



Que la presente se da a conocer al Consejo Doctoral  
al R.D. 156 número 279 del libro  
de correspondencia  
Sevilla, 12 de junio de 1994

El Jefe del Negociado de Tesas,

*Alvaro Laffitte*

EFFECTOS DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA Y FUNCIONES DE  
LOS CAROTENOS EN *PHYCOMYCES*

Trabajo realizado en el Departamento de Genética,  
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla,  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
por la Licenciada

VIRGINIA MARTIN ROJAS

*Virginia Martin Rojas*

Sevilla, 6 de junio de 1994

Director y Ponente

*E. Cerdá Olmedo*

Dr. Enrique Cerdá Olmedo  
Catedrático de Genética de la  
Universidad de Sevilla



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

padres  
Salva

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para  
que mi Tesis Doctoral EFECTOS DE LA RADIACIÓN  
ULTRAVIOLETA Y FUNCIONES DE LOS  
CAROTENOS EN PHYCOMYCES  
sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado:

Sevilla, a 27 de octubre de 1994.

VIRGINIA MARTIN ROJAS

INDICE

<b>INTRODUCCION GENERAL.....</b>	<b>1</b>
1. El organismo de trabajo.....	1
2. Ciclo asexual de vida.....	3
3. Ciclo sexual de vida.....	6
4. Objetivo del trabajo.....	6

**CAPITULO PRIMERO:**

<b>EFFECTOS DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA.....</b>	<b>8</b>
---	----------

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>8</b>
--------------------------	----------

1. Generalidades.....	8
2. Fototropismo a luz azul.....	8
3. Fototropismo a radiación ultravioleta.....	11

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>13</b>
------------------------	-----------

1. Aislamiento de los mutantes.....	13
2. Heterocariosis.....	14
3. Otros rasgos fenotípicos.....	15
4. Tropismos.....	17

<b>DISCUSION.....</b>	<b>20</b>
-----------------------	-----------

## CAPITULO SEGUNDO:

<b>FUNCIONES DE LOS CAROTENOS.....</b>	<b>23</b>
INTRODUCCION.....	23
1. Generalidades.....	23
2. Carotenos como fotorreceptores.....	23
3. Carotenos como precursores.....	24
4. Radioprotección por carotenos.....	26
4.1. Luz.....	26
4.2. Radiaciones.....	28
5. Posibles mecanismos de acción de los carotenoides.....	28
6. Posible papel de los carotenoides en el envejecimiento celular.....	29
7. Síntesis y regulación de los carotenos en <i>Phycomyces</i> .....	30
8. Objetivos del trabajo.....	31
RESULTADOS.....	32
1. Diseño del experimento.....	32
2. Exposición a radiación ultravioleta C.....	36
3. Exposición a luz blanca.....	39
4. Exposición a radiación gamma.....	43
5. Exposición a peróxido de hidrógeno.....	46
6. Envejecimiento.....	48
6.1. Envejecimiento de esporas en agua.....	48
6.2. Envejecimiento de esporas en los esporangios.....	48
6.3. Envejecimiento de micelio.....	48

7. Competencia entre otras estirpes mutantes de la carotenogénesis.....	55
DISCUSION.....	57
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>60</b>
1. Estirpes.....	60
2. Condiciones de cultivo.....	62
3. Fuentes de radiación y medidas.....	63
3.1. Fuentes de luz blanca.....	63
3.2. Fuentes de radiación azul.....	63
3.3. Fuentes de radiación ultravioleta.....	64
3.4. Fuente de radiación gamma.....	64
4. Mutagénesis.....	64
5. Aislamiento de los mutantes.....	65
6. Formación del heterocarionte.....	66
7. Medidas del fototropismo.....	66
8. Análisis de ácido gálico.....	68
9. Análisis de carotenos.....	68
10. Experimentos de competencia.....	69
11. Envejecimiento.....	70
11.1. Envejecimiento de esporas en agua.....	70
11.2. Envejecimiento de esporas en los esporangios.....	70
11.3. Envejecimiento del micelio en el medio de cultivo.....	70

<b>RESUMEN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>73</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>86</b>

## INTRODUCCION GENERAL



## 1. El organismo de trabajo

*Phycomyces* es un género de hongos filamentosos perteneciente a la familia Mucoráceas, orden Mucorales y clase Zigomicetos.

Las motivaciones para su estudio han cambiado gradualmente con el tiempo, pero el organismo ha mantenido su atractivo durante más de un siglo. *Phycomyces* fue descrito por primera vez por Agardh (1817), quien lo confundió con un alga y lo denominó *Ulva nitens*, por su llamativo brillo metálico. Kunze (1817) descubrió el error anterior y lo identificó como un hongo llamándolo *Phycomyces nitens*. Burgeff (1925) escindió la especie *Phycomyces nitens* en dos; las estirpes más frecuentes en los laboratorios pertenecen a la nueva especie *Phycomyces blakesleeanus*, así llamada en honor del científico Alfred Blakeslee.

Wilhelm Hoffmeister, en su libro "Die Pflanzenzelle" (1867), registró la existencia de reacciones de este hongo a la luz. Carnoy (1870) describió el ciclo de vida asexual de *Phycomyces* y aportó detalles de su morfología y de su desarrollo. Massart (1888) publicó el primer trabajo sobre fisiología cuantitativa de *Phycomyces* midiendo sus respuestas a pequeñas diferencias de intensidad luminosa. En las investigaciones con *Phycomyces* han destacado tres grandes científicos en este siglo. Alfred Blakeslee descubrió el ciclo de vida sexual de los hongos en 1904. A partir de 1912, Hans Burgeff estudió la genética y la bioquímica de *Phycomyces*. La fisiología es conocida sobre todo gracias al impulso dado por Max Delbrück y sus colaboradores, a partir de 1957.

Se han estudiado mucho los esporangióforos, que son una sola célula gigante que responde a numerosos estímulos ambientales. Los estímulos simétricos modifican su velocidad de crecimiento; por ejemplo, la ilumina-

ción simétrica (fotomecismo), la introducción en el medio de ciertos compuestos químicos (quimiomecismo) y la colocación o remoción de una cajita a su alrededor (claustromecismo). Los estímulos asimétricos cambian la dirección de crecimiento; por ejemplo, los esporangióforos giran hacia la luz (fototropismo positivo) y las corrientes de aire (anemotropismo), crecen contra la gravedad (gravitropismo) y se alejan de los objetos cercanos (evitación).

El conjunto de todas las investigaciones científicas realizadas en *Phycomyces* ha sido objeto de dos grandes revisiones: Bergman *et al.* (1969) y Cerdá-Olmedo y Lipson (1987).

*Phycomyces* es un hongo heterotálico con dos tipos sexuales, denominados (+) y (-), indistinguibles morfológicamente y sólo identificables por su reacción con el otro sexo (Blakeslee, 1904). Burgeff (1924) demostró que los micelios (+) y (-) de *Mucor mucedo*, otro hongo mucoral, separados por una membrana emiten señales químicas que inician el desarrollo sexual. Estas señales se denominan hormonas sexuales o feromonas. Diferentes estudios sugieren que la estimulación sexual de los mucorales se debe a los ácidos trispóricos, y que las feromonas que se intercambian son los precursores metabólicos inmediatos de los ácidos trispóricos (Caglioti *et al.*, 1966; van den Ende, 1968; Sutter *et al.*, 1971; Sutter *et al.*, 1973; Sutter *et al.*, 1974).

Los carotenos de *Phycomyces* atrajeron la atención de los científicos, incluso antes de los días de la cromatografía y de la espectrofotometría. El color amarillo y su distribución en la célula en forma de gotitas de lípidos fueron descritos hace más de un siglo (Carnoy, 1870). Se atribuyó este color al  $\beta$ -caroteno hace más de 50 años (Schopfer, 1935; Schopfer y Jung, 1935). La introducción de nuevas técnicas bioquímicas permitió una investigación intensa de los carotenoides (Goodwin, 1952; Goodwin, 1980; Bramley, 1985; Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1992). Estos carotenos no son un elemento meramente decorativo del hongo, como lo demuestra la compleja regulación de su síntesis. Los genéticos han mejorado la variedad y la belleza de la Naturaleza creando mutantes con nuevos colores, debidos a la interrupción de su ruta biosintética en distintos pasos y a modificaciones de la regulación (Meissner y Delbrück, 1968; Cerdá-Olmedo, 1985).

*Phycomyces* requiere tiamina (Burgeff, 1934; Schopfer, 1934). Este fue el primer caso descubierto de requerimiento de una vitamina por parte de un organismo distinto de los animales superiores y dió lugar a un excelente bioensayo usado durante medio siglo para detectar con exactitud las concentraciones de tiamina en medios complejos.

Burgeff inició el estudio de la genética de *Phycomyces* con el descubrimiento de la heterocariosis en su ciclo de vida asexual (1912) y de la recombinación en su ciclo de vida sexual (1914). Sin embargo, hasta los años setenta no se le dió un verdadero impulso con la introducción de nuevos marcadores genéticos (Cerdá-Olmedo, 1975; Eslava *et al.*, 1975a; Eslava *et al.*, 1975b), el desarrollo de métodos para la producción artificial de heterocariontes (Ootaki, 1973; Suárez *et al.*, 1985) y el aislamiento de mutantes (Roncero *et al.*, 1984). Se dispone de una extensa colección de mutantes que han sido utilizados para estudios fenotípicos, para la asignación de mutaciones a genes determinados estableciendo grupos de complementación, y para la construcción de un mapa genético (Alvarez *et al.*, 1993).

En el abordaje de cualquier problema biológico es de esencial importancia la elección del organismo de estudio. *Phycomyces* tiene como principal ventaja la de ser un eucarionte sencillo que se cultiva con facilidad y se presta a estudios genéticos y bioquímicos.

*Phycomyces* es un saprofito terrestre con dos ciclos de vida, uno sexual y otro asexual. Los ciclos de vida comprenden sucesiones de estructuras morfológicas que difieren unas de otras por su composición química, sus funciones fisiológicas y sus desarrollos potenciales (Figura 1).

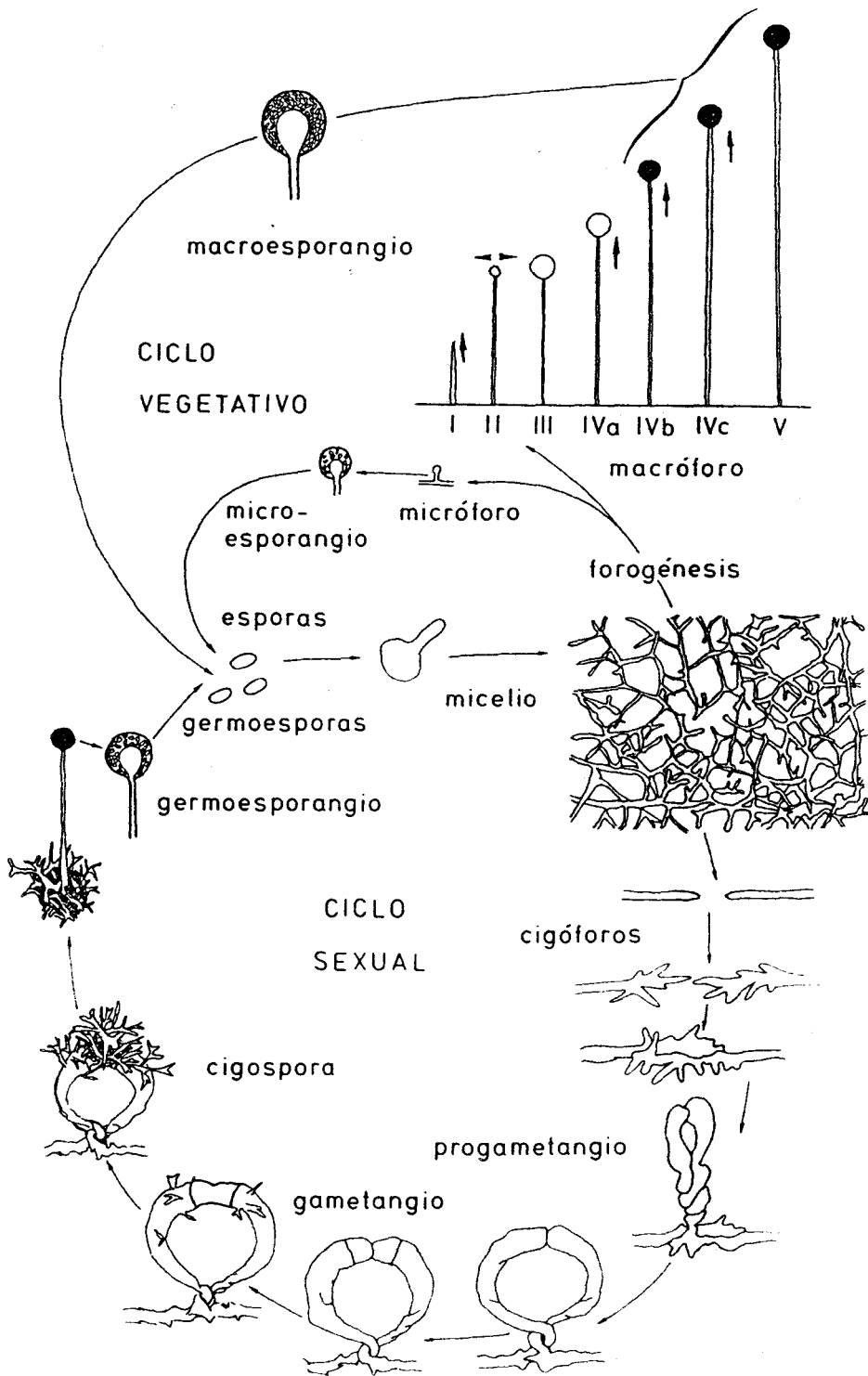
## 2. Ciclo asexual de vida

Las esporas de *Phycomyces* contienen entre 1 y 6 núcleos, aunque más del 80% son tri o tetranucleadas (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968). Son de forma elipsoidal, con una longitud media de 9  $\mu\text{m}$  y una anchura de 6  $\mu\text{m}$ . Solo una minoría de las esporas germina cuando se encuentran en un medio que permita el crecimiento: menos del 1% en ciertos medios mínimos. La germinación masiva se consigue por choque térmico de las esporas

(Robbins *et al.*, 1942) o por la adición al medio de ciertos compuestos químicos, como acetato o propionato (Robbins *et al.*, 1942; Borchert, 1963; Van Mulders *et al.*, 1986). Tras la activación, la espora se hincha y comienzan a emerger uno, dos, o a veces tres tubos de germinación, que dan lugar a un micelio de hifas cilíndricas, no tabicadas y abundantemente ramificadas. Todo el micelio es una sola célula con numerosísimos núcleos (cenocito).

*Phycomyces* crece con rapidez en medios sencillos. A temperatura ambiente (22 °C) el micelio se expande unos 2 cm por día sobre la superficie del medio. El micelio superficial construye unas hifas aéreas especializadas (esporangióforos), cada una de las cuales sostiene un esporangio portador de esporas. Existen dos tipos de esporangióforos: los macróforos que alcanzan fácilmente los 10 cm de longitud y cuyos esporangios contienen del orden de cien mil esporas y los microfóros que tienen aproximadamente 1 mm de longitud y cuyos esporangios contienen unas mil esporas (Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1985). Los macróforos y los microfóros se originan a partir de primordios morfológicamente diferentes denominados macroprimordios y microprimordios, respectivamente (Thornton, 1972; Thornton, 1975). El desarrollo de los esporangióforos recibe el nombre de forogénesis y está regulado por la luz y otros factores ambientales. En las condiciones usuales de laboratorio, la forogénesis se inicia el tercer día de crecimiento vegetativo.

Durante la forogénesis se producen unas intensas corrientes citoplasmáticas en el micelio y en los esporangióforos que llevan muchos núcleos desde diferentes partes del micelio hasta la punta de los esporangióforos, donde se va a formar el esporangio. El desarrollo de un macróforo pasa a través de varias fases. En el estadio I, el esporangióforo es esencialmente un cilindro que crece por su ápice; en el estadio II, se diferencia un esporangio esférico que crece radialmente; en el estadio III, no se observa crecimiento pero el esporangio se tabica formando las esporas asexuales; en el estadio IV, el esporangióforo comienza de nuevo el crecimiento vertical, localizado en un segmento de unos 2 mm de longitud debajo del esporangio. Este crecimiento continúa durante muchas horas si las condiciones lo permiten.



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

### 3. Ciclo sexual de vida

Dos micelios de diferentes sexos situados próximos uno de otro emiten unas hifas especializadas denominadas cigóforos. Cuando dos cigóforos de distintos sexos contactan, comienzan juntos a emerger del medio hacia el aire y toman el nombre de progametangios. Estos tabican sus ápices separando una célula llamada gametangio; posteriormente, los dos gametangios fundirán sus contenidos en una cigospora, desapareciendo las membranas plasmáticas y paredes celulares entre los dos. Así la cigospora contiene citoplasma y núcleos aportados por ambas estirpes en partes iguales. Al mismo tiempo, se generan unos apéndices a modo de espinas de la pared celular del gametangio, que cubren la cigospora. La cigospora madura permanece en estado de latencia durante varios meses, al cabo de los cuales produce un germoesporangióforo, de aspecto similar a los esporangióforos del ciclo vegetativo. Su germoesporangio correspondiente contiene del orden de mil germoesporas, capaces de iniciar un ciclo asexual normal. Las germoesporas representan el resultado de activos fenómenos de recombinación genética.

### 4. Objetivo del trabajo

*Phycomyces* es un organismo muy adecuado para el estudio de tropismos causados por las radiaciones. Nos planteamos el reto de decidir si la respuesta a la radiación ultravioleta es mediada por la misma maquinaria que causa la respuesta a luz azul, como tradicionalmente se había afirmado. La existencia de un tropismo especial para la radiación ultravioleta plantea ciertas dudas. ¿Por qué iba *Phycomyces* a desarrollar un sistema de detección y respuesta para la radiación ultravioleta? Si no se trataba de un mero efecto marginal del receptor de la luz azul, ¿tan importante es huir de la radiación ultravioleta? ¿Qué daños provoca esta radiación? ¿Dispondría también de algún sistema especial de defensa ante estos daños una vez producidos? Tradicionalmente, se habían propuesto a los carotenos como protectores frente a este tipo de daños celulares. Investigamos si algún caroteno

ofrecía alguna ventaja frente a la radiación ultravioleta a las estirpes que lo contenían. Puestos en este camino, decidimos extender la investigación a otras radiaciones. Ante los sorprendentes resultados encontrados nos preguntamos ¿para qué están en la célula entonces? ¿Estarán implicados en la defensa química por ataques oxidativos? ¿Protegen del envejecimiento?

**CAPITULO PRIMERO:  
EFECTOS DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA**



# INTRODUCCION

## 1. Generalidades

Los esporangióforos de *P. blakesleeanus* crecen hacia una fuente de luz azul (fototropismo positivo), huyen de una fuente de radiación ultravioleta (fototropismo negativo) y modifican transitoriamente su velocidad de crecimiento cuando se cambia la intensidad de la iluminación o irradiación (fotomecismo). En general, cuando el esporangióforo recibe una estimulación simétrica, no se desvía; las estimulaciones asimétricas causan tropismo.

Existe una longitud de onda ( $\lambda = 305$  nm) que no causa tropismo, aunque se aplique asimétricamente (Curry y Gruen, 1959; Presti y Galland, 1987). Esta longitud de onda constituye un "punto de compensación" entre el tropismo positivo y el negativo.

## 2. Fototropismo a luz azul

Bajo iluminación simétrica, un aumento en la intensidad de luz incrementa transitoriamente la velocidad de crecimiento del esporangióforo. El lado distal de un esporangióforo irradiado con iluminación unilateral azul recibe menos luz que el proximal porque parte de la luz es reflejada, absorbida y dispersada por el esporangióforo. Según estas observaciones, se esperaría que el lado proximal creciera más deprisa que el distal, lo cual originaría un fototropismo negativo, o sea, justamente lo contrario de lo que ocurre.

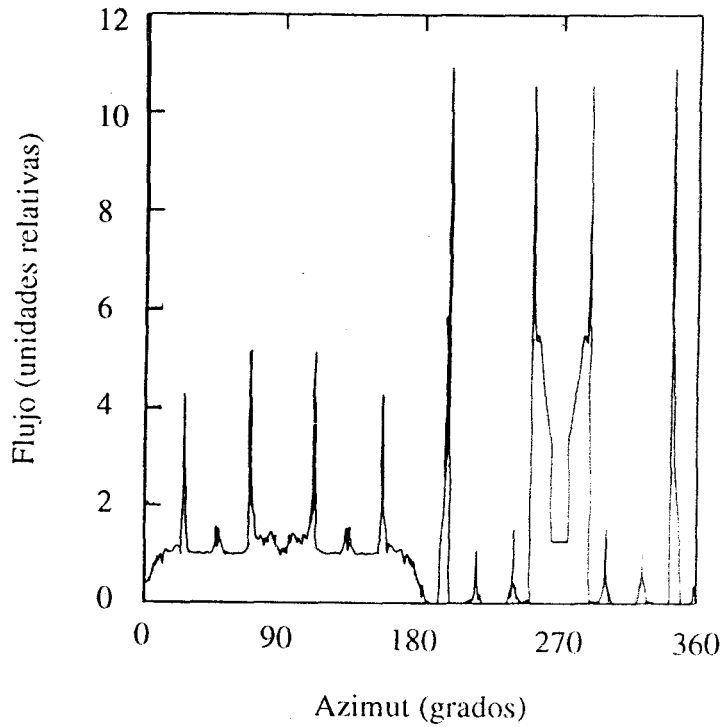
El esporangióforo no tiene en cuenta la iluminación total de cada lado, sino que responde al enfoque en el lado distal del esporangióforo de la luz

azul que penetra por la cara proximal (Blaauw, 1908). Bajo iluminación unilateral azul dos fuertes bandas de enfoque aparecen en el lado distal del cuerpo cilíndrico del esporangióforo (Figura 2). La importancia del enfoque, o "efecto lente", se demostró sumergiendo esporangióforos en medios con diferentes índices de refracción (Buder, 1918; Buder, 1920; Zankel *et al.*, 1967) y colocando ante el esporangióforo una lente divergente (Shropshire, 1962). Conforme se incrementa el índice de refracción, la curvatura fototrópica se hace menos acusada y a cierto valor crítico (algo inferior al índice de refracción del esporangióforo) deja de haber tropismo. Cualquier incremento adicional en el índice de refracción da lugar a una curvatura negativa (Figura 3). Es decir, el esporangióforo compara los perfiles de distribución de luz de ambos lados y ciertas diferencias entre ellos dan lugar a los tropismos (Fukshansky, 1993).

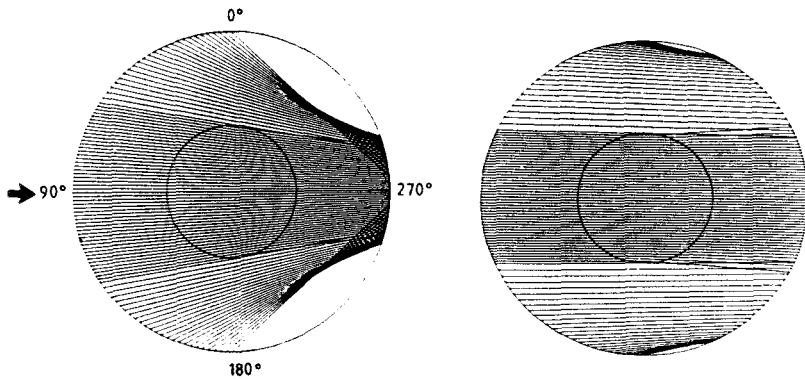
Los argumentos anteriores indican el papel decisivo del perfil de distribución de luz en ambos lados. La célula no procesa señales locales sino un perfil de luz completo (Fukshansky y Steinhardt, 1987; Dennison y Vogelmann, 1989). Este perfil viene determinado por seis fenómenos físicos: la reflexión en el lado proximal del esporangióforo, el enfoque, la atenuación debida a la absorción y a la dispersión en el interior de la célula, las reflexiones internas múltiples, la interferencia entre diferentes rayos luminosos y el estado de polarización de la onda incidente (Steinhardt y Fukshansky, 1987). Existe una alta densidad de partículas en el citoplasma de *Phycomyces* que influyen sobre las propiedades ópticas de la célula (Dennison y Vogelmann, 1989).

El fotorreceptor para luz azul está anclado a la membrana plasmática y tiene una orientación fija en ella. Esta conclusión se basa fundamentalmente en el dicroísmo, o sea, el distinto efecto de la luz azul según sea su plano de polarización (Jesaitis, 1974) y en la exploración del esporangióforo con un haz de luz muy fino (Meistrich *et al.*, 1970).

Efectos de la radiación ultravioleta



**Figura 2.** Distribución de la luz azul (450 nm) incidente en la superficie del esporangióforo (Steinhardt *et al.*, 1989). La luz incide desde el azimut 90 grados; el lado distal, por tanto, se extiende entre 180 y 360 grados de azimut (ver Figura 3).

