

R. 4495



TD  
640

GERMINACION DE LAS ESPORAS DE PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS

Trabajo realizado en el Departamento de Genética,  
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla,  
para optar al grado de Doctor en Biología,  
por el licenciado

FRANCISCO RIVERO PALLARES

Sevilla, 6 febrero 1986

Director y Ponente.

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

A mis padres,  
por estar ahí todo el tiempo,  
y a la Naturaleza,  
por ser más fantástica  
que cualquier fantasía imaginable.

No puede morir lo que yace eternamente, y con el transcurso de extraños evos hasta la muerte puede morir.

Abdul Alhazred, "Necronomicon"

Al relatar las circunstancias que han llevado a mi confinamiento en este asilo para dementes, me doy cuenta de que mi presente situación hará surgir naturalmente dudas sobre la autenticidad de mi relato.

H.P. Lovecraft, "La tumba"

Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar.

A. Machado

"...gracieux Mucor,..., ces petites plantes se jouent de la patiente la plus héroïque; on dirait qu'elles se plaisent à dérober le cycle de leur vie aux regards scrutateurs de la science"

J.B. Carnoy, 1870

(sobre Mucor romanus, hoy Phycomyces).

## I N T R O D U C C I O N

Phycomyces blakesleeenanus Burgeff es un hongo filamentoso, unicelular y multinucleado. Tradicionalmente se clasifica en la clase Cigomicetos, orden Mucorales, familia Mucoráceas. En esta familia se encuentran muchos mohos comunes, como Mucor y Rhizopus.

Phycomyces puede realizar un ciclo de vida asexual y otro sexual (Fig. 1). El ciclo asexual puede iniciarse con la germinación de las esporangiosporas (a partir de ahora, esporas). Se forma un micelio ramificado que, en condiciones apropiadas, emite hifas aéreas denominadas esporangióforos. Tras un período de crecimiento, el esporangióforo diferencia un esporangio apical, en el cual se forman las esporas por tabicación del citoplasma. La fase de formación de las esporas se llama estadio III y se caracteriza por la ausencia de crecimiento en el esporangióforo y el esporangio y el cambio de coloración del esporangio de amarillo a gris. Cada esporangio maduro tiene unas  $10^5$  esporas, con una amplia variabilidad. Las esporas liberadas del esporangio cierran el ciclo. Una descripción más detallada se encuentra en Bergman et al. (1969).

Las esporas maduras son latentes constitutivas según la definición de Sussman (1969), es decir, no germinan masivamente en un medio de cultivo que permite el crecimiento del micelio. Este trabajo se centra en la germinación de la espora. El proceso de germinación está descrito en la Figura 2. La espora se va hinchando y redondeando conforme avanza la germinación. A partir de las 3 horas aparecen pequeñas vacuolas que aumentan de tamaño y se van fundiendo en una gran vacuola central. Hacia las 8 horas aparece el tubo germinal.



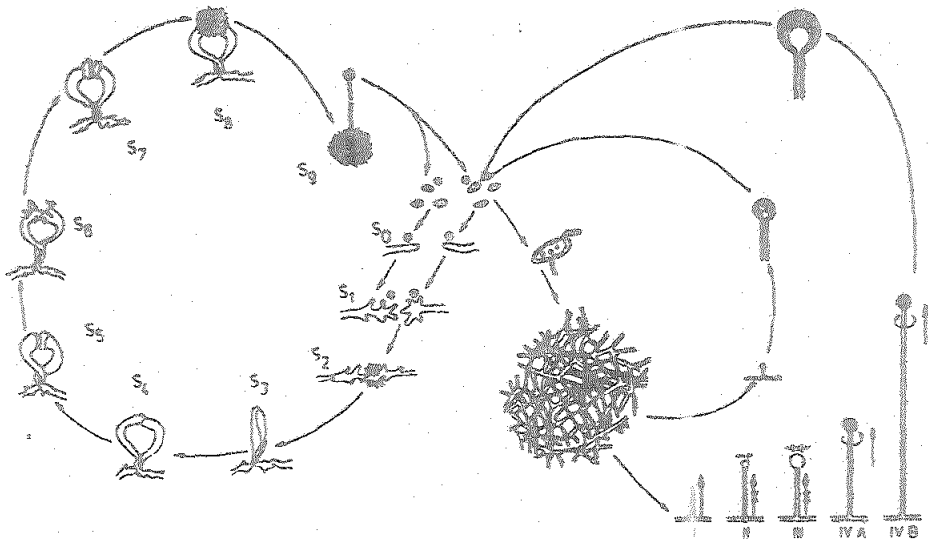


Figura 1. Ciclo de vida de *Phycomyces*. Las esporas (centro), activadas e incubadas en un medio adecuado, germinan y producen un micelio tupido de hifas ramificadas. Los esporangióforos, o estructuras fructíferas vegetativas (inferior derecha), se producen bien como macróforos (varios cm o incluso dm de longitud) o micróforos (aproximadamente 1 mm de longitud). En ambos casos llevan un esporangio (superior derecha) conteniendo esporas. Hay dos tipos sexuales. Una sucesión compleja de hechos bioquímicos y morfológicos ocurren cuando los micelios de tipos opuestos se encuentran y que tiene como resultado la formación de la cigospora (superior izquierda). Las cigosporas germinan tras una larga latencia y producen un germoesporangióforo, que forma un germoesporangio. Las germoesporas son los productos de la recombinación genética. Las germoesporas son muy parecidas a las esporas vegetativas y son capaces de iniciar el ciclo vegetativo.

