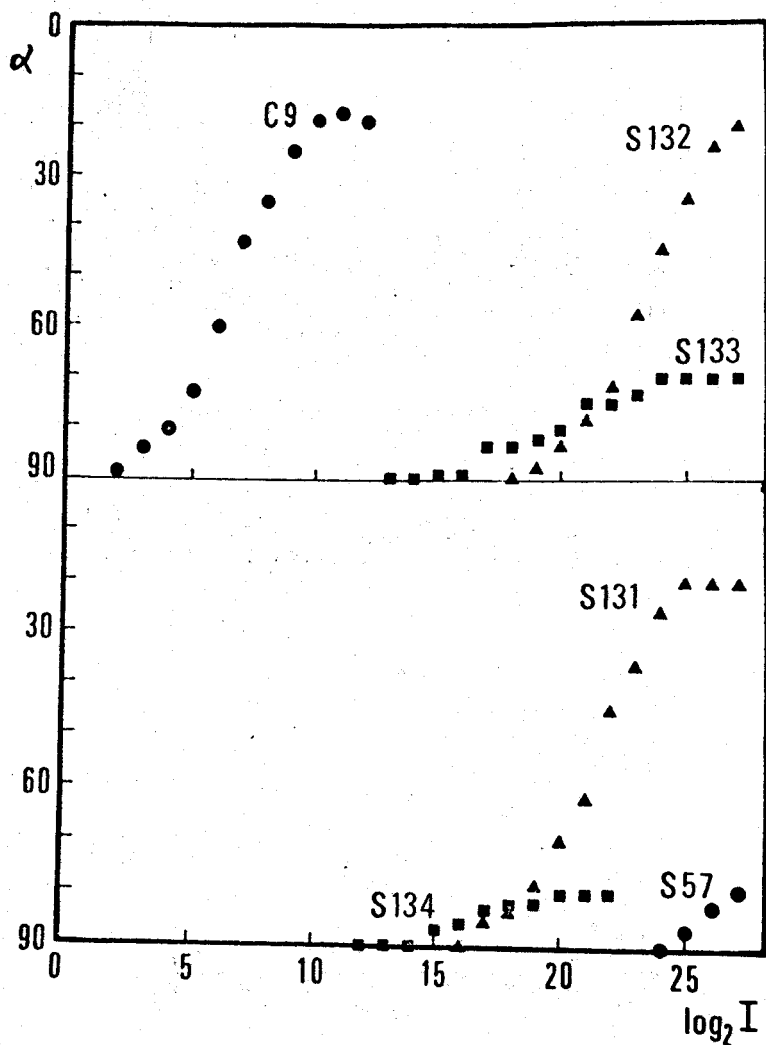


Figura 9. Relación entre el ángulo de desviación respecto a la horizontal (α) y la intensidad luminosa en el tipo silvestre (C9), dos mutantes de clase 1-1 (S131 y S132), un mutante de clase 1-2 (S57) y dos de clase 2 (S133 y S134). El experimento duró 5 horas.



En la Figura 10 se representan los mismos datos pero figurando ahora en el eje vertical no el ángulo sino el logaritmo de su cotangente. La función se compone de dos rectas, de pendiente 0 y 1 respectivamente.

No ocurre lo mismo en el caso de los mutantes de clase 2.

A partir de las gráficas anteriores podemos definir los siguientes parámetros:

El umbral fotogeotrópico es el logaritmo de la última intensidad a la que, tras 5 horas de luz, α es menor de 90° .

La pendiente fotogeotrópica es la de la relación entre $\log \cot \alpha$ y $\log I$, en el intervalo comprendido entre la intensidad crítica y la umbral.

Intensidad crítica es aquella por encima de la cual el ángulo se hace independiente de la intensidad. Corresponde a la intersección entre las rectas de pendiente 1 y 0 en las gráficas anteriores.

Los parámetros así definidos son medidas experimentales que pueden o no corresponder a valores de equilibrio según la estirpe concreta de que se trate y de la duración del experimento.

La Tabla II indica los valores de esos parámetros para varias estirpes.

COMPLEMENTACION CUANTITATIVA ENTRE MUTANTES DEL COMPORTAMIENTO

Complementación cuantitativa entre C9 y S57: Describiremos en detalle la complementación cuantitativa entre las estirpes C9 (carR) y S57 (carA, madC, clase 1-2) como ejemplo del protocolo seguido en todos los casos.

Se obtuvo, en primer lugar, el heterocariote entre ambas estirpes por el método microquirúrgico de Ootaki (60). El heterocariote se distingue fácilmente por su color amarillo, debido a la acumulación de β -caroteno al complementar las mutaciones carA y carR (46). Una vez obtenido, el heterocariote debe ser identificado. Para ello segregamos sus esporas sobre medio ácido con objeto de reaislar de su descendencia las estirpes homocariotes originales.

Procedemos ahora al estudio por complementación cuantitativa de la variable fenotípica elegida, en nuestro caso el comportamiento.

Los heterocariotes entre mutantes carA y carR acumulan diversas cantidades de β -caroteno, γ -caroteno y licopeno en función de la proporción de los núcleos de uno y otro tipo que contengan y, por tanto, presentan diferentes tonalidades de color (46).

Se siembran en medio ácido esporas del heterocariote y se aíslan micelios de distintas proporciones nucleares. Cada uno de ellos se designa con una letra mayúscula.

Los heterocariotes mantienen su proporción nuclear durante el crecimiento vegetativo del micelio, incluso en

Figura 10. Relación entre $\log_2 \text{ctg } \alpha$ y $\log_2 I$ para las mismas estirpes que en la figura 9, en idénticas condiciones experimentales.

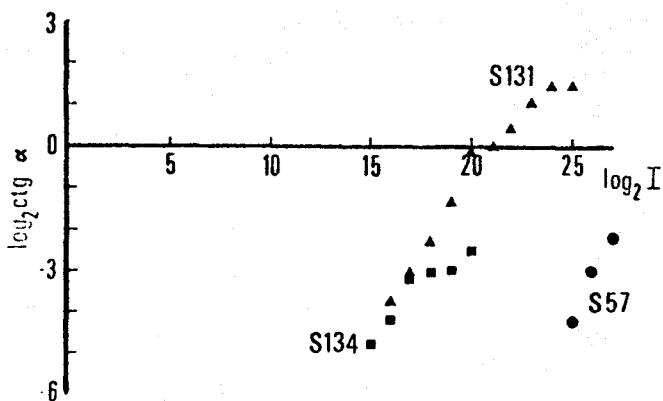
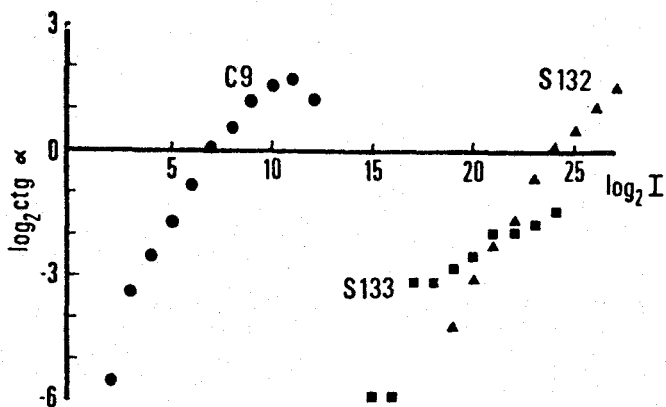


Tabla 2, Umbral e intensidad crítica de algunos
mutantes de *Phycomyces* y de la estirpe
silvestre.

Estirpe	Umbral	Intensidad crítica
NRR1555	0	+9
C47	16	24
C59	18.5	21
C68	14	Desconocida
S14	24	>29

Tabla 3. Análisis genético de C9#557

Micelio	Vacios	Bancos	Rojos	Ambos	Amarillos	p
A	189	4	209	2	494	0.8
B	281	0	200	1	318	0.75
C	207	5	96	6	486	0.7
D	628	0	64	0	107	0.66
E	420	34	21	0	308	0.45
F	201	52	17	2	528	0.4
G	288	97	7	2	406	0.35
H	443	140	2	1	214	0.2
I	418	162	1	0	219	0.15
J	626	17	15	2	141	0.5

Las columnas de la tabla 3 indican respectivamente: número de tubitos vacíos, con sólo micelio homocariote *carA*, con sólo homocariote *carR*, con ambos, con micelio heterocariote y proporción de núcleos *carR*

trasplantes a medios nuevos (50). Se pueden obtener varios micelios heterocariontes con la misma proporción nuclear y dedicarlos a distintos análisis genéticos, bioquímicos y de comportamiento.

El dedicado a estudio genético se cultiva hasta que haya producido gran cantidad de esporas. Las recogemos y suspendemos en medio líquido, distribuyéndolo a continuación en tubitos pequeños, de modo que la media de esporas por tubito sea aproximadamente la unidad. A los cinco días nuevos micelios han crecido, y se procede a anotar los siguientes datos: número de tubitos sin micelio, número de tubitos con sólo micelio homocariote carA (blanco), número con sólo carR (rojo), número de tubitos con micelio homocariote carA y homocariote carR y número de tubitos con micelio heterocarionte, tengan o no homocariontes además (50). La Tabla III resume datos así para heterocariontes C9*S57 y da las estimaciones de la proporción nuclear correspondiente.

Para estudios del comportamiento se trasplantan trozos de micelio a tubitos llenos de medio sólido, donde crecen y emiten esporangióforos. Se quitan con pinzas todos los esporangióforos menos uno en estadio IVb, seleccionado por su robustez y verticalidad (9). Estas preparaciones se exponen durante cinco horas a distintas distancias de la fuente de iluminación, que emite luz azul perpendicular al eje del esporangióforo.

La Figura 11 representa la desviación del esporangióforo con la vertical en función de la intensidad luminosa. Cada punto representa la media de diez determinaciones (excepcionalmente seis).

Para análisis de carotenoides se utilizaron micelios de 4 o 5 días. La Figura 12 representa los espectros de absorción de los tres carotenos principales encontrados y la Tabla IV resume los análisis cuantitativos de distintos micelios.

Para cada heterocarionte tenemos, tras esta serie de experimentos, tres clases de datos:

- 1) La proporción nuclear.
- 2) El ángulo alcanzado en cinco horas de experimentación a distintas intensidades luminosas, y, por tanto, las intensidades umbral y crítica y la pendiente fotogeotrópica.
- 3) El análisis de carotenoides.

La figura 13 relaciona el umbral de cada heterocarionte con su proporción nuclear. La pendiente fotogeotrópica no varía en ningún heterocarionte C9*S57.

En el resto de las complementaciones cuantitativas hemos seguido exactamente el mismo proceso que en la descrita, pero no hemos estudiado cuantitativamente los carotenoides sino sólo cualitativamente a efectos de identificación de heterocariontes. Para mayor brevedad, no exponemos todos los datos obtenidos sino directamente la proporción nuclear y el umbral de cada heterocarionte.

Complementación cuantitativa entre C2(carA) y C9(carR)
Ambas estirpes tienen comportamiento normal. El objeto de este estudio es asegurarnos de que ni las diferen-

Figura 11. Relación entre el ángulo de desviación a la horizontal (α) tras cinco horas de iluminación y la intensidad luminosa en heterocariotes C9#557. Las proporciones nucleares se exponen en la tabla 3.

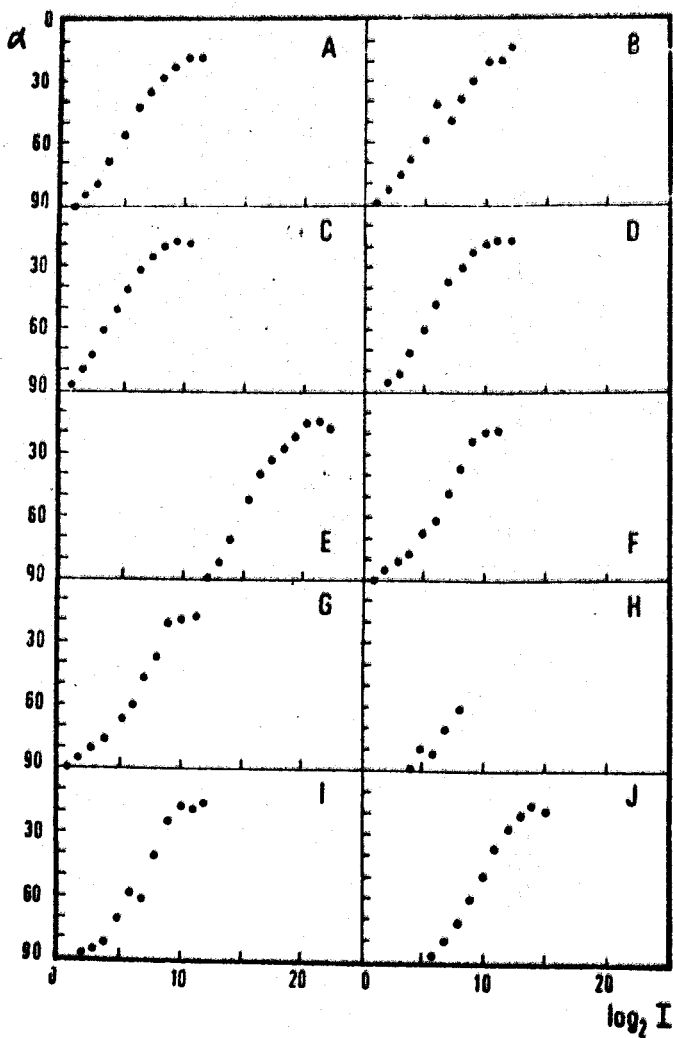


Figura 12. Espectros de absorción de los carotenoides que acumula un heterocariote C9*S57. La identificación se ha hecho comparando los espectros con los ya publicados.(47)

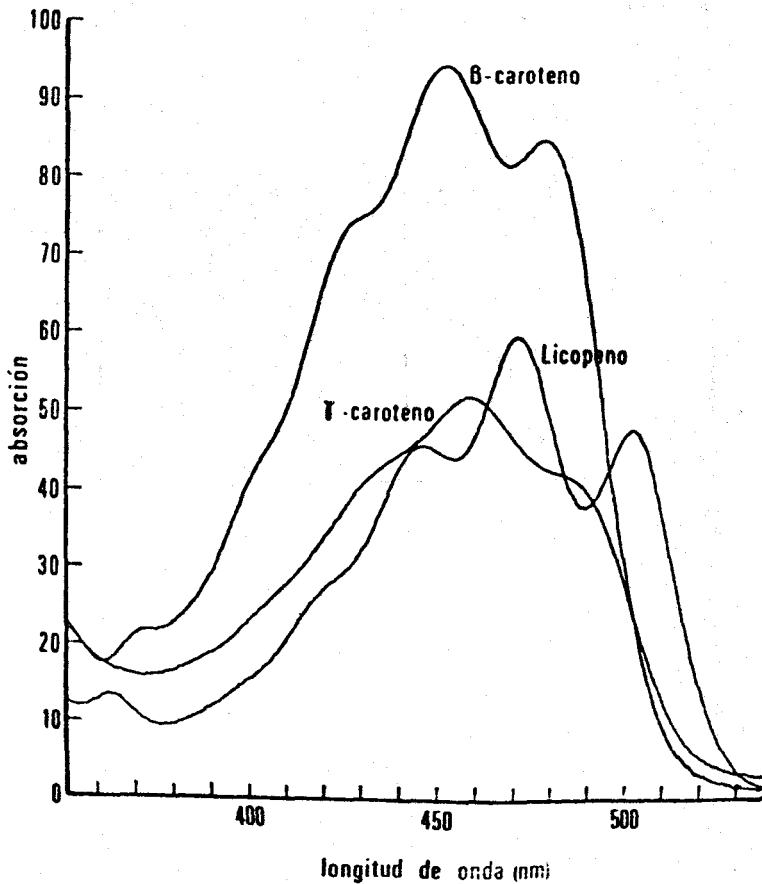


Tabla 4. Cantidades de distintos carotenoides acumuladas por distintos micelios del heterocarionte C9*557

Micelio	licopeno	γ -caroteno	β -caroteno
A	295	54	30
B	280	71	68
C	210	52	39
D	230	41	28
E	120	12	133

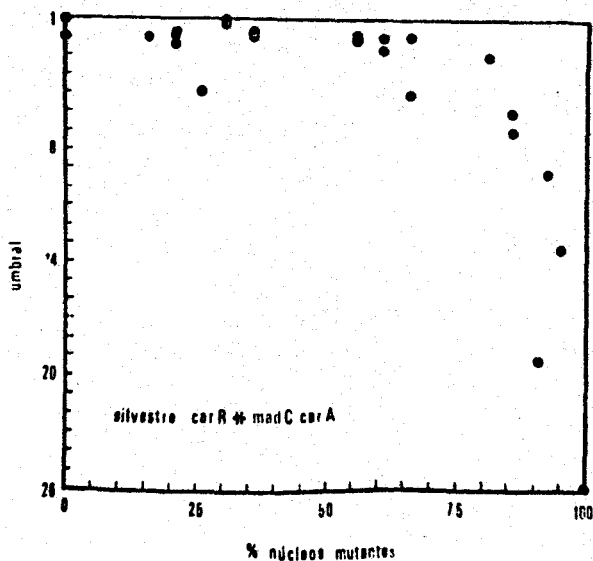
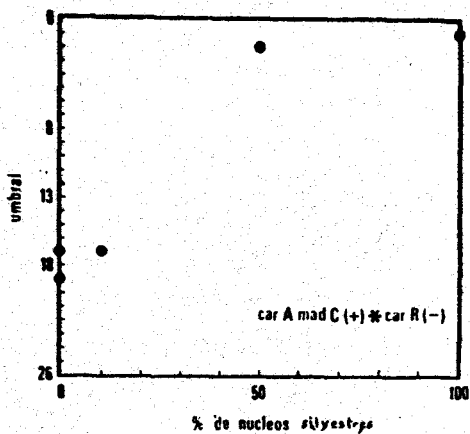
Las cantidades se miden en $\mu\text{g/g}$ de materia seca

Tabla 5. Análisis genético de S18*580

p	Micelio	Vacios	Blancos	Rojos	Ambos	Amarillos
0.15	A	631	101	1	0	64
0.32	B	298	87	10	1	404
0.54	C	623	12	19	1	136
0.6	D	427	38	52	1	302
0.71	E	430	7	86	1	271
0.85	F	624	1	107	0	68

Las columnas de esta tabla corresponden a las diferentes clases de tubitos que resultan de la siembra de medio líquido con esporas del heterocarionte. La letra p indica la proporción de núcleos carR (S80).