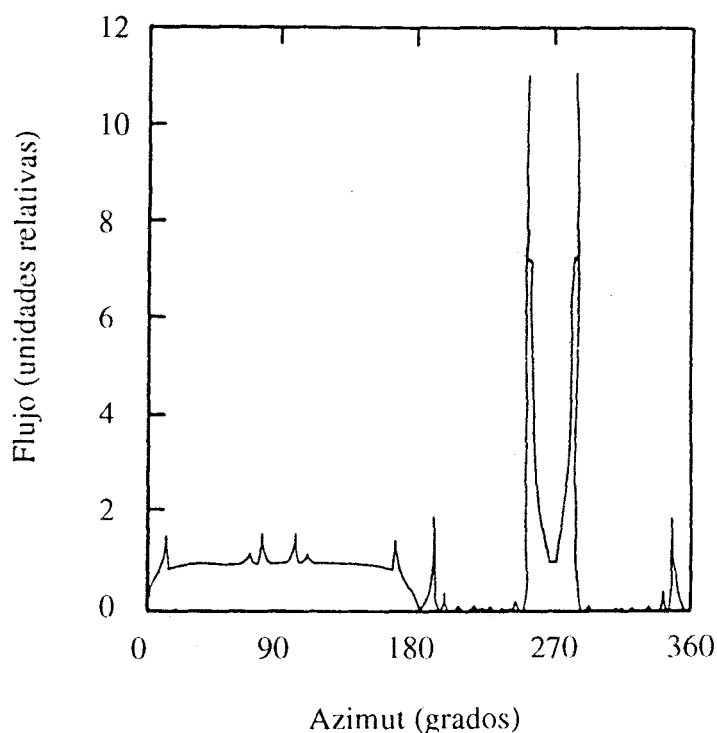


**Figura 3.** (Izquierda) Haces de luz en un esporangióforo que crece en el aire bajo irradiación unilateral azul (450 nm) y muestra un fuerte fototropismo positivo. (Derecha) Haces de luz en un esporangióforo que crece inmerso en un fluido con índice de refracción  $n = 1.31$  bajo irradiación unilateral azul (450 nm) y no muestra fototropismo (Steinhardt *et al.*, 1989).

### **3. Fototropismo a radiación ultravioleta**

Ya hemos adelantado que los esporangióforos sometidos a radiación ultravioleta de longitud de onda inferior a 305 nm experimentan un tropismo negativo. Los esporangióforos contienen grandes cantidades de ácido gálico (Dennison, 1959), compuesto que absorbe fuertemente la radiación ultravioleta. Este hecho permitió a Delbrück y Shropshire (1960) proponer que los tropismos a luz azul y a radiación ultravioleta están mediados por el mismo mecanismo celular. El cambio de tropismo positivo a negativo lo atribuyeron a la atenuación óptica del estímulo por la absorción de la radiación ultravioleta a través del esporangióforo, que protegería de la radiación incidente al lado distal.

La conjetura de Delbrück y Shropshire (1960) fue contradicha por el cálculo de la distribución de la intensidad de radiación ultravioleta dentro del esporangióforo (Popescu *et al.*, 1989a). Se encontraron unas fuertes bandas de enfoque de la radiación ultravioleta en la cara distal, a pesar de la absorción interna del esporangióforo (Figura 4). Las medidas de densidad óptica en el esporangióforo realizadas con una microsonda apoyaron la distribución calculada (Fukshansky y Richter, 1990). En la misma dirección se encontró que los esporangióforos no presentan tropismos a intensidades muy bajas ( $8 \times 10^{-8} \text{ W m}^{-2}$ ) de radiación ultravioleta y que, a intensidades aún más bajas, el tropismo se hace positivo (Popescu *et al.*, 1989a). Estos autores demostraron que el enfoque era esencial para este tropismo positivo.



**Figura 4.** Distribución de la radiación ultravioleta (277 nm) incidente en la superficie del esporangióforo (Popescu *et al.*, 1989a). La luz incide desde el azimut 90 grados; el lado distal, por tanto, se extiende 180 a 360 grados de azimut.

A falta de un mecanismo unitario para el tropismo a luz azul y a radiación ultravioleta, cabe la posibilidad de que la célula disponga de receptores específicos y transductores sensoriales para la radiación ultravioleta, diferentes de los de la luz azul. Nosotros hemos aislado y caracterizado mutantes que apoyan esta teoría, y presentamos una hipótesis de trabajo sobre la relación entre las cadenas transductoras sensoriales de la luz azul y la radiación ultravioleta.

# RESULTADOS

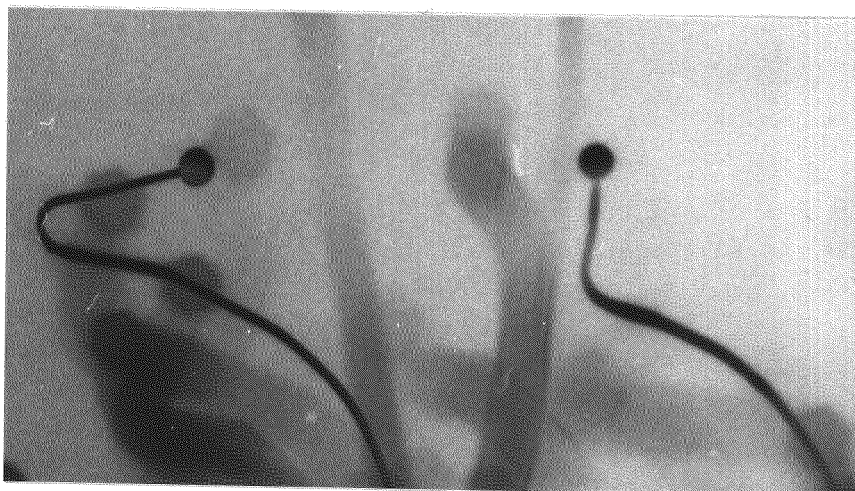
## 1. Aislamiento de los mutantes

Se desea aislar mutantes con un tropismo a la luz igual al de la estirpe silvestre, pero con un tropismo alterado cuando se exponen a la radiación ultravioleta de 277 nm.

El heterocarionte C2 \* S213 se expuso a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina siguiendo el procedimiento descrito por Roncero *et al.* (1984). Este método produce suspensiones de esporas con altas tasas de mutación en sus núcleos, que provienen principalmente de los núcleos S213 del heterocarionte. A partir de dos suspensiones diferentes de esporas, se inocularon 700 cajas de Petri y se obtuvieron unas 70.000 colonias en total. Se expusieron sucesivamente a luz blanca horizontal durante 140 minutos y a radiación horizontal ultravioleta durante 30 minutos, procedentes ambas del mismo lado, y se observó la conducta de los esporangióforos en estadio IV (portadores de un esporangio maduro).

La gran mayoría de las colonias se comportaron como el tipo silvestre (Figura 5, izquierda), es decir, sus esporangióforos giraban primero a un lado (hacia la fuente de luz blanca) y luego a otro (huyendo de la fuente de radiación ultravioleta). Se aislaron quince esporangios de diferentes colonias cuyos esporangióforos giraban hacia la lámpara azul pero ignoraban la ultravioleta (Figura 5, derecha). Las esporas de estas colonias se recogieron, subcultivaron y reensayaron, pues sus esporangióforos no exhibían un comportamiento uniforme, y este ciclo se repitió unas cinco veces con cada uno de los quince mutantes aislados.

En las condiciones del ensayo, los esporangióforos mutantes huían de la fuente de radiación ultravioleta tras largas exposiciones.



**Figura 5.** Respuestas de un esporangióforo silvestre (izquierda) y un esporangióforo mutante (derecha) a la luz azul y a la radiación ultravioleta. Se expusieron durante 140 minutos a luz blanca y a continuación durante 30 minutos a radiación ultravioleta, procedentes ambas del lado izquierdo de la fotografía.

## 2. Heterocariosis

Una característica notable de estos mutantes fue que sus esporas desarrollaban colonias con diferentes fenotipos. Algunas de ellas daban lugar a esporangióforos con conducta normal e incluso se encontraban colonias con esporangióforos con ambos tipos de respuesta. Algunas colonias eran homocariotes silvestres, puesto que los esporangióforos de todos sus descendientes respondían normalmente.

La segregación puede ser explicada si suponemos que las estirpes mutantes son heterocariotes portadores de núcleos mutantes y silvestres. Las mutaciones son letales recesivas con efectos dominantes en el comporta-

miento. Los núcleos mutantes no sobreviven a menos que convivan con núcleos auxiliares silvestres en un heterocarionte. Los núcleos mutantes en las quince estirpes nuevas se denominaron S581 a S595 y las mutaciones responsables de sus fenotipos se nombraron *uvi-1* a *uvi-15*, respectivamente. Los mutantes S213 \* S587 y S213 \* S588 se aislaron de la misma suspensión de esporas; el resto se aisló de otra suspensión de esporas diferente.

Esta explicación se confirmó cuando se transfirió el núcleo mutante S591 de la compañía del núcleo S213 en el heterocarionte original a otro heterocarionte con el núcleo auxiliar C271. Los heterocariontes C271 \* S591 son amarillos, crecen en agar mínimo y desarrollan esporangióforos con respuesta defectuosa a la radiación ultravioleta. Este heterocarionte produciría tres clases de esporas: homocariontes C271 (que dan lugar a colonias blancas y auxótrofas para el ácido nicotínico), heterocariontes C271 \* S591, (con proporciones nucleares variadas) y homocariontes S591 (inviabiles). Los heterocariontes C271 \* S591 que tenían claro comportamiento mutante tenían una alta proporción de núcleos mutantes, ya que dieron lugar a muy pocos descendientes blancos o ninguno; los que no los producían en la primera generación de esporas, los desarrollaban en una generación subsiguiente.

### **3. Otros rasgos fenotípicos**

Los espectros de absorción de los extractos acuosos de las puntas de los esporangióforos (1 cm) de los quince mutantes son similares a los del tipo silvestre. Si toda la absorción a 262 nm se atribuyera al ácido gálico ( $E_{1\%, 1\text{cm}} = 408$  a 262 nm), el contenido de este compuesto en las puntas de los esporangióforos (Tabla I) sería de  $3.16 \pm 0.09$  mg g<sup>-1</sup> de peso seco (media y error típico en 32 determinaciones en el silvestre y en las quince estirpes mutantes).

Algunos mutantes exhibían rasgos especiales en heterocariosis, además de la letalidad en homocariosis. La mayoría de las colonias de la estirpe S213 \* S585 desarrollaban esporangióforos que cesaban muy pronto su crecimiento (menores de 2 cm); el resto de los esporangióforos crecía normalmente y exhibía los tropismos propios de los mutantes. Los esporangióforos de la estirpe S213 \* S586 cesaban de crecer cuando alcanzaban entre 2 y 3 cm, mucho antes que los de la estirpe silvestre. Los esporangióforos de



**TABLA I.** Concentraciones de ácido gálico en los heterocariontes y en el tipo silvestre NRRL1555 (mg de ácido gálico por g de peso seco en dos determinaciones).

Estirpe	Experimento 1	Experimento 2
S213 * S581	3.2	3.6
S213 * S582	2.9	3.6
S213 * S583	3.3	2.8
S213 * S584	2.3	3.0
S213 * S585	3.8	3.3
S213 * S586	2.8	3.2
S213 * S587	2.5	2.9
S213 * S588	2.6	3.2
S213 * S589	5.0	2.6
S213 * S590	3.2	3.0
S213 * S591	3.2	3.6
S213 * S592	3.4	2.9
S213 * S593	3.1	3.3
S213 * S594	2.7	3.4
S213 * S595	2.8	3.3
NRRL1555	2.7	3.9

la estirpe S213 \* S581 no exhibían tropismos a la radiación ultravioleta, pero algunas de las colonias presentaban esporangióforos que no respondían a la luz blanca.

#### 4. Tropismos

La cepa C271 \* S591 se seleccionó para posteriores estudios y de aquí en adelante la llamaremos "*el mutante*" para recordar que lleva una mutación *uvi-11*. Se empleó un heterocarionte con una alta proporción de núcleos mutantes y una baja proporción de núcleos silvestres C271. Los esporangióforos de la cepa S213 \* S591 crecían más lentamente que los de la estirpe silvestre (43% de la velocidad de crecimiento silvestre en promedio). Los esporangióforos a los que se midió el tropismo presentaban una velocidad de crecimiento superior a  $20 \mu\text{m min}^{-1}$ . Un sistema asistido por ordenador midió y registró los ángulos de curvatura de los esporangióforos silvestres y mutantes a luz azul (450 nm) y radiación ultravioleta (277 nm). La figura 6 muestra ejemplos de la curvatura de un esporangióforo silvestre y otro mutante.

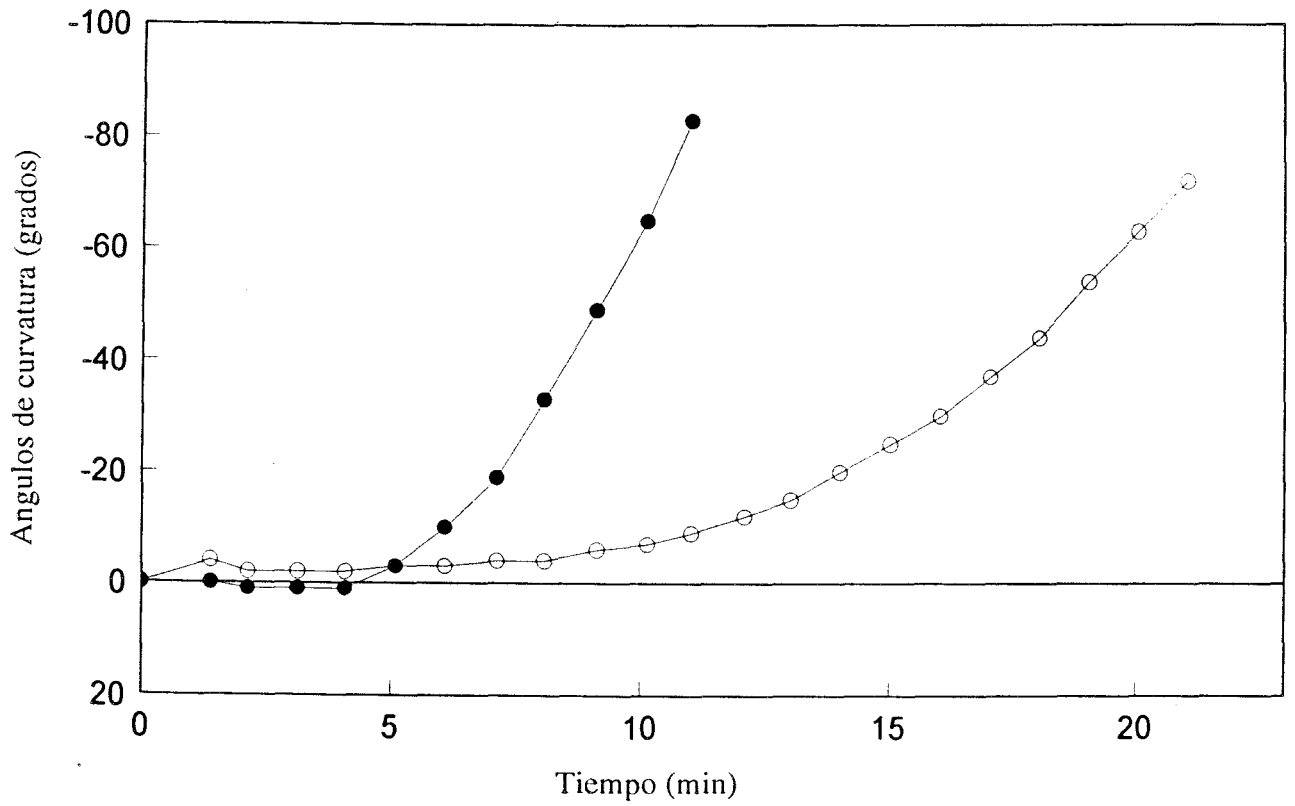
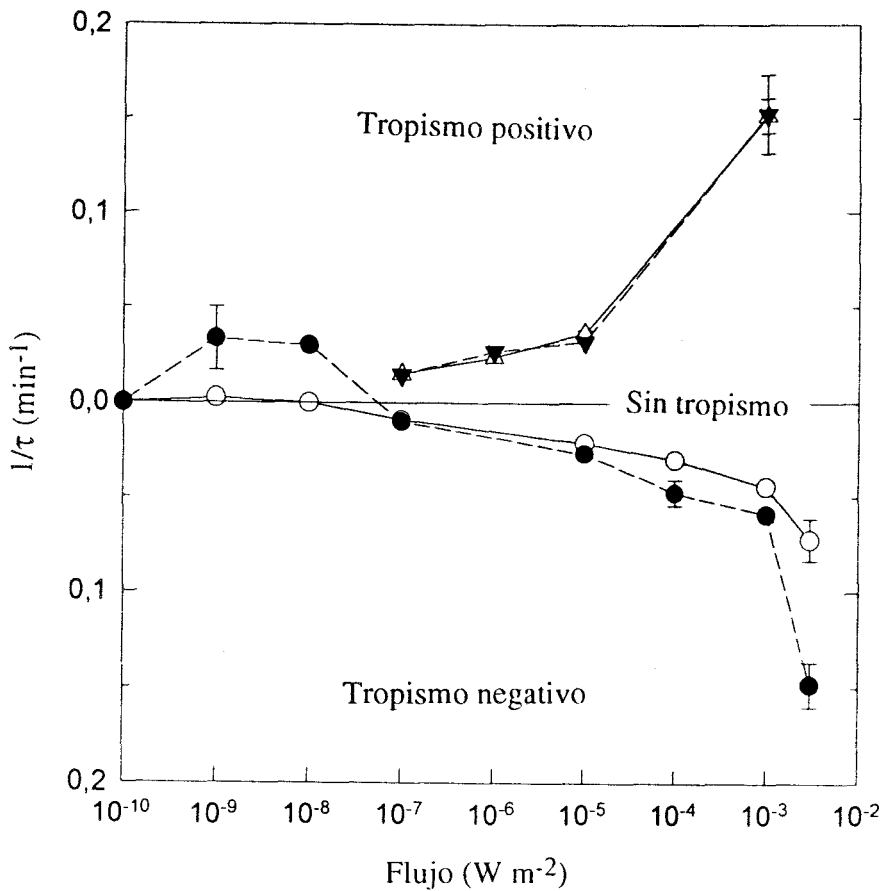


Figura 6. Tropismo negativo de un esporangióforo silvestre ( ● ) y de un esporangióforo mutante ( ○ ) durante irradiación unilateral ultravioleta ( $3 \times 10^{-3} \text{ W m}^{-2}$ ). Los esporangióforos crecieron bajo luz cenital azul ( $0.17 \text{ W m}^{-2}$ ) hasta el momento cero.

La latencia trópica (tiempo entre el comienzo de la irradiación unilateral y el inicio de la curvatura) depende del flujo y el tipo de radiación, ultravioleta o azul (Figura 7). Existen dos diferencias importantes entre los esporangióforos mutantes y silvestres. El tropismo positivo de la estirpe silvestre a bajas intensidades de radiación ultravioleta está ausente en el mutante; como consecuencia, el umbral aparente del mutante es varios órdenes de magnitud superior al del tipo silvestre. A altas intensidades de radiación ultravioleta, los tipos mutante y silvestre presentan tropismo negativo, pero el mutante demora más en responder que el silvestre. Ambas estirpes responden de manera idéntica a la luz azul.



**Figura 7.** Latencia del tropismo de los esporangióforos silvestres (▲, ●) y mutantes C2 \* S591 (Δ, ○) en función del flujo y la longitud de onda de radiación (▲ Δ, 450 nm; ● ○, 277 nm). Las latencias que preceden a los tropismos positivo y negativo se representan por encima y por debajo de la línea cero, respectivamente. Las barras de errores no se muestran cuando son menores que el símbolo.

## DISCUSION

Los mutantes aislados en este trabajo contradicen el punto de vista que afirma que los tropismos a radiación ultravioleta y a luz azul son llevados a cabo por unos mismos mecanismos celulares que absorben la radiación, transducen la señal resultante y la emplean en influir en el crecimiento. Los productos génicos mutados parecen desempeñar un papel en la respuesta a ultravioleta pero no a la luz.

Como la radiación ultravioleta más eficaz es la de 280 nm (Curry y Gruen, 1959; Delbrück y Shropshire, 1960), cabe suponer que es absorbida por proteínas. El tropismo negativo no puede atribuirse a la destrucción por la absorción de radiación ultravioleta de proteínas esenciales para el crecimiento. Si esto fuera así, el lado proximal, al absorber más radiación ultravioleta que el lado distal, crecería más lentamente, lo cual es justamente lo contrario de lo que sucede en la realidad.

Los hechos observados son explicables por destrucción de proteínas si se supone que son particularmente sensibles a la destrucción por ultravioleta una o más proteínas que usualmente frenan el crecimiento. Esta explicación, aunque posible, puede parecer poco probable. Alternativamente, se puede suponer que el tropismo a radiación ultravioleta es un proceso sensorial específico, no idéntico al responsable del tropismo a luz azul.

No se debería concluir que en *Phycomyces* existen productos génicos dedicados exclusivamente a mediar el tropismo a la radiación ultravioleta. El fracaso de obtener mutantes en homocariosis indica que los productos de los genes correspondientes desempeñan una función vital, incluso en el micelio. La alta frecuencia de aparición de los mutantes sugiere que las mu-

taciones inutilizan productos génicos, en vez de causar modificaciones específicas.

Los quince mutantes encontrados se aislaron de dos suspensiones de esporas diferentes; como en la obtención de estas suspensiones intervino la reproducción vegetativa, cabe que un mutante haya sido aislado varias veces de una suspensión. Este no es el caso de los mutantes S213 \* S581, S213 \* S585 y S213 \* S586, que presentan características fenotípicas diferentes del resto de los mutantes hallados. Del tipo mayoritario tenemos al menos dos alelos diferentes, uno de cada suspensión. Uno de ellos es el investigado en detalle, S213 \* S591.

Los resultados no excluyen que las respuestas a la radiación ultravioleta y a la luz azul compartan algunos mecanismos celulares. Presumiblemente, se podrían aislar mutantes afectados en ambas respuestas, pero nuestra búsqueda se orientó a prescindir de los mutantes con tropismo defectivo a la luz azul.

Nuestra búsqueda hubiera encontrado con facilidad dos tipos de mutantes, si hubieran existido: los que presentaran tropismo positivo a altas intensidades de radiación ultravioleta y los completamente recesivos. El procedimiento se diseñó para facilitar el aislamiento de mutaciones recesivas, pero el comportamiento fue dominante en todos los casos. No hay por tanto indicación alguna de componentes celulares no indispensables que medien en el tropismo a la radiación ultravioleta pero no en el tropismo a luz azul.

Debemos postular, por tanto, dos sistemas de fotorrecepción: el sistema "A", que responde a la luz azul, y el sistema "U", que responde a radiación ultravioleta. Como todas las moléculas que absorben luz azul también absorben radiación ultravioleta, el sistema A tendría que responder a ambas radiaciones. Los dos sistemas estimulan el crecimiento.

El sistema A estimula el crecimiento cuando absorbe la energía procedente de las radiaciones, mientras que desconocemos el efecto que el sistema U causa en el crecimiento. El fototropismo positivo mediado por el sistema A se atribuye a que sus fotorreceptores responden a la distribución de luz en la membrana plasmática, fuertemente influenciada por el enfoque.

Si el sistema U estimulara el crecimiento, para explicar el tropismo negativo a ultravioleta bastaría suponer que sus receptores no están en la membrana plasmática. La distribución de energía en la masa del citoplasma y en el tonoplasto (membrana de la vacuola central del esporangióforo) depende muy poco del enfoque (Steinhardt *et al.*, 1989). El tropismo sería negativo porque hay más estímulo en el lado proximal que en el distal. La comparación del efecto de radiación ultravioleta con distintos planos de polarización podría decidir si el receptor de ultravioleta está fijo y orientado en el tonoplasto. En el caso en el que el sistema U desacelerara el crecimiento del esporangióforo, los receptores deberían estar localizados en la membrana plasmática, pues por el efecto de enfoque el lado distal crecería menos que el lado proximal. De este modo, al dar lugar el sistema U a un fotomecismo negativo, se necesitaría un mecanismo responsable del crecimiento neto del esporangióforo. Esto podría explicarse si asumiéramos que el sistema A estimula el crecimiento del esporangióforo en mayor medida bajo irradiación ultravioleta que bajo iluminación azul.

Como el mutante responde de manera normal a la luz azul, debe tener un sistema A normal y un sistema U modificado. El sistema U es responsable del tropismo positivo que tiene lugar a bajas intensidades de radiación ultravioleta ( $8 \times 10^{-8} \text{ W m}^{-2}$ ), pues este tropismo positivo se halla totalmente ausente en el mutante. Esta respuesta podría también estar causada por una interacción entre los dos sistemas de fotorrecepción, A y U.

El tropismo negativo a intensidades más altas de radiación ultravioleta debe ser el resultado de los dos sistemas de fotorrecepción. Se podría predecir que un mutante al que le faltara completamente el sistema U presentaría un tropismo positivo a la radiación ultravioleta, independientemente del flujo de ésta, porque la respuesta sería mediada únicamente por el sistema A. Nuestros mutantes no están desprovistos completamente del sistema U, al menos porque al ser heterocariontes poseen una cierta dosis del alelo normal. El heterocarionte que hemos estudiado debería a la actividad residual del sistema U su respuesta a intensidades altas de radiación ultravioleta, pero con un período de latencia mayor. Este retraso de la respuesta fue lo que nos permitió aislar los mutantes, porque se buscaron con una exposición relativamente breve a intensidades altas de radiación ultravioleta.