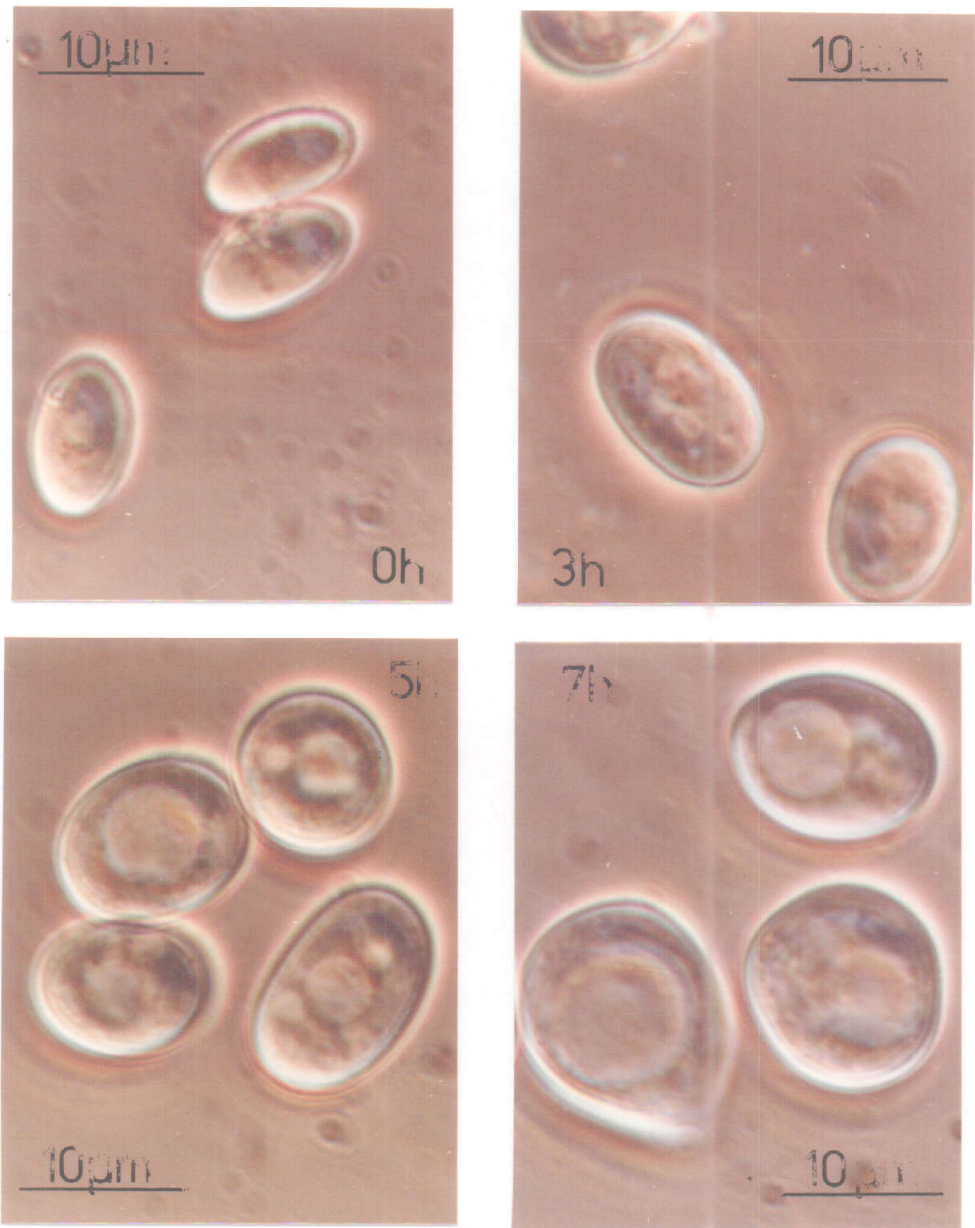


Figura 2. Secuencia de la germinación de *Phycomyces* según se observa al microscopio óptico. Las esporas se hinchan y redondean progresivamente. A partir de las tres horas aparecen pequeñas vacuolas que aumentan de tamaño y terminan formando una gran vacuola central. A partir de las siete horas comienza a aparecer el tubo de germinación.

## I. LA ESPORA LATENTE

### Citología

Las esporas son elipsoidales; su tamaño y su forma dependen de las condiciones de cultivo y de las estirpes estudiadas (Rudolph, 1958). La estirpe NRRL1555 incubada en luz produce esporas cuyas medidas son, como media, 11  $\mu\text{m}$  de largo y 7  $\mu\text{m}$  de ancho.

Las esporas tienen de 1 a 7 núcleos, predominando las de 3 ó 4 (Johannes, 1950; Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968; Reau, 1972). Con la tinción Feulgen los núcleos pueden verse como pequeños globos rugosos de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro (Robinow, 1957).

En el citoplasma hay gotas de lípidos cubiertas con ferritina (David, 1974; Grove, 1976) que contienen beta-caroteno (Furch et al., 1976). Las mitocondrias están situadas en la periferia del citoplasma. Son generalmente redondas y tienen muchas y poco desarrolladas crestas (Grove, 1974; Tu y Malhotra, 1976; Pambor, 1979).

El plasmalema tiene dos tipos de partículas, pequeñas y grandes, diferentemente distribuidas entre la cara interna y la externa del plasmalema (Malhotra y Tewari, 1973; Tu y Malhotra, 1977b; Kirillov et al., 1979).

La pared celular tiene un grosor de 0.3 a 0.4  $\mu\text{m}$  y está formada por diversas capas con diferente densidad a los electrones (Tu y Malhotra, 1976; Furch y Pambor, 1978a, 1978b).

### Composición

El contenido de las esporas de Phycomyces se muestra en la Tabla 1. La principal reserva de carbono es la trehalosa (alfa-D-glucopiranosil-alfa-D-glucopiranosido).