Figura 13. Relación entre el umbral fotogeotrópico y la proporción nuclear en distintos heterocariontes. *A* abajo datos del heterocarionte C9 (carR(-)) * S57 (carAmadC(-)). *A* arriba los del heterocarionte C9 * C142 (carAmadC(+)).



cias en la síntesis de carotenoides ni el hecho de la heterocariosis influyen en el comportamiento.

La Figura 14 muestra el umbral en relación con la proporción nuclear en heterocariontes una de cuyos componentes es, en todos los casos, la estirpe de comportamiento normal C9 y el otro un mutante del comportamiento perteneciente a respectivamente cada uno de los cinco grupos de complementación.

Otras complementaciones cuantitativas

Las Figuras 15 y 16 muestran las relaciones entre el umbral y la proporción nuclear en heterocariontes una de cuyos componentes es, en todos los casos, la estirpe de comportamiento normal C9 y el otro un mutante del comportamiento perteneciente a respectivamente cada uno de los cinco grupos de complementación.

De las figuras expuestas se deduce que la dependencia entre $\log I$ y ángulo α alcanzado en cinco horas no difiere significativamente entre las estirpes C2, C9 o sus heterocariontes, por lo que se concluye que las diferencias en la clase y cantidad de carotenoides acumulados, que esas estirpes y sus heterocariontes presentan, no afectan de modo importante al comportamiento y, por tanto, las mutaciones carR y carA sirven bien a su fin de marcadores genéticos para poder hallar las proporciones nucleares sin interferir en el carácter bajo estudio.

En las tres estirpes mutantes de clase 1 y en sus heterocariontes la pendiente fotogeotrópica es la normal. En cambio, en los mutantes de clase 2 la pendiente fotogeotrópica está alterada y la alteración subsiste en los heterocariontes entre cada una de esas estirpes y la silvestre si la proporción de núcleos de ésta última es pequeña. Puesto que el umbral de los mutantes de clase 2 presumiblemente no corresponde a un valor de equilibrio es interesante analizar, en estos mutantes, la relación entre el ángulo alcanzado a determinada intensidad y tiempo con la proporción nuclear (Figura 17).

El umbral fotogeotrópico sufre variaciones en todas las estirpes de comportamiento anormal empleadas y es un carácter fuertemente recesivo en los heterocariontes entre cada una de esas estirpes y la silvestre; es decir, el umbral del heterocarionte está mucho más próximo al del silvestre que al de la estirpe mutante para casi todas las proporciones nucleares. Habida cuenta de la escala logarítmica en que se representa la intensidad, parece existir una dependencia aproximadamente lineal entre la proporción de núcleos silvestres en cada heterocarionte y su intensidad umbral.

No se detectan interacciones especiales entre los núcleos silvestres y mutantes, aunque en los mutantes de tipo 2 el ángulo alcanzado por el heterocarionte a cierta intensidad y tiempo no es un carácter tan recesivo como el umbral.

COMPLEMENTACION CUANTITATIVA ENTRE S18 (carA madC, CLASE 1-2a) y S80 (carR, AUXOTROFO)

Con objeto de aplicar la técnica de la complementación cuantitativa a un sistema más sencillo y conocido que

Figura 14. Relación entre umbral fotoelectrónico y pro-
porción nuclear en un heterocarionte CZK9.

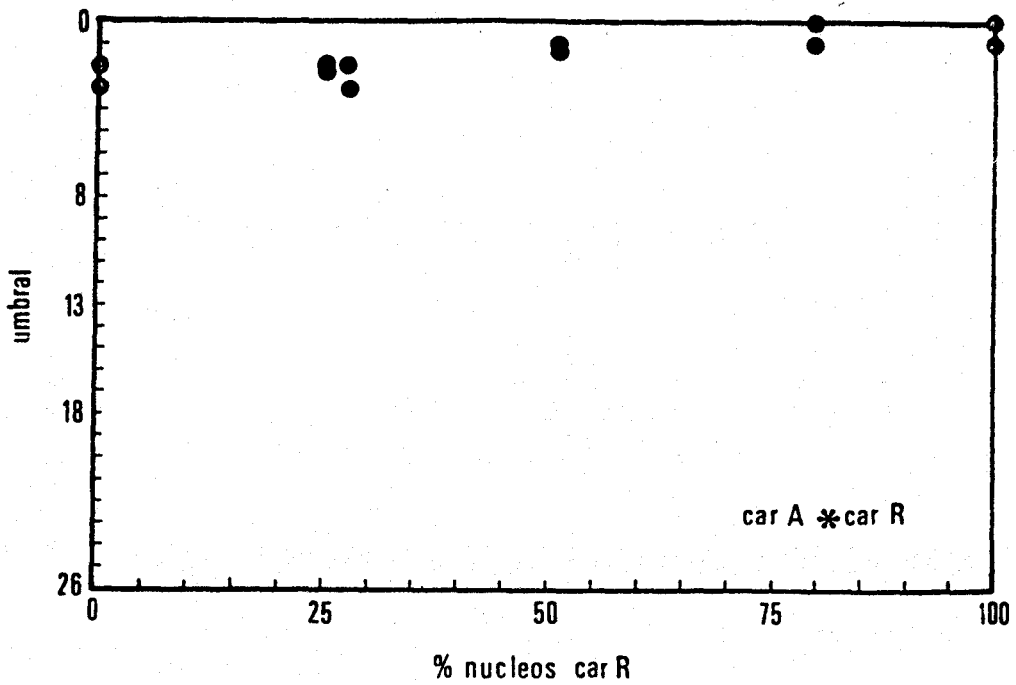


Figura 15. Relación entre umbral fotogeotrópico y proporción nuclear en dos heterocariontes. Arriba los datos de un heterocarionte entre un mutante madB y el silvestre. Abajo los del heterocarionte entre uno madA y el silvestre.

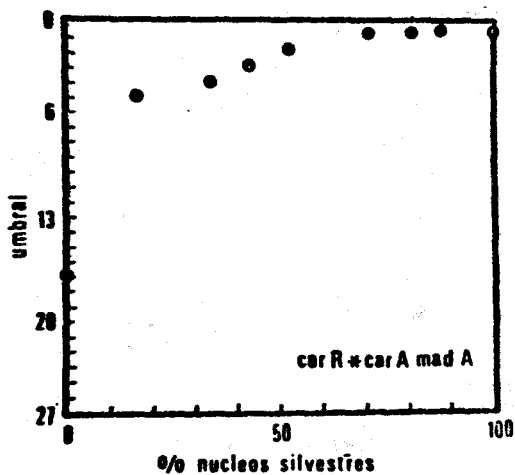
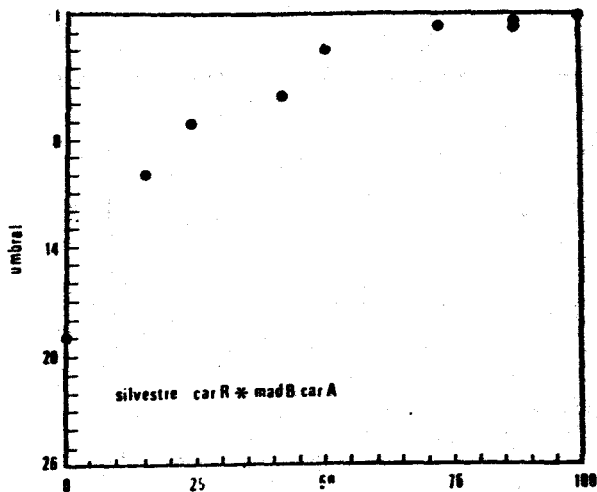


Figura 16. Relación entre umbral fotoeotrópico y proporción nuclear en un heterocariote entre un mutante madD y el tipo silvestre (arriba) y entre éste y un mutante madE (abajo).

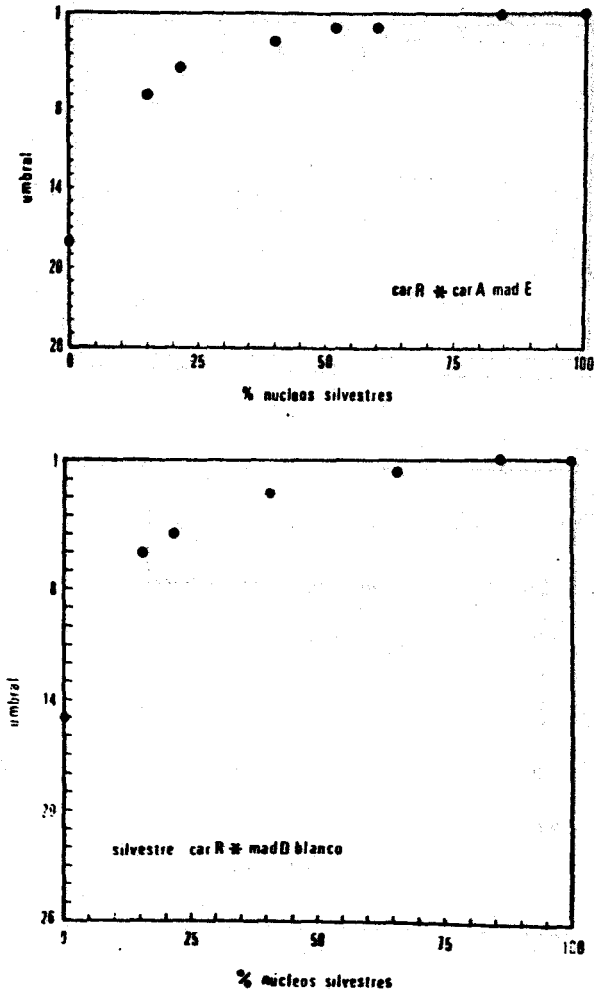
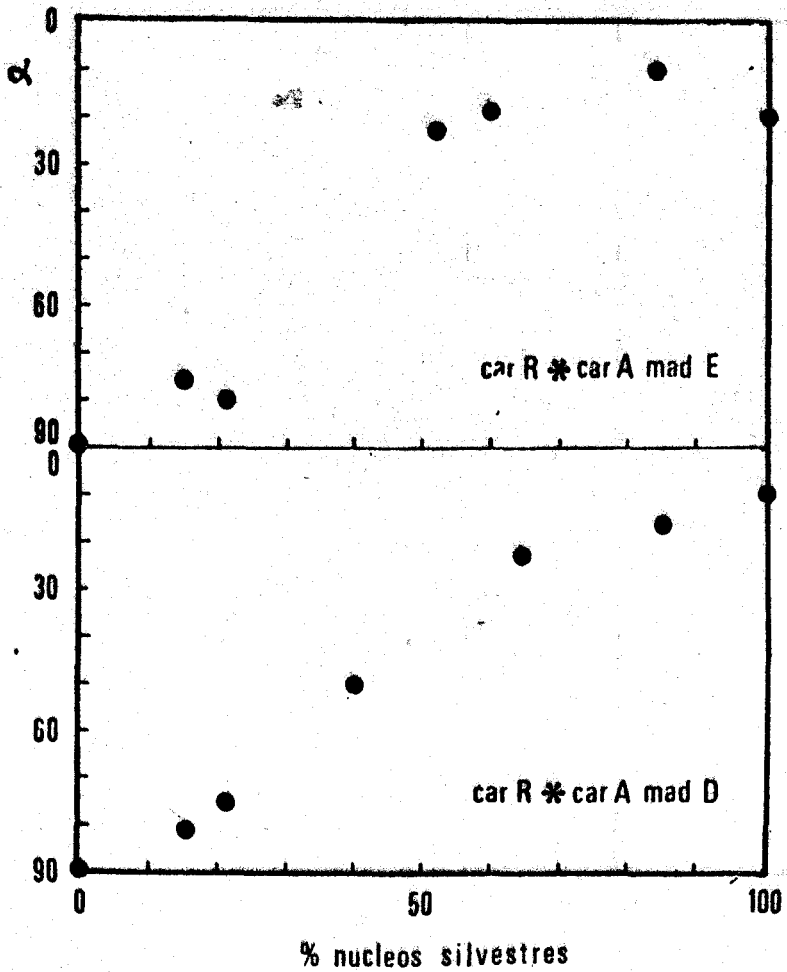


Figura 17. Relación entre el ángulo alcanzado con respecto a la horizontal (α) tras cinco horas de iluminar con una intensidad de 17 unidades y la proporción nuclear en los mismos heterocariontes que en la figura 16.



el fototropismo, y por tanto más claro a la hora de interpretar los resultados y de detectar las posibles dificultades experimentales imprevistas que esta técnica pudiera presentar, estudiamos la complementación de un auxótrofo frente al protótrofo.

Usamos los mismos marcadores que en las complementaciones con mutantes del comportamiento.

La Tabla V muestra los análisis genéticos para el cálculo de la proporción nuclear. La Figura 18 demuestra que el auxótrofo y cualquiera de sus heterocariontes crece prácticamente igual que el protótrofo en medio rico y la mutación comporta como muy recesiva en medio pobre, lo que es de esperar en este tipo de mutaciones. Los marcadores de color empleados no parecen influir sensiblemente en el crecimiento. La gráfica indica que basta alrededor de un 15% de núcleos protótrofos para que el micelio no muestra deficiencia alguna en su crecimiento. No aparecen dificultades imprevistas al aplicar experimentalmente las ideas de la complementación cuantitativa.

SIMULACION DE LA SEGREGACION DE HETEROCARIONTES

El programa 9 simula el proceso de formación por un heterocarionte de esporas homocariontes de ambos tipos y heterocariontes y también el reparto de una muestra al azar de tamaño N de esas esporas en M tubitos. Enumera las distintas clases de tubitos resultantes del reparto y calcula a partir de esa enumeración la proporción nuclear del heterocarionte inicial.

Ha sido preciso recurrir a técnicas de simulación dada la complejidad de la situación real, lo que hace difícil abordarla mediante las técnicas del análisis matemático. La simulación de la situación real ha servido para comprobar que, en nuestras condiciones experimentales, el cálculo de las proporciones nucleares de los heterocariontes no estaba sujeto a errores o ambigüedades.

El programa consta de cuatro partes principales cada una de las cuales se relaciona con una hipótesis necesaria al buen funcionamiento de la técnica.

1) Obtención de una muestra al azar de tamaño N a partir de una población infinita de esporas con la siguiente distribución de frecuencias:

Homocariontes de clase A, $\sum p^i f_i$

Homocariontes de clase B, $\sum (1-p)^i f_i$

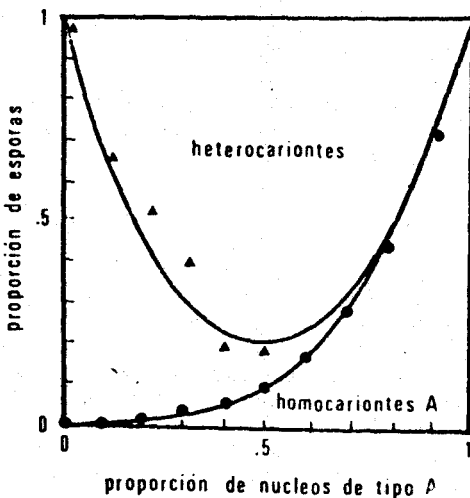
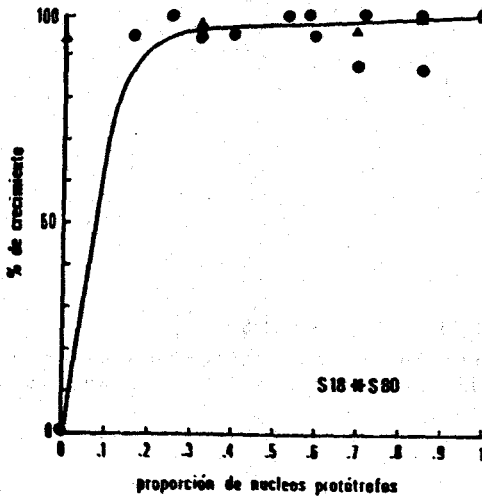
Heterocariontes, $1 - \sum (p^i + (1-p)^i) f_i$

que son las esperadas teóricamente entre las esporas de un heterocarionte con p como proporción de núcleos de clase A y f_i como frecuencia de esporas con i núcleos.