**CAPITULO SEGUNDO:  
FUNCIONES DE LOS CAROTENOS**



# INTRODUCCION

## 1. Generalidades

Los pigmentos carotenoides están ampliamente distribuidos por la naturaleza. Son componentes obligatorios de los sistemas fotosintéticos y están también presentes en muchos organismos no fotosintéticos. Son producidos por las plantas, las algas y muchas bacterias y hongos y son adquiridos por ingestión por muchos organismos que no los producen, como los animales.

## 2. Carotenos como fotorreceptores

La luz es una fuente de energía para los organismos fotosintéticos. Todos estos organismos contienen carotenoides y los mutantes que carecen de ellos no pueden hacer la fotosíntesis; además los inhibidores de la carotenogénesis son herbicidas potentes. La explicación de estos hechos es que los carotenos protegen a la célula contra los efectos fotodinámicos debidos a la iluminación de la clorofila, de lo cual hablaremos más adelante. Por otra parte, los carotenos desempeñan el papel de pigmentos auxiliares de la clorofila (Strain, 1949; Siefermann-Harms, 1985), es decir, son capaces de absorber luz de longitudes de onda que la clorofila no puede y transferir la energía al centro de reacción. De esta manera, los carotenos amplían el espectro de absorción de luz solar del organismo fotosintético. Químicamente, es factible que los carotenoides puedan capturar energía para la fotosíntesis porque sus estados singletes son más energéticos que el de la clorofila (Cogdell y Gardiner, 1993).

Los organismos vivos utilizan la luz para obtener información de su ambiente. La luz gobierna multitud de fenómenos, como los ritmos circadianos, los tropismos y muchos procesos bioquímicos. Muchos hongos tienen complejos ciclos de vida y existen multitud de ejemplos donde la transición de una fase a otra del desarrollo está gobernada por la luz (Carlile, 1970; Gressel y Rau, 1983; Kumagai, 1988).

Las flavinas y los carotenos han sido considerados posibles fotorreceptores de *Phycomyces* para luz azul (Presti y Delbrück, 1978; Presti y Galland, 1987; Galland y Lipson, 1987). Además de afectar al crecimiento de los esporangióforos, la luz azul modifica su producción (fotomorfogénesis) y estimula la síntesis de  $\beta$ -caroteno (fotocarotenogénesis). El  $\beta$ -caroteno y otros carotenos coloreados no son necesarios para la fotocarotenogénesis, como lo demuestra el que los mutantes *carB* de *Phycomyces*, que sólo contienen el precursor incoloro fitoeno, incrementan el contenido de éste cuando son estimulados por luz (Bejarano *et al.*, 1991). Este es un fuerte argumento en contra de que el fotorreceptor sea el caroteno. El mismo argumento se puede extender al fototropismo de *Phycomyces* (Bergman *et al.*, 1973; Presti *et al.*, 1977) y a la fotocarotenogénesis de *Neurospora crassa* (Lansbergen *et al.*, 1976) y de *Gibberella fujikuroi* (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). Los mutantes *carB*, sin embargo, carecen de otras respuestas a la luz, como es el caso de la fotomorfogénesis (Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1990). El  $\beta$ -caroteno desempeña un papel importante (quizás como fotorreceptor) en estas respuestas.

### 3. Carotenos como precursores

El  $\beta$ -caroteno es un componente casi esencial de las dietas de los mamíferos porque es la fuente usual de retinol (vitamina A), que desempeña funciones muy importantes en visión, desarrollo e integridad celular (Frolik y Roller, 1981; Goodall *et al.*, 1980; Hagins, 1972; Hagins y Yoshikami, 1974). El déficit de retinol en las poblaciones humanas causa cegueras irreversibles en millones de personas y daños en otras muchas. El retinal es el grupo prostético de los pigmentos visuales (rodopsinas) de los animales. Las rodopsinas se localizan en las membranas de las estructuras fotorreceptoras especializadas de los ojos de los animales. La absorción de luz por parte del retinal de las rodopsinas induce unos cambios

conformacionales en el conjunto, que se traducen en alteraciones en las propiedades de permeabilidad de las membranas. El ácido retinoico tiene efectos sobre el crecimiento animal, de manera que si se administra este compuesto a animales alimentados con una dieta carente de retinol, éstos sufren deterioros en la visión y en la capacidad reproductora, pero siguen creciendo normalmente.

El  $\beta$ -caroteno es precursor de los ácidos trispóricos (Austin *et al.*, 1970), hormonas de *Phycomyces* esenciales para completar su ciclo sexual. Los mutantes sin  $\beta$ -caroteno son sexualmente incompetentes, aunque contengan licopeno o fitoeno. Estos mutantes no pueden estimular a otro individuo, aunque sí son estimulables por hormonas sexuales de otro con suficiente contenido de  $\beta$ -caroteno (Sutter, 1975).

El  $\beta$ -caroteno posee un papel antitumoral, puesto que reduce el número de células transformadas en cultivos y la incidencia de tumores en animales expuestos a oncógenos químicos y físicos (Dorogokupla *et al.*, 1973; Epstein, 1973; Pung *et al.*, 1988; Mathews-Roth y Krinsky, 1987); en los organismos procarióticos se le ha demostrado una actividad anti-mutagénica (Santamaria *et al.*, 1984). El retinol y otros retinoides tienen el mismo efecto (Hicks, 1983). Los carotenoides tienen efecto antitumoral por sí mismos, aparte de su conversión a retinoides, como lo demuestran los efectos positivos de carotenoides que no se convierten en retinol, como la cantaxantina (Santamaria *et al.*, 1983; Mathews-Roth y Krinsky, 1987). Puede que haya tumores sensibles a retinol y no a carotenoides, en los que la cantaxantina no tiene efecto (Mathews-Roth *et al.*, 1991). Los estudios epidemiológicos indican que las personas que comen más carotenoides y las que poseen una mayor concentración de retinol en sangre tienen menos probabilidad de contraer cáncer (Peto *et al.*, 1981; Wolf, 1982). El papel antitumoral del retinol se debe a su capacidad de estimular las respuestas inmunológicas: el retinol sólo protege contra tumores inmunológicamente incompatibles con el animal (Felix *et al.*, 1976).

El  $\beta$ -caroteno parece inducir mejorías en enfermedades vasculares y circulatorias (Gerster, 1991; Jialal *et al.*, 1991).

## 4. Radioprotección por carotenos

### 4.1. Luz

La luz puede producir daños en los organismos, sobre todo en presencia de ciertos compuestos llamados fotosensibilizadores. Estos daños frecuentemente requieren la presencia de oxígeno molecular (inactivación fotodinámica).

Se atribuye a los carotenoides coloreados el papel de protectores de la célula contra los efectos destructivos fotodinámicos producidos por la iluminación de la bacterioclorofila y la clorofila. Los carotenoides protegerían contra la fotooxidación de los constituyentes de la célula. Estos compuestos pueden realizar esta función en estos organismos porque el bajo nivel energético de su estado triplete les permite desactivar los estados triplete de la clorofila y singlete del oxígeno (Cogdell y Gardiner, 1993).

Griffiths *et al.* (1955) encontraron un mutante con fitoeno, pero sin carotenoides coloreados, de *Rhodobacter sphaeroides*, una bacteria púrpura fotosintética, llamada entonces *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Este mutante podía sobrevivir realizando la fotosíntesis en condiciones de anaerobiosis, o bien en oscuridad por oxidación aeróbica de compuestos orgánicos, pero la exposición simultánea a luz y aire le causaba la muerte.

Por extensión de los resultados anteriores, se pensó que los carotenoides desempeñarían la misma función fotoprotectora en los organismos no fotosintéticos. En este caso, los fotosensibilizadores podrían ser compuestos usuales en las células (por ejemplo, la riboflavina y los citocromos) o compuestos exógenos (como el azul de metileno y el azul de toluidina).

Los tipos silvestre de *Micrococcus* sp (Mathews y Krinsky, 1965) y de *Sarcina lutea* (Mathews y Siström, 1960; Mathews y Krinsky, 1965) expuestos a luz azul en presencia de azul de toluidina sobreviven sin dificultad, mientras que los mutantes sin color de estos organismos mueren en las mismas condiciones. La composición de carotenoides de *Sarcina lutea* varía en el silvestre y tres mutantes según las condiciones de cultivo

e iluminación; el grado de fotoprotección frente a la luz visible en presencia de azul de toluidina y de aire no parece depender de la composición relativa de la mezcla de carotenoides, sino de la cantidad total (Mathews y Krinsky, 1970). *Mycobacterium* no produce carotenoides cuando se cultiva en oscuridad y muere si se expone a una luz intensa; cuando se cultiva en una luz tenue, induce la carotenogénesis y resiste la exposición posterior a luz intensa (Wright y Rilling, 1963). Los genes de biosíntesis de carotenoides de *Erwinia herbicola* clonados y expresados en *Escherichia coli* protegen a esta bacteria cuando se expone simultáneamente a luz visible y azul de toluidina. Si se la expone a radiación ultravioleta A acompañada de compuestos fotosensibilizadores, como el fenilheptatrieno, que ejercen su efecto letal sobre las membranas celulares, los productos de estos genes protegen a la bacteria; sin embargo, esta protección no se produce si la radiación va acompañada de mutágenos como el 8-metoxipsoraleno o el psoraleno con diferentes lugares de producción de daños en la célula (Tuveson *et al.*, 1988).

La inactivación fotodinámica del conidio de *Neurospora crassa* tiene lugar por acción de la luz azul en presencia de azul de metileno, azul de toluidina o naranja de acridina. Las cepas deficientes en carotenoides son más sensibles a la inactivación en presencia de azul de metileno o azul de toluidina, pero no en la de naranja de acridina. El azul de metileno y el azul de toluidina ejercen su efecto sobre la membrana celular donde los carotenoides están accesibles, mientras que el naranja de acridina daña el núcleo, lejos de la influencia protectora de los carotenoides (Thomas *et al.*, 1981). La luz visible es letal para *Ustilago violacea*, sobre todo en presencia de azul de toluidina. Un mutante sin carotenos es más sensible que uno con fitoeno y éste, a su vez, más sensible que las estirpes con carotenos coloreados (Will *et al.*, 1984).

Los carotenoides están presentes en muchos ojos y fotorreceptores (Kirschfeld, 1982) donde su principal función sería la de protegerlos de los efectos deletéreos de la luz. Así, por ejemplo, las células de las moscas que contienen luteína y zeaxantina sufren menos daños cuando se exponen a radiación ultravioleta que las que carecen de esos carotenoides (Zhu y Kirschfeld, 1984). En la mácula del ojo humano, los carotenoides podrían contribuir además a evitar la aberración cromática en la retina (disminuyendo la acción del componente azul de la luz).

Algunos enfermos son muy sensibles a la luz porque sus células contienen fotosensibilizadores, como las porfirinas. El consumo de  $\beta$ -caroteno mejora la capacidad de exponerse a la luz en los afectados por varias de estas enfermedades, como la protoporfiria eritropoyética (Mathews-Roth, 1982; Mathews-Roth, 1984).

#### 4.2. Radiaciones

Un tipo silvestre de *Micrococcus* sp y un mutante sin color sobreviven de igual manera cuando se exponen a radiaciones ultravioleta y gamma; lo mismo ocurrió en *Sarcina lutea* frente a las radiaciones X y ultravioleta (Mathews y Krinsky, 1965).

Los conidios de la estirpe silvestre de *Neurospora* sobreviven ligeramente mejor a la radiación ultravioleta A que los de un mutante albino (Thomas *et al.*, 1981; Blanc *et al.*, 1976); no existen diferencias en la supervivencia de los conidios cuando se exponen a radiación ultravioleta B o C (Blanc *et al.*, 1976).

El fitoeno inyectado da lugar a una disminución del eritema inducido por la acción de la radiación ultravioleta B (280 - 315 nm) en conejos de indias, aunque la muerte de algunos animales oscurecen las conclusiones por interferir con los resultados (Mathews-Roth y Pathak, 1975). El consumo de  $\beta$ -caroteno, incluso en grandes cantidades y por mucho tiempo, sólo produce una protección insignificante en los seres humanos frente al eritema inducido por el sol (Mathews-Roth *et al.*, 1972).

#### 5. Posibles mecanismos de acción de los carotenoides

Los efectos biológicos descritos deben atribuirse a las propiedades físicas y químicas de los carotenoides. Los carotenoides son capaces de tamponar los estados excitados del oxígeno y de los pigmentos fotosensibilizados en tejidos vegetales y animales (Kirschfeld, 1982). *In vitro*, los carotenoides son capaces de capturar especies excitadas, como el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) formado por fotosensibilización de moléculas como la clorofila o la riboflavina al ser iluminadas (Krinsky, 1991). La velocidad de reacción entre carotenoides y oxígeno singlete aumenta con la longitud de

la cadena de los enlaces dobles conjugados (Foote *et al.*, 1970). Los niveles de energía de los estados tripletes de varios carotenoides coloreados están por debajo del estado triplete del oxígeno, y por tanto pueden proteger contra él. El fitoeno no tiene esta propiedad (Bensasson *et al.*, 1976).

Los productos primarios, resultantes de la acción de la radiación ultravioleta sobre los lípidos insaturados, son radicales formados por la expulsión de un átomo de hidrógeno (Halliwell y Gutteridge, 1989). Estos radicales pueden reaccionar con oxígeno dando lugar a peroxirradicales, capaces de iniciar una reacción en cadena de peroxidación lipídica y destrucción de liposomas. La absorbencia por parte de los carotenoides de la radiación ultravioleta C (200 - 290 nm) es muy pequeña en comparación con la de los lípidos insaturados; por ello, son mucho menos eficientes en mantener la integridad de los liposomas en preparaciones irradiadas con ultravioleta C en comparación con las fotosensibilizadas con luz azul (Krinsky y Deneke, 1982). Se ha propuesto que los carotenoides pueden ser sustratos competitivos en las reacciones de peroxidación lipídica, porque capturan  $^1O_2$  y reaccionan con él o, directamente, con los radicales libres formados (Krinsky y Deneke, 1982; Burton, 1989). Se ha demostrado que la acción simultánea del  $\alpha$ -tocoferol y del  $\beta$ -caroteno es mucho más efectiva en la inhibición de las reacciones de peroxidación lipídica que si ambos compuestos actúan independientemente (Palozza y Krinsky, 1992). Por otra parte, la eficacia antioxidante del  $\beta$ -caroteno depende de los tipos y las proporciones de radicales libres que se generen y el lugar de la célula donde se produzcan (Palozza *et al.*, 1992). El poder antioxidante del  $\beta$ -caroteno es mayor a bajas tensiones de oxígeno; el  $\alpha$ -tocoferol es más efectivo a altas tensiones de oxígeno (Palozza y Krinsky, 1991).

## **6. Posible papel de los carotenoides en el envejecimiento celular**

Las especies animales más longevas están mejor protegidas contra los productos resultantes del metabolismo del oxígeno (Tolmasoff *et al.*, 1980). El mayor determinante de la longevidad y de la capacidad funcional de los sistemas biológicos parece ser el mantenimiento de la integridad

macromolecular y funcional de la célula, principalmente del ADN (Bergtold *et al.*, 1988).

Existe una correlación positiva significativa entre la vida media de algunos mamíferos y sus concentraciones de carotenoides en el suero y en el cerebro, de tal manera que estos compuestos podrían proteger contra el cáncer y contribuir a la longevidad. El retinol no parece tener importancia en estas funciones (Cutler, 1984). La autooxidación de los tejidos *in vivo* parece correlacionar bastante bien con la tasa de peroxidación *in vitro*. Esto sugiere que el envejecimiento de los mamíferos es causado, en parte, por la peroxidación de los tejidos, iniciada por radicales de oxígeno, y que la longevidad de las diferentes especies de mamíferos se debe, en gran medida, a las diferencias de capacidad potencial de peroxidación de los tejidos. La composición de las membranas y la concentración de antioxidantes juegan un papel importante en la determinación de la sensibilidad de las células a los radicales de oxígeno y contribuyen a la longevidad de la especie humana (Cutler, 1985).

## 7. Síntesis y regulación de los carotenos en *Phycomyces*

Ya hemos adelantado en la introducción general de este trabajo que *Phycomyces* produce carotenos. Se dispone de una amplia batería de mutantes de este hongo con diferentes propiedades carotenogénicas, por tener esta ruta interrumpida en distintos pasos o por modificaciones en la regulación. Algunos no producen  $\beta$ -caroteno (*carB*, *carR* y *carRA*); otros acumulan cantidades anormales de este pigmento: muy baja (*carA*), baja (*carC*) o muy alta (*carS*).

La carotenogénesis está regulada por su producto final, el  $\beta$ -caroteno, que reprime su propia síntesis cuando alcanza una determinada concentración (Bejarano *et al.*, 1988). Cuando se bloquea parcialmente la ruta mediante inhibidores químicos o por mutaciones rezumantes de los genes *carB* o *carR*, la concentración final de  $\beta$ -caroteno se mantiene y aumenta el flujo de moléculas en la ruta; esto provoca un incremento en la acumulación de intermediarios.

Para que funcione la retroinhibición es necesaria la presencia del producto del gen *carS* (pS). Su ausencia funcional (mutaciones recesivas



del gen *carS*) provoca la activación de la ruta (mutantes superproductores).

Por otro lado, el producto A (pA) del gen *carRA* es esencial para la carotenogénesis. Su pérdida absoluta conlleva a un bloqueo total de la ruta que ninguna de las estimulaciones conocidas es capaz de romper.

La concentración del  $\beta$ -caroteno acumulado en los dobles mutantes *carA carS* es el resultado de las acciones contrarias de ambas mutaciones. Una posible explicación para este comportamiento es que la regulación de la ruta por producto final consista en la inactivación del pA por el  $\beta$ -caroteno y el pS. No se puede precisar la naturaleza exacta de la interrelación entre los tres elementos, aunque una posibilidad es que el  $\beta$ -caroteno se una a pA y pS mediante el reconocimiento de los extremos de las moléculas y forme un complejo "pA :  $\beta$ -caroteno : pS" que bloquee la ruta. En ausencia de  $\beta$ -caroteno no se podría formar el complejo que inhibe a pA.

Según esta hipótesis, el pS de los mutantes *carS* albinos tendría más afinidad por pA y se necesitaría, por tanto, menos  $\beta$ -caroteno para inhibir la ruta. La dominancia de estas mutaciones apoya esta hipótesis.

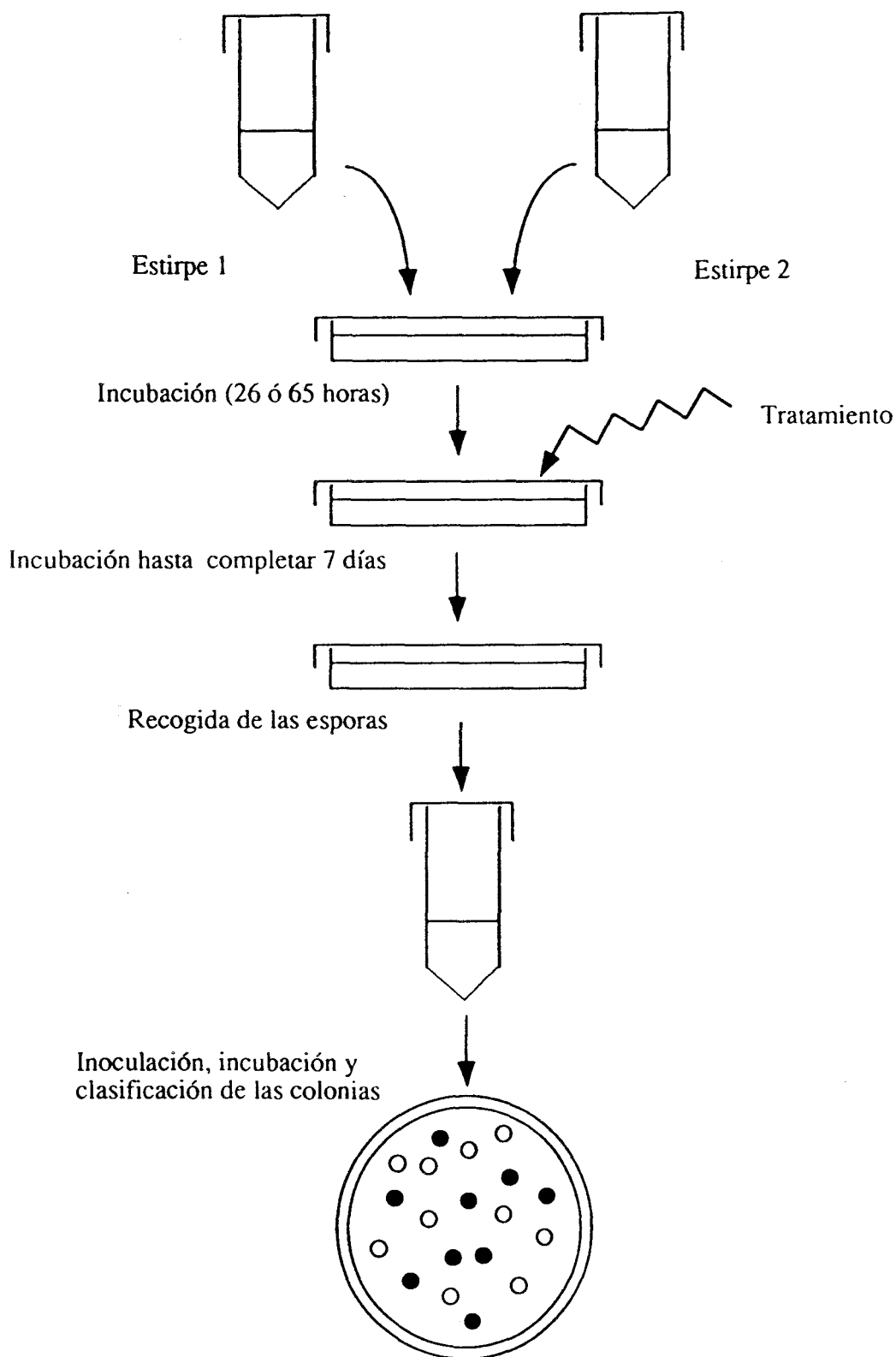
## 8. Objetivos del trabajo

El resumen efectuado sobre los efectos fisiológicos de los carotenoides muestra que no existen conclusiones claras al respecto. En la literatura se encuentran algunas propuestas para el estudio de la influencia de los carotenos en situaciones extremas agudizadas por pigmentos fotosensibilizadores (Griffin, 1994). Tal como describiremos en los siguientes apartados, la competición entre estirpes con distintas propiedades carotenogénicas y sometidas a diferentes condiciones adversas (radiaciones y ataques químicos), nos ayudará a dilucidar si los carotenoides contribuyen a que las células se recuperen de los tratamientos. Algunos experimentos nos permitirán conocer la importancia del  $\beta$ -caroteno en el envejecimiento celular.

## RESULTADOS

### 1. Diseño del experimento

En los experimentos se hace competir a parejas de estirpes bajo diferentes condiciones adversas (Figura 8). Dos estirpes que difieren en la producción de carotenos se sembraron juntas en agar mínimo. A las 26 ó a las 65 horas (según el tratamiento) de incubación a 22 °C en la oscuridad, los micelios se sometieron a diferentes tratamientos nocivos y se continuó la incubación hasta completar los siete días. Se recogieron, lavaron y contaron las esporas al microscopio. Se inocularon en agar patata ácido unas 100 esporas por caja, se incubaron y se clasificaron según su color. Las parejas de estirpes se representan siempre con los mismos símbolos (Tabla II). Los símbolos cerrados representan pares de estirpes que difieren en la cantidad de caroteno que acumulan (alto, silvestre o bajo); los símbolos abiertos representan pares de estirpes que contienen concentraciones parecidas de carotenos diferentes ( $\beta$ -caroteno, licopeno, fitoeno). La estirpe C115 es a la vez la "alta" en la primera serie de comparaciones y la "beta" en la segunda serie.



**Figura 8.** Esquema del experimento de competencia entre estirpes con distintos contenidos de carotenos bajo diferentes tratamientos adversos.