Tabla 1. Composición de esporas desecadas de Phycomyces.

Componentes y su porcentaje		Referencias	
Pared celular 25%	Esporopolenina 10%	5	
	Proteínas 11%	5	
	Quitina 4%	5	
	Otros polisacáridos 50%	Glucosa 55%	11
		Ac. Urónicos 25%	11
Manosa 15%		11	
Trehalosa 25-35%	1, 9		
Proteínas 22%	10		
ARN 5.2%	10		
ADN 0.4%	10		
Aminoácidos 2-3%	Glutamina 50%	3, 6	
	Glutamato 10%	3, 6	
	Asparagina 7%	3, 6	
	Alanina 6%	3, 6	
	Aspartato 5%	3, 6	
Lípidos 3%	Palmitico 5-13%	2, 8	
	Oleico 11-24%	2, 8	
	Linoleico 24-28%	2, 8	
	Linolénico 36-48%	2, 8	
Cenizas 7%	7		
Agua 3%	4		

1. Delvaux, 1974. 2. Furch et al., 1976. 3. Furch y Steinberg, 1977. 4. Furch, 1978. 5. Furch y Pambor, 1978b. 6. Furch, 1979. 7. B. Furch, no publicado. 8. Marouf y Malhotra, 1976. 9. Rudolph y Ochsén, 1969. 10. Van Assche y Carlier, 1973. 11. Van Laere et al., 1977.

No hay glucógeno (Furch, 1981) y los lípidos son poco abundantes. La reserva de nitrógeno es la glutamina.

### Metabolismo

Las esporas latentes contienen algunos polisomas (Van Assche y Dekeersmaeker, 1973), pero la síntesis de proteína y ARN es muy reducida y la de ADN, indetectable (Van Assche y Carlier, 1973).

Las esporas secas no tienen un consumo apreciable de oxígeno. Las esporas latentes suspendidas en agua consumen 51 nl de O<sub>2</sub> por g peso seco y segundo, mientras que en medio de cultivo consumen diez veces más (Rudolph, 1960a). El cociente respiratorio, o relación entre el CO<sub>2</sub> producido y el O<sub>2</sub> consumido, vale 0.9 (Delvaux, 1974). La espora tiene dos mecanismos respiratorios, el normal, para el que dispone de los citocromos necesarios (Keyhani et al., 1972), y otro insensible a cianuro (Van Laere et al., 1980b). Por ahora sólo cabe especular acerca del papel fisiológico de esta ruta alternativa (Solomos, 1977), pero en semillas podría estar relacionada con los fenómenos de rehidratación de la membrana mitocondrial (Simon, 1978).

La espora latente puede tomar glucosa externa y metabolizarla a través de la vía de los monofosfatos de hexosas. Sin embargo, alrededor del 60 % de la glucosa incorporada se destina a sintetizar trehalosa (Van Laere y Carlier, 1975).

El tratamiento de esporas latentes con piruvato en varias concentraciones y a diferentes pH no induce la germinación. Sin embargo, el piruvato entra en la espora a pH bajos. Las esporas decarboxilan muy mal el piruvato a pH 4.5 (el del medio de cultivo usual), pero la reacción mejora a pH más bajos. No se han encontrado diferencias en la actividad de la deshidrogenasa del piruvato en extractos

de esporas latentes y activadas. Sí hay diferencias en la descarboxilación del piruvato: la fracción mitocondrial de esporas latentes dobla su actividad descarboxilante cuando se trata con tritón X-100; no ocurre así cuando el tratamiento se realiza sobre la fracción mitocondrial de esporas activadas. Estas últimas tienen una alta actividad descarboxilante basal (Van Laere y Van der Bosch, 1981; Van Laere et al., 1982).

La espora latente contiene grandes cantidades de ATP, aunque se incube en agua. La adición de un sustrato incrementa el contenido de trifosfato de nucleótidos (Furch, 1974; Van Laere et al. 1980b).

La espora latente excreta pequeñas cantidades de piruvato, etanol y acetaldehído (Furch, 1971).

## II. ACTIVACION DE LA ESPORA

Activar las esporas latentes es inducir las a crecer. Las condiciones de cultivo en que se obtienen las esporas influyen en su germinación. La esporulación en la luz o a temperaturas relativamente elevadas las hace más fácilmente activables por calor (Robbins et al., 1942; Rudolph, 1960b). La adición de AMPc al medio de cultivo afecta a la distribución de partículas en el plasmalema de las esporas y reduce su germinabilidad (Tu y Malhotra, 1977a). El envejecimiento de las esporas favorece su germinación espontánea, pero disminuye su viabilidad global (Robbins et al., 1942); este efecto es menor si las esporas se conservan a bajas temperaturas (Sommer y Halbsguth, 1957).

### Germinación en medios autoclavados

Una baja proporción de las esporas de Phycomyces (1-5%) germinan al ser incubadas en un medio de cultivo capaz de sostener el crecimiento activo del micelio (Sommer y

Halbsguth, 1957). La proporción es aun menor (<1%) si se utilizan productos muy puros y se esteriliza el medio por filtración. Se conocen varios tratamientos activadores que provocan la germinación de prácticamente todas las esporas; los más utilizados son el choque térmico y la exposición a acetato.

Se supone que el autoclavado del medio descompone al menos alguno de sus componentes en compuestos activadores. Se ha demostrado que el autoclavado de la glucosa a pH alcalino provoca su descomposición a acetato, un agente activador (Brinckmann, 1960), pero los medios usualmente autoclavados tienen pH ácido.

El calentamiento de glucosa en solución ácida la transforma parcialmente en 5-hidroximetilfurfural (Wolfson et al., 1948) y aldehídos insaturados en los carbonos 2 y 3 (Evans y Gillam, 1943). La literatura ignora si estos compuestos son activadores de las esporas de Phycomyces, pero el furfural activa a las esporas de Neurospora.