El modo de simular este proceso se describe en Materiales y Métodos y los resultados en la Figura 19, donde se muestran mediante línea continua los valores esperados de las proporciones de cada uno de los tres tipos de esporas en función de p y con puntos la media de 50 valores obtenidos por simulación para diferentes valores de p y N.

Figura 18. Relación entre el % de área crecida por un heterocariote S18*S80 y la proporción nuclear, respectivamente en medio pobre (círculos) y rico (triángulos). El 100% de crecimiento es el área crecida por S18 en los cuatro días de experimentación.

Figura 19. Proporción de esporas homocariotes y heterocariotes producidas por un heterocariote en función de su proporción nuclear. En línea continua los valores esperados, con puntos la media de 50 datos obtenidos por simulación.



Como se deduce de la proximidad entre los valores simulados y los esperados, el programa realmente genera muestras de tamaño N con los requerimientos prescritos. La obtención de esa muestra incluye, tanto en la realidad como en el programa un componente aleatorio. Lo importante es averiguar la relación entre el tamaño N y el error en la estimación de la proporción nuclear. Como no es ésta la única fuente de error en dicha estimación, no la analizaremos ahora, sino conjuntamente con las otras.

2) Distribución de las N esporas en M tubitos, en nuestro caso 800, de modo que cada espora tenga la misma probabilidad "a priori" de ir a un tubito determinado. Hemos trabajado con 800 tubitos porque experimentos de simulación preliminares, en los que N variaba de 100 a 1800, nos indicaron que ese era el número mínimo de esporas necesario para reducir suficientemente los errores en las proporciones de esporas, debidas al azar en la muestra de tamaño N. Puesto que la técnica requiere que la media de esporas por tubito sea aproximadamente 1, evidentemente 800 es el número mínimo de tubitos que podemos emplear.

En la Figura 21 se representa el número medio de tubitos vacíos para diferentes valores de N. Se representan con puntos los valores obtenidos en los experimentos de simulación con línea continua y los predichos a partir de la binomial

$$\left(\left(\frac{M-1}{M} \right)^N + \left(1 - \left(\frac{M-1}{M} \right)^N \right)^M \right)$$

La concordancia entre los valores obtenidos y los esperados es una prueba de que el programa distribuye la esporas en los tubitos según los requerimientos prescritos. El número total de experimentos simulados para cada tamaño N es, en este caso, de 100.

Esta es la segunda fuente de variabilidad en la estimación del p: la distribución de las N esporas en los M tubitos.

3) Cálculo del número medio de esporas totales y de esporas de cada uno de los tres tipos por tubito, a partir de los resultados del apartado anterior. La distribución real de tipo multinomial no es utilizada; las medias citadas se calculan a partir del término 0 de la distribución de Poisson correspondiente. Se trata, por tanto, de una aproximación basada en la hipótesis de que si la media de esporas por tubito es suficientemente pequeña la distribución multinomial real conduciría a resultados muy parecidos a los de tres distribuciones de Poisson independientes. Esta aproximación introduce una tercera fuente de error en la estimación del p. Un test apropiado de la validez de la hipótesis en que se basa esta aproximación sería la comparación de las medias calculadas dividiendo el número total o el de cada tipo de esporas entre M con las calculadas mediante el método descrito. La Figura 20 contiene una de esas comparaciones; es la distribución de las diferencias entre el número medio de esporas calculado a partir de la distribución de Poisson y la media real de la muestra. La Figura 22 muestra la

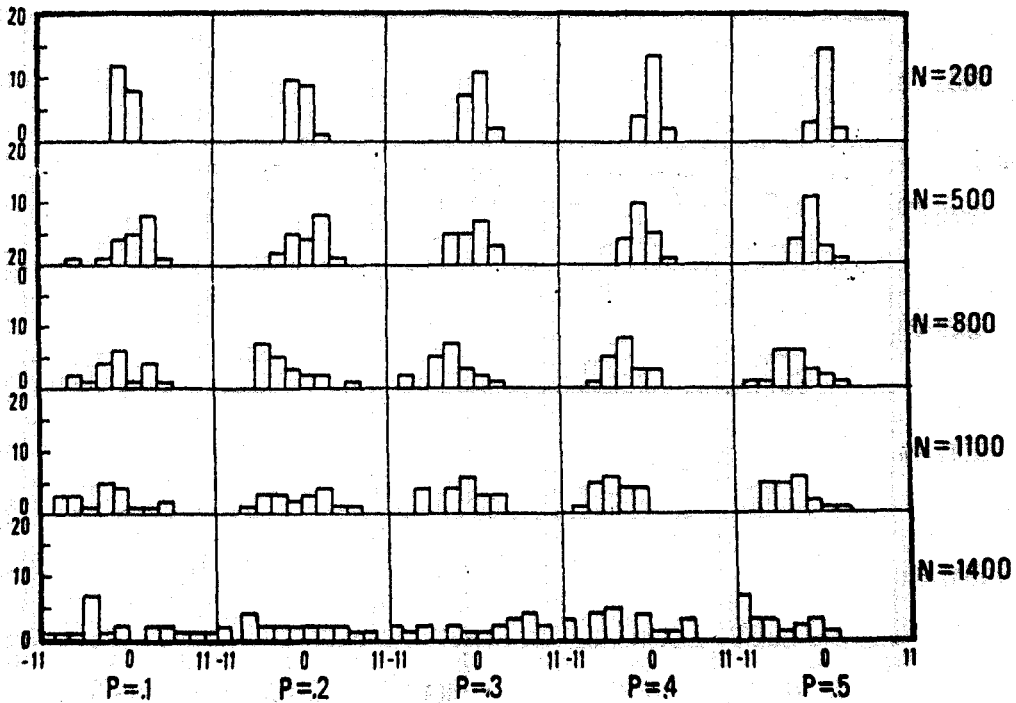


Figura 20. Distribución de las diferencias entre la media real de esporas por tubito y la estimación obtenida a partir de la distribución de Poisson de esporas en tubitos. Se representan las distribuciones para distintos p y N . La anchura del rango es 0.22. y la de cada intervalo 0.01.

Figura 21. Número medio esperado de tubitos vacíos (línea continua) para diferentes valores de N y media de tubitos vacíos en 100 experimentos de simulación para cada valor de N (en puntos la media obtenida por simulación).

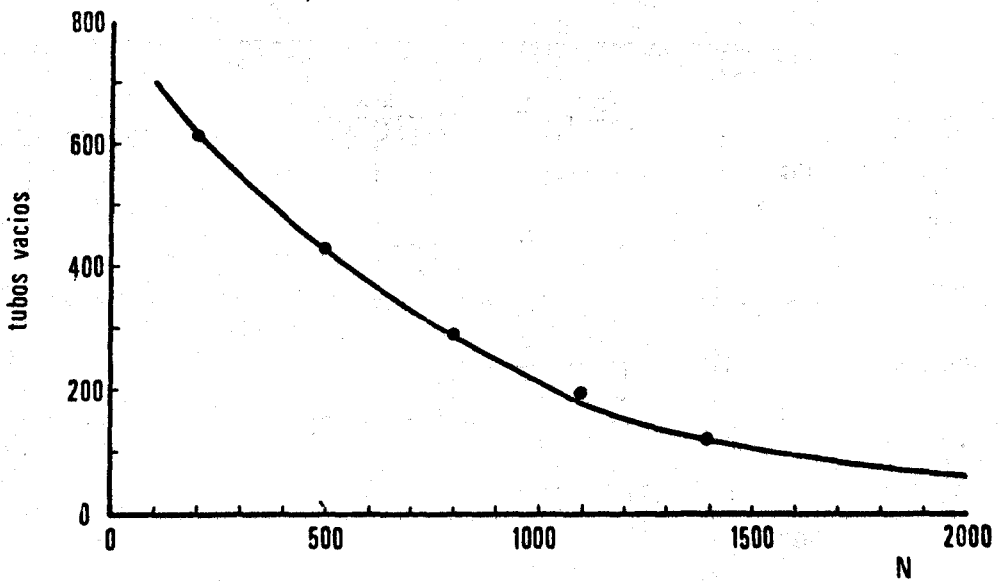
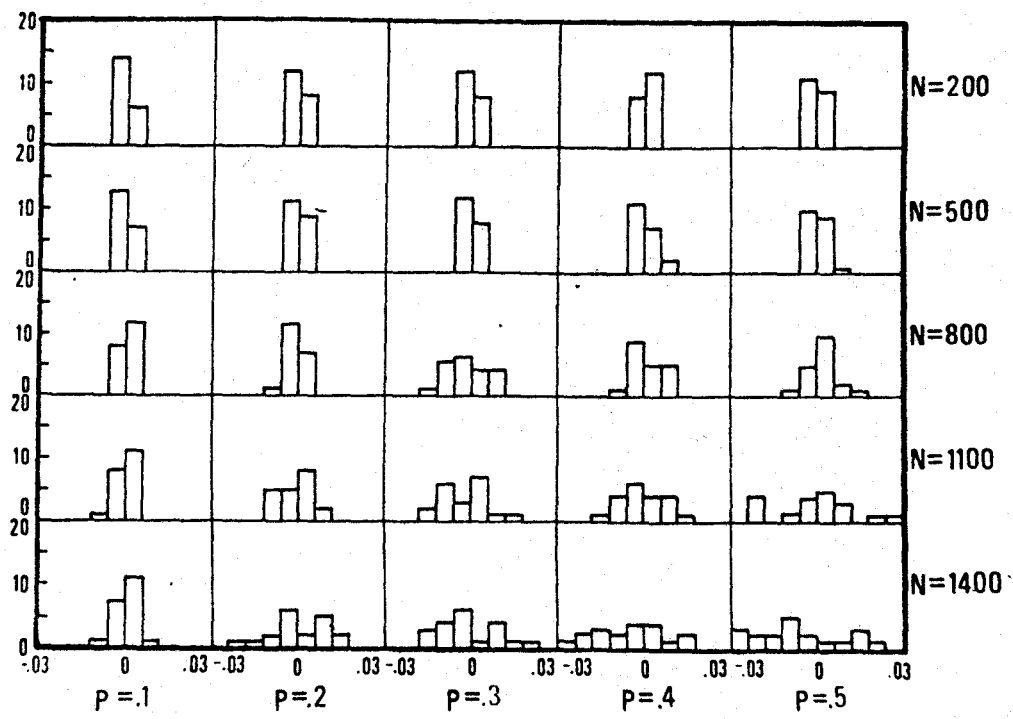


Figura 22. Distribución, para distintos N y p, de las diferencias entre la media de esporas por tubito a partir del término 0 de la distribución de Poisson de esporas en tubitos y la media de esporas por tubito calculada sumando las medias de cada uno de tres tipos de esporas por tubito, halladas a partir de la distribución de Poisson correspondiente, La anchura del intervalo es 0.001.



distribución de las diferencias entre la media de esporas calculada a partir de la distribución de Poisson de esporas en tubitos y la calculada sumando las medias de cada uno de los tres tipos de esporas, calculada cada una de ellas a partir de la distribución de Poisson correspondiente. Las diferencias en ambos casos son tan pequeñas que podemos concluir que la aproximación de la distribución de Poisson a la real es excelente.

4) Estimación de la proporción nuclear del heterocariote a partir de las medias de esporas de los tres tipos previamente halladas. En el laboratorio suele hacerse por un método gráfico; en este programa lo hemos hecho hallando la solución de las ecuaciones:

$$\sum_{i=1}^{i=6} p^i f_i = m_A/m$$

$$\sum_{i=1}^{i=6} (1-p)^i f_i = m_B/m$$

donde m_A y m_B son, respectivamente, las medias de esporas de clase A y esporas de clase B por tubito. La subrutina que resuelve esas ecuaciones fue previamente comprobada mediante la sustitución de p en esas ecuaciones por números arbitrarios conocidos lo que proporcionó valores determinados a m_A y m_B , para a continuación verificar si la subrutina daba los valores adecuados de p cuando era aplicada a los valores correspondientes de m_A y m_B . En los 10 valores de p que probamos el resultado fue satisfactorio. El cálculo de p se hace con dos cifras decimales significativas. La Figura 23 muestra la media de los valores de p calculados en los experimentos de simulación para diferentes tamaños de muestra y proporciones nucleares inicialmente asumidas. Todas las fuentes de variabilidad citadas, actuando conjuntamente, son las responsables de las diferencias entre las estimaciones de p y el p inicial de que partimos.

La Tabla VI indica las desviaciones típicas de los valores de p en función del tamaño de la población N y del valor inicialmente asumido de p , o "valor verdadero". Al ser tan pequeñas las desviaciones típicas tenemos la seguridad de en cada cálculo concreto de un p determinado nuestra estimación será muy próxima al valor real.

Figura 23. Los puntos representan la media de 40 estimaciones de la proporción nuclear halladas en experimentos de simulación. Las líneas horizontales representan los valores esperados a cada uno de los diferentes tamaños de N , es decir, la proporción nuclear de la que se partía en cada simulación.

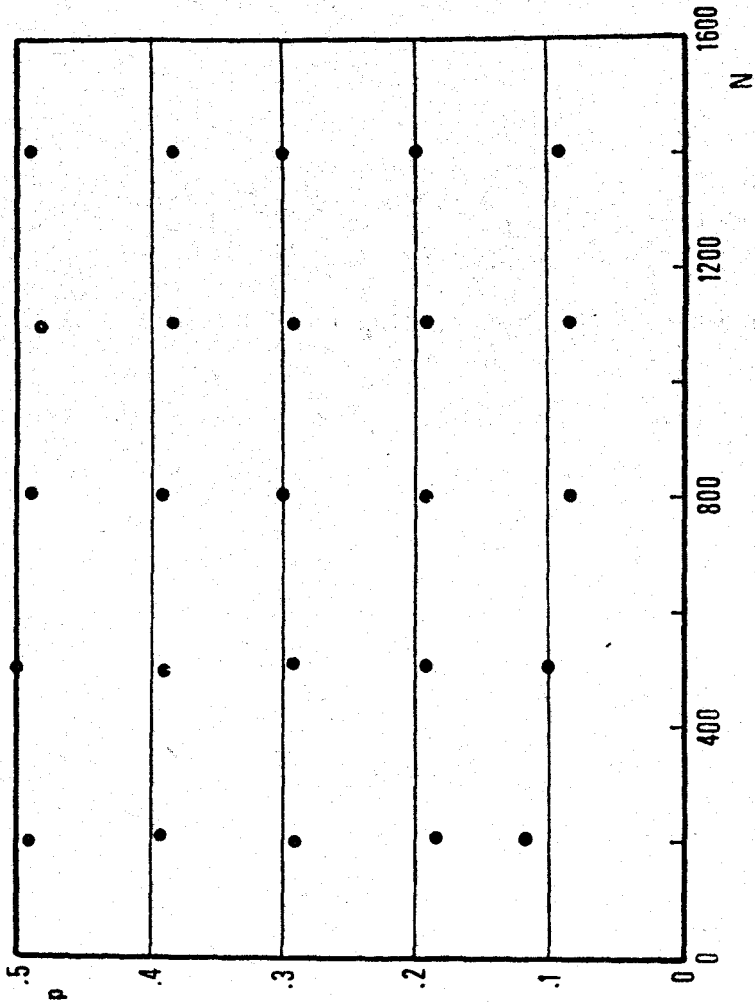


Tabla 6. Desviación típica de la distribución de estimaciones de p para diferentes tamaños N de la muestra y diferentes valores de p .

$N \backslash p$	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
200	0.0402	0.0542	0.0359	0.0424	0.0386
500	0.0278	0.0307	0.0316	0.0274	0.0330
800	0.0348	0.0310	0.0400	0.0260	0.0279
1100	0.0425	0.0240	0.0270	0.0300	0.0265
1400	0.0272	0.0237	0.0360	0.0470	0.0390

Cada desviación típica se basa en 40 estimaciones de p independientes, realizadas por simulación con ayuda de ordenador.

MODELO MATEMATICO DEL COMPORTAMIENTO

Nuestro modelo pretende explicar la fotorrespuesta de crecimiento y el fototropismo como fenómenos derivados de un mecanismo molecular común, así como el comportamiento de las diferentes clases de mutantes del comportamiento que se han aislado y los resultados de la complementación cuantitativa entre cada una de esas clases de mutantes y el silvestre.

El modelo alcanza esos tres objetivos en el mismo orden que los hemos mencionado y cada parte necesita, además de las hipótesis formuladas para las partes anteriores, otras nuevas e independientes. El modelo predice, sin necesidad de hipótesis adicionales, los resultados de otros experimentos no utilizados en su elaboración y prevé la existencia de nuevas clases de mutantes.