**Tabla II.** Estirpes de *Phycomyces* que se cultivan juntas, sus fenotipos y sus símbolos.

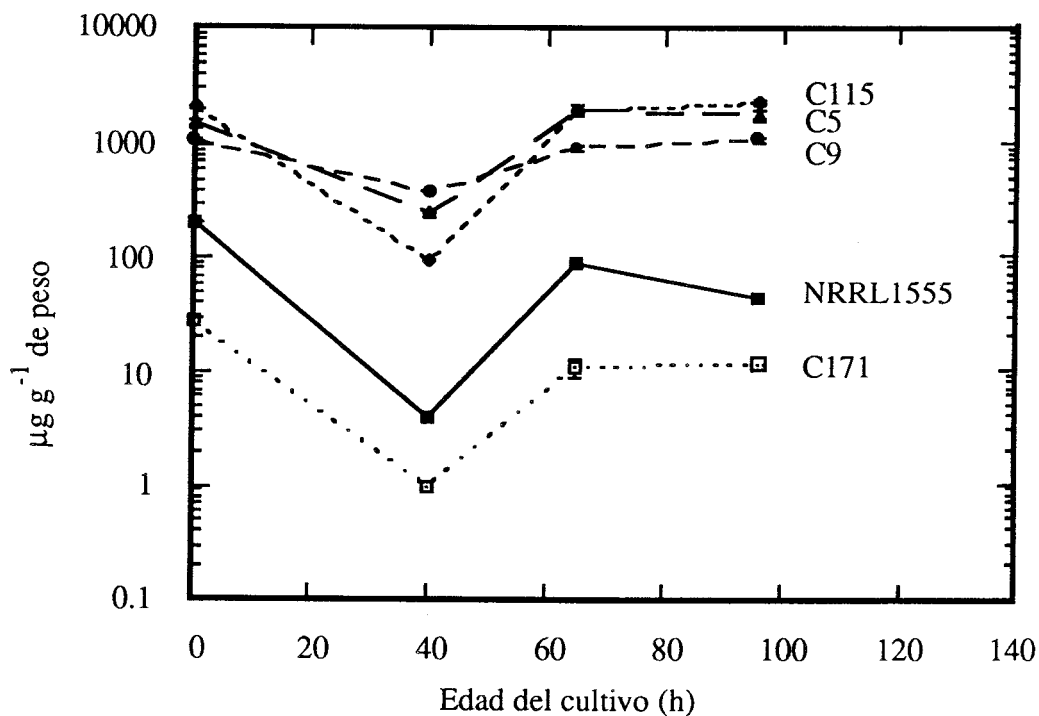
Estirpes	Fenotipos	Símbolos
NRRL1555 y C115	Silvestre y alta	▲
C171 y NRRL1555	Baja y silvestre	■
C171 y C115	Baja y alta	●
C5 y C115	Fitoeno y beta	△
C9 y C115	Licopeno y beta	□
C5 y C9	Fitoeno y licopeno	○

Uno de los indicios de daños fue la disminución de la cosecha de esporas en los cultivos tratados (Figuras 10, 13, 16 y 18). Este no fue siempre un buen indicador, ni se puede esperar que lo sea, pues tras ser sometido el cultivo a las condiciones adversas se le da tiempo suficiente para recuperarse y esporular. Por otra parte, las esporas son estructuras de resistencia y, como tales, probablemente proliferen en las situaciones adversas. Para estar seguros del daño causado, cuando no se observaba disminución en la cosecha de esporas, se utilizaron otros criterios como la disminución de la velocidad de crecimiento de los micelios (en los experimentos con luz blanca y radiación gamma) y la supervivencia de un número escaso de colonias aisladas (con las dosis más elevadas de radiación ultravioleta C y agua oxigenada). Se descartaron los experimentos en que quedaban muy pocos supervivientes (menos de 20 colonias) porque darían lugar a grandes oscilaciones estadísticas.

Aunque las estirpes son muy conocidas, comprobamos el contenido de carotenos en cultivos de 0 a 96 horas de edad en las condiciones de los experimentos (Figura 9). Los cultivos usuales (26 horas en medio sólido)

producen tan escasa masa micelial y tan adherida al agar que no se pueden analizar sus carotenos. Los cultivos de 40 horas se hicieron en medio líquido para evitar el problema de la adherencia de agar a los micelios. En los cultivos más viejos, el error debido a la mezcla de agar y micelios se considera despreciable, al poder retirarse el agar con facilidad.

Según los resultados mostrados en la Figura 9, podemos afirmar que las diferencias de los mutantes en cuanto a sus contenidos de carotenos se mantienen a las edades a las que las diferentes estirpes de *Phycomyces* recibieron los tratamientos.

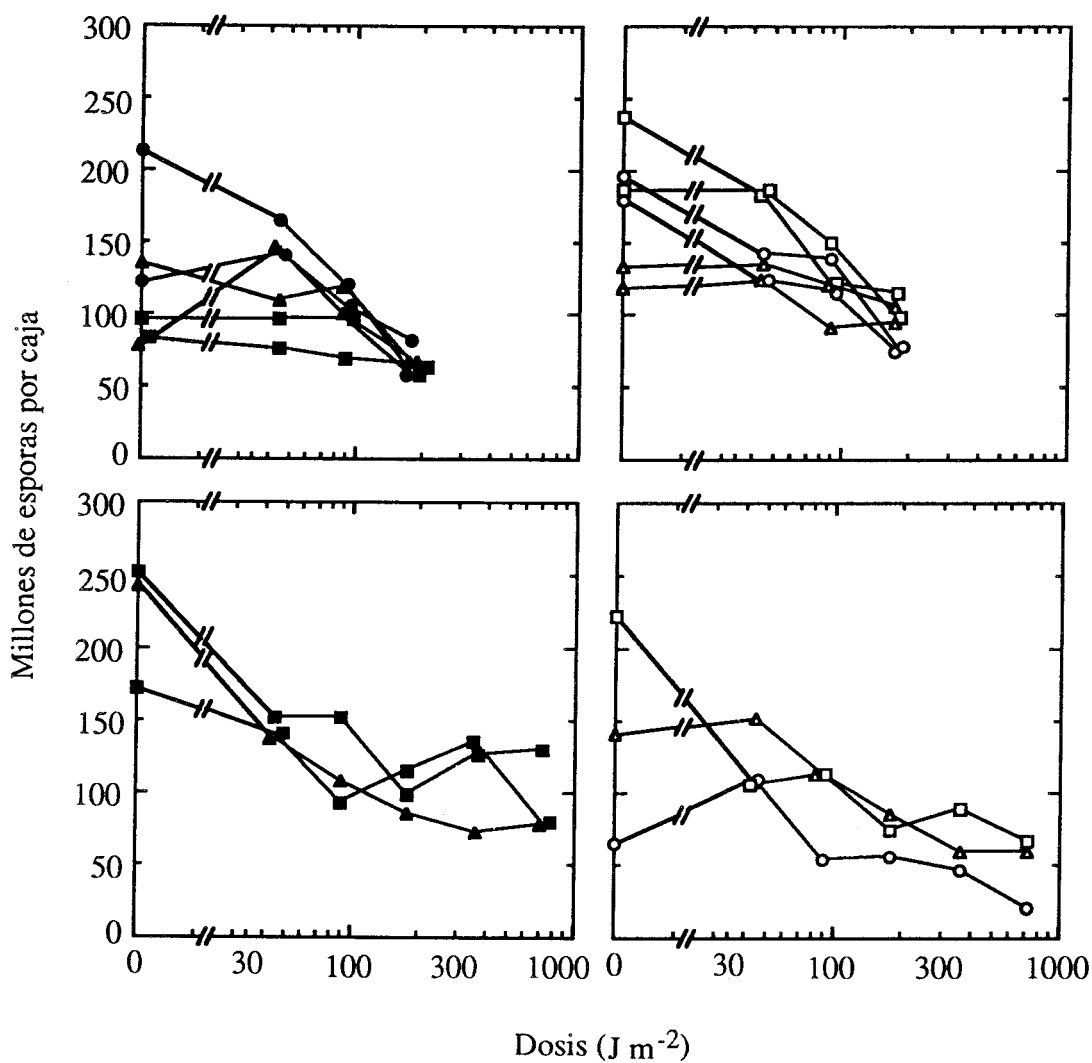


**Figura 9.** Contenido de carotenos de varias estirpes de *Phycomyces*. Media y error típico en dos determinaciones independientes del contenido de fitoeno en la estirpe C5, de licopeno en C9 y C171 y de  $\beta$ -caroteno en C115 y NRRL1555.

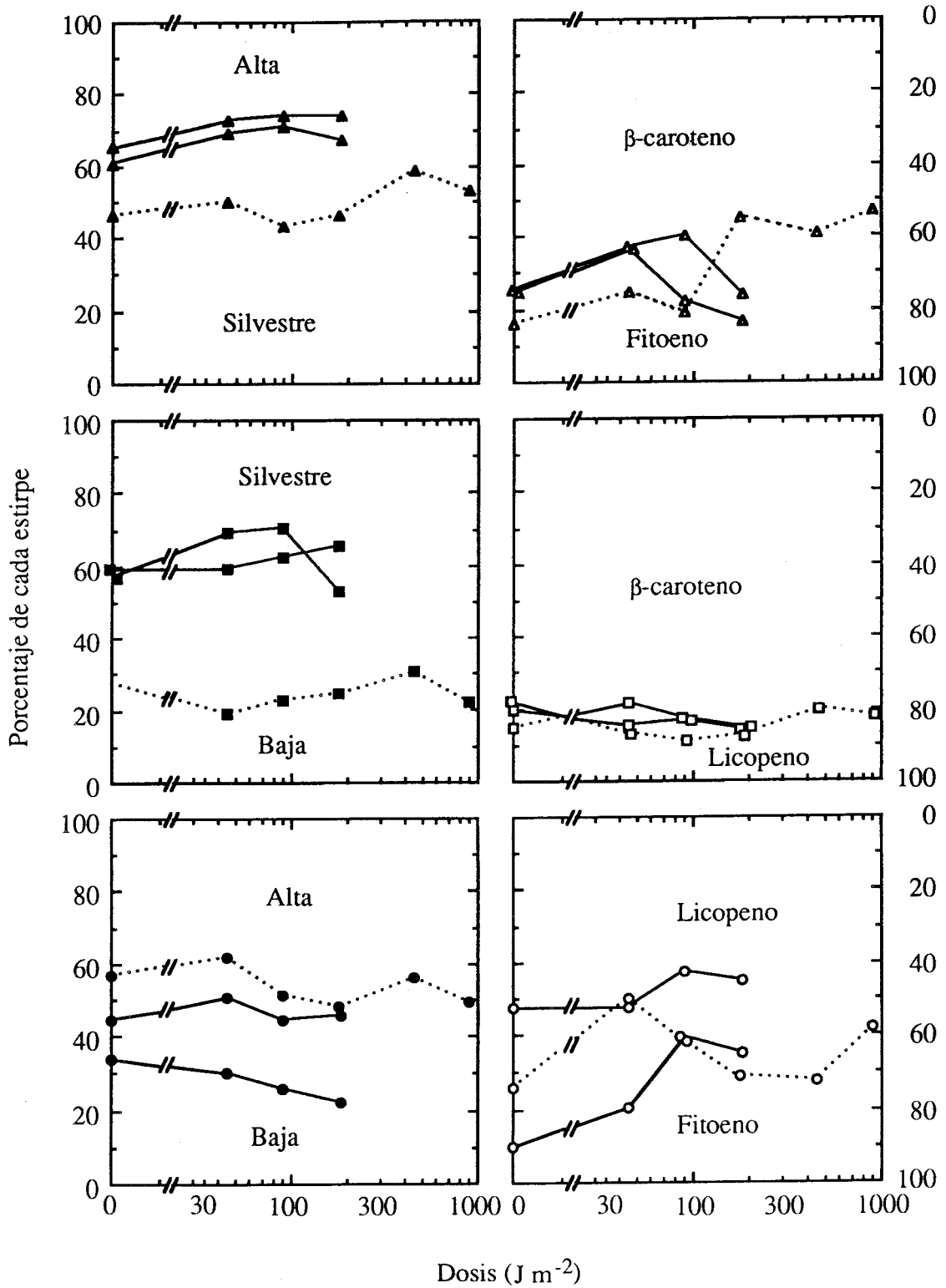
## **2. Exposición a radiación ultravioleta C**

Para elegir las dosis de radiación ultravioleta C aplicadas, nos basamos en el descenso en la producción de esporas (Figura 10) y en la aparición de pocas colonias (menos de 20) a dosis muy altas, como es el caso de las dosis de 450 y 900 J m<sup>-2</sup> aplicadas a cultivos de 26 horas.

La abundancia relativa de cada estirpe se mantuvo aproximadamente constante en todos los casos. Ninguna estirpe predominó claramente sobre su pareja tras la exposición a radiación ultravioleta C (Figura 11).



**Figura 10.** Cosecha de esporas en cultivos mixtos expuestos a radiación ultravioleta C. En las gráficas superiores se representan los cultivos irradiados a las 26 horas de edad; en las gráficas inferiores se representan los cultivos irradiados a las 65 horas de edad. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.



**Figura 11.** Producción relativa de esporas de dos estirpes en cultivos mixtos expuestos a ultravioleta C. Los trazos continuos representan los cultivos mixtos irradiados a las 26 horas de edad. Los trazos discontinuos representan los cultivos mixtos irradiados a las 65 horas de edad. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.



### **3. Exposición a luz blanca**

Las dosis de luz blanca que podemos aplicar en nuestro laboratorio no son suficientes para causar daños en los micelios. Para inducir estos daños se cultivaron los micelios en presencia de riboflavina, fotosensibilizador existente en la naturaleza. La concentración de riboflavina que se utilizó en las exposiciones, así como las dosis con las que se irradiaron las parejas de estirpes se eligieron tras hacer un seguimiento de las velocidades de crecimiento de micelios obtenidos inoculando unas 100 esporas en el centro de una caja de Petri (Figura 12). El retraso en el crecimiento es una manifestación externa de algunos de los daños producidos en el micelio por la acción combinada de la riboflavina y la luz visible. La concentración de riboflavina que se eligió para exponer los cultivos de las parejas de estirpes a luz blanca fue de 10 mg l<sup>-1</sup>. Las cosechas de esporas de los cultivos mixtos tienen una tendencia a disminuir a las dosis mayores aplicadas (Figura 13). Ninguna estirpe predomina claramente sobre su pareja tras ser expuestas simultáneamente a luz blanca en presencia de riboflavina (Figura 14).

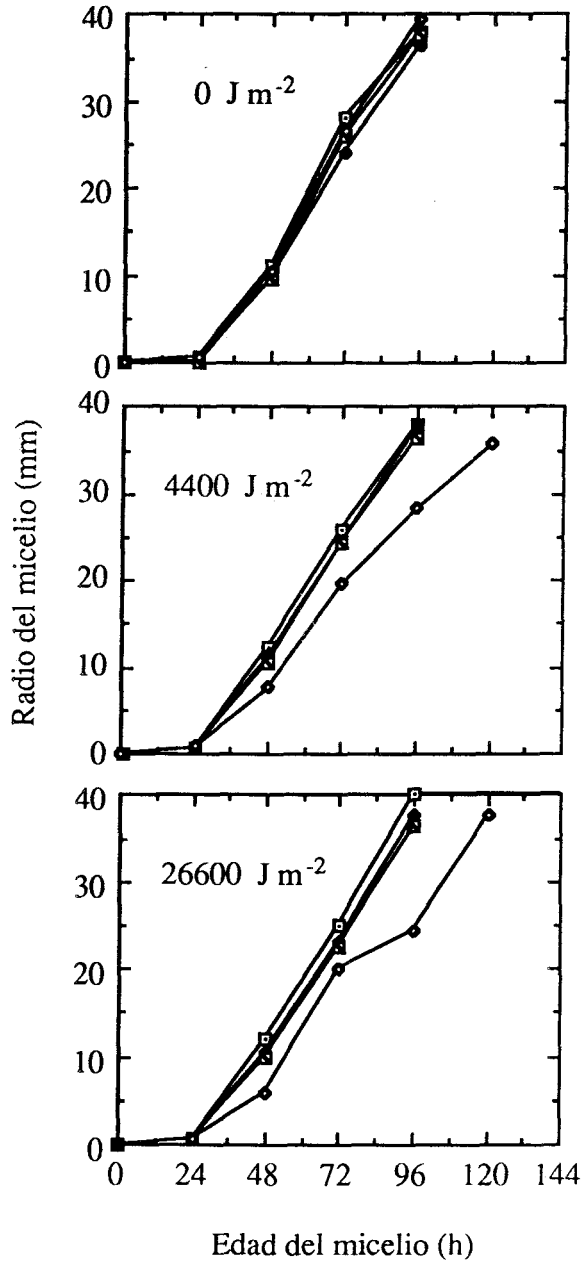
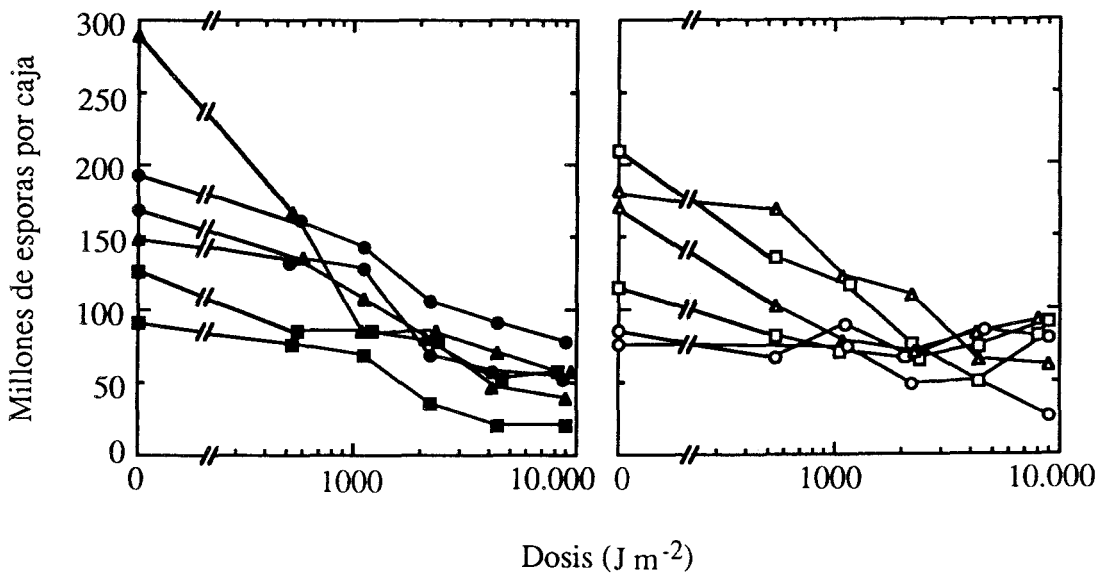


Figura 12. Velocidad de expansión micelial en cultivos expuestos a diferentes dosis de luz blanca y con varias concentraciones de riboflavina: 0 (—□—), 0.1 (—●—), 1 (—■—) y 10 (—○—) µg ml<sup>-1</sup>.



**Figura 13.** Cosecha de esporas en cultivos mixtos expuestos a luz blanca. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.

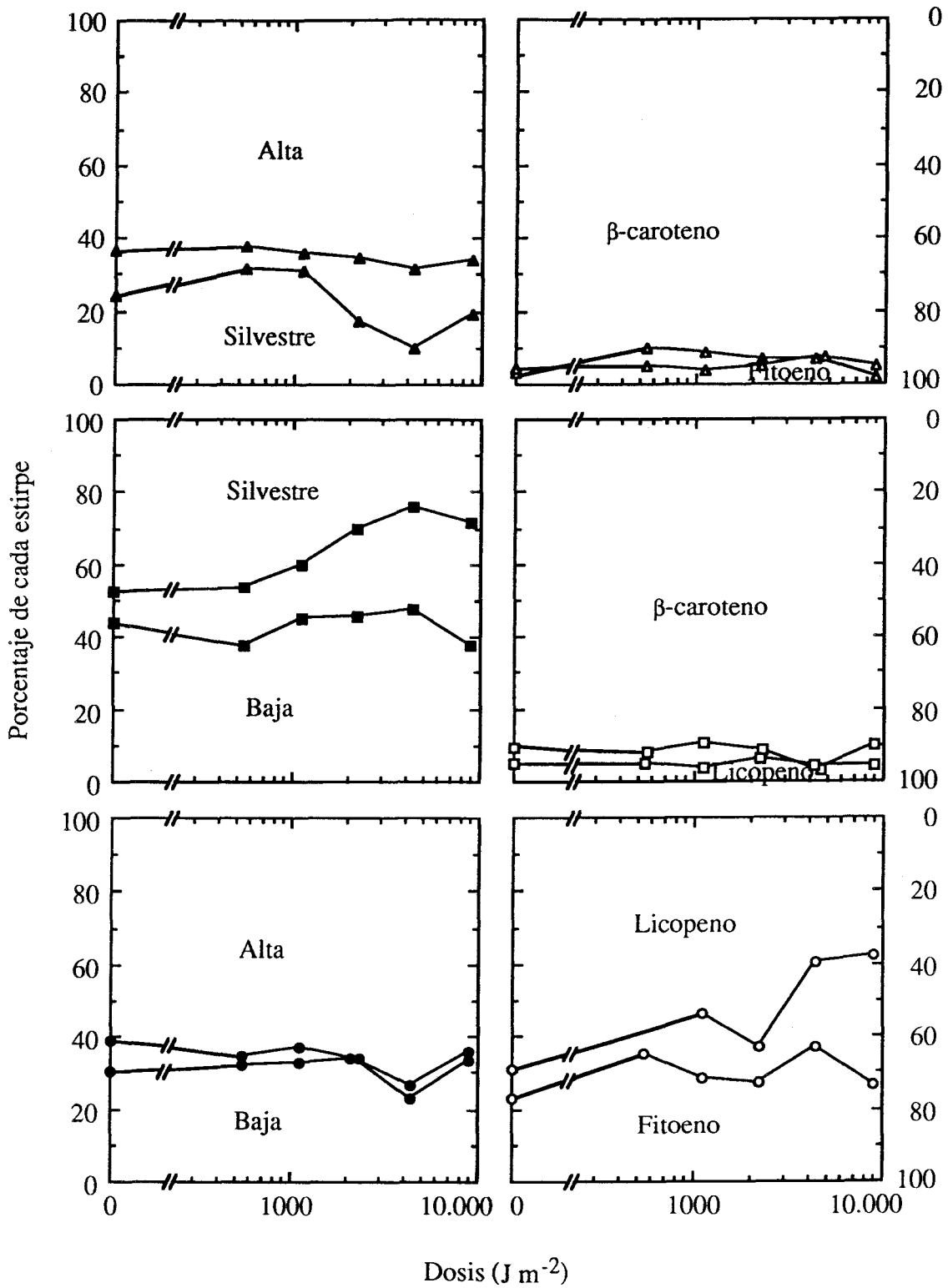
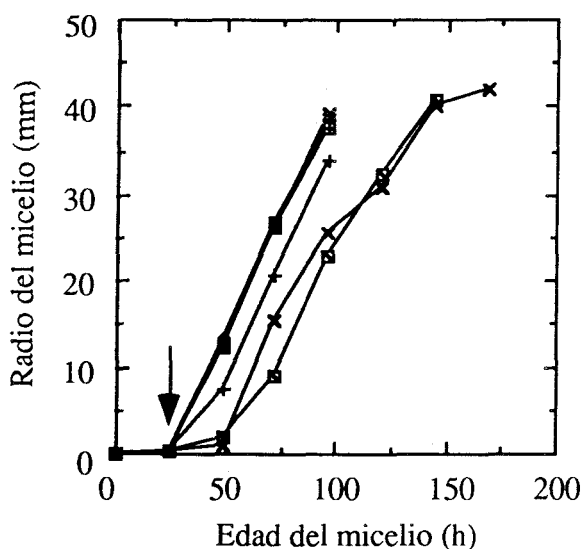


Figura 14. Producción relativa de esporas de dos estirpes en cultivos mixtos expuestos a luz blanca. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.

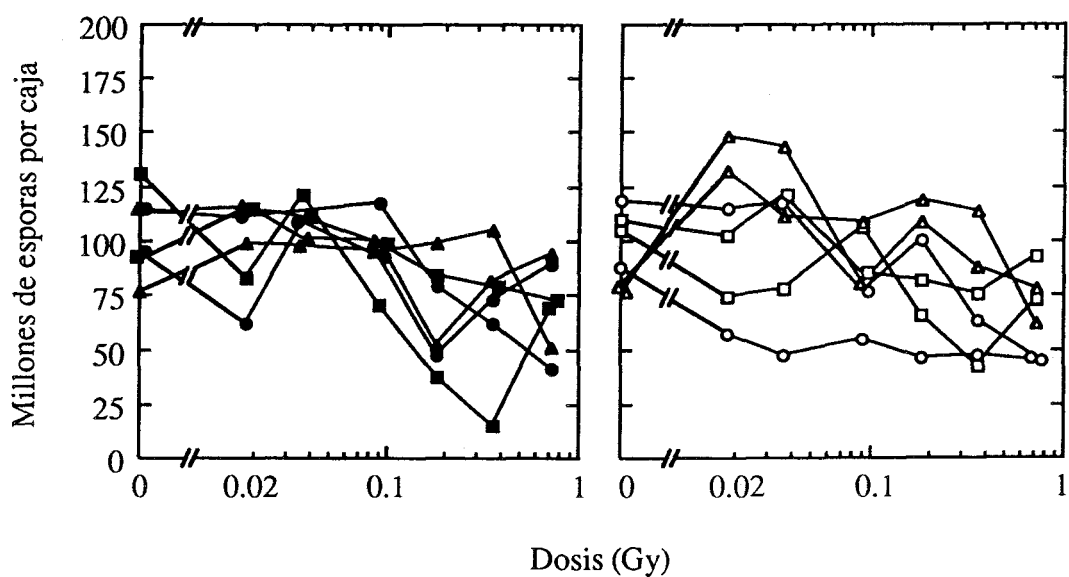
#### 4. Exposición a radiación gamma

Los daños causados por la radiación gamma retrasan el crecimiento micelial subsiguiente (Figura 15). La producción de esporas muestra una correlación negativa con las dosis de radiación (Figura 16).