### Activación por calor

Las esporas de Phycomyces pueden ser activadas por choque térmico (Robbins et al., 1942). El tiempo de exposición necesario para alcanzar la activación máxima depende inversamente de la temperatura (Borchert, 1962; Van Laere et al., 1980b). El tratamiento más utilizado es la exposición a 48°C durante 5 a 30 minutos. Las esporas secas no se activan por calor (Halbsguth y Rudolph, 1959), pero la activación no exige suspenderlas en agua; basta que su contenido de agua sea el 60% (Verbeke et al., 1981). La activación por calor ocurre en anaerobiosis (Halbsguth y Rudolph, 1959) y no es afectada por la azida sódica (Van Laere et al., 1980b) ni por los inhibidores de la síntesis de proteínas (Van Assche et al., 1972).

Las esporas de Phycomyces activadas por calor e incubadas en agua no germinan y pierden progresivamente el estado activado. Esta desactivación es favorecida por la anaerobiosis e impedida por la incubación a 1°C o el secado; la vuelta al estado latente requiere, por tanto, alguna actividad metabólica (Halbsguth y Rudolph, 1959). Las esporas desactivadas pueden ser activadas por un nuevo choque térmico. Las repetidas activaciones van seguidas de desactivaciones cada vez menores y finalmente matan a las esporas (Halbsguth y Rudolph, 1959). La desactivación depende de la temperatura usada para activar a las esporas y del tiempo de exposición a ella, así como del tiempo de incubación en agua antes de transferir al medio de cultivo (Borchert, 1962; Van Laere et al., 1980b).

La exposición a 50°C durante 3 minutos activa las esporas irreversiblemente, es decir, aumenta la síntesis de ARN y proteína, el contenido de ATP permanece alto (Van Laere et al., 1980b), se produce una vacuolización incipiente (Borchert, 1962) y disminuye la densidad de las esporas (Van Laere et al., 1980a) aunque se incuben posteriormente en agua. Los mismos fenómenos ocurren en las esporas activadas reversiblemente (3 minutos a 44°C) sólo si las esporas se incuban en presencia de glucosa puesto que si se incuban en agua vuelven al estado latente. Por tanto, las esporas activadas irreversiblemente son menos dependientes de sustratos exógenos para los primeros momentos de la germinación. El tratamiento a 50°C activa la trehalasa y provoca una abundante producción de glucosa, que basta para mantener el estado activado de la espora. Parece como si las esporas quedaran obligadas a germinar cuando metabolizan una cierta cantidad de glucosa (Van Laere et al., 1980b).

La alta presión puede ser usada para diferenciar entre la posible implicación de lípidos (Sussman, 1976) o de



proteínas (Cotter, 1973) en el proceso de activación por calor. La temperatura de transición de los sistemas de membrana se incrementa unos 20°K por cada 1000 atm (De Smedt, 1975). La temperatura de cambios conformacionales de proteínas se incrementa sólo de 2 a 6°K por cada 1000 atm y aun disminuye a presiones de 1000 a 3000 atm (Suzuki et al., 1972). Los resultados para la activación por calor de las esporas de Phycomyces son sólo consistentes con un cambio conformacional de una proteína (Thevelein et al., 1979).

Diferentes alcoholes (Thevelein et al., 1979) y fenoles (Thevelein et al., 1983) disminuyen la temperatura de activación de la espora. Este cambio es, sin embargo, menor que el esperado si las estructuras de membrana estuvieran implicadas en el fenómeno (Thevelein et al., 1979; Thevelein, 1981). Por tanto, una proteína, de posible naturaleza hidrofóbica, parece estar implicada en la activación por calor de la espora de Phycomyces. Datos calorímetros confirman esta conclusión (Van Cauwelaert y Verbeke, 1979; Verbeke et al., 1981).

#### Activación por compuestos químicos

Existe bastante controversia acerca de los compuestos químicos que activan a las esporas de Phycomyces. La Tabla 2 es una lista parcial de los compuestos ensayados. Las discrepancias no se deben achacar a variación en la estirpe usada, que fue casi siempre K1, sino que podrían deberse a diferencias en las condiciones de cultivo en que se obtuvieron las esporas. Los únicos compuestos que activan a la espora bajo condiciones fisiológicas son el acetato, el propionato y el butirato.

Tabla 2. Compuestos químicos que activan las esporas de Phycomyces

a) Compuestos activos en condiciones fisiológicas.

Muy activos

	Tratamiento	Germinación	Referencias
Acetato	0,1 M, 15 min, 30°C	90%	1,2,3,4,5,7,9
	1mM en el medio	90%	1,2,3,4,5,7
Propionato	0,1 M, 10 min, 30°C	85%	1,2,3,4,7
	12 mM en el medio	100%	1,2,3,4,7
n-Butirato	25 mM en el medio	85%	1,2,3,4

<u>Controvertidos</u>	<u>Resultado positivo</u>	<u>Resultado negativo</u>
Formiato	4	2
i-Butirato	4	3
n-Valerato	2,4	3
Glioxilato	1,2	3
Piruvato	4,5,7	3,9
Acetaldehído	2,3,6	7

b) Compuestos activos sólo mediante un pretratamiento

	Tratamiento	Germinación	Referencias
$S_2O_4Na_2$	0,1 mg/ml, 3 min	88%	8
$SO_3HNa$	0,1 mg/ml, 60 min	75%	8
$S_2O_5Na_2$	0,1 mg/ml, 60 min	13%	8
$PO_4H(NH_4)_2$	0,1 M pH 9, 60 min	85%	9
Sales $Fe^{++}$	1 M $Cl_2Fe$ , 5 min	35%	10

1. Borchert, 1962. 2. Brinckman, 1960. 3. Delvaux, 1974. 4. Robbins et al., 1942. 5. Rudolph, 1960a. 6. Rudolph, 1961b. 7. Sommer y Halbsguth, 1957. 8. Van Assche et al., 1978. 9. Van Laere et al., 1980c. 10. Verbeke et al., 1981.