RESPUESTAS A LA LUZ

Las respuestas a la luz que *Phycomyces* presenta, pueden explicarse admitiendo que:

1) La estructura fotorreceptora-adaptadora consta de numerosos elementos que funcionan independientemente unos de otros. Para cada elemento el estímulo subjetivo instantáneo viene dado por:

$$S_i = \frac{E| - A}{A} \quad \text{si } A > A_d$$

$$S_i = 0 \quad \text{si } | \leq A_d \text{ y } A = A_d$$

donde A_d es el valor mínimo de A , b es una constante aproximadamente igual a cinco minutos, E es una constante adimensional que mide la efectividad global de la cadena de transductores colocados entre el fotorreceptor y el mecanismo de adaptación, supuestos todos lineales, y el valor del nivel de adaptación A puede calcularse a partir de:

$$dA = \frac{E| - A}{b} dt.$$

El estímulo total recibido por un elemento en el tiempo t será:

$$S = \int_0^t S_i dt = b \ln \frac{A}{A_0} = \frac{E|t}{A} \quad \text{cuando } t \text{ es muy pequeño,}$$

como ya demostramos en la introducción.

El tamaño de la respuesta que dará cada elemento será:

$$T = KS$$

donde T es el alargamiento adicional del esporangióforo provocado por la estimulación y K es una constante, que se mide en cm/minuto, característica del efector.

2) Los elementos se hallan en o cerca de la pared, girando con ella a velocidad angular constante.

3) Las respuestas de los diferentes elementos se suman al difundir en ambos sentidos desde su punto de origen.

Veamos como estos tres postulados explican la fotorres puesta de crecimiento y el fototropismo.

Fotorrespuesta de crecimiento

El esporangióforo se halla iluminado homogéneamente. En el tiempo 0 incrementamos la intensidad luminosa hasta un valor I que, en adelante, se mantendrá constante.

En cada elemento el nivel de adaptación varía según:

$$A_x = EI - (EI - A_{0x}) e^{-\frac{t}{b}}$$

donde A_{0x} es el nivel de adaptación que el elemento x tenía al variar la iluminación.

Por cada punto del espacio pasará una ristra de elementos, cada uno de los cuales transmitirá allí un estímulo igual a:

$$S_{ixz} = \frac{EI - A_{xz}}{A_{xz}}$$

donde A_{xz} viene dado por:

$$A_{xz} = EI - (EI - A_{0x}) e^{-\frac{t_{xz}}{b}}$$

siendo t_{xz} el tiempo que el elemento x ha tardado en llegar desde el punto en que se encontraba al variar la iluminación al punto z que estamos considerando y A_{xz} el nivel de adaptación del elemento x al llegar a z .

El estímulo total acumulado en el punto z será:

$$S = \int_0^t S_i dt$$

ya que por z van pasando elementos que han tardado diferentes tiempos entre 0 y t , en llegar desde el punto en que fueron estimulados.

Para un mismo tiempo t , dada la simetría de la situación, cada punto recibe el mismo estímulo total, convirtiéndose, por tanto, todos los puntos en fuentes de respuestas elementales iguales, cuya suma es la respuesta global observable.

Fototropismo

Consideremos la zona sensible como un cilindro homogéneo, transparente, de índice de refracción mayor que el del aire, de altura g y diámetro d constantes (figura 6). El cilindro permanece recto durante el tropismo dada la pequeñez de sus dimensiones en comparación con el radio de curvatura del arco descrito durante el giro.

La zona de crecimiento refleja, absorbe, dispersa y refracta la luz. Limitémonos a aquellos ángulos ($\alpha > 20^\circ$) para los que el foco se halla fuera de la célula. Supongamos que iluminamos con un haz monocromático, de 480 nm

(a la cual el espectro de acción muestra un máximo), que se repartirá en los siguientes flujos:

$$\text{Flujo incidente, } F_I = I_1 S \text{sen} \alpha$$

donde I_1 es la intensidad incidente y S el área del plano medio del cilindro, igual a $\pi r d$.

$$\text{Flujo no reflejado, } F_{NR} = R F_I = R I_1 S \text{sen} \alpha$$

donde R es la fracción de luz no reflejada, supuesta constante e independiente del ángulo de incidencia α .

$$\text{Flujo disperso, para } \alpha = 90^\circ, F_D = D F_{NR} = R D I_1 S.$$

Para otros valores de α , el flujo disperso sigue valiendo aproximadamente lo mismo, ya que el flujo no reflejado varía en proporción directa a $\text{sen} \alpha$ pero el camino óptico y con él las posibilidades de dispersión lo hace en proporción inversa a $\text{sen} \alpha$, como se deduce de la figura 6:

$$D = d / \text{sen} \alpha$$

$$\text{Flujo absorbido, } F_A = 0$$

puesto que a esta longitud de onda la absorción es tan pequeña que podemos despreciarla en primera aproximación.

$$\text{Flujo refractado, } F_R = F_{NR} - F_D$$

Si la iluminación es unilateral, esta distribución de flujos acarrea la siguiente distribución de intensidades (figura 6):

$$\text{Zona A, } I_x = I_D + I_{NR} \cos \beta$$

donde β es el ángulo formado por la dirección de los rayos y el radio que pasa por el punto x .

$$\text{Zonas B, C y D, } I_x = I_D$$

$$\text{Zonas E y F, } I_x = I_D + I_R$$

Las dos últimas, E y F, son las zonas brillantes de filo nítido originadas por la refracción.

Para calcular estas intensidades basta dividir los flujos correspondientes por las áreas que iluminan. Así, llamando a a la anchura de una banda brillante, tendremos que:

$$I_D = \frac{F_D}{\pi a} = \frac{R D}{\pi} I_1$$

$$I_{NR} = \frac{F_{NR}}{S} R I_1 \text{ sen } \alpha$$

$$I_R = \frac{F_R}{2ag} = \frac{R \text{ sen } \alpha - RD}{2a} I_1 d$$

y llamando f a la ventaja focal, es decir a la relación entre el arco de 90° y el de una banda brillante, tendremos que:

$$f = \pi d / 4a$$

$$I_R = \frac{2Rf(\text{sen } \alpha - D)}{\pi} I_1$$

En la banda iluminada la intensidad será:

$$I_B = I_R + I_D$$

Como estamos considerando un cilindro transparente, (la situación biológica más similar sería estudiar la óptica del esporangióforo de un mutante albino), a 480 nm de longitud de onda y en el rango de ángulos de incidencia en el que estamos trabajando ($\alpha > 20^\circ$), la dispersión es pequeña (conduce a una densidad óptica de alrededor de 0.01) y podemos despreciar todos los términos en que aparezca D , si están sumando o restando. Quedaría:

$$I_B = \frac{2R \text{ sen } \alpha}{\pi} I_1 f$$

La relación entre la intensidad en la banda brillante y la intensidad en las zonas oscuras adyacentes sería entonces:

$$I_S = \frac{2f \text{ sen } \alpha}{D}$$

Esta distribución de intensidades traería consigo el siguiente programa de iluminación para cada elemento receptor, una vez pasado cierto tiempo entre el cambio de iluminación y el momento que estamos considerando:

En la zona A, llamando γ al complementario de β , la velocidad angular del receptor respecto del eje del esporangióforo vendría dada por:

$$j = d\gamma/dt$$

La intensidad a la que se ve sometido el receptor en esa zona es:

$$I_x = I_D + I_{NR} \cos \gamma$$

por lo que al llegar a la primera mitad de la zona A, ($\gamma = 90^\circ$) el nivel de adaptación de cada elemento, suponiendo que el inicial ($\gamma = 0^\circ$) fuera I_D , será:

$$A = I_D + I_{NR} \frac{j^2 + jbe \frac{j\pi}{2b}}{j^2 + b^2}$$

que para velocidades angulares del receptor de unos 6°/min. es prácticamente nulo el estímulo subjetivo al que conduce el valor de A.

Por razones parecidas la segunda mitad de la zona A tampoco provoca estímulos en los receptores que la atraviesan. Igual ocurre en las zonas B, C y D, donde al ser la intensidad casi constante, los receptores se hallan en todo momento adaptados a la intensidad local.

Sin embargo, al pasar por las bandas brillantes, E y F, los receptores sufren una fuerte y breve estimulación, ya que llegan adaptados a la intensidad dispersa reinante en B y se encuentran con la fuerte iluminación que la refracción provoca en E.

La banda brillante es tan estrecha que el receptor la atraviesa en un minuto o menos y el nivel de adaptación apenas tiene tiempo de cambiar. En consecuencia, el estímulo total recibido en cada banda será:

$$S = \frac{EI}{A} x t = I_s t = \frac{2ft s \text{sen} \alpha}{D}$$

Teniendo en cuenta que ft es aproximadamente constante, puesto que f es inversamente proporcional a a , la anchura de la banda brillante, pero t es directamente proporcional a a , ya que es el tiempo que un receptor a velocidad angular constante tarda en atravesar la banda brillante, se cumple que:

$$ft = \frac{\pi d}{4a} \times \frac{2a}{jd} = \frac{\pi}{2j}$$

En consecuencia,

$$S = \frac{\pi \text{sen} \alpha}{jD}$$

Si hacemos diferentes experimentos de fototropismo, empleando I_1 progresivamente menores, llegaremos a una intensidad tan pequeña que la intensidad dispersa será menor o igual que el mínimo del nivel de adaptación. Para esta I_1 crítica todavía hay estimulación por efecto de la ventaja focal, pero ahora:

$$S = \frac{EI}{A_d} B t = \frac{ER \text{sen} \alpha}{j A_d} I_1$$

En resumen, ambas bandas brillantes actúan como fuentes de estímulos proporcionales a $I_1 \text{sen} \alpha$ por debajo de cierto valor crítico de la intensidad y a $\text{sen} \alpha$ por encima de él. Este valor crítico de la intensidad vendría dado por:

$$A_d = \frac{ER D}{\pi} I_1$$

El tamaño de las respuestas originadas en cada una de las bandas brillantes será:

$$T = K \frac{ERs \operatorname{sen} \alpha}{j A_d} |, \text{ por debajo de valor crítico de } |,$$

$$T = K \frac{\pi \operatorname{sen} \alpha}{j D} \text{ por encima del valor crítico de } |,$$

Al difundir las respuestas así originadas, la parte distal aumentaría su velocidad respecto a la proximal, hacia la cual se produciría un giro, por ser el esporangióforo de diámetro constante.

Este giro tendría las siguientes características:

1) Velocidad angular fototrópica, ω_F , igual al cociente de la diferencia de velocidades lineales distal y proximal por el radio medio de giro:

$$\omega_F = \frac{\Delta v}{r_m}$$

De la figura 3 fácilmente se deduce que:

$$\omega_F = \frac{\Delta v}{d_m}$$

donde d_m es la distancia media de una cara a la otra, es decir:

$$d_m = 2 \frac{r \operatorname{sen} \alpha}{\pi/2} = \frac{2d}{\pi}$$

Por tanto,

$$\omega_F = \frac{\pi \Delta v}{2d}$$

Suponiendo que las respuestas de ambas bandas se suman y difunden, de modo que:

$\Delta v = T$, tendremos que: $\Delta v = 2K_1 T$, de donde,

$$\omega_F = KK_1 \frac{\pi^2 \operatorname{sen} \alpha}{j d D} \text{ por encima del valor crítico de } |,$$

$$\omega_F = KK_1 \frac{\pi ER \operatorname{sen} \alpha}{j A_d} |, \text{ por debajo del valor crítico de } |,$$

Podemos ahora hacer intervenir el geotropismo. Como dijimos en la introducción, para fuerzas estimulantes no mucho mayores que la gravedad terrestre el componente efectivo es proporcional al coseno del ángulo entre el eje del esporangióforo y la fuerza. Descomponiendo la proporcionalidad en un componente efector (K) y otro receptor (G), tendremos que:

$$\omega_G = KG \cos \alpha$$

Al integrarse ambos estímulos suponiendo que sean sus efectos aditivos:

$$(1) \quad \omega_{FG} = K \left(\frac{K_1 \pi^2 \text{sen} \alpha}{j d D} - G \cos \alpha \right) \text{ por encima del valor crítico de } l_1$$

$$\omega_{FG} = K \left(\frac{K_1 \pi E D \text{sen} \alpha}{j d A_d} - G \cos \alpha \right) \text{ por debajo del valor crítico de } l_1$$

2) Ángulo de equilibrio, como consecuencia de la ecuación (1), la velocidad angular se anula para cierto ángulo, llamado de equilibrio, que vendrá dado por:

$$(2) \quad \text{tg} \alpha_{eq} = \frac{j d D G}{\pi^2 K_1} \text{ por encima del valor crítico de } l_1$$

$$l_1 \text{tg} \alpha_{eq} = \frac{j d A_d G}{\pi E K_1} \text{ por debajo del valor crítico de } l_1$$

El ángulo de equilibrio es independiente del ángulo que inicialmente forme el eje del esporangióforo con la luz; asimismo es independiente de K. El ángulo de equilibrio es independiente de la intensidad por encima del valor crítico de ésta y depende de ella por debajo de ese valor. Las tres propiedades del ángulo de equilibrio se deducen de la ecuación (2) con facilidad.

3) Duración del giro; cuya relación con el ángulo recorrido por el esporangióforo puede predecirse a partir de las ecuaciones anteriores. En efecto,

$$d\alpha/dt = \omega_{FG}, \text{ luego:}$$

$$dt = \frac{d\alpha}{K(P \text{sen} \alpha - G \cos \alpha)} \text{ por encima del valor crítico de } l_1$$

$$dt = \frac{d\alpha}{K(Q l_1 \text{sen} \alpha - G \cos \alpha)} \text{ por debajo del valor crítico de } l_1$$

donde P y Q son respectivamente los coeficientes que multiplican a sen en la ecuación (1).

Integrando la ecuación anterior entre 0 y t, resulta:

$$(3) \quad t = \frac{1}{K \sqrt{Z^2 + G^2}} \ln \frac{Z - \sqrt{Z^2 + G^2} + G \text{tg} \frac{\alpha}{2}}{Z + \sqrt{Z^2 + G^2} + G \text{tg} \frac{\alpha}{2}} + H$$

donde Z es P si estamos por debajo del valor crítico de l_1 y es $Q l_1$ por encima de ese valor crítico. Para obtener H basta con resolver la ecuación anterior para las condiciones iniciales, es decir para $\alpha = 90^\circ$ y $t = 0$.

Se comprueba fácilmente que el tiempo que tarda el esporangióforo en llegar al ángulo de equilibrio es infinito, es decir durante el tropismo el esporangióforo tiende asintóticamente al equilibrio.

4) Desviación lateral originada por la latencia de la respuesta de crecimiento. Si la latencia no existiera, la distribución de respuestas de crecimiento en la cara distal del esporangióforo paralelo a la luz y, en consecuencia, el plano de giro sería paralelo al de la luz. La existencia de una latencia en la expresión de la respuesta de crecimiento determina que el punto de máxima velocidad distal se halle desplazado a favor de las agujas del reloj el mismo ángulo que el receptor haya recorrido en el tiempo de latencia. De ahí que exista un ángulo de desviación lateral a favor de las agujas del reloj de unos 12° si la intensidad incidente es mayor de su valor crítico y que aumenta, como lo hace la latencia, al bajar la intensidad por debajo de su valor crítico, llegando a ser de unos 90° en las proximidades del umbral fotogeotrópico.

Simulación del fototropismo

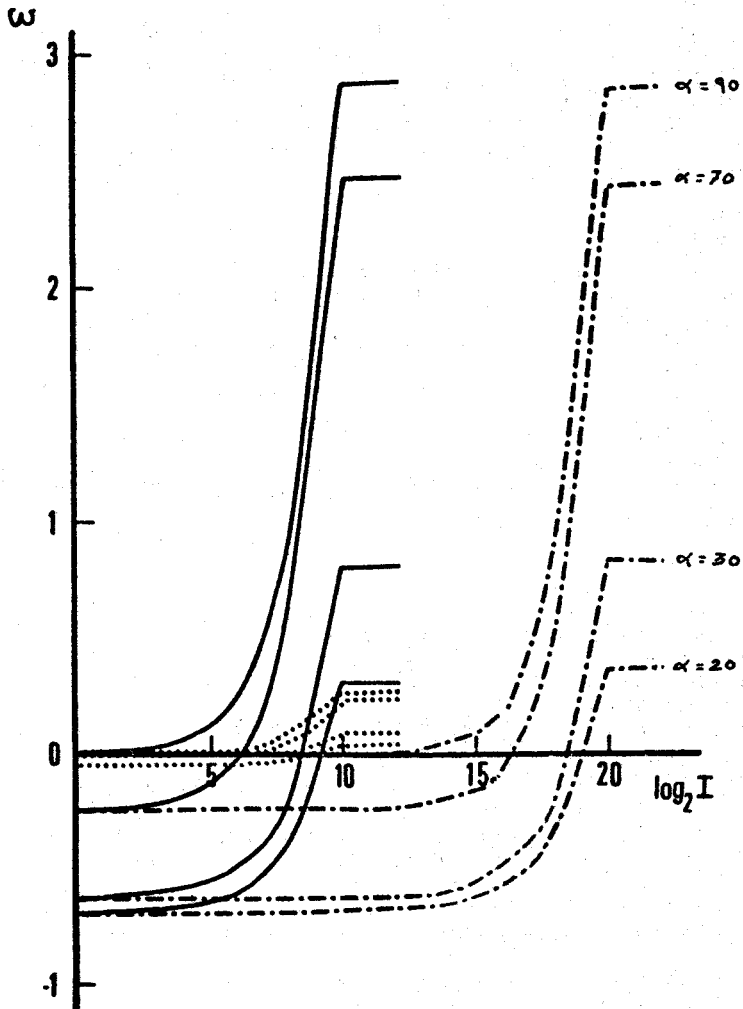
Las constantes que aparecen en las ecuaciones anteriores pueden ser calculadas "grosso modo" empleando datos experimentales. Nosotros hemos considerado el ángulo de equilibrio igual a 14° y la velocidad angular cuando el ángulo de incidencia es de 90° y la intensidad superior al valor crítico la hemos igualado a $3^\circ/\text{minuto}$; hemos considerado el umbral fotogeotrópico igual a 0 unidades logarítmicas y el mínimo del valor de adaptación, A_d , 40 veces superior al umbral fototrópico, es decir, igual al logaritmo en base 2 de 40. El producto $R\theta$ lo hemos igualado a 0.2 a partir de datos sobre la densidad óptica de los mutantes albinos (42). Hemos considerado igual a 1 el valor de la constante E. La velocidad angular geotrópica en la oscuridad, cuando el esporangióforo está horizontal, la hemos igualado a $0.72^\circ/\text{minuto}$.