Ninguna estirpe predomina claramente sobre su pareja tras la exposición a radiación gamma (Figura 17). Los resultados de los cultivos de la estirpe baja en carotenos (C171) y la alta en  $\beta$ -caroteno (C115) presentan fuertes oscilaciones, pero no una tendencia clara.



**Figura 15.** Crecimiento de micelios expuestos a radiación gamma. Los micelios obtenidos inoculando unas 100 esporas silvestres en el centro de una caja de Petri se expusieron a las 26 horas (flecha) a 0 (—□—), 0.02 (—●—), 0.04 (—■—), 0.09 (—+—), 0.18 (—x—), 0.36 (—◻—) y 0.73 (—x—) Gy.



**Figura 16.** Cosecha de esporas en cultivos mixtos expuestos a radiación gamma. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.

Funciones de los carotenos

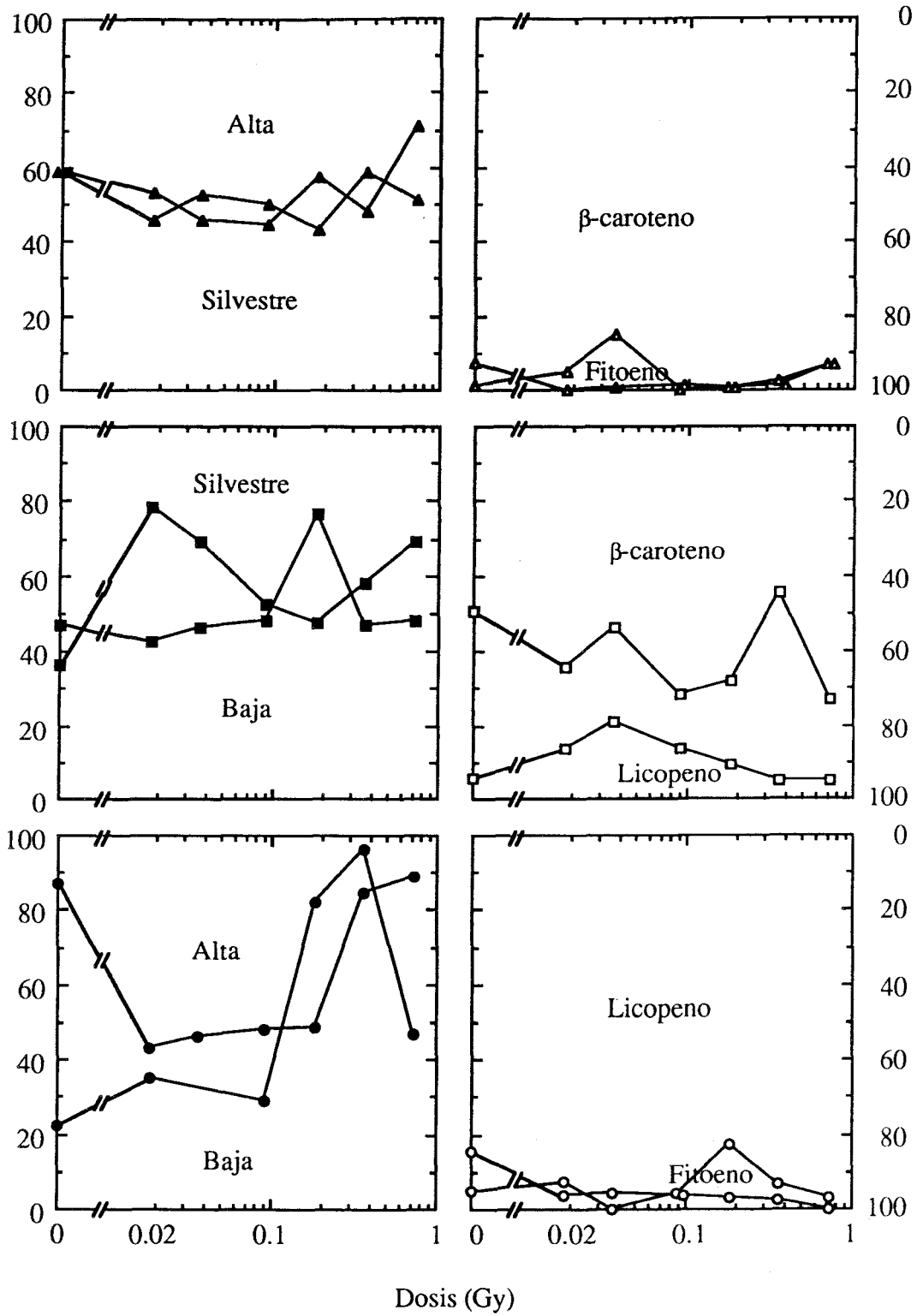
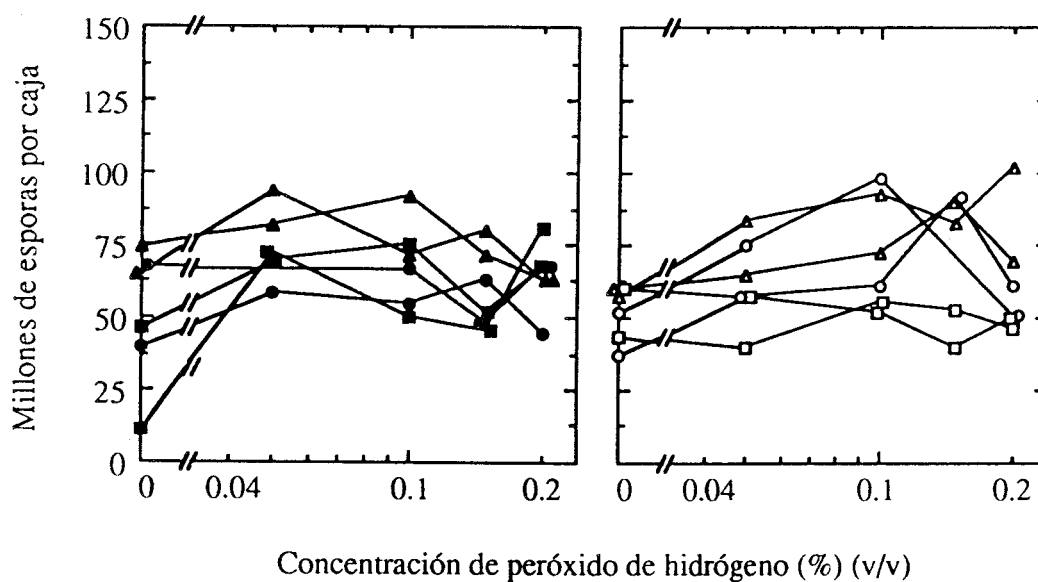


Figura 17. Producción relativa de esporas de dos estirpes en cultivos mixtos expuestos a radiación gamma. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.

## 5. Exposición a peróxido de hidrógeno

Las adiciones de 500  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno de 0.5 y 1% (v/v) sobre la superficie de las cajas de Petri de 10 cm de diámetro, donde se encuentran creciendo los micelios de 26 horas, son demasiado letales para ser analizadas y sólo permiten el desarrollo de un número bajo de colonias (menos de 20). La producción de esporas de los cultivos mixtos no disminuye en presencia de peróxido de hidrógeno (Figura 18) y ninguna estirpe predomina claramente sobre su pareja (Figura 19).



**Figura 18.** Cosecha de esporas en cultivos mixtos expuestos a peróxido de hidrógeno. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.



Funciones de los carotenos

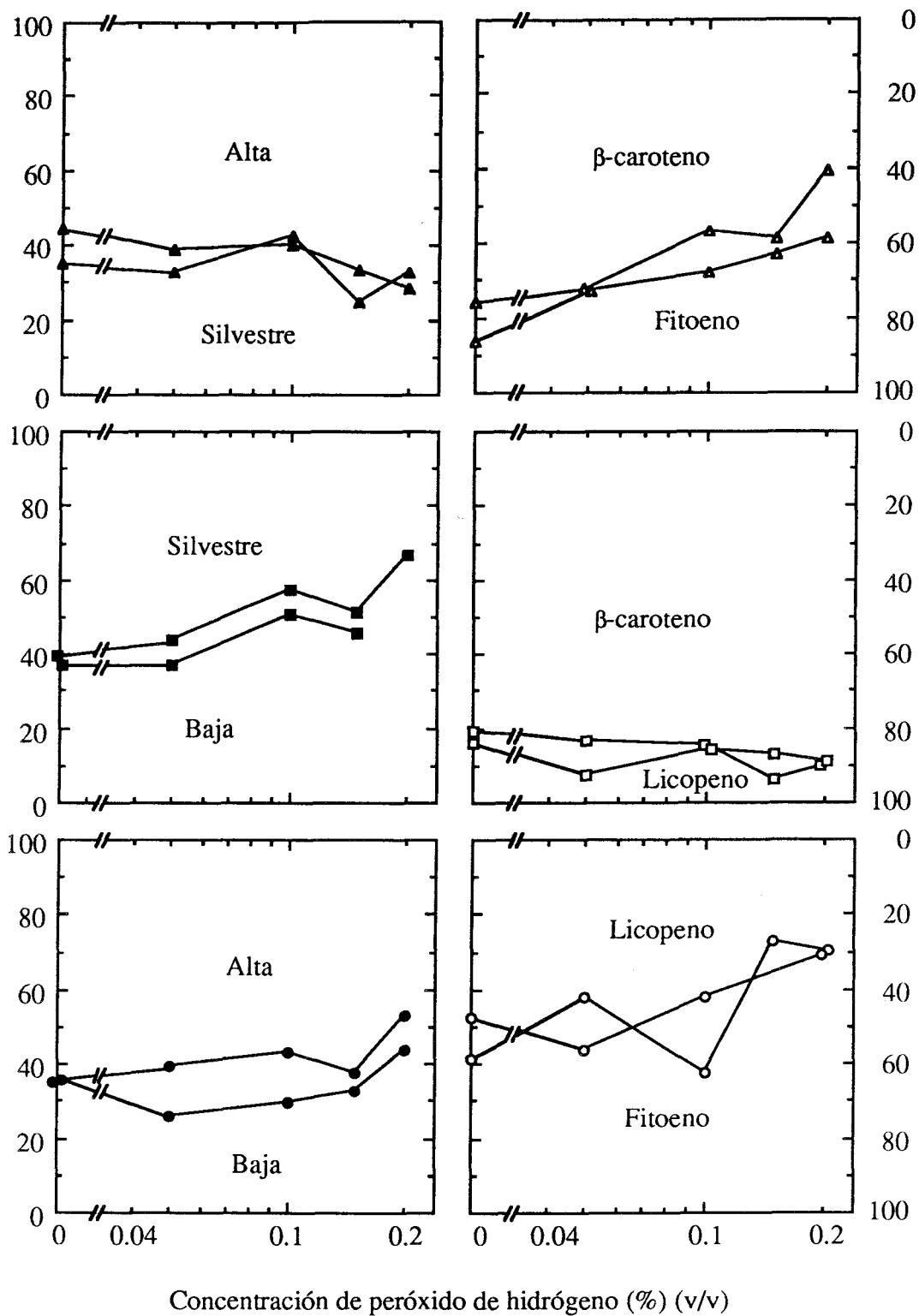


Figura 19. Producción relativa de esporas de dos estirpes en cultivos mixtos expuestos a peróxido de hidrógeno. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.

## **6. Envejecimiento**

### **6.1. Envejecimiento de esporas en agua**

Las esporas producidas por cultivos mixtos no expuestos a ningún tratamiento se dejaron envejecer en agua a temperatura ambiente (sobre la mesa del laboratorio). Cada cierto período de tiempo se sembraron alícuotas y se determinó el número total de esporas viables (Figura 20) y la proporción de las dos estirpes presentes en los cultivos mixtos (Figura 21). El número de esporas viables disminuyó, aproximadamente, en la misma proporción en todas las parejas de estirpes. No hay predominio de ninguna estirpe sobre su compañera de cultivo, aunque se observan oscilaciones sin tendencias claras.

### **6.2. Envejecimiento de esporas en los esporangios**

Las esporas permanecieron en los esporangios de los cultivos a 22 °C en la oscuridad. El número de esporas visibles en el microscopio permaneció constante, lo cual indica que no se lisaron en el tiempo que permanecieron en los esporangios. El número de esporas viables disminuyó con el tiempo, es decir, las esporas van muriendo (Figura 22). Las esporas de la estirpe silvestre parecen sobrevivir mejor que sus compañeras de cultivo (Figura 23).

### **6.3. Envejecimiento de micelio**

Una vez extraídas las esporas de cultivos mixtos envejecidos como en el apartado 6.2, los micelios restantes se lavaron y se cubrieron con agar mínimo a 48 °C y, al cabo de una semana de incubación, se recogieron las esporas. No existen diferencias en la viabilidad de las esporas que producen los micelios de distintas edades (Figura 24). Tomando la producción de esporas como un indicio de la viabilidad del micelio, los micelios de la estirpe con mucho  $\beta$ -caroteno parecen sobrevivir mejor que los de la estirpe silvestre y entre los que tienen mucho caroteno se estableció un orden de supervivencia  $\beta$ -caroteno > licopeno > fitoeno (Figura 25).

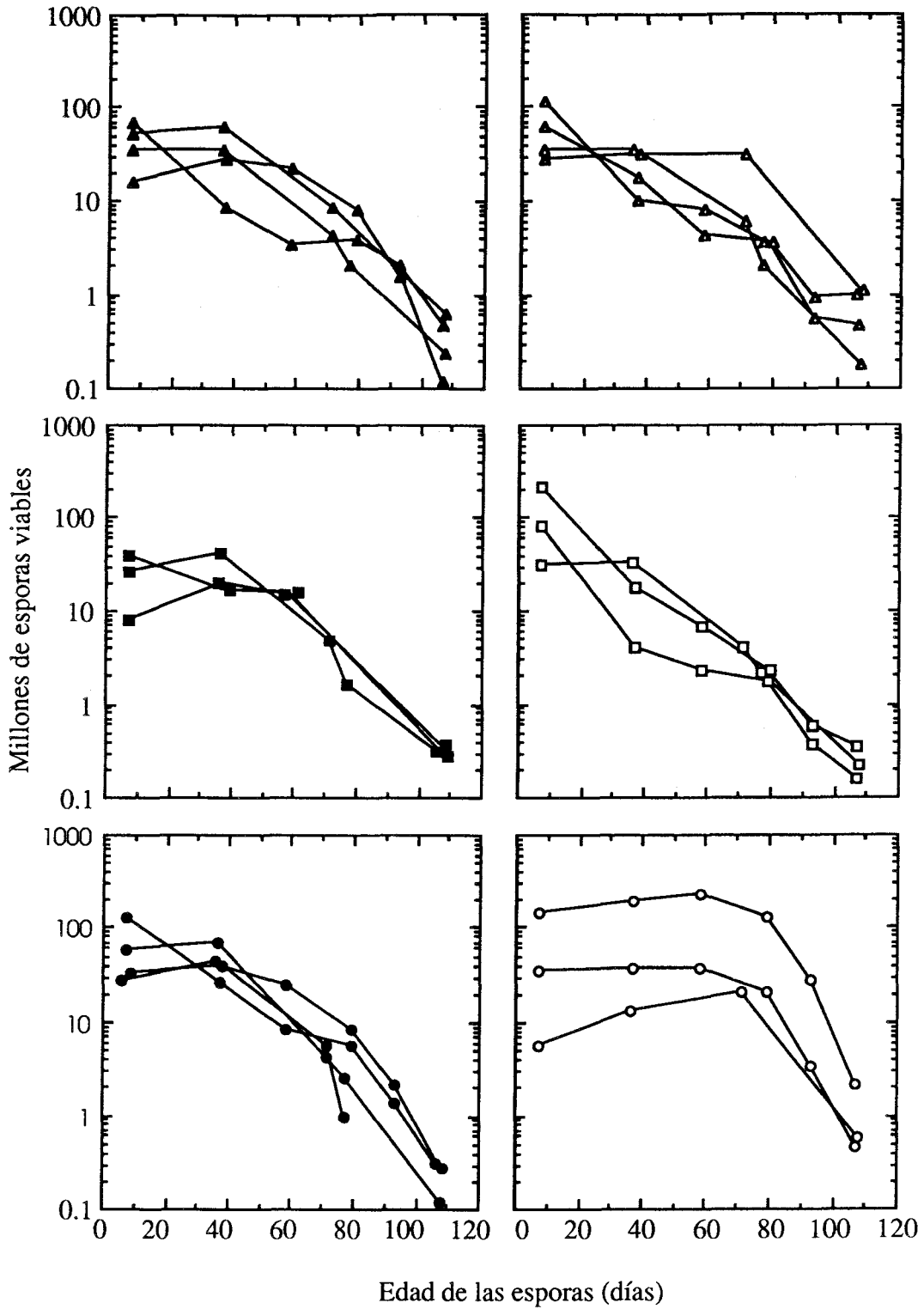


Figura 20. Esporas viables en mezclas de esporas que se dejan envejecer en agua. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.

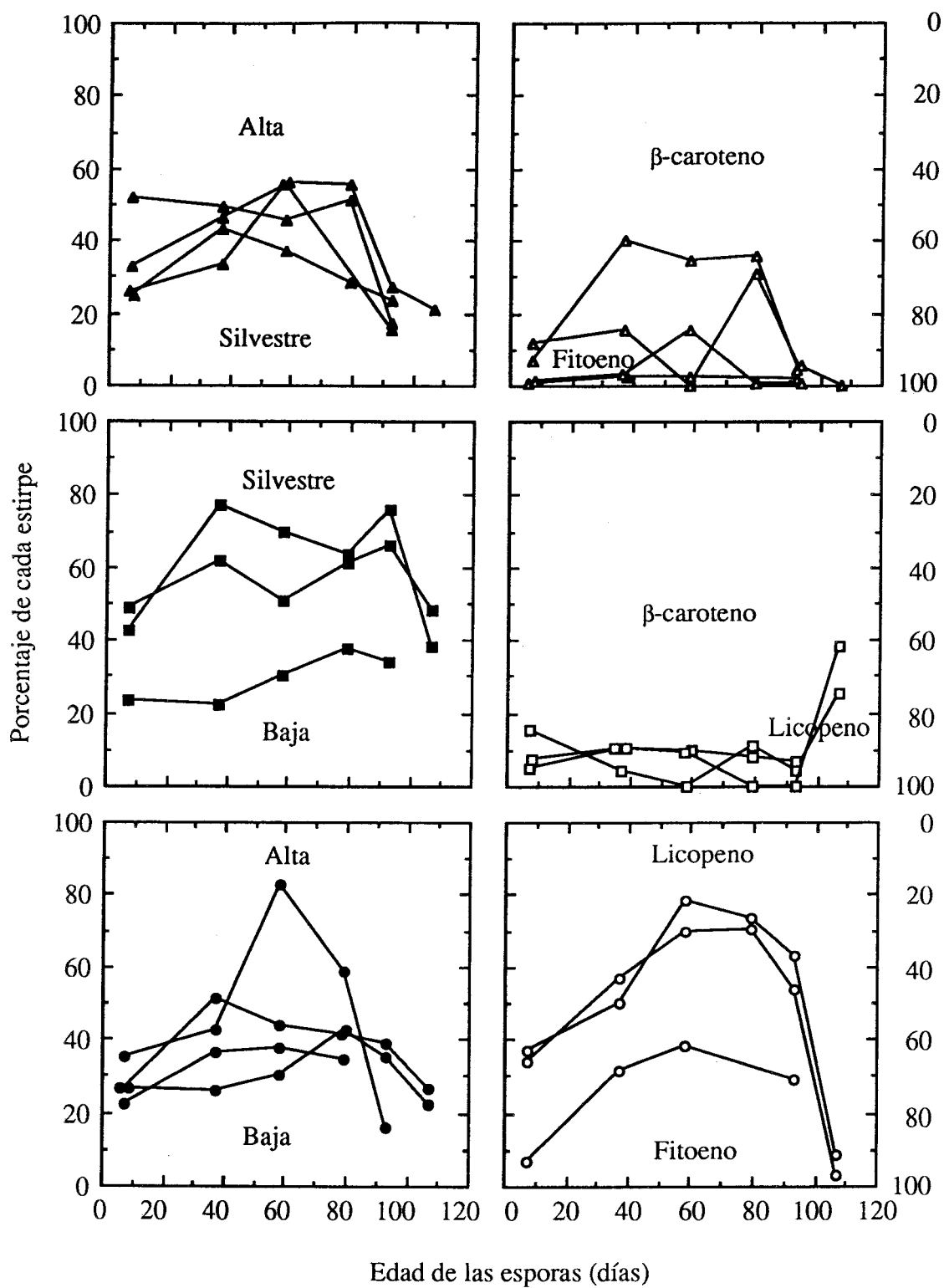


Figura 21. Abundancia relativa de cada estirpe en las mezclas de esporas que se dejan envejecer en agua. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.

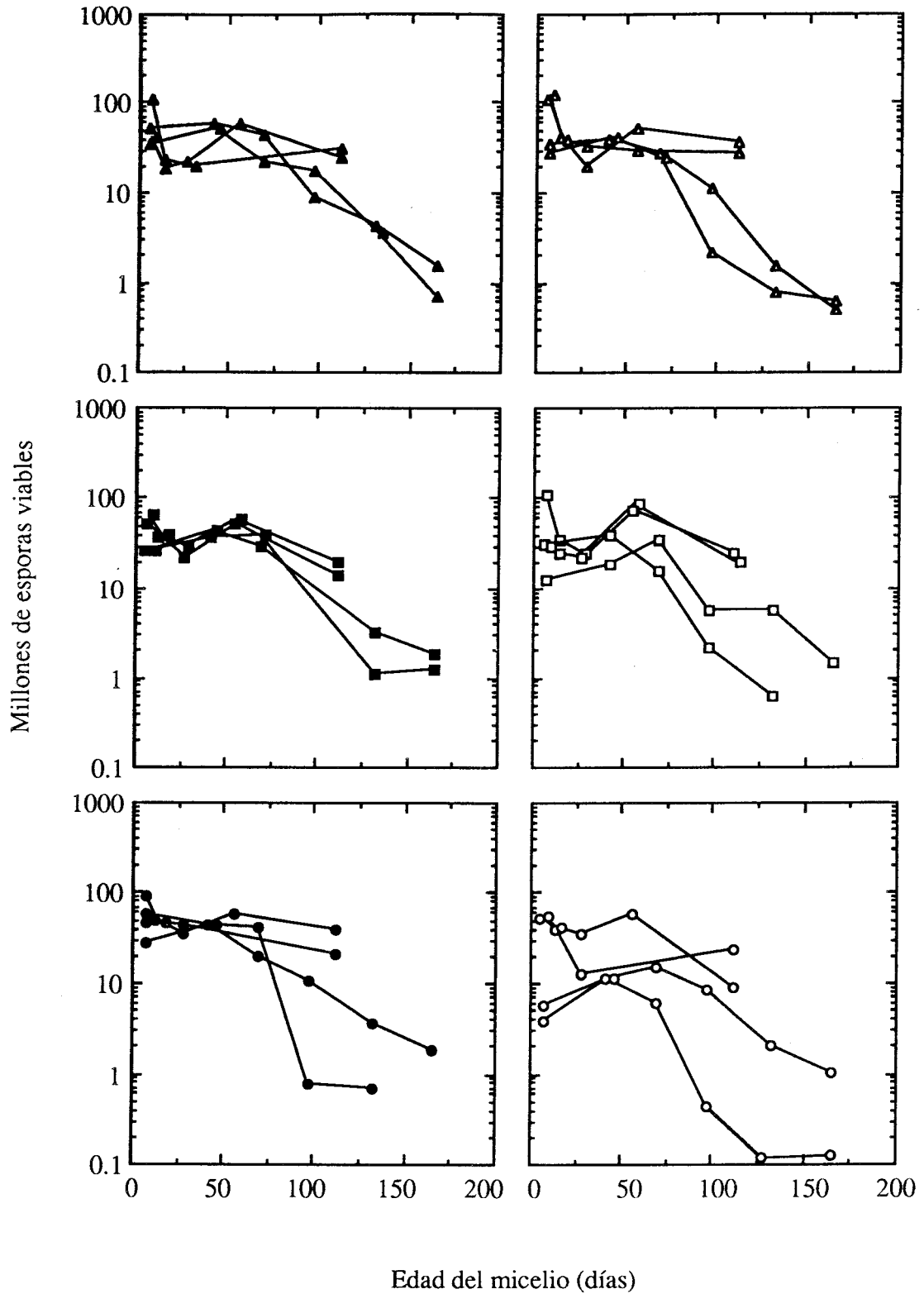


Figura 22. Esporas viables en cultivos mixtos dejados envejecer en su medio de cultivo. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.