La activación por acetato es función de la concentración, la temperatura y la duración del tratamiento. A más baja temperatura y concentración son necesarios tiempos más largos de tratamiento para obtener el mismo porcentaje de germinación. Resultados similares se obtienen con el propionato y butirato (Borchert, 1962. Delvaux, 1974). Se obtiene una germinación prácticamente total tanto con tratamientos agudos de acetato amónico (0.1 M durante 15 minutos a 30°C) como con tratamientos crónicos (10 mM en el medio de cultivo).

Los valores de pH entre 4 y 6 no afectan la activación por acetato (Borchert, 1962. Delvaux, 1974). A pH mayor que 6 la activación empieza a ser dependiente del catión y por encima de 8 no hay activación (Van Laere et al., 1980c). La efectividad del tratamiento con acetato disminuye con el catión según el orden  $\text{NH}_4 > \text{K} > \text{Na} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{Pb}$  (Delvaux, 1974). La sensibilidad al catión varía con la estirpe (Pambor, 1978). La activación por acetato ocurre en anaerobiosis (Borchert, 1962), pero es completamente inhibida por la presencia de azida sódica (Van Laere et al., 1980c).

El mismo tipo de análisis calorimétrico realizado para la activación por calor sugiere que un cambio conformacional de una proteína de naturaleza hidrofóbica está implicado en la activación por acetato (Van Cauwelaert y Verbeke, 1979; Verbeke et al., 1981).

Varios ácidos orgánicos monocarboxílicos (acético, propiónico, butírico, fórmico, salicílico, acrílico, trifluoroacético y monofluoroacético) activan a las esporas de Phycomyces mediante un tratamiento agudo, si bien el efecto depende del pH (Van Laere, comunicación personal). Algunos de estos ácidos son tóxicos y otros no son metabolizables.

La activación por acetato es irreversible (Borchert, 1962).

La adición de ionóforos a varios hongos (Coprinus macrorhizus, Saccharomyces cerevisiae, Mucor racemosus y Neurospora crassa) provoca un incremento transitorio del AMPc (Trevillyan y Pall, 1979; Uno e Ishikawa, 1981). Se propone que la despolarización estimula la ciclasa del adenilato unida a membrana (Pall, 1977). Los ácidos orgánicos de pequeño tamaño atraviesan la membrana sin gran dificultad en su forma protonada, pero una vez dentro de la célula se disocian y los protones libres podrían afectar directa o indirectamente a la polaridad de la membrana (Crofts et al., 1967, Ullmann y Danchin, 1981). La activación de las esporas de Phycomyces por ácidos orgánicos monocarboxílicos podría deberse a una despolarización de la membrana.

#### Curiosidad

Una radiación de 300 Krad de rayos gamma producidos por  $^{137}\text{Cs}$  activa a las esporas. El crecimiento del micelio se inhibe por este tratamiento (Van Assche et al., 1977).

### III. GERMINACION

#### Condiciones de germinación

Se suele estudiar la germinación en un medio de cultivo definido, aunque basta una solución de glucosa y fosfato (Sommer y Halbsguth, 1957). El oxígeno es necesario (Wood-Baker, 1955; Halbsguth y Rudolph, 1959), con tres niveles de exigencia: 1) la activación puede ocurrir en anaerobiosis estricta; 2) la formación de varias vacuolas dispersas necesita pequeñas concentraciones de oxígeno; 3) la formación de la vacuola central y del tubo de germinación necesita un buen aporte de oxígeno (Borchert, 1962).

## Citología

Hay diferencias citológicas espectaculares entre esporas latentes y esporas en germinación. La espora se hincha y vacuoliza y su densidad disminuye desde los primeros minutos (Van Laere et al., 1980a). El núcleo se vuelve más redondeado, incrementa su volumen y se divide (Furch, 1981).

Las gotas de lípidos desaparecen durante los primeros momentos de la germinación (B. Furch y L. Pambor, no publicado), aunque el contenido total de lípidos no varía (Furch et al., 1976). El hierro de la ferritina se solubiliza progresivamente (David, 1974). Las mitocondrias toman un aspecto "normal" (Pambor, 1979).

## Membrana

Tras la activación por calor, hay un cambio en el número y distribución de las partículas de la membrana (Malhotra y Tewari, 1973; Malhotra et al., 1975). La distribución de las partículas de 30-35 nm correlaciona con el porcentaje de germinación después de diferentes tratamientos térmicos (Tu y Malhotra, 1977b; Kirillov et al., 1979). La permeabilidad del plasmalema cambia tras la activación según señalan distintos datos: tinción con rojo neutro (Johannes, 1959), envenenamiento con metales pesados (Borchert, 1962; Furch, 1981), excreción de trehalosa (Van Assche et al., 1978), excreción de aminoácidos (Furch, 1981). Sin embargo, la espora latente puede tomar y metabolizar glucosa (Delvaux, 1974; Van Laere y Carlier, 1975) y fosfato (Van Laere, comunicación personal), que son los únicos sustratos necesarios para la germinación. La disponibilidad de sustrato no parece ser el factor implicado en el mantenimiento de la latencia.

Los cambios citológicos observados en la membrana sugieren que la activación por calor implica un cambio en el plasmalema (Kirillov et al., 1979).