Lo importante no es que los valores que hemos asignado a las constantes sean absolutamente exactos, sino suficientemente próximos a la realidad, para que los valores calculados con las ecuaciones (1), (2) y (3), nos sirvan de ejemplo del comportamiento real de *Phycomyces*. No se trata tanto de predecir exactamente el comportamiento de *Phycomyces* como de ver la forma de ese comportamiento y las variables más importantes que lo determinan.

Con los valores descritos y con ayuda de un ordenador UNIVAC 1108, del Centro de Cálculo de esta Universidad, hemos tabulado las ecuaciones anteriores, obteniendo una simulación matemática del comportamiento de *Phycomyces*.

La figura 24 representa la velocidad angular del esporangióforo en función del $\log_2 I$ y del ángulo de incidencia de la luz. Como se observó, la velocidad angular es tanto mayor cuanto mayor sea el ángulo de incidencia. Es independiente de la intensidad por encima del valor crítico de ésta y disminuye con ella por debajo de dicho valor. Para intensidades menores que el valor crítico, la velocidad angular puede ser negativa si el ángulo de incidencia de la luz es pequeño, lo que quiere decir que

Figura 24. Relación entre la velocidad angular del esporangióforo y la intensidad luminosa. Se representan los valores correspondientes a distintos ángulos de incidencia de la luz (90° , 70° , 30° , 20°), siendo, en cada estirpe (silvestre en línea continua, mutante de clase 2 con puntos y mutante de clase 1 con puntos y rayas) las velocidades mayores las correspondientes a ángulos de incidencia mayores.



el esporangióforo tiende al ángulo de equilibrio tanto si, a esa intensidad, el ángulo de equilibrio es mayor que el de incidencia inicial como si es menor que éste (es decir, tanto si el esporangióforo debe aproximarse a la horizontal a partir de la posición inicial, como si debe aproximarse a la vertical para llegar al equilibrio).

Todas esas conclusiones que el modelo predice se verifican experimentalmente.

La figura 25 muestra la dependencia entre el ángulo de equilibrio y $\log_2 I$. Como se ve, dicho ángulo es independiente de la intensidad por encima del valor crítico y es tanto más próximo a la vertical cuanto menor es la intensidad por debajo del valor crítico. El umbral fotogeotrópico corresponde al valor de la abscisa que corta a la gráfica.

La figura 26 muestra el ángulo alcanzado por el esporangióforo a diferentes tiempos para varias intensidades. El giro es tanto más lento cuanto menor es la intensidad y además se para antes. Ya hemos dicho que el giro es independiente de la intensidad por encima del valor crítico. También las conclusiones de estos dos últimos párrafos son ciertas en la realidad.

MUTANTES

Suponiendo que la mutación provoca una reducción de la eficacia o concentración de alguna de las sustancias implicadas en el comportamiento, el modelo permite predecir la existencia y el comportamiento de los siguientes tipos de mutantes:

Mutantes con E alterado

Serían mutantes alterados en la eficacia de la transducción fototrópica. Se definirían como aquellos que tienen una E menor que la del silvestre:

$$E' = E/h$$

Su comportamiento se obtendría reemplazando E por E' en las ecuaciones (1), (2) y (3), lo que conduciría a un comportamiento como el descrito en las figuras 24, 25 y 26. El mecanismo de adaptación no estaría alterado. La relación entre velocidad angular y $\log_2 I$ sería como la del silvestre pero trasladada a una intensidad h veces mayor. El ángulo de equilibrio fotogeotrópico sería el mismo que el del silvestre a la misma intensidad si nos encontramos por encima del valor crítico del mutante y equivalente al que tendría el silvestre a una intensidad h veces menor si estamos por debajo del valor crítico del mutante. En consecuencia, el umbral fotogeotrópico sería h veces menor en el silvestre que en el mutante ($\log_2 h$ unidades de diferencia entre el del silvestre y el del mutante).

El mutante no vería mejor que el silvestre a intensidades muy altas ya que el blanqueo del pigmento se debe

Figura 25. Relación entre ángulo de equilibrio e intensidad luminosa en el silvestre (círculos blancos) y un mutante con E o con A_d alterado, según las predicciones del modelo.

Figura 31. Relación entre el ángulo recorrido y la proporción nuclear de un heterocarionte entre el silvestre y un mutante con K alterada, cuyo esporangióforo fué iluminado durante 4000 s. con una intensidad de 17 unidades.

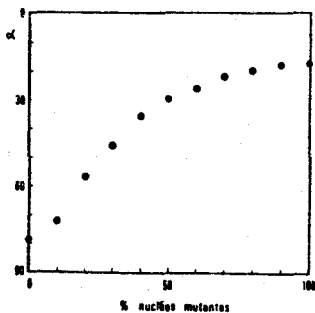
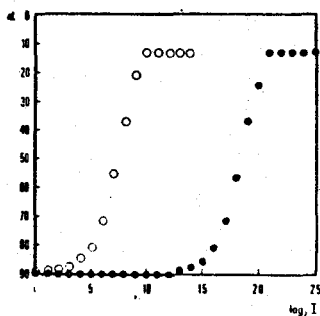
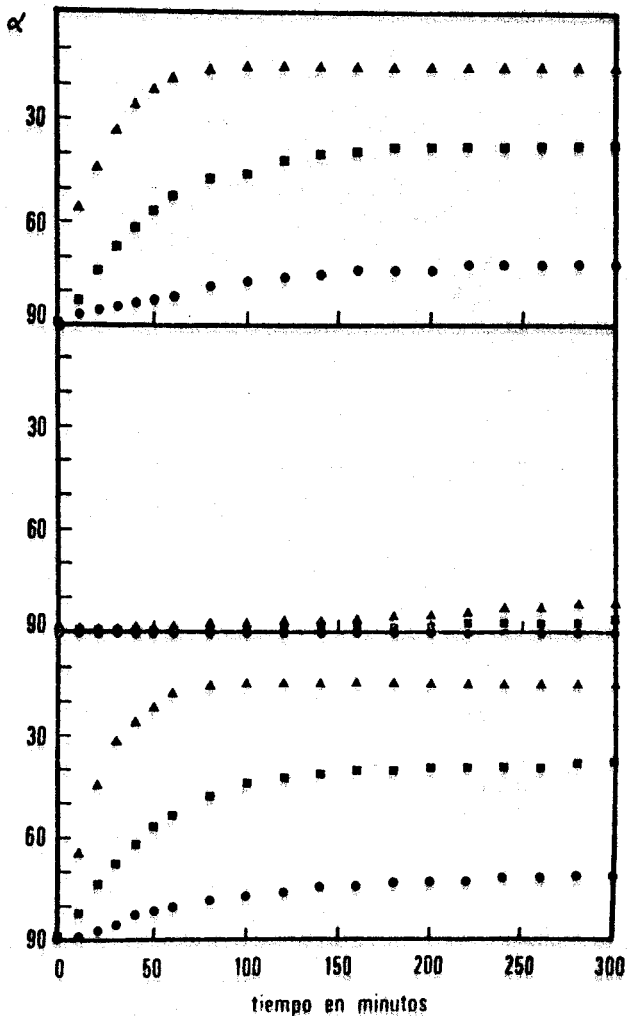


Figura 26. Relación entre el ángulo de desviación a la horizontal y el tiempo de iluminación de un esporangióforo del tipo silvestre (arriba), de un mutante con K alterada (en medio) y de un mutante con E o A_d alterada (abajo). Los dos primeros sometidos a una intensidad de 10 (triángulos), 8 (cuadrados) y 6 (círculos) unidades y el tercero respectivamente a 20, 18 y 16 unidades.



seguir produciendo con la misma eficacia que en el silvestre.

En resumen, estos mutantes se comportarían igual que el silvestre a una intensidad h veces menor, es decir como los mutantes de clase 1 hasta el momento aislados.

Mutantes con A_d alterado

Serían mutantes alterados en el mecanismo de adaptación. Si suponemos que el umbral de adaptación es inversamente proporcional a la concentración de cierta sustancia, estos mutantes tendrían una concentración h veces menor de esa sustancia, y, por tanto:

$$A_d = A'_d/h$$

Su comportamiento se obtendría reemplazando A_d por A'_d en las ecuaciones (1), (2) y (3). Como en estas ecuaciones un aumento de A_d equivale a una disminución de E , estos mutantes se comportarían igual que los anteriores, es decir, como mutantes de clase 1.

No se sabe si los mutantes de clase 1 aislados hasta ahora presentan modificación en E o en A_d , pero los mutantes de esta clase son los más prometedores para identificar mutantes de la adaptación.

Mutantes con K alterado

Estos mutantes estarían alterados en el mecanismo efector y , en consecuencia, y a diferencia de los anteriores, tendrían todos sus tropismos anormales.

Tendrían una actividad efectora menor que la del silvestre:

$$K' = K/h$$

Los estímulos subjetivos y los niveles de adaptación serían los mismos que los del silvestre en las mismas circunstancias, pero el tamaño de la respuesta sería h veces menor que en el silvestre, y también, por tanto, su velocidad trópica. Se trata de mutantes lentos.

Como se observa en las figuras 24, 25 y 26, en estos mutantes girarían más lentamente que el silvestre en las mismas condiciones y , aunque sus ángulos de equilibrio fotogeotrópico serían iguales que los del silvestre, tardarían un tiempo h veces mayor, de ahí que en el tiempo normal que dura un experimento de fototropismo la relación entre ángulo alcanzado y $\log_2 t$ estaría distorsionada.

Estos mutantes se comportarían como los de clase 2.

COMPLEMENTACION CUANTITATIVA

Dada cualquier hipótesis sobre el modo de interacción de los productos génicos en un heterocarionte se pueden predecir los resultados de la complementación cuantitativa.

A la vista de nuestros resultados experimentales, adoptamos la hipótesis sencilla de que los productos de

los genes identificados hasta ahora actúan independientemente. En particular, excluimos la existencia de agregados moleculares con actividad distinta de la mera suma de las actividades de sus componentes.

Heterocarionte con núcleos normales y mutantes con E alterado

El heterocarionte se comportaría como un mutante de clase 1 cuya eficacia fototrópica vendría dada por:

$$E(p) = pE + (1-p)E/h$$

siendo p la proporción de núcleos silvestres y h el factor de reducción de la actividad del mutante, ya que suponemos que una fracción p de los productos génicos se comportan normalmente y una fracción 1-p como el mutante.

El heterocarionte tendría inalterada la adaptación y la efección de la respuesta pero alcanzaría la intensidad crítica a una intensidad incidente $h/p(h-1)+1$ veces mayor que en el silvestre.

La velocidad angular del heterocarionte sería la misma que la del silvestre a una intensidad tantas veces menor como valga la expresión anterior.

La relación entre ángulo de equilibrio y $\log_2 I$ equivaldría a una traslación de la del silvestre paralelamente al eje de abscisas de $\log_2 (h/p(h-1)+1)$ unidades.

En consecuencia, el umbral fotogeotrópico sufriría el mismo desplazamiento hacia la zona de mayores intensidades. Las 27 y 29 representan los resultados de la simulación de una complementación cuantitativa entre el silvestre y un mutante con una E mil veces menor que la del silvestre. La pendiente fotogeotrópica no está alterada y el umbral del mutante es muy recesivo frente al del silvestre. Ambas cosas son ciertas en la práctica.

Heterocarionte con núcleos normales y mutantes con A_d alterado

Llamando C a la concentración de la sustancia hipotética, que determina el mínimo del nivel de adaptación:

$$C(p) = pC + (1-p)C/h \text{ de donde,}$$

$$A(p) = \frac{1}{\frac{p}{A_d} + \frac{1-p}{hA_d}}, \text{ es decir,}$$

$$A(p) = \frac{h}{p(h-1)+1} A_d$$

El comportamiento del heterocarionte sería exactamente igual que el anterior.

En la figura 29 se representa la complementación cuantitativa para el umbral de este heterocarionte suponiendo que la idea anterior no fuera cierta y que, simple

Figura 27. Relación entre el ángulo alcanzado en cinco horas por un esporangióforo y la intensidad luminosa. El esporangióforo es de un heterocarionte entre el silvestre y un mutante con E o A_d alterado. Se presentan los valores correspondientes a distintas proporciones de núcleos silvestres.

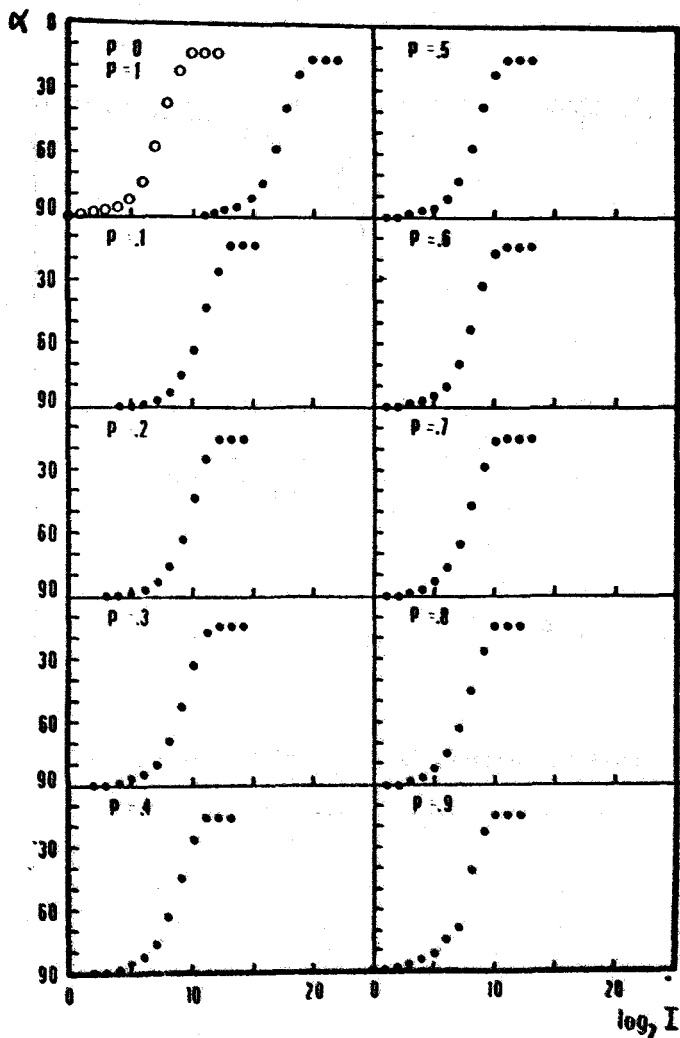
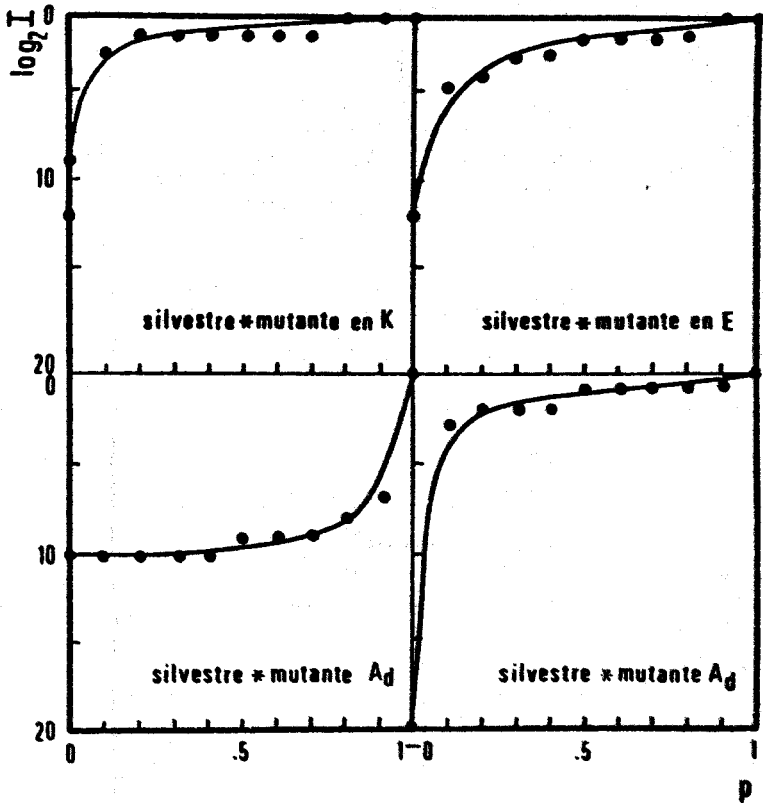


Figura 29. Relación entre el umbral fototrópico y la proporción de núcleos silvestres en los heterocariontes nombrados en la figura, según las predicciones del modelo.



mente, el mínimo del nivel de adaptación del heterocarionte viniera dado por:

$$A_d(p) = pA_d + (1-p)hA_d$$

donde p es la proporción de núcleos silvestres.