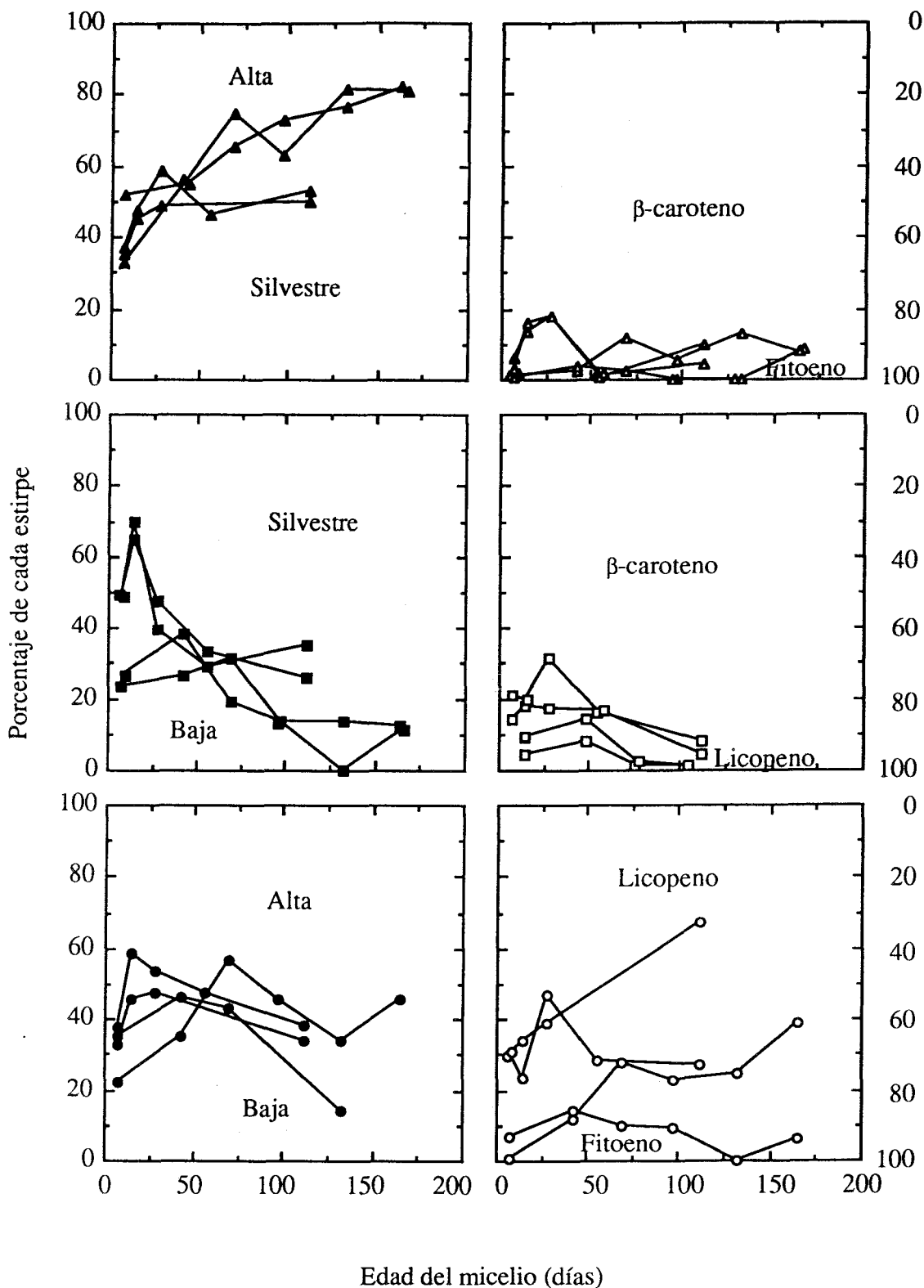


Figura 23. Abundancia relativa de cada estirpe en las esporas de cultivos mixtos dejados envejecer en su medio de cultivo. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.

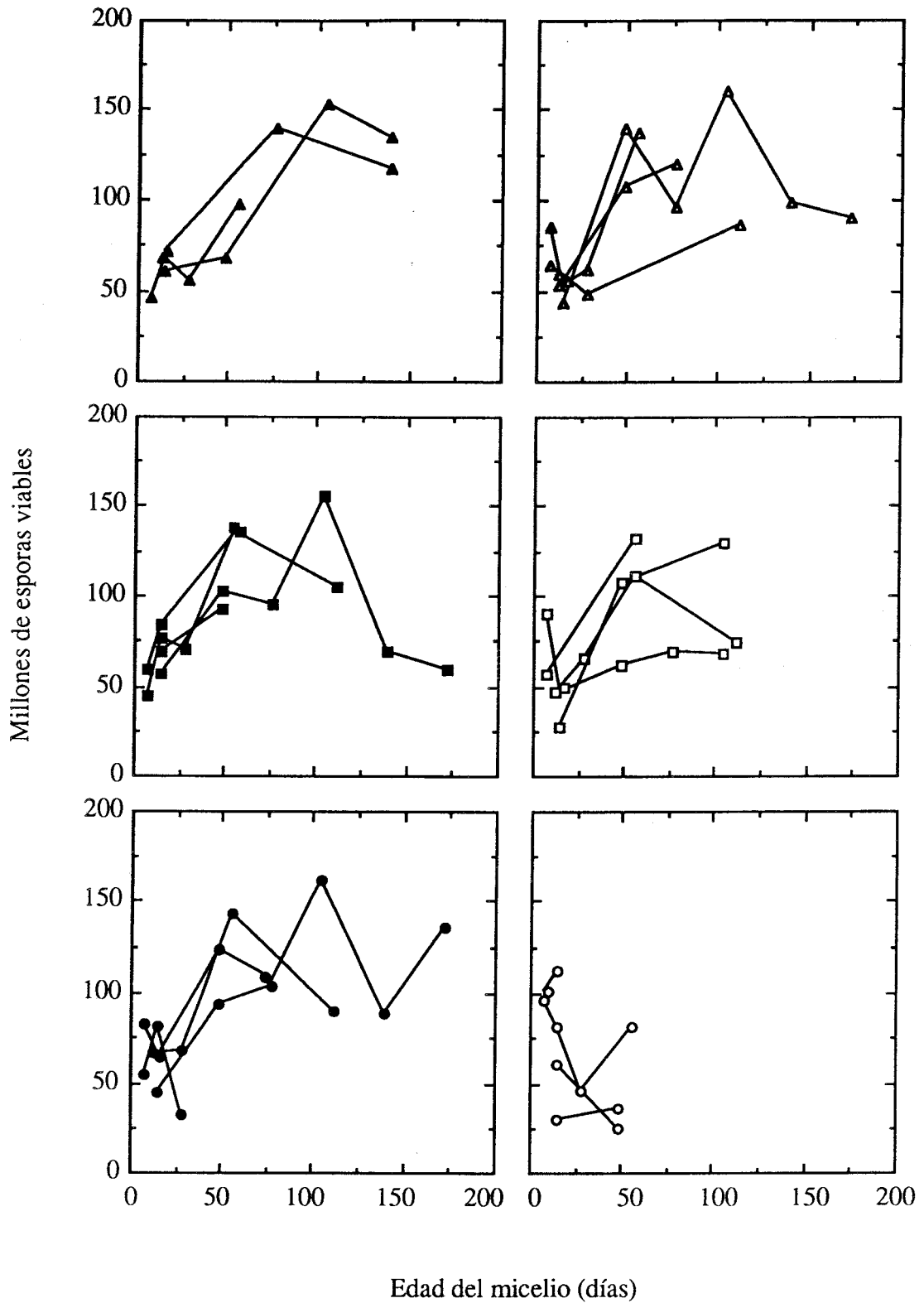
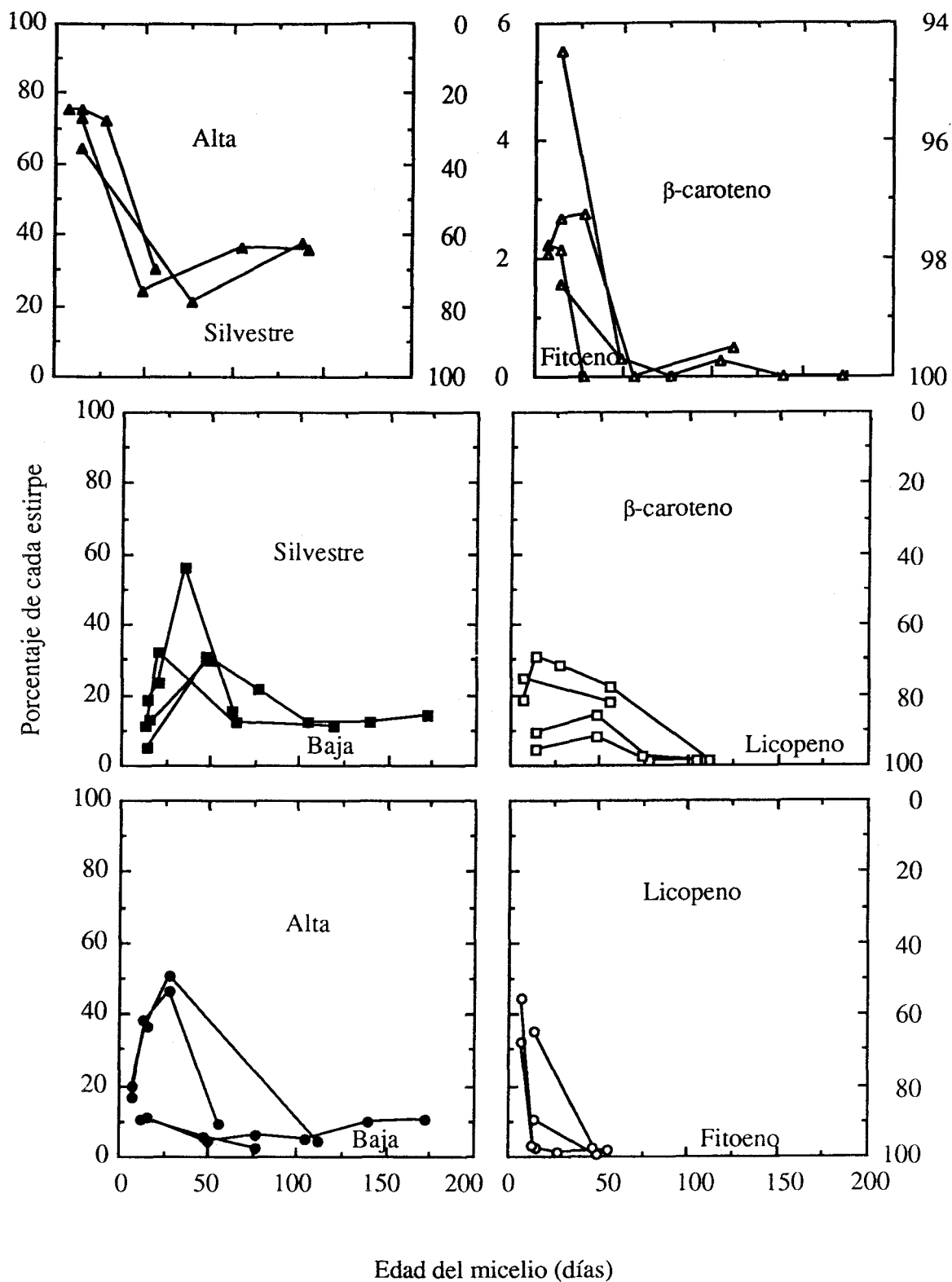


Figura 24. Producción de esporas por cultivos mixtos envejecidos en su medio de cultivo original, tras añadirles nuevo medio de cultivo. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.

Funciones de los carotenos



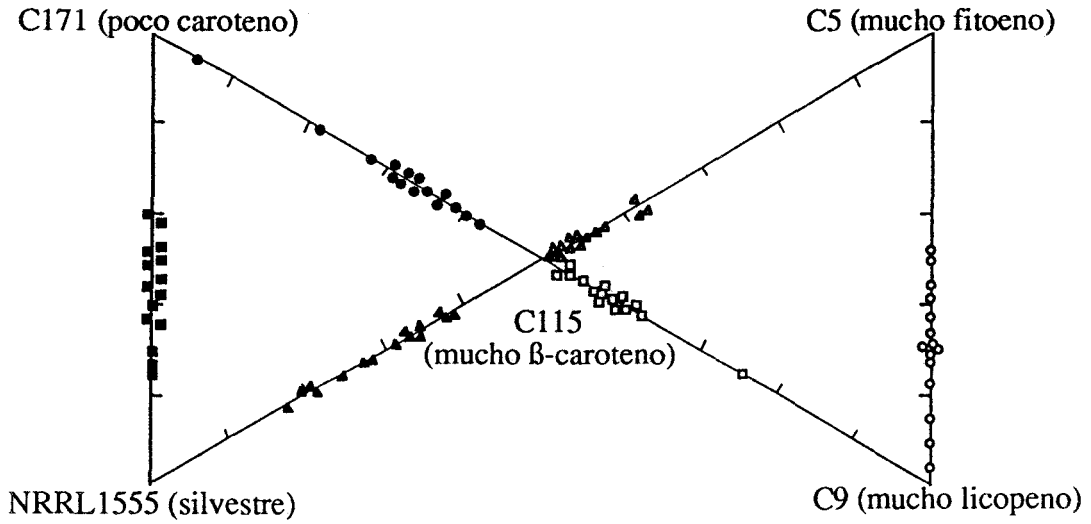
**Figura 25.** Producción relativa de esporas de dos estirpes en cultivos mixtos, dejados envejecer en su medio de cultivo original, tras añadirles nuevo medio de cultivo. Símbolos y nombres de las estirpes en página 34.



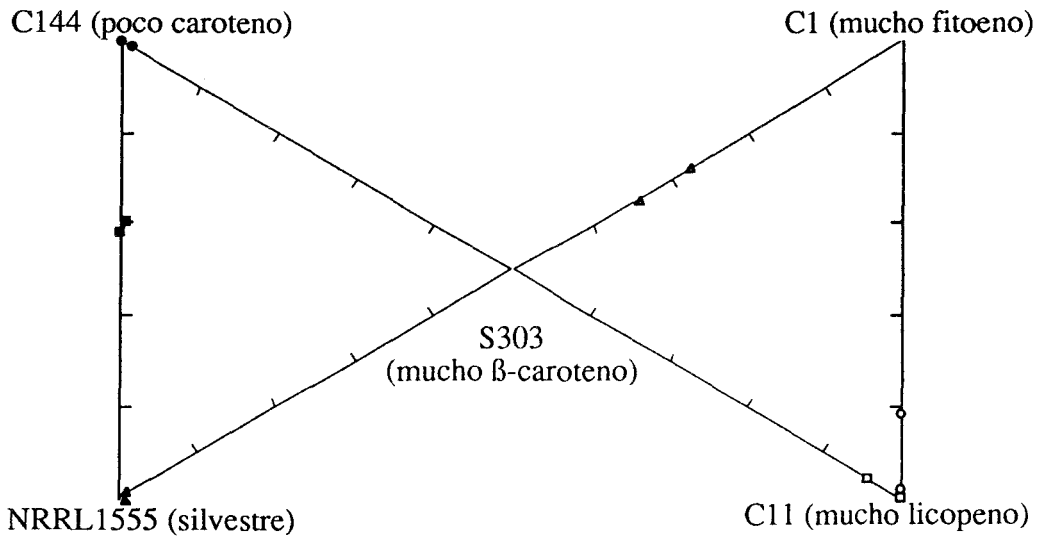
## **7. Competencia entre otras estirpes mutantes de la carotenogénesis**

En todos los cultivos mixtos testigos no sometidos a condiciones adversas ni a envejecimiento, se observan tendencias de ciertas estirpes a predominar sobre otras (Figura 26). Así, por ejemplo, la estirpe C115 predominó frente a C5, C9 y C171 y la estirpe C9 frente a C5.

Este predominio puede no estar relacionado con el contenido en carotenos de las estirpes, sino con otras mutaciones no relacionadas con el caroteno, introducidas por el mismo tratamiento mutagénico que causó el cambio de color. Para inclinarnos por una u otra teoría, se prepararon cultivos mixtos con otros mutantes diferentes afectados en la biosíntesis de carotenos. Los resultados (Figura 27) no confirmaron los anteriores. Por tanto, la capacidad de formar esporas en cultivos mixtos no está afectada tanto por la capacidad de hacer carotenos como por otras mutaciones aleatoriamente presentes en las estirpes.



**Figura 26.** Producción relativa de esporas de dos estirpes en cultivos mixtos inoculados con números iguales de esporas de ambas estirpes. Cada segmento representa un par de estirpes; la proporción de cada una en la cosecha de esporas se indica en escala lineal a lo largo del segmento; los vértices representarían cosechas puras de esporas de la estirpe que rotula el vértice. Los resultados proceden de los testigos no tratados de todos los experimentos de este capítulo.



**Figura 27.** Producción relativa de esporas de dos estirpes en cultivos mixtos inoculados con números iguales de esporas de ambas estirpes. Cada segmento representa un par de estirpes; la proporción de cada una en la cosecha de esporas se indica en escala lineal a lo largo del segmento; los vértices representarían cosechas puras de esporas de la estirpe que rotula el vértice. Los resultados corresponden a cultivos mixtos no tratados.

## DISCUSION

La biosíntesis de los carotenos está regulada por la luz en muchos organismos. Una explicación parcial, ampliamente documentada, es el papel de los carotenos como protectores de las células contra la fotooxidación en los organismos fotosintéticos. En organismos no fotosintéticos los resultados no son uniformes, como se resume en la introducción de este trabajo.

Los carotenos podrían proteger a los organismos de las radiaciones absorbiendo determinadas longitudes de onda (Goldstrohm y Lilly, 1965). Los carotenos actuarían a modo de quitasol, impidiendo que los fotones produjeran daños a las células. La región visible del espectro es absorbida tanto por el licopeno como por el  $\beta$ -caroteno, pero no por el fitoeno. La protección por absorción no puede dejar de ser eficaz en el caso de grandes masas coloreadas, pero no se puede esperar que sea importante en nuestros experimentos, porque se usaron micelios muy jóvenes y muy finos (hifas no superpuestas de unos 10  $\mu\text{m}$  de grosor).

Ninguna de las estirpes empleadas en este trabajo presentó ventaja significativa frente a otra bajo los distintos tratamientos a los que fueron sometidas. A la vista de nuestros resultados podemos concluir que los carotenos no protegen a *Phycomyces* ni de las radiaciones gamma ni ultravioleta C, ni de la luz azul ni del ataque oxidativo por peróxido de hidrógeno.

Podría ser que la cantidad de caroteno necesaria para proteger a las células frente a los ataques externos sea tan baja que esté presente en los mutantes empleados. De hecho, la estirpe baja en carotenos empleada en este trabajo contiene algo de licopeno. De todas maneras, esta hipótesis no explicaría la concentración de  $\beta$ -caroteno presente en el tipo silvestre de *Phycomyces* ni su incremento por varias circunstancias externas.

Los carotenos presentan varios enlaces insaturados en su estructura química. Como consecuencia, pueden reaccionar con los radicales libres que se encuentran en el interior de las células, producidos por las radiaciones que reciben y por ciertos procesos bioquímicos. Varias estirpes empleadas en nuestro trabajo contenían altas concentraciones de  $\beta$ -caroteno, licopeno y fitoeno, respectivamente. De éstos, el que posee más enlaces insaturados es el licopeno, seguido del  $\beta$ -caroteno y luego del fitoeno. Cuando los cultivos fueron expuestos a diversos agentes presuntos inductores de radicales libres, ninguna de las estirpes aventajó a las demás. Indudablemente, estos carotenos son capaces de capturar estas especies químicas altamente reactivas, pero para ello han de estar localizados en el mismo lugar de la célula. Probablemente, la explicación por la que los carotenos no protegen frente a los daños producidos por los diferentes ataques sea la distinta localización de los daños inducidos y de los carotenos. De hecho, las radiaciones gamma y ultravioleta C provocan la mayor parte de los daños en el material genético situado en el núcleo (Cerdá-Olmedo y Reau, 1970), mientras que los carotenos se encuentran en las membranas y en acúmulos especiales en el citoplasma. En el caso del peróxido de hidrógeno y la fotosensibilización por luz y riboflavina, los daños se inducen en el citoplasma, pero no sabemos si están al alcance de los carotenos de las membranas o de los acúmulos citoplasmáticos.

En *Phycomyces*, los ácidos grasos pueden llegar a constituir hasta cerca de la mitad del peso seco (Mehrotra y Nand, 1970; Bartlett y Mercer, 1974). Los ácidos grasos también disponen de enlaces insaturados y ponen a disposición de la estirpe silvestre más de 100 veces el número de dobles enlaces que los carotenos. Los efectos protectores por los dobles enlaces de los carotenos serían despreciables frente a los de los ácidos grasos.

Algunas estirpes aventajaron a otras incluso en situaciones donde no fueron atacadas por ningún agente externo. Estas tendencias son fruto de mutaciones independientes de su composición de carotenos, pues otros mutantes afectados en los mismos pasos de la ruta biosintética no presentaron dichas ventajas.

En nuestros experimentos de envejecimiento parece existir una tendencia, que requiere nuevas verificaciones experimentales, por la que la

estirpe con mayor contenido en  $\beta$ -caroteno aventaja a la que acumula licopeno y estas dos a la que acumula fitoeno. Esto podría ser el resultado de la existencia de otras mutaciones en las estirpes empleadas, por lo que habría que repetir estos experimentos con otras estirpes afectadas en la síntesis de carotenos. Los daños inducidos por envejecimiento se localizan mayoritariamente en las membranas; los lípidos de las membranas sufren peroxidaciones y como consecuencia las membranas pierden fluidez (Halliwell y Gutteridge, 1989). En este caso, los daños y los carotenos coinciden en el espacio, pudiendo estos últimos ejercer su influencia. Entre las estirpes con diferentes contenidos en  $\beta$ -caroteno, la estirpe silvestre parece mejor que la de contenido bajo e, incluso, mejor que la superproductora. La explicación podría ser que la protección por el  $\beta$ -caroteno quede saturada con la concentración que posee la estirpe silvestre y que producir más fuera un desperdicio de materiales y energía. La evolución en los ambientes naturales debe haberse encargado de ajustar la concentración de  $\beta$ -caroteno a su óptimo.

## MATERIALES Y METODOS

## 1. Estirpes

Las estirpes de *P. blakesleeanus* utilizadas en este trabajo, así como su genotipo, fenotipo y origen se presentan en la Tabla III.

Siguiendo la nomenclatura genética propuesta por Demerec *et al.* (1966), las estirpes se designan con una letra mayúscula que corresponde al laboratorio donde fueron obtenidas (C, Instituto de Tecnología de California, Pasadena; S, Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla) y un número de aislamiento. La estirpe silvestre NRRL1555 proviene de la colección del Northern Regional Research Laboratory, USDA, Peoria, Illinois, USA.

Los genotipos de los mutantes se nombran con tres letras minúsculas, indicadoras del proceso biológico afectado, junto a una letra mayúscula que hace referencia al gen mutado, si se conoce, o junto a un guión, si no se conoce, y un número de alelo. Así, las mutaciones *car* afectan a la síntesis de carotenoides; las *nic*, a la síntesis de ácido nicotínico; las *dar*, a la resistencia a 5-deaza-5-carbono-riboflavina; las *geo*, a la respuesta geotrópica; las *mad*, a las respuestas fototrópicas. El tipo sexual de la estirpe se refiere con los signos (+) y (-).

Los heterocariontes se designan con el símbolo "\*" situado entre los nombres de las estirpes que los componen.

TABLA III. Estirpes de *P. blakesleeanus* empleadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Fenotipo	Referencias
NRRL1555	(-)	Silvestre	
C1	<i>carB1</i> (-)	Albino, acumula fitoeno	1, 2, 3
C2	<i>carA5</i> (-)	Blanco	1, 2, 4
C5	<i>carB10 geo-10</i> (-)	Albino, acumula fitoeno. Rápido geotropismo	1, 5
C9	<i>carR21</i> (-)	Rojo, acumula licopeno	1, 6
C11	<i>carR23</i> (-)	Rojo, acumula licopeno	1, 3
C115	<i>carS42 mad-107</i> (-)	Superamarillo, superpro- ductor de $\beta$ -caroteno	1, 4
C171	<i>carA30 carR21</i> (-)	Albino, no produce carotenoides	1, 2, 3
C144	<i>carA3 carR29 mad-98</i> (-)	Albino, no produce carotenoides	2, 3
C271	<i>carA5 nicA101</i> (-)	Albino, auxótrofo para ácido nicotínico	7
S213	<i>dar-52</i> (-)	Resistente a deazarriboflavina	8
S303	<i>carS179</i> (-)	Superamarillo, superpro- ductor de $\beta$ -caroteno	9
C2 * S213	<i>carA5</i> (-) * <i>dar-52</i> (-)	Amarillo	8

<sup>1</sup> Meissner y Delbrück, 1968

<sup>2</sup> Ootaki *et al.*, 1973

<sup>3</sup> Eslava *et al.*, 1974

<sup>4</sup> Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976

<sup>5</sup> Aragón *et al.*, 1976

<sup>6</sup> De la Guardia *et al.*, 1971

<sup>7</sup> Eslava *et al.*, 1975b

<sup>8</sup> Roncero *et al.*, 1984

<sup>9</sup> De la Concha y Murillo, 1984.



## 2. Condiciones de cultivo

Como medio mínimo se utilizó el descrito por Sutter (1975) con 2 g l<sup>-1</sup> de L-asparagina como fuente de nitrógeno. Para su uso como medio sólido se añadieron 15 g l<sup>-1</sup> de agar. Para seleccionar mutantes *dar* se añadió 1 µg ml<sup>-1</sup> de 5-deaza-5-carbono-riboflavina, donación del Prof. P. Hemmerich, de la Universidad de Constanza (Alemania). Para los experimentos de fotosensibilización a la luz azul se añadió riboflavina al agar mínimo.