### Síntesis de ARN y proteínas

Durante las dos primeras horas de la germinación aparece una activa síntesis de ARN, principalmente ARNr (Gamow y Prescott, 1972; Van Assche y Carlier, 1973). También se desarrolla la síntesis de proteínas, reflejada en la incorporación de leucina radioactiva (Van Assche y Carlier, 1973) y en la presencia de polisomas (Van Assche y Dekeersmaeker, 1973).

La aplicación de cicloheximida, que inhibe la síntesis de proteínas, y de 5-fluorouracilo, que se incorpora al ARN con la misma eficacia que el uracilo, pero da lugar a ARN defectuosos, lleva a la conclusión de que algunos fenómenos de la germinación, como la activación de la trehalasa, el incremento de la respiración, el desarrollo de pequeñas vacuolas y el aumento de volumen de la espora, dependen de proteínas preexistentes. Los nuevos ARNm sólo parecen necesarios para la aparición del tubo germinal (Van Laere et al., 1976).

### Pared celular

La pared de la espora se rompe para dejar paso al tubo germinal. Las paredes de ambas estructuras no son continuación una de la otra (Grove, 1976; Furch y Pambor, 1978b) y se diferencian muy claramente tanto por su aspecto al microscopio electrónico como por su composición química. En la pared de la espora predomina la glucana y en la del tubo germinal, así como en la del micelio y los esporangióforos, la quitina (Van Laere et al., 1977; Furch y Pambor, 1978b).

Los cambios químicos y morfológicos van acompañados de un cambio de elasticidad: las esporas latentes mantenidas largo tiempo en glicerol revientan cuando se transfieren a agua, pero las activadas no (Verbeke y Van Laere, 1982).

Al principio de la germinación se produce un aumento espectacular en la actividad de las enzimas necesarias para la síntesis de quitina, como la transaminasa de glutamina a fructosa-6-fosfato, la acetilasa de la glucosamina-6-fosfato y la sintetasa de quitina (Van Laere et al., 1976; Van Laere y Carlier, 1978). Estos aumentos dependen probablemente de la expresión de novo de los genes correspondientes, puesto que no se producen en presencia de cicloheximida o 5-fluorouracilo.

Por el contrario, la síntesis de GDP-fucosa, que participa en la pared del micelio, a partir de GDP-manosa parece depender de enzimas o ARNm preexistentes, porque no es inhibida por el 5-fluorouracilo (Van Laere et al., 1977).

El debilitamiento de la pared podría estar implicado en la sensibilidad a metales pesados tras la activación por acetato (Borchert, 1962) o por calor (Furch, 1981).

### Respiración

El consumo de oxígeno aumenta espectacularmente tras la activación por calor (Halbsguth y Rudolph, 1959; Rudolph, 1960a; Van Laere et al., 1980b) y depende fuertemente de la presencia de glucosa en el medio. El incremento de la respiración no exige la aparición de citocromos antes inexistentes, porque la espora latente contiene un juego completo de citocromos, pero se observan aumentos en los niveles de citocromo a, b y c y de oxidasa del citocromo (Keyhani et al., 1972). La respiración de las esporas activadas va siendo más sensible a la azida conforme avanza la germinación (Van Laere et al., 1980b).

La cicloheximida no inhibe el aumento inicial de la respiración pero inhibe totalmente los incrementos posteriores (Van Laere et al., 1976). El aumento inicial no depende de la síntesis de nuevos citocromos, sino de la disponibilidad de fuentes energéticas apropiadas.

El acetato provoca un consumo de oxígeno mayor que el choque térmico (Borchert, 1962), aun en ausencia de glucosa (Van Laere et al., 1980c).

### Fermentación

Tras la activación por calor, el cociente respiratorio de las esporas aumenta transitoriamente hasta 2.3 (Rudolph, 1960a). Al mismo tiempo se excreta algo de piruvato (Rudolph et al., 1966), lactato (Furch, 1972), glicerol (Furch et al., 1976) y pequeñas cantidades de acetaldehído y etanol (Rudolph, 1961a; Furch, 1972; Delvaux, 1973). La activación por acetato dispara los mismos fenómenos, pero mucho más pronunciados (Delvaux, 1974). La glucólisis no explica el incremento del cociente respiratorio; quizás el metabolismo de la gran reserva de glutamina acoplado a la oxidación del NADH para producir glicerol y lactato podría ser la otra fuente de CO<sub>2</sub> (Furch, 1981).

El calentamiento supraóptimo de las esporas (por ejemplo a 54°C) aumenta la producción de moléculas de dos átomos de carbono (etanol y acetaldehído) a expensas de los de tres, junto con una gran superproducción de CO<sub>2</sub> (Rudolph, 1961a; Furch, 1972). Los efectos de la anaerobiosis y diversos inhibidores sobre la germinación, intercambio de gases y producción de etanol y acetaldehído confirman el origen glucolítico de los productos de la fermentación (Rudolph, 1960a, 1960b, 1961a, 1961c).



La activación por calor y por acetato estimula la entrada de glucosa a las esporas, pero aumenta más, comparativamente, el metabolismo de sustratos endógenos, como glutamina y trehalosa (Delvaux, 1973; Van Laere y Carlier, 1975).

El calentamiento del homogenado de esporas a temperaturas hasta 50°C estimula la glucólisis (Rudolph et al., 1966; Furch, 1969; Rudolph y Furch, 1970; Rudolph, 1972). La búsqueda de una enzima crítica, cuya activación fuera responsable de la estimulación de la glucólisis, no ha dado resultado (Furch, 1972; Delvaux, 1974; Thevelein y Van Assche, 1978; Van Laere y Van Assche, 1978; Furch, 1979).