La dominancia del umbral mutante respecto del silvestre que resulta de esta segunda hipótesis no se ha encontrado experimentalmente en ninguno de los mutantes de $c\bar{1}a$ se estudiados, por lo que consideramos más verosímil la primera idea.

Heterocarionte con núcleos normales y mutantes con K alterado

El heterocarionte se comportaría como un mutante de clase 2, cuya K vendría dada por:

$$K(p) = pK + (1-p)K/h$$

Ni la recepción del estímulo luminoso ni el mecanismo de adaptación se hallarían alterados en el heterocarionte, pero el tamaño de su respuesta sería:

$$\frac{h}{p(h-1) + 1}$$

veces menor que el del silvestre en las mismas circunstancias. En consecuencia, la velocidad trópica del heterocarionte se hallaría reducida por el mismo factor respecto a la del silvestre.

Los valores de equilibrio fotogeotrópico no estarían alterados en ninguno de los heterocariontes, pero a determinado tiempo alcanzarían tan sólo un ángulo equivalente al que hubiera alcanzado el silvestre en un tiempo

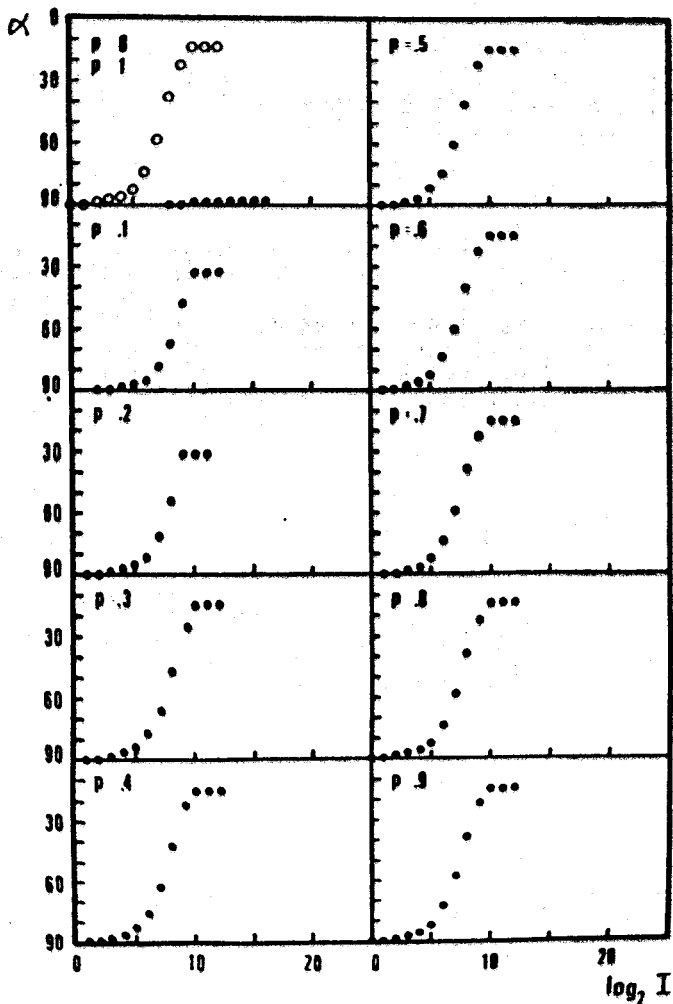
$$\frac{h}{p(h-1) + 1}$$

veces menor. Por eso, la relación entre el ángulo alcanzado y $\log_2 I$ estaría distorsionada, aunque sería tanto más parecida a la del silvestre cuanto mayor fuera en ese heterocarionte la proporción de núcleos silvestres.

El umbral fotogeotrópico del heterocarionte sería a casi todos los p muy parecido al del silvestre, es decir el umbral del mutante se comportaría como un carácter muy recesivo. Estas predicciones se reflejan en las figuras 28 y 29.

Un carácter menos recesivo sería el ángulo recorrido a suficiente intensidad luminosa en un cierto tiempo, con tal de que la intensidad luminosa fuera al menos 1000 veces más grande que el umbral. La complementación cuantitativa de este carácter se representa en la figura 31, que es interesante comparar con la figura 17 que representa la complementación cuantitativa de ese carácter con mutantes reales. Se observa, de nuevo, una buena concor-

Figura 28. Relación entre el ángulo alcanzado en cinco horas por un esporangióforo y la intensidad luminosa. El esporangióforo pertenece a un heterocarionte entre el tipo silvestre y un mutante con K alterada. Figuran los valores correspondientes a distintas proporciones de núcleos silvestres.



dancia entre los valores predichos por el modelo y los obtenidos experimentalmente.

Heterocarionte con núcleos de diferentes mutantes con E alterado

La actividad E es el resultado de la acción consecutiva de un número indeterminado, aunque presumiblemente pequeño, de transductores específicos del canal fototrópico. En lenguaje matemático:

$$E = \sum E_i$$

donde E_i es la actividad del transductor i -ésimo.

Los mutantes que forman parte del heterocarionte estarían afectados en dos transductores diferentes, digamos i y j .

Para hallar la actividad del heterocarionte podemos suponer, en primer lugar, que los transductores forman agregados y que las moléculas mutantes, si bien han perdido actividad, conservan inalterada su capacidad de entrar a formar parte de dichos agregados. En ese caso, en el heterocarionte se darían todos los tipos posibles de interacción entre los transductores presentes, ocurriendo la siguiente situación:

Interacción	Probabilidad	Actividad
$E_i E_j'$	$p(1-p)$	E/hh'
$E_i' E_j$	p^2	E/h'
$E_i' E_j'$	$(1-p)^2$	E/h
$E_i E_i'$	$p(1-p)$	E

donde p es la proporción de núcleos con actividad $E_j' = E_j/h'$ y $1-p$ la de núcleos con actividad $E_i' = E_i/h$.

Como h y h' suelen ser mayores que 1000, la actividad del heterocarionte sería:

$$E(p) = p(1-p)E$$

Al mismo resultado llegaríamos suponiendo que los transductores actúan como sustancias difusibles, de modo que el heterocarionte posee 2 actividades, cada una igual a:

$$E_i(p) = pE_i + (1-p)E_i/h$$

$$E_j(p) = (1-p)E_j + pE_j/h$$

que al actuar conjuntamente darían:

$$E(p) = E_i(p) \times E_j(p) = p(1-p)E$$

En ambos casos, relacionados respectivamente con la imposibilidad y la facilidad de difundir que los productos génicos puedan presentar, el heterocarionte se comportaría como un mutante de clase 1, cuya actividad vendría dada por la ecuación anterior, de la cual se deduce que la complementación sería máxima para $p = 1/2$, siendo para ese p las intensidades críticas y umbral tan sólo 4 veces mayores que las del silvestre. La complementación, por tanto, no sería total pero para p intermedios el comportamiento del heterocarionte sería mucho más parecido al del silvestre que al de cualquiera de los dos mutantes.

En la figura 30 se exponen los resultados de la simulación de la complementación cuantitativa para el umbral de este heterocarionte.

Heterocarionte con núcleos de diferentes mutantes con A_d alterado

De lo que dijimos al hablar de los mutantes con A_d alterado se deduce que los heterocariontes entre dos mutantes con A_d alterado o entre un mutante con A_d alterado y otro con E alterado se comportarían como el heterocarionte recién estudiado.

Heterocarionte con núcleos de mutante con E alterado y con núcleos de mutante con K alterado

Razonando como antes llegaríamos a la conclusión de que en el heterocarionte:

$$E(p) = pE + (1-p)E/h$$

$$K(p) = (1-p)K + pK/h'$$

donde p es la proporción de núcleos con E alterado.

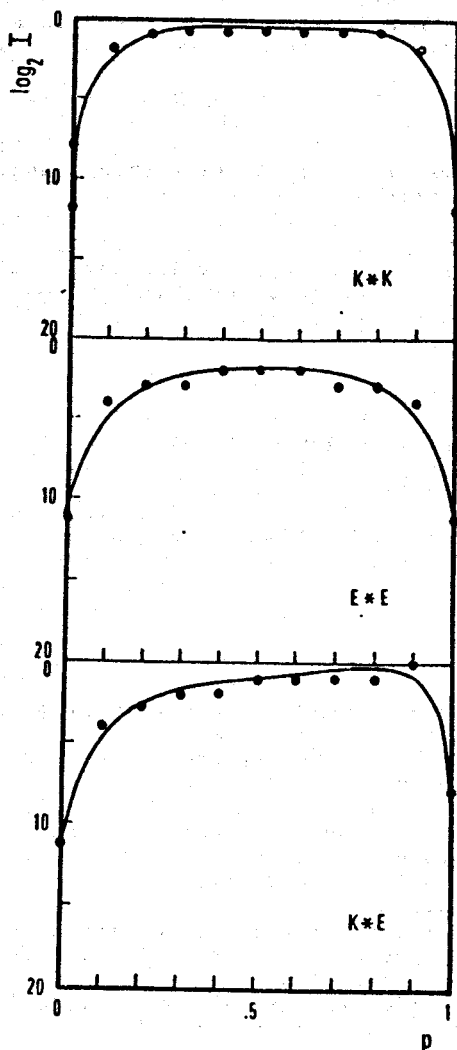
El heterocarionte no se comportaría como ninguna de las dos clases de mutantes aislados ni como el silvestre. Tendría la eficacia de la recepción del estímulo luminoso y la proporcionalidad entre estímulo subjetivo y tamaño de la respuesta alteradas. En consecuencia, tendría alterados tanto los valores de equilibrio fotogeotrópico como el tiempo que tardaría en alcanzarlos.

La figura 30 muestra los resultados de la simulación de la complementación cuantitativa para el umbral de este heterocarionte. La complementación es máxima, aunque no total, para los p intermedios, a los cuales el heterocarionte se comporta muy parecido al silvestre.

Heterocarionte con núcleos de diferentes mutantes con K alterado

Siguiendo cualquiera de las dos líneas de razonamien-

Figura 30. Relación entre la proporción nuclear y el umbral fotogeotrópico en heterocariontes con núcleos de mutantes alterados en K, (arriba), con núcleos de diferentes mutantes alterados en E (en medio), y con núcleos de un mutante alterado en E y otro en K (abajo), según las predicciones del modelo.



to expuestas al hablar de los heterocariontes entre diferentes mutantes con E alterado, llegaríamos a la conclusión de que en este tipo de heterocariontes:

$$K(p) = p(1-p)K$$

a condición de que la reducción de actividad en los mutantes que componen el heterocarionte sea suficientemente grande.

El heterocarionte se comportaría como un mutante de clase 2 cuya K vendría dada por la ecuación anterior.

Tendría normal la recepción de la luz y la adaptación a ella pero la proporcionalidad entre estímulo subjetivo y respuesta, y con ella la velocidad angular, estarían alteradas, por lo que el tiempo que el heterocarionte tardaría en alcanzar los valores de equilibrio fotogeotrópico sería mayor que en el silvestre, aunque los valores de equilibrio permanecerían sin cambiar.

La complementación máxima se daría en heterocariontes con un p de 0.5, como se ve en la figura 30. Un heterocarionte con ese p tendría una velocidad angular cuatro veces menor que la del silvestre, suficiente, por tanto, para alcanzar los valores de equilibrio en el tiempo normal de un experimento de fototropismo.

RESUMEN

El modelo postula que el fototropismo es un sistema con dos variables de entrada, intensidad luminosa y ángulo de incidencia, una variable interna, el nivel de adaptación, y una variable de salida, la velocidad angular. El nivel de adaptación presenta un mínimo que divide el rango de intensidades incidentes en dos: por encima de cierta intensidad crítica y por debajo de ella.

Esta intensidad crítica se alcanza cuando el nivel de adaptación en la zona iluminada por dispersión es igual al mínimo del nivel de adaptación.

Operativamente, podemos sustituir el mínimo del nivel de adaptación que no es directamente medible por una intensidad crítica que sí lo es.

La ley que ligaría los valores de entrada con los de salida sería entonces la ecuación (1) del modelo, en la que se observa que la variable de salida, la velocidad angular, depende en todos los casos de una de las de entrada, el ángulo de incidencia, y sólo en algunos casos, por debajo de la intensidad crítica, de la otra, la intensidad incidente.

Los parámetros habitualmente medidos al estudiar el fototropismo se pueden expresar en función de las variables del modelo. Así, el ángulo de equilibrio corresponde al ángulo de incidencia para el que la velocidad angular se anula (por tanto independiente de la intensidad por encima de la crítica y función de ella por debajo).

El umbral fototrópico se alcanza cuando la intensidad en la banda brillante es igual al mínimo del nivel de

adaptación; en la práctica es una intensidad 2^9 veces menor que la crítica.

El modelo propone que hay básicamente dos clases de mutantes si atendemos al fenotipo: los alterados en la variable de salida (velocidad angular) y los alterados en la variable interna (operativamente, en la intensidad crítica).

La base fisiológica que estaría alterada en los primeros sería el aparato efector. Tendrían los mismos valores de equilibrio que el silvestre pero los alcanzarían más lentamente.

Los segundos estarían afectados bien directamente en el sistema de adaptación bien en otro que desemboca en él: el sistema de recepción y transducción fotospecífico. Tendrían alterados los valores de equilibrio.

El modelo predice, finalmente, el comportamiento de los heterocariontes entre esos mutantes y el silvestre o entre sí. Lo esencial en todos los casos es la recesividad del umbral del mutante.

Para predecir el comportamiento de nuevos mutantes bastaría con variar cualquiera de las otras constantes que figuran en las ecuaciones (1), (2) y (3). Así podría mos predecir el comportamiento de mutantes ageotrópicos ($G = 0$), de adaptación lenta ($b' = hb$) etc.

DISCUSION

La técnica de la complementación cuantitativa:

Puesto que buena parte de nuestro trabajo experimental se basa en el empleo de esta técnica, conviene analizarla en primer lugar.

Los datos obtenidos por simulación indican que el fundamento matemático (50) de la técnica es correcto y que 800 es un número de tubitos suficiente para reducir a un límite aceptable las diferencias entre la estimación del valor del p y el valor real. Los resultados más fiables se obtienen cuando la media de esporas por tubito se acerca a 1. El fundamento genético ha sido estudiado por Cerdá Olmedo y Heisenberg (50) con resultados satisfactorios, por lo que en conjunto la técnica parece sólidamente establecida.

El análisis de las proporciones nucleares está diseñado para que no se vea afectado por el vigor híbrido, es decir, el crecimiento más rápido de los heterocariontes que de los homocariontes. Si hubiera diferencias en la velocidad de crecimiento en otro sentido, habría que modificar la forma de clasificar los tubitos para evitar ocultación de los micelios más lentos por los más rápidos. En el caso de los heterocariontes aquí empleados se observa que crecen igual o más rápidamente que los homocariontes que los componen.

La determinación sería ambigua si, por alguna razón, ambas clases de núcleos tendiesen a separarse en el micelio formando zonas en que predominase uno u otro tipo. En nuestro caso, este fenómeno hubiera conducido a la formación en el micelio de sectores de diferentes colores, por acumular diferentes carotenoides, lo que no tuvimos ocasión de observar. Además, las determinaciones de proporciones nucleares a partir de esporas de diferentes esporangióforos dieron todas el mismo valor (50).

Sin embargo, se observaron sectores al estudiar la complementación cuantitativa entre las estirpes C9 y C142, de diferente sexo, por lo que los datos preliminares que obtuvimos sobre el comportamiento de sus heterocariontes, si bien no contradicen los obtenidos con estirpes del mismo sexo, no pueden ser considerados definitivos.

Los resultados de la complementación cuantitativa entre auxótrofo y protótrofo pueden explicarse admitiendo que los heterocariontes con un 15% o más de núcleos protótrofos crecen igual de bien que el protótrofo. Tal saturación del efecto del gen normal indicaría que el protótrofo, en nuestras condiciones experimentales, tiene una actividad génica seis veces más grande que la necesaria para su crecimiento óptimo. Para nuestro objeto, lo importante es que no aparecen dificultades experimentales imprevistas al aplicar la técnica de la complementación cuantitativa.

Mutantes de clase 1: Las mediciones del ángulo tanto a diferentes tiempos como tras cinco horas de experimentación, trabajando con un amplio rango de intensidades, nos llevan a la conclusión de que estos mutantes

se comportan como lo haría el tipo silvestre a una intensidad cierto número de veces más pequeña. En efecto, la relación entre ángulo α y tiempo en estos mutantes y en el silvestre es la misma si las intensidades se miden en relación a sus umbrales respectivos.