Para el aislamiento de los mutantes y su caracterización fisiológica se empleó agar patata. Este medio se preparó hirviendo 200 g de cubitos de patatas durante una hora, filtrando el extracto y añadiendo 20 g de sacarosa y 15 g de agar al caldo resultante; el volumen se completó con agua destilada hasta un litro; a la mezcla, tras ser autoclavada, se le añadió 1 mg de tiamina . HCl. El análisis de las producciones relativas de esporas de cada estirpe en los experimentos de competencia se realizó en agar patata ajustado a pH 3.3, para inducir el crecimiento colonial (en algunas ocasiones por dificultades para la medida del pH se indujo el crecimiento colonial añadiendo 0.1 ml del detergente Triton X100 al litro de medio).

Para las observaciones de los tropismos de los esporangióforos de ciertas estirpes a luz azul y radiación ultravioleta se usaron cultivos de aproximadamente 10 esporas en viales de 4 ml con agar patata-glucosa comercial (Difco). Estos cultivos se incubaron durante los primeros 2 días en oscuridad y durante los siguientes 2 ó más días bajo luz cenital azul. Los primeros esporangióforos producidos en cada vial se desecharon porque eran excepcionalmente finos.

Los cultivos de *Phycomyces* se iniciaron a partir de esporas activadas por choque térmico a 48 °C durante 10 minutos o mediante transplantes de pequeños trozos de micelio.

### **3. Fuentes de radiación y medidas**

Se emplearon varios tipos de radiaciones en este trabajo. Incluso para diferentes experimentos con un mismo tipo de radiación se utilizaron distintas fuentes de irradiación por necesitar determinadas intensidades y longitudes de onda o por simples razones de disponibilidad.

Las intensidades de la luz azul y blanca y de la radiación ultravioleta se midieron con un fotómetro digital (J16, Tektronix, Beaverton, OR, USA); para la radiación ultravioleta, al fotómetro se le acopló un fotodiodo (S1337 BQ, Hamamatsu) calibrado con un fotómetro Optronic 742.

#### **3.1. Fuentes de luz blanca**

La luz blanca cenital procedía de una batería compuesta por 5 lámparas fluorescentes (Sylvania GTE F40 W/154-RS) colocadas a 50 cm por encima de los cultivos y tenía un flujo de  $3.1 \text{ W m}^{-2}$ ; entre otros usos, esta fuente se empleó en los experimentos de fotosensibilización con riboflavina.

La radiación blanca horizontal empleada para comprobar el fototropismo de los mutantes a luz visible provenía de una lámpara incandescente (Nikon 2KA, 6 V, 30 W) con un flujo de  $1.2 \text{ W m}^{-2}$ .

#### **3.2. Fuentes de radiación azul**

La luz azul cenital, con la que se iluminaban los cultivos crecidos en viales antes de la observación del fototropismo de sus esporangióforos, procedía de una batería de 3 lámparas fluorescentes (Osram L25, 20 W), a través de filtros de PVC ( $\lambda_{\text{máx}} = 500 \text{ nm}$ ,  $\Delta\lambda_{\text{máx}} = 100 \text{ nm}$ ). Esta batería se encontraba a una distancia de 30 cm de los cultivos y tenía un flujo de  $0.17 \text{ W m}^{-2}$ .

La fuente de luz azul empleada para medir el fototropismo de los esporangióforos en el equipo asistido por ordenador procedía de una lámpara halógena (HLX 64610, Osram 50 W) a través de un filtro de interferencia (DEPIL 1, Schott, Mainz, Alemania) que seleccionó la longitud de onda  $449.4 \text{ nm}$  ( $\Delta\lambda_{\text{máx}} = 18.6 \text{ nm}$ ; transmisión 33.2%).

### 3.3. Fuentes de radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta horizontal empleada para el escrutinio de los mutantes provenía de una lámpara de vapor de mercurio de alta presión (Sylvania HSL-BW, 125 W) a la que se había quitado la envuelta fluorescente. A esta lámpara se le aplicó un filtro de interferencia (UV-M-IL, Schott, Mainz, Alemania) que seleccionó la longitud de onda 277.2 nm ( $\Delta\lambda_{\text{máx}} = 22$  nm; transmisión 22%). Las muestras se irradiaron con un flujo de 7 mW m<sup>-2</sup>.

La fuente de radiación ultravioleta empleada para medir el tropismo de los esporangióforos en el equipo asistido por ordenador fue una lámpara de deuterio (H30 = DS Heraus, Hanau, Alemania) con un suministrador de potencia regulable y estabilizado. A esta fuente se le aplicaron filtros neutros (LOT, Darmstadt, Alemania) y un filtro de interferencia ( $\lambda_{\text{máx}} = 277.2$  nm;  $\Delta\lambda_{\text{máx}} = 22$  nm; transmisión 22%).

En los experimentos de competencia bajo radiación ultravioleta C, los cultivos mixtos se expusieron a una lámpara germicida (Sylvania G15T8) con un máximo de emisión a 253.7 nm y un flujo de 1.5 W m<sup>-2</sup>.

### 3.4. Fuente de radiación gamma

La radiación gamma con la que se trataron los cultivos mixtos procedía de una fuente de 18 mm de diámetro situada en el equipo Theratron 80 (Ottawa, Canadá) de la Unidad de Pelecobaltoterapia del Servicio de Radioterapia del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. La fuente de Co<sup>60</sup> poseía una actividad de  $17.124 \times 10^{10} \pm 7.6\%$  Bq (Becquerelios) en la fecha de las exposiciones (diciembre de 1992) y una tasa de exposición de 2.42 Cu × Kg<sup>-1</sup> (Culombios × Kilogramos<sup>-1</sup>) a un metro en las condiciones de la calibración. La dosis de radiación absorbida por los micelios se expresa en Grays (Gy).

## 4. Mutagénesis

Se obtuvieron suspensiones de esporas con alta frecuencia de mutantes siguiendo a Roncero *et al.* (1984). Las esporas del heterocarionte C2 \* S213 inoculadas en agar mínimo ácido dieron tres tipos de colonias:

blancas (con sólo núcleos C2), amarillas (con sólo núcleos S213) y amarillas claras heterocariontes con mezclas de ambos tipos de núcleos en diferentes proporciones. Se subcultivaron varias colonias amarillas muy claras en agar mínimo, se cosecharon sus esporas, se inocularon en agar mínimo ácido y se contaron las colonias de cada color. Se eligió una suspensión de esporas que daba un 79% de colonias blancas y una probabilidad de núcleos amarillos S213  $p = 0.06$  (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968).

Se expusieron  $4.5 \times 10^7$  esporas de este heterocarionte a 0.5 mg del mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en 5 ml durante 30 minutos a temperatura ambiente. El porcentaje de esporas supervivientes a la mutagénesis fue del 10%. El total de esporas supervivientes se inoculó en cuatro cajas de agar mínimo suplementado con 5-deaza-5-carbono-riboflavina y sembradas a razón de  $1.1 \times 10^6$  esporas por caja. Se cosecharon las esporas de cada caja y se mantuvieron congeladas las cuatro suspensiones de esporas por separado. La alta densidad de siembra en el medio de selección favorecía el desarrollo de las colonias con crecimiento normal frente a las de crecimiento lento. En este medio con 5-deaza-5-carbono-riboflavina solo pueden germinar las esporas homocariontes con núcleos S213. Como antes de realizar la mutagénesis la proporción de núcleos S213 en el heterocarionte era muy baja, la gran mayoría de las colonias resistentes a 5-deaza-5-carbono-riboflavina deben proceder de esporas con solo un núcleo viable.

## **5. Aislamiento de los mutantes**

Las esporas activadas procedentes de las suspensiones de esporas de alta frecuencia de mutación se inocularon en agar patata ácido y se incubaron a 22 °C y oscuridad durante 3 días y bajo la luz cenital blanca ( $3.1 \text{ W m}^{-2}$ ) durante las siguientes 14 horas. Los cultivos se expusieron sucesivamente a luz blanca horizontal ( $1.2 \text{ W m}^{-2}$ ) durante 140 minutos y a radiación ultravioleta horizontal ( $7 \text{ mW m}^{-2}$ ) durante 30 minutos, procedentes ambas del mismo lado. Se buscaron esporangióforos que reaccionaran a la primera pero no a la segunda y se aislaron las esporas de sus esporangios.

## **6. Formación del heterocarionte**

El heterocarionte se preparó siguiendo el método de Ootaki (1973) por injerto de esporangióforos del heterocarionte S213 \* S591 y de la estirpe C271. Los injertos produjeron pequeños esporangios y todas sus esporas se inocularon en agar patata ácido.

## **7. Medidas del fototropismo**

Los tropismos del estadio IVb de los esporangióforos se estudiaron con un aparato automático provisto de una cámara de vídeo y gobernado por un ordenador (Popescu *et al.*, 1989a).

Un vial con un cultivo, al que se quitaron todos los esporangióforos menos uno, se observó durante 15 minutos en un microscopio horizontal provisto de un retículo para la medición de la velocidad de crecimiento del esporangióforo. Los esporangióforos con una velocidad de crecimiento inferior a  $20 \mu\text{m min}^{-1}$  se desecharon.

El vial se colocó en un soporte metálico sobre una superficie imantada que permitía su deslizamiento horizontal y su colocación ante la cámara de vídeo (Figura 28). La cámara de vídeo (Grundig, FA 82 CCD, con un máximo de sensibilidad entre 700 y 800 nm) tomaba imágenes del esporangióforo frente a una fuente de luz roja (Schott, 150 W, con 99% de la emisión a longitud de onda superior a 670 nm). La iluminación resultante del esporangióforo,  $100 \text{ mW m}^{-2}$ , no provoca respuestas. Las imágenes se transmitían a la pantalla de un televisor (Grundig BG 123, blanco y negro) y a un ordenador IBM AT dotado del sistema operativo MSDOS 3.3, un programa para analizar la imagen digitalizada, escrito en Turbo Basic, y un programa para coordinar el sistema y controlar el crecimiento del esporangióforo, escrito en Assembler.

El esporangióforo recibía un estímulo procedente de una fuente de luz azul o de radiación ultravioleta colocada en el mismo plano que la cámara de vídeo y la fuente de luz roja, pero en dirección perpendicular a ambas.

Un motor compensaba automáticamente el crecimiento del esporangióforo en estudio, de manera que la base del esporangio se mantenía siem-

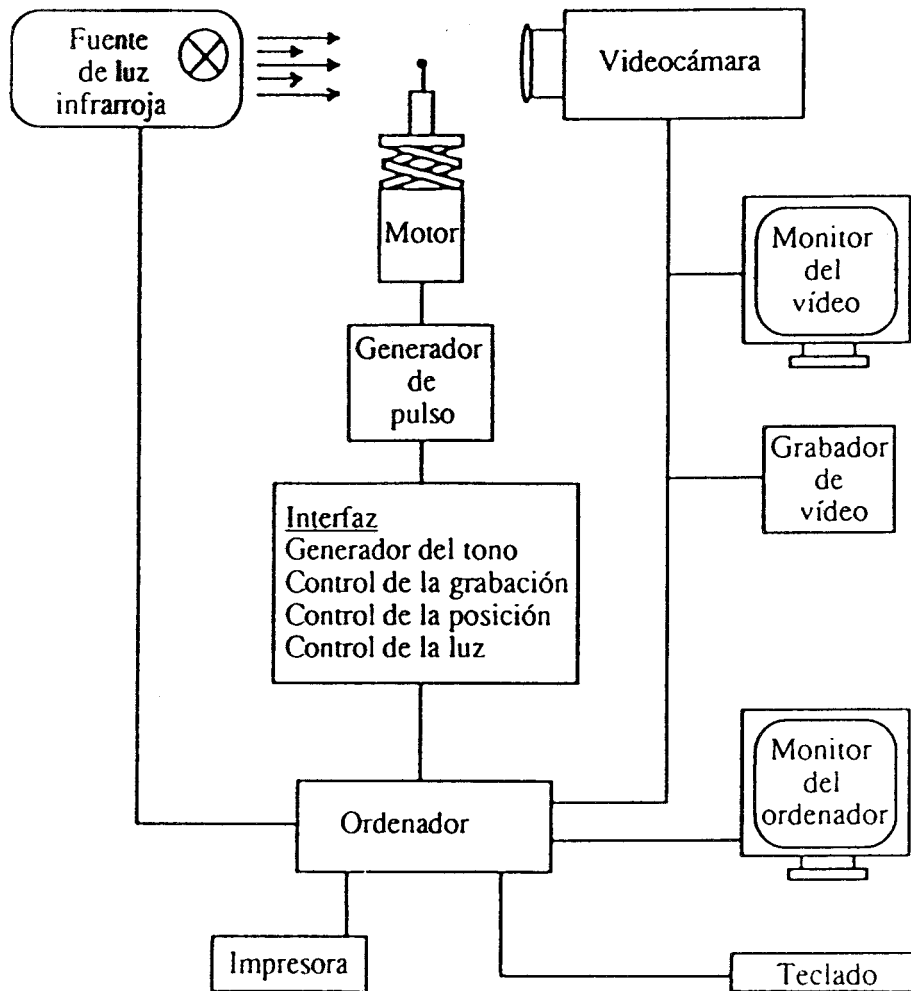


Figura 28. Esquema del aparato asistido por ordenador para las medidas del fototropismo de los esporangióforos (Popescu *et al.*, 1989b).

pre fija en el espacio. Cada vez que la imagen del esporangio en el monitor del ordenador se ponía en contacto con una marca horizontal fija, se ponía en marcha el motor y se hacía descender verticalmente el soporte del vial. Cuando este movimiento rompía el contacto entre el esporangio y la línea horizontal, el ordenador paraba el motor y la imagen se analizaba. Este análisis incluye el cálculo del ángulo de curvatura del esporangióforo respecto a la vertical. En resumen, el procesamiento de datos se compone de los siguientes pasos: la imagen del esporangióforo en el monitor del vídeo, la digitalización, la imagen digitalizada en la pantalla del ordenador, el registro de los movimientos del soporte y el análisis de las imágenes.

El vial, el motor y la cámara de vídeo se encontraban en el interior de una caja negra de madera a una temperatura de  $24 \pm 2$  °C, aislados de las corrientes de aire que el resto de aparatos del equipo pudieran producir. Esta caja poseía dos entradas a través de las cuales la fuente de luz roja iluminaba el esporangióforo y la fuente de luz azul o de radiación ultravioleta irradiaba el esporangióforo.

## **8. Análisis de ácido gálico**

Los esporangióforos se liofilizaron y molieron con arena lavada. El extracto acuoso se centrifugó a 18000 g durante una hora. La absorción ultravioleta del sobrenadante, que se debe casi exclusivamente al ácido gálico (Delbrück y Shropshire, 1960; Poyatos, J.A., comunicación personal), se midió en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japón). Para el cálculo del coeficiente de extinción del ácido gálico a 262.4 nm se midió la densidad óptica de una solución conocida del mismo compuesto.

## **9. Análisis de carotenos**

Se extrajeron los carotenos (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986) y se determinaron sus concentraciones mediante sus coeficientes de extinción (Davies, 1965). Los carotenos de la estirpe C5 se separaron en columnas (de 8 cm de longitud y 1 cm de anchura) de óxido de aluminio (desechado hasta el grado Brockmann II-III) eluidas con concentraciones crecientes de éter etílico en éter de petróleo (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1986). Para extraer los carotenos de las esporas se agitaron en un homogenizador (Braun

8S3032, Melsungen, Alemania) dos veces durante 30 segundos cada una con perlas de vidrio de diámetro entre 425 y 600 mm.

## **10. Experimentos de competencia**

Dos estirpes que difieren en la producción de carotenos, y por tanto en el color, se sembraron en agar mínimo a razón de  $0.76 \times 10^4$  esporas de cada una por caja. A las 26 horas de incubación a 22 °C en la oscuridad, los micelios se sometieron a diferentes tratamientos nocivos y se continuó la incubación en las mismas condiciones hasta completar siete días. Se recogieron las esporas lavando la tapa de las cajas y el micelio con un total de 17 ml de agua destilada estéril. Se lavaron tres veces las esporas por centrifugación en agua destilada estéril. Se contaron las esporas al microscopio con una cámara Bürker y se sembraron 6 cajas de agar patata ácido con aproximadamente 100 esporas por caja. A las 48 horas de incubación a 22 °C y oscuridad, se dibujó un punto en la caja de Petri debajo de cada colonia. Tras incubar las cajas 24 horas a 22 °C bajo luz cenital blanca, se contaron las colonias de cada color. Este procedimiento permitió conocer la producción relativa de esporas de cada estirpe en los cultivos mixtos.

En el caso del tratamiento con radiación ultravioleta C, los micelios se irradiaron a dos edades diferentes: 26 y 65 horas. En el caso de la radiación gamma, las esporas se inocularon sobre láminas de celofán estéril colocadas sobre agar mínimo en cajas de Petri de 5,1 cm de diámetro; a las 26 horas de la inoculación, se extrajeron las láminas, se colocaron entre una plancha de metacrilato de espesor 0,5 cm y varias planchas con un espesor total de 5,25 cm y se expusieron a la radiación gamma con el menor espesor hacia la fuente. De esta manera se consiguió un daño celular máximo debido a los electrones directos de la radiación y a los electrones desplazados de los átomos del metacrilato. Las láminas se continuaron incubando sobre agar mínimo nuevo, pero esta vez en cajas de Petri de 10 cm de diámetro.

Para el ataque oxidativo de los cultivos mixtos por peróxido de hidrógeno, se utilizaron diferentes concentraciones de agua oxigenada CUVE (Laboratorios Pérez-Giménez, Córdoba, España).



## **11. Envejecimiento**

### **11.1. Envejecimiento de esporas en agua**

Dos estirpes que difieren en la producción de carotenos se sembraron en agar mínimo a razón de  $0.76 \times 10^4$  esporas de cada una por caja. A los siete días de incubación a 22 °C en la oscuridad se cosecharon las esporas como en el apartado 10 y las suspensiones en agua destilada estéril se mantuvieron a temperatura ambiente en tubos de ensayo tapados con algodón. Cada mes se tomaron alícuotas de las suspensiones de esporas para determinar la proporción de cada estirpe entre los supervivientes y se analizaron como en el apartado 10.

### **11.2. Envejecimiento de esporas en los esporangios**

Dos estirpes que difieren en la producción de carotenos se sembraron en agar mínimo a razón de  $0.76 \times 10^4$  esporas de cada una por caja. Pasado un período de incubación a 22 °C en la oscuridad de 7 a 165 días, se cosecharon las esporas y se analizaron como en el apartado 10 para determinar la proporción de cada estirpe entre las supervivientes.

### **11.3. Envejecimiento del micelio en el medio de cultivo**

Dos estirpes que difieren en la producción de carotenos se sembraron en agar mínimo a razón de  $0.76 \times 10^4$  esporas de cada una por caja. Pasado un período de incubación a 22 °C en la oscuridad de 7 a 165 días, se cosecharon las esporas y se lavaron los micelios. A estos micelios se les añadieron 20 ml de agar mínimo a 48 °C. A los siete días, se cosecharon las esporas producidas y se analizaron como en el apartado 10 para determinar la proporción de cada estirpe.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

El hongo *P. blakesleeanus* muestra tropismo positivo a la luz azul y tropismo negativo a la radiación ultravioleta. Ambas conductas se suponían mediadas por unos mecanismos celulares de recepción, transducción de señales y ejecución de respuestas. Se han aislado mutantes, llamados *uvi*, que responden normalmente a la luz azul, pero no a la radiación ultravioleta. Estos mutantes demuestran que estos mecanismos son debidos a la acción de mecanismos celulares diferentes. Todas las mutaciones *uvi* encontradas son letales en homocariosis y dominantes en cuanto al tropismo en heterocariosis. Las funciones celulares implicadas en el tropismo a la radiación ultravioleta pero no a luz azul son indispensables para la célula.

Las células disponen de dos mecanismos para el tropismo. El mecanismo especial para la radiación ultravioleta es responsable del ligero tropismo positivo observado con exposiciones débiles a ultravioleta. El mecanismo especial para la luz azul participa también en la respuesta a exposiciones intensas a radiación ultravioleta.

A los carotenos se les atribuyen funciones de protección de las células frente a las radiaciones y otras condiciones adversas. Se han expuesto a diferentes condiciones adversas estirpes de *Phycomyces* que difieren en su capacidad de sintetizar carotenos, se las ha dejado recuperarse juntas de los daños, y se ha determinado su presencia en la población resultante. La presencia de carotenos no ofreció ninguna ventaja a la estirpe que lo contenía frente a las radiaciones gamma y ultravioleta C, la luz blanca en presencia de un fotosensibilizador (riboflavina) y el peróxido de hidrógeno. Tampoco presentan diferencias frente a estas acciones las estirpes de *Phycomyces* que acumulan cantidades similares de diferentes carotenos (licopeno, fitoeno y  $\beta$ -caroteno).

Las esporas y los micelios de todas las estirpes permanecen viables durante varios meses en condiciones ambientales normales. Las esporas de

las distintas estirpes pierden viabilidad independientemente de su contenido en carotenos, tanto si envejecen en agua o en los esporangios.

Hemos encontrado indicios de que los micelios con carotenos coloreados resisten mejor al envejecimiento, y los que contienen  $\beta$ -caroteno más que los que contienen licopeno.

Las diferencias en el predominio de las estirpes en los cultivos mixtos son independientes de sus contenidos carotenogénicos y están estrechamente ligadas a mutaciones secundarias.

## BIBLIOGRAFIA

- Agardh, C. A. (1817) "Synopsis algarum Scandinaviae, adjecta dispositione universali algarum". Ex officina Berlingiana, Lundae, XL +135 p.
- Alvarez, M. I., Benito, E. P., Campuzano, V. y Eslava, A. P. (1993) "Genetic loci of *Phycomyces blakesleeanus*". En *Genetic Maps. Locus Maps of Complex Genomes*, 6th edition (ed. O'Brien, S. J.), pp: 3120-3126, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Aragón, C. M. G., Murillo, F. J., Guardia, M. D. de la y Cerdá-Olmedo, E. (1976) "An enzyme complex for the dehydrogenation of phytoene in *Phycomyces*". *Eur. J. Biochem.* **63**: 71-75.
- Austin, D. J., Bu'Lock, J. D. y Drake, D. (1970) "The biosynthesis of trisporic acids from  $\beta$ -carotene via retinal and trisporol". *Experientia* **26**: 348-349.
- Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1986) "Chemical modification of carotenogenesis in *Gibberella fujikuroi*". *Phytochemistry* **25**: 1837-1841.
- Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1987) "Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*". *Curr. Genet.* **11**: 505-511.
- Bartlett, K. y Mercer, E. I. (1974) "Variation in the levels and composition of the sterols and sterol esters of *Phycomyces blakesleeanus* with age of culture". *Phytochemistry* **13**: 1115-1121.
- Bejarano, E. R., Parra, F., Murillo, F. J., Cerdá-Olmedo, E. (1988) "End-product regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*". *Arch. Microbiol.* **150**: 209-214.

- Bejarano, E. R., Avalos, J., Lipson, E. D. y Cerdá-Olmedo, E. (1991) "Photoinduced accumulation of carotene in *Phycomyces*". *Planta* **183**: 1-9.
- Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1992) "Independence of the carotene and sterol pathways of *Phycomyces*". *FEBS* **306**: 209-212.
- Bensasson, R., Land, E. J. y Maudinas, B. (1976) "Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet and electron pulse irradiation". *Photochem. Photobiol.* **23**: 189-193.
- Bergman, K., Burke, P. W., Cerdá-Olmedo, E., David, C. N., Delbrück, M., Foster, K. W., Goodell, E. W., Heisenberg, M., Meissner, G., Zalokar, M., Dennison, D. S. y Shropshire, W. Jr. (1969) "*Phycomyces*". *Bacteriol. Rev.* **33**: 99-157.
- Bergman, K., Eslava, A. P. y Cerdá-Olmedo, E. (1973) "Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism". *Mol. Gen. Genet.* **123**: 1-16.
- Bergtold, D. S., Simic, M. G., Alessio, H. y Cutler, R. G. (1988) "Urine biomarkers for oxidative DNA damage". *Basic Life Sci.* **49**: 483-489.
- Blaauw, A. H. (1908) "Die Perzeption des Lichtes". *Recl. Trav. Bot. Neerl.* **5**: 209-372.
- Blakeslee, A. F. (1904) "Sexual reproduction in the Mucorineae". *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* **40**: 205-319.
- Blanc, P. L., Tuveson, R. W. y Sargent, M. L. (1976) "Inactivation of carotenoid-producing and albino strains of *Neurospora crassa* by visible light, blacklight, and ultraviolet radiation". *J. Bacteriol.* **125**: 616-625.
- Borchert, R. (1963) "Über die Azetat-Aktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*". *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **38**: 31-61.