### Trehalosa y trehalasa

La activación, sea por calor o por acetato, provoca una disminución en el contenido de trehalosa, la principal sustancia de reserva de la spora, y un aumento del contenido de glucosa tanto en la spora como en el medio (Rudolph y Ochsen, 1969). La disminución de la trehalosa correlaciona con un aumento de unas 10 veces en la actividad trehalasa (Van Assche et al., 1972; Delvaux, 1973). Un fenómeno similar se ha encontrado en Mucor (Dewerchin y Van Laere, 1984). La cicloheximida no influye en este aumento, lo que sugiere activación de la enzima y no síntesis de novo.

Si las esporas activadas se incuban en agua, la trehalasa se desactiva en una hora. Se pueden repetir la activación y la desactivación hasta cinco veces por choques térmicos consecutivos, es decir, se trata de un proceso reversible. Una exposición durante una hora a 50°C impide la desactivación de la enzima; posteriormente, la actividad enzimática declina con la viabilidad de las esporas (Van Assche et al., 1972).

Los alcoholes de cadena corta (metanol a pentanol) hacen disminuir la temperatura necesaria para la activación de la trehalasa, mientras que alcoholes de cadena larga (heptanol a nonanol) la aumentan (Thevelein et al., 1981). Los alcoholes de cadena larga, al menos hasta decanol, deberían hacer disminuir la temperatura de activación si esta activación implicara una transición de fase de los fosfolípidos (Eliasz et al., 1976). Por el contrario, el efecto de los alcoholes sobre la temperatura de activación de la trehalasa se parece al que tienen sobre la temperatura de gelificación del almidón (Thevelein et al., 1981). También las altas presiones afectan de manera parecida a la activación de la trehalasa (Thevelein et al., 1980) y a la gelificación del almidón (Thevelein et al., 1981), y de manera diferente a las proteínas y los fosfolípidos. Estas observaciones y la posible localización de la trehalasa cerca de la pared celular (Van Assche et al., 1978) sugieren que el mecanismo activador de la trehalasa sea una transición de fase de un polisacárido (Thevelein et al., 1981).

Posteriormente se ha encontrado que la trehalasa de las esporas se puede activar in vitro por AMP cíclico, en presencia de ATP,  $Mg^{++}$  y una cinasa de proteínas (Van Laere y Hendrix, 1983), lo que sugiere una regulación por fosforilación dependiente de AMPc. El AMPc también activa la trehalasa de Saccharomyces cerevisiae (Van der Plaat y Van Solingen, 1974) a través de una fosforilación de la enzima (Uno et al., 1984).

Hay una buena correlación entre la activación de la trehalasa y la germinación de las esporas después de tratamientos a varias temperaturas (Van Assche y Carlier, 1975). Sin embargo, la activación de la trehalasa no ocurre inmediatamente después de la exposición de esporas suspendidas en agua a los tratamientos activadores estudiados,

sino que requiere la incubación de las esporas en glucosa (Van Assche et al., 1977, 1978; Van Laere et al., 1980c; Thevelein et al., 1980; Thevelein, 1981; Thevelein et al., 1983). Es decir, la activación de la trehalasa depende, directa o indirectamente, de su producto, la glucosa.

Thevelein (1984) ha revisado los conocimientos sobre la trehalasa y su regulación.

### AMP cíclico

Tras la activación de las esporas aumentan transitoriamente las concentraciones de dos reguladores importantes del metabolismo, el AMPc y la fructosa-2,6-bisfosfato.

El incremento transitorio del contenido de AMPc alcanza su máximo unos dos minutos después de la activación térmica. En la activación por acetato o por piro-sulfito el aumento es más lento y más duradero (Van Mulders y Van Laere, 1984). También hay un aumento transitorio de la concentración de AMPc al comienzo de la germinación de las esporas de Mucor (Dewerchin y Van Laere, 1984) y de las zoosporas de Blastocladiella emersonii (Vale et al., 1976).

La adición de AMPc a esporas activadas por calor parece acelerar su germinación (Jones y Bu'lock, 1977). La adición de AMPc a diversos medios de cultivo que contienen una variedad de fuentes de carbono y nitrógeno induce la germinación de las esporas de Mucor racemosus (Wertman y Panozkas, 1981).

En Eucariotas, el AMPc regula muchos procesos metabólicos mediante la activación de una cinasa de proteínas (revisión, Gancedo et al., 1985). Por su relación con esta Tesis hay que mencionar su papel en la regulación de la síntesis y utilización de glucógeno (Villar-Palasi et al., 1971). Este efecto regulador se refleja en la disminución del contenido de glucógeno en el micelio de Phycomyces

cuando se añade AMPc al medio de cultivo (Tu y Malhotra, 1977a). En Phycomyces, se ha identificado a la cinasa de la sintetasa del glucógeno como una cinasa de proteínas inespecífica dependiente de AMPc (Sánchez Monteseirín, 1984).

#### Fructosa-2,6-bisfosfato

La célula sintetiza fructosa-2,6-bisfosfato a partir de la fructosa-6-fosfato mediante la fosfofructocinasa 2. Saccharomyces regula esta enzima por un sistema de fosforilación dependiente de AMPc (François et al., 1984).

La fructosa-2,6-bisfosfato es un regulador de la glucólisis en muchos organismos; ejerce este papel activando la fosfofructocinasa 1, una de las primeras enzimas de la glucólisis (Hers y Van Schaftingen, 1982). En Phycomyces, la activación de la fosfofructocinasa 1 depende de concentraciones micromolares de fructosa-2,6-bisfosfato (Van Laere, 1983). Unos quince minutos después de la activación por calor o acetato se encuentra un aumento transitorio de la concentración de fructosa-2,6-bisfosfato y este aumento es proporcional al de la fracción de esporas comprometidas irreversiblemente a germinar (Van Laere et al., 1983). Se obtienen resultados similares en Mucor, Neurospora y Agaricus (Van Laere, 1983).