Los experimentos de complementación cuantitativa refuerzan aún más la similitud de comportamiento de los tres grupos de complementación, A, B y C que componen la clase 1 de mutantes: en los tres la relación entre el ángulo α y $\log_2 I$ en el heterocarionte viene dada por una traslación de la del silvestre y en los tres el umbral del mutante es fuertemente recesivo. No parece haber interacción entre los productos génicos silvestre y mutante, es decir, la capacidad de responder a la luz de cada heterocarionte es directamente proporcional a su contenido en núcleos silvestres. Este sorprendente resultado puede explicarse admitiendo que los genes mutados intervienen en el comportamiento a través de la acción de sustancias difusibles, que serían sus productos génicos o resultado de la acción de sus productos génicos. Tal capacidad de difusión de las sustancias implicadas en el comportamiento de *Phycomyces* no quiere decir necesariamente que no existan además estructuras, con elementos no difusibles, relacionadas con el comportamiento, pero aún no tendríamos mutantes en ellas.

Hemos confirmado que los mutantes de clase 1 tienen normales los otros sentidos (9), por lo que deben tener un efector trópico normal. Sus alteraciones deben afectar a transductores específicos del canal fototrópico o al aparato de adaptación. A parecidas conclusiones sobre el sitio de alteración de los mutantes se llega a través de otras observaciones (9,7).

Mutantes de clase 2: Estos mutantes giran más lentamente que el tipo silvestre y de ahí posiblemente la distorsión en la relación entre ángulo α y $\log_2 I$. Seno cillamente, no serían valores de equilibrio los medidos en estos experimentos. El hecho de que también tengan alterados los otros tropismos indica que posiblemente su defecto radique en el efector o en transductores comunes a todos los sentidos (9).

En estos mutantes el umbral se comporta como un carácter muy recesivo, lo que se explica pensando que la complementación, en este caso, afectaría a la velocidad angular y dada la rapidez de giro del silvestre en relación con el mutante, la velocidad angular del heterocarionte sería mucho más grande que la del mutante y bastaría para volver a poner de manifiesto los valores de equilibrio en los experimentos de larga duración. Estos valores de equilibrio, según numerosos indicios, serían los mismos en estos mutantes, en el silvestre y en sus heterocariontes (9).

La representación del ángulo alcanzado en cierto tiempo a una intensidad determinada no es tan recesiva como el umbral. Esta medida tiene más sentido biológico dada las características de giro lento de estos mutantes.

El hecho de que no sea tan recesiva quizá se relacione con la presumible complejidad de interacción entre los productos génicos silvestre y mutante relacionados con el aparato efector, dada la posibilidad de que no sean productos difusibles, sino un complejo molecular grande relacionado con el crecimiento de la pared celular (53) (54).

Modelo: Nuestro modelo permite explicar cualitativamente el comportamiento del silvestre y de las tres clases fenotípicas de mutantes. Las predicciones del modelo concuerdan tanto con nuestros resultados experimentales (relación entre ángulo α y $\log 2t$ o el tiempo transcurrido) como con los resultados de otros experimentos descritos en la Introducción (37).

Según el modelo, los parámetros claves del comportamiento en el equilibrio fotogeotrópico son la intensidad crítica, por encima de la cual el comportamiento es independiente de la intensidad luminosa, y el ángulo de equilibrio, que se obtendría mediante un compromiso entre foto y geotropismo.

El único parámetro dinámico que el modelo considera de interés es la velocidad angular, es decir, la diferencia de velocidades entre las dos mitades del esporangióforo (7). Esta variable de salida depende únicamente de dos características internas (una variable fisiológica: el nivel de adaptación, y una constante que relaciona estímulo subjetivo con respuesta).

El modelo permite predecir la existencia de mutantes precisamente con las características de los encontrados: mutantes alterados en la eficacia de la transducción fototrópica o en el mecanismo de adaptación cuyo comportamiento correspondería al de los mutantes de clase 1, de los que sabemos que están alterados en transductores específicos del canal luminoso y mutantes alterados en el efector o en transductores posteriores a la integración de los estímulos subjetivos cuyo comportamiento correspondería al de los mutantes de clase 2, de los que sospechamos que efectivamente están alterados donde el modelo predice (9).

El modelo explica el comportamiento de esos mutantes en las complementaciones cuantitativas frente al silvestre, concretamente la recesividad del umbral en todos los casos. De las hipótesis adicionales introducidas para explicar la complementación cuantitativa la más dudosa es la que se refiere al significado del nivel de adaptación A, considerado como índice de la concentración de determinado producto.

No existe base experimental para tal hipótesis, pero está de acuerdo con la reciente sugerencia de Lipson (56) de que la adaptación puede ser un proceso puramente fotoquímico que depende de la velocidad de regeneración del pigmento visual.

Esta idea permite asignar una interpretación molecular concreta a los mutantes de tipo 1. Los habría de dos clases, con una concentración reducida de pigmento

normal, y con una concentración normal de pigmento anormal, en los que la fracción de pigmento inactivo sería mayor que la del silvestre a la misma intensidad (alterados en la adaptación). Además, permite concretar la deficiencia que sufriría una de las clases mutantes que nuestro modelo predice pero que no hemos analizado en detalle: los mutantes que adaptarían más lentamente. Estos mutantes tendrían una constante de tiempo de adaptación mayor que la del silvestre, a causa de su menor velocidad de regeneración del pigmento inactivo.

Por su parte, los mutantes de clase 2 posiblemente tengan como defecto molecular una menor actividad o concentración de la enzima responsable de las diferencias de crecimiento (quitinasa o sintetasa de la quitina). Disponemos, pues, de un conjunto de hipótesis de trabajo para abordar a nivel molecular el comportamiento mediante estudios bioquímicos en los mutantes que lo tienen alterado.

Las predicciones que el modelo permite efectuar sobre los resultados de las complementaciones cuantitativas entre mutantes del comportamiento, de ser ciertas en la realidad, asentarían sobre una sólida base los resultados de complementación cualitativa entre esos mutantes obtenidos por Ootaki (61), puesto que según nuestras predicciones, el comportamiento del heterocariote, caso de que fuera entre dos estirpes afectadas en diferentes cistrones, sería netamente distinguible del de ambos homocariotes para todas las proporciones nucleares encontradas en la práctica.

En resumen, el modelo nos parece que tiene como rasgos positivos el explicar, al menos cualitativamente, el comportamiento del silvestre y de los mutantes aislados y el basarse en hechos conocidos y explicar comportamientos aparentemente complicados a base de hipótesis sencillas, en especial, no necesita postular comportamientos no lineales, al menos lejos de la saturación.

Junto a esta ausencia de transductores no lineales el modelo es de una extrema sencillez en cuanto a la integración de estímulos subjetivos se refiere; postula simplemente la aditividad algebraica de los diferentes estímulos subjetivos y hace innecesaria, por tanto, un orgánulo especial encargada de la integración. Posiblemente los diferentes sentidos interaccionen directamente durante la ejecución de la respuesta. En nuestro modelo, el nivel de adaptación A juega un papel esencial puesto que al ser el estímulo subjetivo función de

$\frac{1-A}{A}$ y no de I quedan explicadas unitariamente la transitoriedad de la respuesta y la dependencia del tamaño de la respuesta no de I sino de $\log I$, y no necesita postular un transductor logarítmico. Además, la existencia de un mínimo del nivel de adaptación permite explicar sin complicaciones tres hechos experimentales bien conocidos e importantes: la existencia de dos rangos de

intensidades eficaces, en los que Phycomyces se comporta de muy diferente manera; el hecho de que la independencia del comportamiento respecto de la intensidad luminosa en el rango "normal" no se deba a saturación del sistema y la existencia de un umbral fototrópico a una intensidad no nula.

Una consecuencia estimulante del modelo es que el número de moléculas directamente relacionadas con el fototropismo no es necesariamente grande por lo que la esperanza de poder realizar una disección genética y molecular completa del sistema se ve reforzada.

Como rasgos negativos, señalaríamos tres: en primer lugar la excesiva simplificación que hace de la óptica del esporangióforo, simplificación indispensable dada la extrema complejidad de la situación real (51), pero que con toda seguridad es inexacta. Sin embargo, no es probable que afecte de modo importante a la validez del modelo. Por ejemplo, la variación en la cantidad de carotenoides con la consiguiente variación de densidad óptica no parece afectar de modo importante al comportamiento de las diferentes estirpes estudiadas.

En segundo lugar y ésta puede ser una pega más seria, también es excesivamente sencilla la interpretación que damos de los cambios en la óptica del sistema en función del giro. Es muy probable que para ángulos pequeños entre direcciones de la luz y del esporangióforo las variaciones sean tan importantes que el modelo pierda validez. Esa mayor diferencia entre los datos experimentales y las predicciones para ángulos pequeños es perfectamente observable en las Figuras 4 y 10. En tercer lugar la idea de que el tamaño de la respuesta en la banda brillante está linealmente relacionado con la velocidad de crecimiento en la mitad distal es otra simplificación dudosa y excesiva.

Además de estos rasgos negativos creemos conveniente recalcar que el modelo no explica, ni lo intenta, el fundamento molecular o dinámico de la respuesta de crecimiento, sino que utiliza directamente relaciones cuantitativas descubiertas durante el estudio de la respuesta de crecimiento y las aplica al tropismo (43) (31) (37). Hay numerosas pruebas de que las respuestas de crecimiento y el fototropismo están íntimamente relacionados. Muchas de ellas se exponen en la Introducción. Una prueba importante y reciente es la concordancia entre las alteraciones que los mutantes del comportamiento sufren tanto en la respuesta de crecimiento como en el tropismo. Asimismo las alteraciones en la respuesta de crecimiento de los mutantes concuerdan con la interpretación que de ellos da el modelo: alterados en los transductores específicos y en el efector trópico.

En conjunto, el modelo puede ser considerado como una primera aproximación al fotogeotropismo del silvestre y los mutantes, en especial para ángulos mayores de 25°.

Síntesis de carotenoides: Nuestros resultados confirman los de otros autores respecto al modo cualitativo y cuantitativo de complementación de los mutantes con síntesis de carotenoides alterada en Phycomyces. Concretamente, apoyan los resultados de las complementaciones cuantitativas realizados en este laboratorio (30) de los que nació la hipótesis de que la biosíntesis de β -caroteno a partir de fitoeno en Phycomyces es llevada a cabo por un complejo enzimático que consta de 4 moléculas de una deshidrogenasa y 2 de una ciclasa. Los mutantes carA estarían alterados en un gen regulador, y los mutantes carR estarían alterados en el gen para la ciclasa.

El comportamiento de Phycomyces: perspectivas

para el futuro: Dijimos al comienzo que el interés de Phycomyces reside principalmente en que sirva de modelo sencillo para el estudio a nivel molecular de los problemas del comportamiento. En esa línea lo conseguido hasta el momento es poco, faltando por aclarar la base molecular de este conjunto de hechos bien establecidos a un nivel macroscópico.

Habría que comenzar el análisis de las deficiencias moleculares de los mutantes obtenidos (43) (53), trabajo más propio de bioquímico y biofísico que de genético. Lo que sí pueden aportar los genéticos a este campo de estudio es el aislamiento y caracterización de nuevos tipos de mutantes, para lo que convendría emplear otros mutágenos que no fueran la nitrosoguanidina y otras técnicas de aislamiento; en especial, la búsqueda de mutantes termosensibles del comportamiento sería de sumo interés, no sólo el intrínseco de este tipo de mutantes, sino dada la sospecha de que algunas clases importantes de mutantes previsibles sean letales.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Hemos estudiado el comportamiento de Phycomyces variándonos de mutantes que lo tienen alterado. Hemos confirmado que los mutantes del comportamiento pueden agruparse por su fenotipo en tres clases:

Clase 1-1) Sólo tienen alterado el fototropismo, teniendo los otros tropismos (a la gravedad, y a los objetos cercanos) normales. También tienen alteradas las otras respuestas a la luz (fotoiniciación de esporangióforos y fotoinducción de la síntesis de carotenoides). Se trataría de mutantes alterados en los transductores tempranos del canal fototrópico.

Clase 1-2) Su único tropismo alterado es el fototropismo y además tienen normales las otras respuestas a la luz. Se trataría de mutantes alterados en transductores todavía específicos del fototropismo pero posteriores a efección de las otras respuestas a la luz.

Clase 2) Tienen normales la fotoiniciación y la fotoinducción pero alterados todos los tropismos. Estarían alterados en transductores comunes a todos los tropismos o en el efector trópico.

Mediante experimentos de medición a cortos intervalos de tiempo del ángulo recorrido por un esporangióforo iluminado unilateralmente hemos confirmado que los mutantes de clase 1 (1-1 y 1-2) se comportan como lo haría el silvestre a una intensidad más baja, mientras que los mutantes de tipo 2 son mutantes lentos, que giran más lentamente que el silvestre no importa lo alta que sea la intensidad estimulante. En cambio, los de clase 1, si subimos mucho la intensidad estimulante, llegan a comportarse igual que el silvestre.

Mediante experimentos de medición del ángulo alcanzado tras varias horas de iluminación unilateral, trabajando con un amplio rango de intensidades luminosas, hemos confirmado los resultados del párrafo anterior y otros ya establecidos sobre los cambios que los mutantes manifiestan en estos experimentos, a saber, que los mutantes de clase 1 tienen una relación entre el ángulo y la intensidad equivalente a una traslación de la del silvestre y que los mutantes de clase 2 la tienen distorsionada debido a la lentitud de su giro.

Hemos aislado un mutante albino (por no acumular carotenoides coloreados) a partir de una estirpe perteneciente a cada uno de los cinco grupos de complementación en que se agrupan los mutantes del comportamiento. Hemos logrado heterocariontes entre cada uno de esos dobles mutantes y la estirpe C9, que tiene comportamiento normal y es de color rojo por acumular licopeno. Los heterocariontes son amarillos por complementar las mutaciones que afectan a la síntesis de β -caroteno en sus componentes, carA y carR respectivamente.

Hemos estudiado el comportamiento de los heterocariontes en función de su proporción nuclear, técnica conocida como complementación cuantitativa. En estos estudios hemos mostrado que el umbral del mutante es

recesivo frente al del silvestre en los cinco grupos de complementación y que no parece haber interacciones especiales entre los productos génicos del mutante y del silvestre, lo que sugiere que se trata de sustancias difusibles.

Basándonos en estas y otras observaciones, hemos desarrollado un modelo matemático del comportamiento, que describe el comportamiento del silvestre y predice la existencia de los mutantes aislados y su comportamiento. También predice los resultados de la complementación cuantitativa entre los mutantes y el silvestre y entre cada par de mutantes diferentes. El modelo postula que el comportamiento de Phycomyces es un sistema con dos variables de entrada (la intensidad luminosa y el ángulo de incidencia de la luz), una variable interna (el nivel de adaptación) operativamente sustituible por otra externa (la intensidad crítica) y una variable de salida (la velocidad angular). De esas variables es posible deducir las habitualmente estudiadas, como el umbral y la pendiente fotogeotrópica.

Hemos estudiado con ayuda de un ordenador las ecuaciones del comportamiento que aparecen en el modelo y las hemos tabulado. Hemos estudiado el problema del error debido a variaciones aleatorias en el cálculo de la proporción nuclear de un heterocariote a partir de las esporas que produce y hemos demostrado que, en nuestras condiciones experimentales, las estimaciones de la proporción nuclear son perfectamente fiables. Hemos demostrado que la estirpe auxótrofa S80 crece bien en heterocariosis aún con sólo un 15% de núcleos silvestres, pareciendo haber para esa proporción nuclear una saturación del efecto génico silvestre.

Finalmente, hemos confirmado las conclusiones anteriormente alcanzadas en este laboratorio sobre las proporciones de distintos carotenoides acumuladas por heterocariotes con núcleos carA y carR al variar sus proporciones nucleares.

AGRADECIMIENTOS

Al director de este departamento, D. Enrique Cerdá, y a todos mis compañeros, por que con ellos y de ellos he aprendido mucho. A Bonnie Walters que, generosamente, ha mecanografiado este trabajo. Muy especialmente a Delia Balbontín y a Paco García, del Centro de Cálculo de esta Universidad, por su inestimable ayuda en la programación del los aspectos matemáticos de esta Tesis.