- Bramley, P. M. (1985) "Carotenogenic enzymes from *Phycomyces*". Pure & Appl. Chem. **57**: 671-673.
- Buder, J. (1918) "Die Inversion des Phototropismus bei *Phycomyces*". Ber. Dtsch. Bot. Ges. **36**: 104-105.
- Buder, J. (1920) "Neue phototropische Fundamentalversuche". Ber. Dtsch. Bot. Ges. **38**: 10-19.
- Burgeff, H. (1912) "Über Sexualität, Variabilität und Vererbung bei *Phycomyces nitens*". Ber. Dtsch. Bot. Ges. **30**: 679-685.
- Burgeff, H. (1914) "Untersuchungen über Variabilität, Sexualität und Erbllichkeit bei *Phycomyces nitens* Kuntze I". Flora **107**: 259-316.
- Burgeff, H. (1924) "Untersuchungen über Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen I". Bot. Abh. **4**: 1-31.
- Burgeff, H. (1925) "Über Arten und Artkreuzung in der Gattung *Phycomyces* Kunze". Flora **118-119**: 40-46.
- Burgeff, H. (1934) "Pflanzliche Avitaminose und ihre Behebung durch Vitaminzufuhr". Ber. Dtsch. Bot. Ges. **52**: 384-490.
- Burton, G. W. (1989) "Antioxidant action of carotenoids". J. Nutr. **119**: 109-111.
- Caglioti, L., Cainelli, G., Camerino, B., Mondelli, R., Prieto, A., Quilico, A., Salvatori, T. y Selva, A. (1966) "The structure of trisporic-C acid". Tetrahedron Suppl. **7**: 175-187.
- Carlile, M. J. (1970) "The photoresponses of fungi". En *The Photobiology of Microorganisms* (ed. Halldal, P.), pp: 309-344, Wiley, New York.
- Carnoy, J. B. (1870) "Recherches anatomiques et physiologiques sur les champignons". Bull. Soc. R. Bot. Belg. **9**: 157-321.
- Cerdá-Olmedo, E. y Reau, P. (1970) "Genetic classification of the lethal effects of various agents on heterokaryotic spores of *Phycomyces*". Mutat. Res. **9**: 369-384.



- Cerdá-Olmedo, E. (1975) "The genetics of *Phycomyces blakesleeanus*". Genet. Res. **25**: 285-296.
- Cerdá-Olmedo, E. (1985) "Carotene mutants of *Phycomyces*". Meth. Enzimol. **110**: 220-243.
- Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E. D. (eds.) (1987) "*Phycomyces*". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 430 pp.
- Cogdell, R. J. y Gardiner, A. T. (1993) "Functions of carotenoids in photosynthesis". Meth. Enzymol. **214**: 185-193.
- Concha, A. de la y Murillo, F. J. (1984) "Accumulation of a complex form of  $\beta$ -carotene by *Phycomyces blakesleeanus* cytoplasmic mutants". Planta **161**: 233-239.
- Corrochano, L. M. y Cerdá-Olmedo, E. (1990). "Photomorphogenesis in behavioural and colour mutants of *Phycomyces*". J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **6**: 325-335.
- Curry, G. M. y Gruen, H. E. (1959) "Action spectra for the positive and negative phototropism of *Phycomyces* sporangiophores". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **45**: 797-804.
- Cutler, R. G. (1984) "Carotenoids and retinol: their possible importance in determining longevity of primate species". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 7627-7631.
- Cutler, R. G. (1985) "Peroxide-producing potential of tissues: Inverse correlation with longevity of mammalian species". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 4798-4802.
- Davies, B. H. (1965) "Analysis of carotenoid pigments 4. Fungi". En *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (ed. Goodwin, T. W.), pp: 497-498, Academic Press, New York.
- Delbrück, M. y Shropshire, W. Jr. (1960) "Action and transmission spectra of *Phycomyces*". Plant Physiol. **35**: 194-204.

- Demerec, M., Adelber, E. A., Clark, A. J. y Hartman, P. E. (1966) "A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics". *Genetics* **54**: 61-76.
- Dennison, D. S. (1959) "Gallic acid in *Phycomyces* sporangiophores". *Nature* **184**: 2036.
- Dennison, D. S. y Vogelmann, T. C. (1989) "The *Phycomyces* lens: measurement of the sporangiophore intensity profile using a fiber optic microprobe". *Planta* **179**: 1-10.
- Dorogokupla, A. C., Troitzkaia, E. G., Adilgireieva, L. K., Postolnikov, S. F. y Chekrigina, Z. P. (1973) "(Effect of carotene on the development of induced tumors)". *Zdravookhr. Kazakh.* **10**: 32-34.
- Ende, H. van den (1968) "Relationship between sexuality and carotene synthesis in *Blakeslea trispora*". *J. Bacteriol.* **96**: 1298-1303.
- Epstein, J. H. (1973) "Effects of  $\beta$ -carotene on UV induced cancer formation in the hairless mouse skin". *Photochem. Photobiol.* **25**: 211-213.
- Eslava, A. P., Alvarez, M. I. y Cerdá-Olmedo, E. (1974) "Regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* by vitamin A and  $\beta$ -ionone". *Eur. J. Biochem.* **48**: 617-623.
- Eslava, A. P., Alvarez, M. I. y Delbrück, M. (1975a) "Meiosis in *Phycomyces*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 4076-4080.
- Eslava, A. P., Alvarez, M. I., Burke, P. V. y Delbrück, M. (1975b) "Genetic recombination in sexual crosses of *Phycomyces*". *Genetics* **80**: 445-462.
- Felix, E. L., Cohen, M. H. y Loyd, B. C. (1976) "Immune and toxic anti-tumor effects of systemic and intralesional vitamin A". *J. Surgical Res.* **21**: 307-312.
- Foote, C. S., Chang, Y. C. y Denny, R. W. (1970) "Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection". *J. Am. Chem. Soc.* **92**: 5216-5218.

- Frolik, C. A. y Roller, P. P. (1981) "The role of retinoids (vitamin A and its analogs) in the prevention of epithelial cancer". En *Antitumor Compounds of Natural Origin: Chemistry and Biochemistry* (ed. Aszalos A.), vol II, pp: 87-128, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Fukshansky, L. y Steinhardt, A. R. (1987) "Spatial factors in *Phycomyces* phototropism: analysis of balanced responses". *J. Theor. Biol.* **129**: 301-323.
- Fukshansky, L. y Richter, T. (1990) "What do we know about the non-uniform perception of a phototropic stimulus in *Phycomyces*?". *Planta* **182**: 107-112.
- Fukshansky, L. (1993) "Intracellular processing of a spatially non-uniform stimulus: case study of phototropism in *Phycomyces*". *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **19**: 161-186.
- Galland, P. y Lipson, E. D. (1987) "Light physiology of *Phycomyces* sporangiophores". En *Phycomyces* (eds. Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E D.), pp: 49-92, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Gerster, H. (1991) "Potential role of  $\beta$ -carotene in the prevention of cardiovascular disease". *Internat. J. Vit. Nut. Res.* **61**: 277-291.
- Goldstrohm, D. D. y Lilly, V. G. (1965) "The effect of light on the survival of pigmented and nonpigmented cells of *Dacryopinax spatularia*". *Mycologia* **57**: 612-623.
- Goodall, A. H., Fisher, D. y Lucy, J.A. (1980) "Cell fusion, haemolysis and mitochondrial swelling induced by retinol and derivatives". *Biochim. Biophys. Acta* **595**: 9-14.
- Goodwin, T. W. (1952) "Fungal carotenoids". *Bot. Rev.* **18**: 291-316.
- Goodwin, T. W. (ed.) (1980) "The biochemistry of carotenoids". En *Plants*, 2ª edición, vol. 1, Chapman and Hall, London. 377 pp.

- Govind, N. S. y Cerdá-Olmedo, E. (1986) "Sexual activation of carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*". J. Gen. Microbiol. **132**: 2775-2780.
- Gressel, J. y Rau, W. (1983) "Photocontrol of fungal development". En *Photomorphogenesis. Encyclopedia of Plant Physiology New Series* (eds. Shropshire, W. y Mohr, H.), vol. 16, pp: 603-639, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Griffin, D. H. (ed.) (1994) "Secondary (special) metabolism". En *Fungal Physiology*, 2ª edición, pp: 246-274, ed. Wiley-Liss, New York-Chichester-Brisbane-Toronto-Singapore.
- Griffiths, M., Siström, W. R., Cohen-Bazire, G. y Stanier, R. Y. (1955) "Function of carotenoids in photosynthesis". Nature **176**: 1211-1214.
- Guardia, M. D. de la, Aragón, C. M. G., Murillo, F. J. y Cerdá-Olmedo, E. (1971) "A carotenogenic enzyme aggregate in *Phycomyces*: evidence from quantitative complementation". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**: 2012-2015.
- Gutiérrez-Corona, F. y Cerdá-Olmedo, E. (1985) "Environmental influences in the development of *Phycomyces* sporangiophores". Exp. Mycol. **9**: 56-63.
- Hagins, W. A. (1972) "The visual process: excitatory mechanisms in the primary receptor cells". Ann. Rev. Biophys. Bioeng. **1**: 131-158.
- Hagins, W. A. y Yoshikami, S. (1974) "A role for Ca<sup>2+</sup> in excitation of retinal rods and cones". Exper. Eye Res. **18**: 299-305.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. (eds.) (1989) "Free Radicals in Biology and Medicine", 2ª edición, Clarendon Press, Oxford, 543 pp.
- Heisenberg, M. y Cerdá-Olmedo, E. (1968) "Segregation of heterokaryons in the asexual cycle of *Phycomyces*". Mol. Gen. Genet. **102**: 187-195.

- Hicks, R. M. (1983) "The scientific basis for regarding vitamin A and its analogues as anti-carcinogenic agents". Proc. Nutr. Soc. **42**: 83-93.
- Hofmeister, F. (1867) "Pflanzenzelle, p. 286 (citado en Pfeffer, 1906, p.165).
- Jesaitis, A. J. (1974) "Linear dichroism and orientation of the *Phycomyces* photopigment". J. Gen. Physiol. **63**: 1-21.
- Jialal, I., Norkus, E. P., Cristol, L. y Grundy, S. M. (1991) "β-carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein". Biochim. Biophys. Acta **1086**: 134-138.
- Kirschfeld, K. (1982) "Carotenoid pigments: their possible role in protecting against photooxidation in eyes and photoreceptor cells". Proc. R. Soc. Lond. B **216**: 71-85.
- Krinsky, N. I. y Deneke, S. M. (1982) "Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids". JNCI **69**: 205-210.
- Krinsky, N. I. (1991) "Effects of carotenoids in cellular and animal systems". Am. J. Clin. Nutr. **53**: 238S-246S.
- Kumagai, T. (1988) "Photocontrol of fungal development". Photochem. Photobiol. **47**: 889-896.
- Kunze, G. (1817) "*Phycomyces*". Mykologische Hefte **1**: 113-114.
- Lansbergen, J. C., Renaud, R. L. y Subden, R. E. (1976) "Phytoene photoinduction in a carotenoid mutant of *Neurospora crassa*". Can. J. Bot. **54**: 2445-2448.
- Massart, J. (1888) "Recherches sur les organismes inférieurs. 1. La loi de Weber vérifiée pour l'héliotropisme du champignon". Bull. Acad. R. Sci. Belg., 3rd Ser. **16**: 590-601.
- Mathews, M. M. y Siström, W. R. (1960) "Function of carotenoid pigments of *Sarcina lutea*". Arch. Mikrobiol. **35**: 136-146.

### Bibliografía

- Mathews, M. M. y Krinsky, N. I. (1965) "The relationship between carotenoid pigments and resistance to radiation in non-photosynthetic bacteria". *Photochem. Photobiol.* **4**: 813-817.
- Mathews, M. M. y Krinsky, N. I. (1970) "Studies on the protective function of the carotenoids pigments of *Sarcina lutea*". *Photochem. Photobiol.* **11**: 419-428.
- Mathews-Roth, M. M., Pathak, M. A., Parrish, J., Fitzpatrick, T. B., Kass, E. H., Toda, K. y Clemens, W. (1972) "A clinical trial of the effects of oral beta-carotene on the responses of human skin to solar radiation". *J. Invest. Dermatol.* **59**: 349-353.
- Mathews-Roth, M. M. y Pathak, M. A. (1975) "Phytoene as a protective agent against sunburn (> 280 nm) radiation in guinea pigs". *Photochem. Photobiol.* **21**: 261-263.
- Mathews-Roth, M. M. (1982) "Photosensitization by porphyrins and prevention of photosensitization by carotenoids". *J. Nat. Cancer Inst.* **69**: 279-285.
- Mathews-Roth, M. M. (1984) "Porphyrin photosensitization and carotenoid protection in mice; *in vitro* and *in vivo* studies". *Photochem. Photobiol.* **40**: 63-67.
- Mathews-Roth, M. M. y Krinsky, N. I. (1987) "Carotenoids affect development of UV-B induced skin cancer". *Photochem. Photobiol.* **46**: 507-509.
- Mathews-Roth, M. M., Lausen, N., Drouin, G., Richter, A. y Krinsky, N. I. (1991) "Effects of carotenoid administration of bladder cancer prevention". *Oncology* **48**: 177-179.
- Mehrotra, B. S. y Nand, K. (1970) "Mycological fat production in India. I. A preliminary survey of fat producing moulds". *Sydowia Annales Mycologici* **24**: 131-143.
- Meissner, G. y Delbrück, M. (1968) "Carotenes and retinal in *Phycomyces* mutants". *Plant Physiol.* **43**: 1279-1283.

- Meistrich, M. L., Fork, R. L. y Matricón, J. (1970) "Phototropism in *Phycomyces* as investigated by focused laser radiation". *Science* **169**: 370-371.
- Mulders, R. M. van, Laere, A. J. van y Verbeke, M. N. (1986) "Effects pH and cations on the germination induction of *Phycomyces* spores with carboxylic acids". *Biochem. Physiol. Pflanzen* **181**: 103-115.
- Murillo, F. J. y Cerdá-Olmedo, E. (1976) "Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*". *Mol. Gen. Genet.* **148**: 19-24.
- Ootaki, T. (1973) "A new method for heterokaryon formation in *Phycomyces*". *Mol. Gen. Genet.* **121**: 49-56.
- Ootaki, T., Crafts-Lighty, A., Delbrück, M. y Hsu, W. -J. (1973) "Complementation between mutants of *Phycomyces* deficient with respect to carotenogenesis". *Mol. Gen. Genet.* **121**: 57-70.
- Palozza, P. y Krinsky, N. I. (1991) "The inhibition of radical-initiated peroxidation of microsomal lipids by both  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene". *Free Rad. Biol. Med* **11**: 407-414.
- Palozza, P. y Krinsky, N. I. (1992) " $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol are synergistic antioxidants". *Arch. Biochem. Biophys.* **297**: 184-187.
- Palozza, P., Moualla, S. y Krinsky, N. I. (1992) "Effects of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol on radical-initiated peroxidation of microsomes". *Free Rad. Biol. Med* **13**: 127-136.
- Peto, R., Doll, R., Buckley, J. D. y Sporn, M. B. (1981) "Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?". *Nature* **290**: 201-208.
- Popescu, T., Roessler, A. y Fukshansky, L. (1989a). "A novel effect in *Phycomyces* phototropism". *Plant Physiol.* **91**: 1586-1593.
- Popescu, T., Zängler F., Sturm, B. y Fukshansky, L. (1989b) "Image analyzer used for data acquisition in phototropism studies". *Photochem. Photobiol.* **50**: 701-705.

- Presti, D., Hsu, W.-J. y Delbrück, M. (1977) "Phototropism in *Phycomyces* mutants lacking  $\beta$ -carotene". *Photochem. Photobiol.* **26**: 403-405.
- Presti, D. y Delbrück, M. (1978) "Photoreceptors for biosynthesis, energy storage and vision". *Plant Cell Environ.* **1**: 81-100.
- Presti, D. E. y Galland, P. (1987) "Photoreceptor biology of *Phycomyces*". En *Phycomyces* (eds. Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E. D.), pp: 93-126, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Pung, A. O., Rundhaug, J. E., Yoshizawa, C. N. y Bertram, J. S. (1988) " $\beta$ -carotene and canthaxanthin inhibit chemically- and physically-induced neoplastic transformation in 10T1/2 cells". *Carcinogenesis* **9**: 1533-1539.
- Robbins, W. J., Kavanagh, V. W. y Kavanagh, F. (1942) "Growth substances and dormancy of spores of *Phycomyces*". *Bot. Gaz.* **104**: 224-242.
- Roncero, M. I. G., Zabala, C. y Cerdá-Olmedo, E. (1984) "Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine on *Phycomyces* spores". *Mutat. Res.* **125**: 195-204.
- Santamaria, L., Bianchi, A., Arnaboldi, A., Andreoni, L. y Bermond, P. (1983) "Dietary carotenoids block photocarcinogenic enhancement by benzo (a)pyrene and inhibit its carcinogenesis in the dark". *Experientia* **39**: 1043-1045.
- Santamaria, L., Bianchi, L., Bianchi, A., Pizzala, R., Santagati, G. y Bermond, P. (1984) "Photomutagenicity by 8-methoxypsoralen with and without singlet oxygen involvement and its prevention by  $\beta$ -carotene". *Med. Biol. Environ.* **12**: 541-546.
- Schopfer, W. H. (1934) "Les vitamines cristallées B comme hormones de croissance chez un microorganisme (*Phycomyces*)". *Arch. Mikrobiol.* **5**: 511-549.



- Schopfer, W. H. (1935) "Sur l'identification d'un caroténoïde de champignon". C. R. Soc. Biol. **118**: 3-4.
- Schopfer, W. H. y Jung, A. (1935) "Recherches sur l'activité vitaminique A du thalle d'une Mucorinée". C. R. Soc. Biol. **120**: 1093-1095.
- Shropshire, W. Jr. (1962) "The lens effect and phototropism of *Phycomyces*". J. Gen. Physiol. **45**: 949-958.
- Siefermann-Harms, D. (1985) "Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function". Biochim. Biophys. Acta **811**: 325-355.
- Steinhardt, A. R. y Fukshansky, L. (1987). "Geometrical optics approach to the intensity distribution in finite cylindrical media". Appl. Optics **26**: 3778-3789.
- Steinhardt, A. R., Popescu, T. y Fukshansky, L. (1989) "Is the dichroic photoreceptor for *Phycomyces* phototropism located at the plasma membrane or at the tonoplast?". Photochem. Photobiol. **49**: 79-87.
- Strain, H. H. (ed.) (1949) "Photosynthesis in Plants". Cap. 6. Iowa State College Press, Ames.
- Suárez, T., Orejas, M. y Eslava, A. P. (1985) "Isolation, regeneration, and fusion of *Phycomyces blakesleeanus* spheroplasts". Exp. Mycol. **9**: 203-211.
- Sutter, R. P., Capage, D. A. y Harrison, T. L. (1971) "Aspects of trisporic acid synthesis in *Blakeslea trispora*". First International Mycological Congress, Exeter: IV 2.
- Sutter, R. P., Capage, D. A., Harrison, T. L. y Keen, W. A. (1973) "Trisporic acid biosynthesis in separate plus and minus cultures of *Blakeslea trispora*: identification by *Mucor* assay of two mating-type-specific components". J. Bacteriol. **114**: 1074-1082.
- Sutter, R. P., Harrison, T. L. y Galasko, G. (1974) "Trisporic acid biosynthesis in *Blakeslea trispora* via mating type-specific precursors". J. Biol. Chem. **249**: 2282-2284.

- Sutter, R. P. (1975) "Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**: 127-130.
- Thomas S. A., Sargent, M. L. y Tuveson, R. W. (1981) "Inactivation of normal and mutant *Neurospora crassa* conidia by visible light and near-UV: role of  $^1O_2$ , carotenoid composition and sensitizer location". Photochem. Photobiol. **33**: 349-354.
- Thornton, R. M. (1972) "Alternative fruiting pathways in *Phycomyces*". Plant Physiol. **49**: 194-197.
- Thornton, R. M. (1975) "Photoresponses of *Phycomyces blakesleeanus*: initiation and development of sporangiophore primordia". Am. J. Bot. **62**: 370-378.
- Tolmasoff, J. M., Ono, T. y Cutler, R. G. (1980) "Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 2777-2781.
- Tuveson, R. W., Larson, R. A. y Kagan, J. (1988) "Role of cloned carotenoid genes expressed in *Escherichia coli* in protecting against inactivation by near-UV light and specific phototoxic molecules". J. Bacteriol. **170**: 4675-4680.
- Will, O. H., Newland, N. A. y Reppe, C. R. (1984) "Photosensitivity of pigmented and nonpigmented strains of *Ustilago violacea*". Curr. Microbiol. **10**: 295-302.
- Wolf, G. (1982) "Is dietary  $\beta$ -carotene an anti-cancer agent?". Nutr. Rev. **40**: 257-261.
- Wright, L. J. y Rilling, H. C. (1963) "The function of carotenoids in a photochromogenic bacterium". Photochem. Photobiol. **2**: 339-342.
- Zankel, K. L., Burke, P. V. y Delbrück, M. (1967) "Absorption and screening in *Phycomyces*". J. Gen. Physiol. **50**: 1893-1906.
- Zhu, H. y Kirschfeld, K. (1984) "Protection against photodestruction in fly photoreceptors by carotenoid pigments". J. Comp. Physiol. A. **154**: 153-156.

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que les estoy muy agradecida y sin ellas esta tesis no hubiera sido posible jamás.

A Enrique, todo lo que sé, él me lo ha enseñado. Quiero agradecerle su dedicación a este trabajo, su paciencia, sus ideas, sus genialidades y el haberme iniciado en el hábito del "paseo".

Al Prof. Leonid Fukshansky, la posibilidad de trabajar en su laboratorio, sus aportaciones a la primera parte de este trabajo y su inmensa amabilidad. A Claudia, Thomas, Andreas, Heribert, Johannes, Alex, Michaela y Mischa, su inestimable ayuda con los ordenadores, su gran amistad y el haber llenado mis cuatro meses en Alemania de maravillosos recuerdos. A Nour y Marc, el haberme acogido en su hogar y haberme hecho sentir como en mi propia casa y entre mi familia.

A los Profs. Reiner Hertel y Edgar Wagner, sus valiosos comentarios y su entrañable amistad.

Al Prof. Hemmemerich de la Universidad de Constanza, por la 5-deaza-5-carbono-riboflavina utilizada en este trabajo.

Al Prof. Javier Avalos, su apoyo, sus ánimos, sus consejos y el haber sido, en más de una ocasión, mi "pañuelo de lágrimas". Quiero agradecerle sus geniales bromas que me han animado tanto, sobre todo en los peores momentos. Todo el trabajo fotográfico de esta tesis se lo debo a él.

Al Prof. Antonio Marín, su infinita amabilidad y el no tener más que palabras agradables para los demás.

Al Prof. Gregorio García Herdugo, el haberme iniciado en la Ciencia y el haberme obsequiado con tan valiosos consejos.

Al Servicio de Radioterapia del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, el haberme brindado la posibilidad de realizar los experimentos de radiación gamma en sus instalaciones. Muy especialmente quiero agradecer a Amadeo Gómez su inestimable ayuda, eficiencia y dedicación y, sobre todo, el haberse expuesto a las radiaciones en mi lugar, habiéndose ganado muy merecidamente el calificativo de "padrino de mis hijos".

A mi gran amiga Carmen, estos maravillosos 24 años de amistad en los que más que una amiga ha sido una "hermana". Quiero agradecerle sus inestimables consejos, ánimos y charlas matutinas que me hicieron ver los problemas de otro color. Me siento muy afortunada por esta amistad tan inmensa.

A Chon , sus ánimos, su ayuda, su amistad y las divertidas charlas en la secretaría. A Ana, exactamente lo mismo.

A Asun, su impecable trabajo, y a Pepe Córdoba, su disposición para todo lo que he necesitado.

A mis compañeros de laboratorio, Javi y Luis Corrochano, con los que siempre pude contar. A la Asociación de Amigos del Baño de la 115, es decir, Nicolás, Rafa Flores, Rafa Fernández, Santi, Lara y Bina, el ser una gente tan entrañable y divertida. Al pobre baño de la 115, al que se le cargó de tantas responsabilidades.

A Pepe Casadesús, Tahía, Antonio Hidalgo, Paco Luque, Enca, Quique, Antonio Carballo, J. M. Gasent, Paco Castrejón, M<sup>a</sup> Carmen, Manolo, Andrés Garzón, Fernando, Gabi, Helena y Félix, a los que echaré de menos.

A Isabel y Juanjo, sus ánimos en la escalera.

A Carlos M<sup>a</sup>, Lola y José Carlos, su amistad y sus consejos.

A mis padres, el haberme dado la posibilidad de llegar a aquí. Quiero agradecerles su disponibilidad para todo, su comprensión, su apoyo y el haber aguantado los días difíciles sin pedir explicaciones. Aquí quiero decir que tengo los MEJORES padres que se pueda desear.

## *Agradecimientos*

A toda mi familia natural y política, que de una manera u otra me han apoyado. A Laura, Helio y Sergio, por haberme dado tantas alegrías.

A Salva, que ha sido lo mejor de estos últimos cinco años. Quiero darle las gracias por absolutamente TODO. Le agradezco el haber estado presente en los momentos en los que pensé abandonar; los sacrificios compartidos han pesado mucho menos. Sobre todo quiero darle las gracias por nuestra vida en común.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, la financiación de estos años.

A todos, muchas gracias.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. VIRGINIA MARTIN ROJAS titulada EFFECTOS DE LA RADIACION UV Y FUNCIONES DE LOS CAROTENOS EN PHYCOMYCES

acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE POR UNANIMIDAD

Sevilla, 15 de JULIO 1994

El Vocal,



El Presidente



El Vocal,



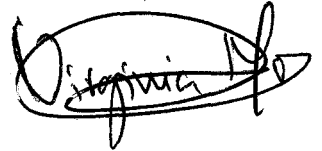
El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,



500537772

FBI E TD-262

537772