BIBLIOGRAFIA

1. ARMSTRONG, J.B. y ADLER, J. (1969). *J. Bacteriol.*, 97: 156-161.
2. ARMSTRONG, J.B. y ADLER, J. (1969). *Genetics*, 61: 61-66.
3. ARMSTRONG, J.B., ADLER, J. y DAHL, M.M. (1967). *J. Bacteriol.*, 93: 390-398.
4. BANBURY, G.H. (1952). *J. Exp. Bot.*, 3: 86-94.
5. BENJAMIN, C.R. y HESSELTINE, C.W. (1959). *Mycologia*, 51: 751-711.
6. BERG, H.C. y BROWN, D.A. (1972). *Nature*, 239: 500-504.
7. BERGMAN, K., BURKE, P.V., CERDA OLMEDO, E., DAVID, C.N., DELBRUCK, M., FOSTER, K.W., GOODELL, E.W., HEISENBERG, M., MEISSNER, G., ZALOKAR, M., DENNISON, D.S., y SHROPSHIRE, W. (1969). *Bact. Rev.*, 33: 99-157.
8. BERGMAN, K. (1972). *Planta*, 107: 53-67.
9. BERGMAN, K., ESLAVA, A. y CERDA OLMEDO, E. (1973). *Molec. Gen. Genet.*, 123: 1-16.
10. BURKE, P.V. (1970). Tesis doctoral, California Institute of Technology.
11. CARLILE, M.J. (1961). *J. Gen. Microbiol.*, 28: 161-167.
12. CASTLE, E.S. (1929). *J. Gen. Physiol.*, 12: 391-400.
13. CASTLE, E.S. (1930). *J. Gen. Physiol.*, 13: 421-435.
14. CASTLE, E.S. (1932). *J. Gen. Physiol.*, 16: 75-88.
15. CASTLE, E.S. (1934). *J. Gen. Physiol.*, 17: 751-762.
16. CASTLE, E.S. (1935). *J. Gen. Physiol.*, 19: 797-805.
17. CASTLE, E.S. (1938). *Protoplasma*, 31: 331-345.
18. CASTLE, E.S. (1959). *J. Gen. Physiol.*, 45: 39-64.
19. CASTLE, E.S. (1961). *J. Gen. Physiol.*, 145: 39-64.
20. CASTLE, E.S. (1961). *Science*, 133: 1424-1425.
21. CASTLE, E.S. (1965). *J. Gen. Physiol.*, 48: 409-423.
22. CASTLE, E.S. (1966). *J. Gen. Physiol.*, 49: 925-935.
23. CERDA OLMEDO, E. (1974), en: *A Handbook of Genetics*. Ed. R.C. King. New York: Plenum Press, 343-359.
24. COHEN, R. y DELBRUCK, M. (1958). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 52: 361-388.
25. COHEN, R. y DELBRUCK, M. (1958). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 52: 361-388.
26. COHEN, R. y DELBRUCK, M. (1959). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 42: 677-695.

27. COHEN, R. (1974). *Nature*, 251: 144-146.
28. CURRY, G.M. y GRUEN, H.E. (1959). *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 45: 797-804.
29. DE BOER, S.R. (1929). *Rec. Trav. Botan. Neerl.*, 25: 117-240.
30. DE LA GUARDIA, M.D., ARAGON, C.M.G., MURILLO, F.J. y CERDA OLMEDO, E. (1971). *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 68: 2012-2015.
31. DELBRUCK, M. y REICHARDT, W. (1956), en: *Cellular Mechanism in Differentiation and Growth*. Ed. D. Rucnick, Princeton: Princeton Univ. Press, 344.
32. DELBRUCK, M. y SHROPSHIRE, W., JR. (1969). *Plant Physiol.*, 35: 194-204.
33. DENNISON, D.S. (1959). *Science*, 129: 775-777.
34. DELBRUCK, M. y VARJU, D. (1961). *J. Gen. Physiol.*, 44: 1177-1188.
35. DENNISON, D.S. (1961). *J. Gen. Physiol.*, 45: 23-38.
36. DENNISON, D.S. (1961). *Nature*, 184: 2036.
37. DENNISON, D.S. (1964). *J. Gen. Physiol.*, 47: 4.
38. DENNISON, D.S. (1965), *J. Gen. Physiol.*, 48: 393-408.
39. DENNISON, D.S. y BOZOF, R. (1973). *J. Gen. Physiol.*, 62: 157-168.
40. DENNISON, D.S. y ROTH, C.C. (1967). *Science*, 156: 1386-1388.
41. ESLAVA, A.P., ALVAREZ, M.I. y CERDA OLMEDO, E. (1974) *Eur. J. Biochem.*, 48: 617-623.
42. FOSTER, K. (1972). Tesis doctoral. California Institute of Technology.
43. FOSTER, K.W. y LIPSON, E.D. (1973). *J. Gen. Physiol.*, 62: 590-617.
44. FRANKE, W.W. y REAU, P. (1973). *Arch. Mikrobiol.*, 90: 121-129.
45. GAMOW, R.I. y GOODELL, W. (1969). *Plant Physiol.*, 44: 15-20.
46. GONZALEZ ARAGON, C. (1974). Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
47. GOODWIN, T.W. (1953). *Biochem. J.*, 50: 550-558.
48. GRUEN, H.E. (1959). *Plant Physiol.*, 34: 158-168.
49. GRUEN, H.E. (1965). *Mycologia*, 57: 683-695.
50. HEISENBERG, M. y CERDA OLMEDO, E. (1968). *Genetics*, 102: 187-195.
51. JAFFE, L.F. (1960). *J. Gen. Physiol.*, 43: 897-911.

52. JAN, Y.N. (1974). Tesis doctoral. California Institute of Technology.
53. JAN, Y.N. (1974). J. Biol. Chem., 249: 1973-1979.
54. JESAITIS, A.J. (1974). J. Gen. Physiol., 63: 1-31.
55. JOHNSON, D.L. y GAMOW, I. (1971). J. Gen. Physiol., 57: 41-49.
56. LIPSON, E.D. En publicación.
57. MEISSNER, G. y DELBRUCK, M. (1968). Plant Physiol., 43: 1279-1283.
58. MEISTRICH, M. y FORK, R.L. (1970). Science, 169: 370-371.
59. MURILLO ARAUJO, F. (1975). Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
60. OOTAKI, T. (1973). Molec. Gen. Genet., 121: 49-56.
61. OOTAKI, T., FISCHER, E.P. y LOCKHART, P. (1974). Molec. Gen. Genet., en prensa.
62. OOTAKI, T., LIGHT, M., DELBRUCK, M. y HSU, W.J. (1973). Molec. Gen. Genet., 121: 57-70.
63. ORTEGA, J., HARRIS, J.F. y GAMOW, R.I. (1974). Plant Physiol., 53: 485-490.
64. ORTEGA, J. y GAMOW, R.I. (1970). Science, 168: 1371-1375.
65. PICKETT, J.M. y FRENCH, C.S. (1967). Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 57: 1587-1593.
66. POFF, L. y BUTLER, W.L. (1973). Nature, 248: 799.
67. RILLING, H.C. (1964). Biochim. Biophys. Acta, 79: 464-475.
68. ROELOFSEN, P.A. (1950). Rec. Trav. Bot. Neerl., 42: 73-110.
69. ROELOFSEN, P.A. (1951). Biochim. Biophys. Acta, 6: 357-373.
70. SHROPSHIRE, W., JR., (1959). Science, 130: 336.
71. SHROPSHIRE, W., JR., (1962). J. Gen. Physiol., 45: 949-958.
72. SHROPSHIRE, W., JR., y BERGMAN, K. (1968). Plant Physiol., 43: 1317-1318.
73. SHROPSHIRE, W., JR. y GETTLENS, R.M. (1966). Plant Physiol., 41: 203-207.
74. SHROPSHIRE, W., JR. y WITHROW, R.B. (1958). Plant Physiol., 33: 360-365.
75. VARJU, P., EDGARD, L. y DELBRUCK, M. (1961). J. Gen. Physiol., 45: 48-58.

76. ZALOKAR, M. (1969). J. Cell. Biol., 41: 494-509.
77. ZANKEL, T., BURKE, V. y DELBRUCK, M. (1967).
J. Gen. Physiol., 50: 1893-1906.
78. ZYCHA, H., SIEPMANN, R. y LINNEMANN, G. (1969).
Mucorales. Lehre: Verlag von J. Cramer, 67-71.

INDICE DE MATERIAS

1. INTRODUCCION

1.1	¿Por qué <u>Phycomyces</u> ?	1
1.2	Ciclo de vida	2
1.3	Comportamiento de <u>Phycomyces</u>	4
1.3a	Respuestas a la gravedad	4
1.3b	Respuestas a la presión mecánica	5
1.3c	Respuestas a objetos cercanos	6
1.3d-1	Fotoiniciación de esporangióforos	7
1.3d-2	Fotoinducción de carotenoides	7
1.3d-3	Respuesta de crecimiento	8
1.3d-4	Fototropismo	13
1.4	Interacción entre los sentidos	14
1.4a	Fotoautoquimiotropismo	14
1.4b	Fotogeotropismo	14
1.5	Mutantes del comportamiento	14
1.6	Relación entre la respuesta trópica y la de crecimiento	16
1.7	Zonas del esporangióforo: en crecimiento, sensible y efectora	18
1.8	Óptica de la zona sensible	20
1.9	Modelos del fototropismo	22
1.10	Base molecular del comportamiento	24
1.10a	Recepción	24
1.10b	Transducción	25
1.10c	Efección	26

2. MATERIALES Y METODOS

2.1	Estirpes	26
2.2	Medios, condiciones de cultivo	28
2.3	Obtención de mutantes	28
2.4	Obtención e identificación de heterocariontes	28
2.5	Análisis de carotenoides	28
2.6	Estudios de comportamiento	28

2.7	Análisis genético.....	29
2.8	Simulación de comportamiento.....	29
2.9	Simulación de análisis genético.....	30
2.10	Unidades.....	31
3.	RESULTADOS	
3.1	Comportamiento de los mutantes.....	32
3.1a	Velocidad de giro.....	32
3.1b	Angulo alcanzado en 5 horas a diferentes intensidades luminosas.....	32
3.2	Complementación cuantitativa entre mutantes del comportamiento.....	37
3.2a	Complementación cuantitativa entre C9 y S57.....	37
3.2b	Complementación cuantitativa entre C2 y C9.....	40
3.2c	Otras complementaciones cuanti- tativas.....	45
3.3	Complementación cuantitativa entre S18 y S80.....	45
3.4	Simulación de la segregación de hetero- cariontes.....	50
4.	MODELO MATEMATICO DEL COMPORTAMIENTO	
4.1	Respuestas a la luz.....	59
4.1a	Fotorrespuesta de crecimiento.....	60
4.1b	Fototropismo.....	60
4.1c	Simulación del fototropismo.....	66
4.2	Mutantes.....	68
4.2a	Mutantes con E alterado.....	68
4.2b	Mutantes con A _d alterado.....	71
4.2c	Mutantes con K alterado.....	71
4.3	Complementación cuantitativa.....	71
4.3a	Heterocariontes con núcleos normales y mutantes con E alterado.....	72
4.3b	Heterocariontes con núcleos normales y mutantes con A _d alterado.....	72
4.3c	Heterocariontes con núcleos normales y mutantes con K alterado.....	75

4.3d	Heterocariontes con núcleos de diferentes mutantes con E alterado.....	77
4.3e	Heterocariontes con núcleos de diferentes mutantes con A _d alterado.....	78
4.3f	Heterocariontes con núcleos de mutantes con E alterado y con núcleos de mutantes con K alterado.....	78
4.3g	Heterocariontes con núcleos de diferentes mutantes con K alterado.....	78
4.4	Resumen del modelo.....	80
5. DISCUSION		
5.1	La técnica de la complementación cuantitativa.....	82
5.2	Mutantes de clase 1.....	82
5.3	Mutantes de clase 2.....	83
5.4	Modelo matemático del comportamiento.....	84
5.5	Síntesis de carotenoides.....	87
5.6	El comportamiento de <u>Phycomyces</u> : perspectivas para el futuro.....	87
6.	RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	88
7.	BIBLIOGRAFIA.....	90
8.	INDICE DE MATERIAS.....	94
9.	INDICE DE FIGURAS.....	97
10.	INDICE DE TABLAS.....	100

INDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Ciclo asexual de <u>Phycomyces</u> y detalle de la zona de crecimiento y del esporangio.....3
Figura 2:	Respuesta de crecimiento en el tipo silvestre y en mutante de clase 2.....9
Figura 3:	(A) Fototropismo al estimular con un rayo fino.....15 (B) Esquema del giro.....15
Figura 4:	(A) Relación entre el ángulo de desviación respecto a la vertical (θ) y la intensidad luminosa en el tipo silvestre, un mutante de clase 1, y uno de clase 2.....17 (B) Relación entre $\log \cot \theta$ y $\log I$ para las mismas estirpes que en A.....17
Figura 5:	Esquema del flujo de los estímulos tropicos en <u>Phycomyces</u> . Se indican las zonas en las que están alterados los mutantes...21
Figura 6:	Distribución de intensidades en el esporangióforo al iluminar unilateralmente....21
Figura 7:	Relación entre el ángulo de desviación respecto a la vertical y el tiempo en el tipo silvestre, un mutante de clase 1 y uno de clase 2.....33
Figura 8:	(A) Relación entre el ángulo de desviación respecto a la vertical y el tiempo, en dos mutantes de clase 1-2.....34 (B) Relación entre el ángulo de desviación respecto a la vertical y tiempo, en el tipo silvestre y un mutante de clase 1.....35
Figura 9:	Relación entre el ángulo de desviación respecto a la horizontal (α) y la intensidad luminosa en el tipo silvestre, dos mutantes de clase 1-1, un mutante de clase 1-2, y dos de clase 2.....36
Figura 10:	Relación entre $\log \cot \alpha$ y $\log I$ para las mismas estirpes que en la Figura 9.....38

Figura 11:	Relación entre el ángulo de desviación con la horizontal (α) y la intensidad luminosa en heterocariontes C9*S57.....	41
Figura 12:	Espectros de absorción de los carotenoides que acumula un heterocarionte C9*S57.....	42
Figura 13:	Relación entre el umbral fotogeotrópico y la proporción nuclear en distintos heterocariontes.....	44
Figura 14:	Relación entre umbral fotogeotrópico y proporción nuclear en un heterocarionte C2*C9.....	49
Figura 15:	Relación entre umbral fotogeotrópico y proporción nuclear en dos heterocariontes entre la estirpe silvestre y sendos mutantes de clase 1-1.....	47
Figura 16:	Relación entre umbral fotogeotrópico y proporción nuclear en un heterocarionte entre un mutante <u>madD</u> y el tipo silvestre y entre éste y un mutante <u>madE</u>	48
Figura 17:	Relación entre el ángulo alcanzado con respecto a la horizontal tras cinco horas de iluminación la proporción nuclear en los mismos heterocariontes que en la Figura 16.....	49
Figura 18:	Relación entre la fracción de crecimiento respecto a S18 de un heterocarionte S18*S80 y la proporción nuclear.....	51
Figura 19:	Proporción de esporas homocariontes y heterocariontes producidas por un heterocarionte en función de su proporción nuclear.....	51
Figura 20:	Distribución de las diferencias entre la media real de esporas por tubito y la estimación obtenida a partir de la distribución de Poisson de esporas en tubitos.....	53
Figura 21:	Número medio esperado de tubitos vacíos, para diferentes valores de N y media de tubitos vacíos en 100 experimentos de simulación.....	54

Figura 22:	Distribución, para distintos N y p, de las diferencias entre las medias de esporas por tubito calculadas por 2 métodos distintos.....	55
Figura 23:	Resultados de la simulación del análisis genético de un heterocarionte.....	57
Figura 24:	Relación entre la velocidad angular del esporangióforo y la intensidad luminosa.....	67
Figura 25:	Relación entre ángulo de equilibrio e intensidad luminosa en el silvestre y un mutante con E o con A_d alterado.....	69
Figura 26:	Relación entre el ángulo de desviación con la horizontal y el tiempo de iluminación de un esporangióforo del tipo silvestre, de un mutante con K alterado, y de un mutante con E o A_d alterado.....	70
Figura 27:	Relación entre el ángulo alcanzado en cinco horas por un esporangióforo heterocarionte y la intensidad luminosa.....	73
Figura 28:	Relación entre el ángulo alcanzado en cinco horas por un esporangióforo heterocarionte silvestre*K y la intensidad luminosa.....	76
Figura 29:	Relación entre el umbral fototrópico y la proporción de núcleos silvestres en distintos heterocariontes.....	74
Figura 30:	Relación entre la proporción nuclear y el umbral fotogeotrópico en heterocariontes con núcleos de diferentes mutantes alterados en K, con núcleos de diferentes mutantes alterados en E, y con núcleos de un mutante alterado en E y otro en K.....	79
Figura 31:	Relación entre el ángulo recorrido y la proporción nuclear de un heterocarionte entre el silvestre y un mutante con K alterada.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estirpes de Phycomyces blakesleeanus usadas en esta tesis.....27

Tabla 2: Umbral e intensidad crítica de algunos mutantes de Phycomyces y de la estirpe silvestre.....39

Tabla 3: Análisis genético de C9*S57.....39

Tabla 4: Cantidades de distintos carotenoides acumuladas por distintos micelios del heterocarionte C9*S57.....43

Tabla 5: Análisis genético de S18*S80.....43

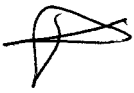
Tabla 6: Desviación típica de la distribución de estimaciones de p para diferentes tamaños N de la muestra y diferentes valores de p.....58

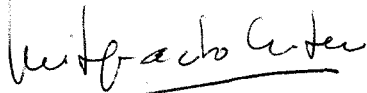
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS

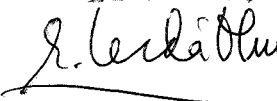
Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de JUAN RAMON MEDINA PRECIOSO titulada "COMPLEMENTACIÓN CUANTITATIVA ENTRE MUTANTES Y SU COMPORTAMIENTO EN PHYCOMYCES"

acordó otorgarle la calificación de "Sobresaliente" "cum laude"

Sevilla, 14 de Junio 1.988

El Vocal,


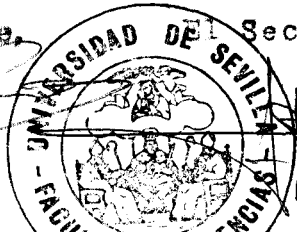
El Vocal,


El Vocal,


El Presidente,

Secretario,

El Doctor



J. Medina