#### IV. RESUMEN DE HIPOTESIS

##### Activación de la trehalasa.

La activación de la trehalasa correlaciona con la germinación de las esporas. Esto hizo pensar que posiblemente la trehalasa fuera la llave de la germinación puesto que moviliza la gran reserva de carbono de las esporas (Van Assche y Carlier, 1975).

Sin embargo, la producción de glucosa por la trehalasa no puede ser el mecanismo disparador de la germinación puesto que la espora latente es capaz de tomar y metabolizar glucosa externa. Asimismo, los datos termodinámicos indican que el efecto de la temperatura es distinto para la germinación y para la activación de la trehalasa. Más bien parece que la activación de la trehalasa no es la causa de la germinación, sino uno de los procesos primordiales que ocurren en la espora germinante.

#### Producción de fructosa-2,6-bisfosfato

El aumento de la concentración de fructosa-2,6-bisfosfato correlaciona con la proporción de esporas que germinan tras los distintos tratamientos activadores.

Este aumento transitorio de la concentración de fructosa-2,6-bisfosfato puede favorecer el consumo de glucosa y ser, por tanto, el disparador de la germinación. Hay que recordar, sin embargo, que la espora latente es capaz de tomar y metabolizar glucosa externa. Más bien parece que el aumento transitorio de la fructosa-2,6-bisfosfato es, al igual que la activación de la trehalasa, uno de los procesos primordiales de la germinación. Ambos mecanismos servirían para utilizar rápidamente la reserva de carbono una vez que la espora se ha decidido a germinar.

#### Metabolismo del piruvato

Las esporas tienen mitocondrias de estructura característica que cambian muchísimo durante los primeros momentos de la germinación. Estos cambios morfológicos podrían estar correlacionados con cambios en las actividades enzimáticas del metabolismo mitocondrial del piruvato.

El piruvato entra en la espora latente, pero no la activa. Tampoco es metabolizado hacia el ciclo de Krebs puesto que las esporas latentes incubadas en presencia de piruvato no producen 2-oxoglutarato; sin embargo, este cetoácido aparece en grandes cantidades tras la activación por calor o acetato.

Parece, por tanto, que algunas enzimas de la membrana mitocondrial relacionadas con la utilización de piruvato pueden actuar como cuello de botella de la germinación. Se ha propuesto que el blanco de la activación es la metabolización del piruvato (Van Laere et al., 1982). El choque térmico elimina este cuello de botella mientras que el acetato lo elude al metabolizarse.

#### Metabolismo de la glutamina

Las esporas de Phycomyces contienen glutamina y glutamato en grandes cantidades y, presumiblemente, compartimentalizadas (Furch, 1979). La activación por calor haría que estos sustratos fuesen accesibles. De hecho, tanto la glutamina como el glutamato desaparecen casi completamente durante la germinación al mismo tiempo que aumenta el contenido de gamma-aminobutirato y se encuentra mucho amonio tanto dentro como fuera de la espora.

Glutamina y glutamato son sustratos del ciclo de Krebs cuando se metabolizan a través del desvío del gamma-aminobutirato. Esta ruta evita el sistema de la deshidrogenasa del 2-oxoglutarato que está ausente del micelio de Phycomyces nitens y otros hongos (Dowler et al., 1963). De este modo aportan a la célula grandes cantidades de poder reductor y energía. Se ha propuesto que el blanco de la activación de las esporas es la metabolización de la glutamina (Furch, 1981)

## Activación de la ciclasa del adenilato

El aumento transitorio de la concentración de AMPc es el primer cambio observable tras la activación de las esporas. Cabe pensar que este aumento dispara una serie de procesos en la espora latente mediante la activación de proteínas por fosforilación. Entre estas enzimas estarían la trehalasa, la fosfofructocinasa 2 y la fosfatasa del glicerol-3-fosfato.

El nivel celular de AMPc viene dado por la actividad de dos enzimas: la ciclasa del adenilato, que lo produce a partir de ATP, y la fosfodiesterasa, que lo degrada hasta AMP.

Las esporas latentes pierden la actividad fosfodiesterasa cuando se activan por choque térmico (Van Laere, comunicación personal). Sin embargo, no parece lógico que esta enzima sea la llave de la germinación ya que equivale a decir que la espora latente produce y degrada constantemente AMPc. Parece más lógico que la llave de la germinación sea la ciclasa del adenilato. Los mutantes pde de Phycomyces carecen de una de las bandas de actividad fosfodiesterasa en el micelio (Reddy et al., en preparación); sin embargo, muestran una actividad fosfodiesterasa en las esporas latentes similar al tipo silvestre (Van Laere, comunicación personal).

La ciclasa del adenilato es una proteína de membrana. Podría ser la proteína de naturaleza hidrofóbica blanco de la activación por calor y por acetato propuesta a partir de los datos calorimétricos y termodinámicos. Dichos tratamientos la activarían e inducirían, al menos transitoriamente, un incremento de la concentración de AMPc, con los efectos de activación en cascada de proteínas ya mencionados. Estos datos, junto con datos obtenidos con otros hongos, hacen que esta proteína sea un buen candidato a ser el blanco de la activación.

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

## Estirpes

La Tabla 3 enumera las estirpes de Phycomyces blakesleeanus usadas en este trabajo, junto con su genotipo y su origen.

En la descripción de genotipos, ger designa mutaciones que afectan al proceso de germinación. Todos los mutantes ger han sido aislados en el curso de este trabajo. Las estirpes S347, S376 a S378, S410 a S415 no necesitan un tratamiento activador para germinar. Las estirpes S433 a S441 responden escasamente a la activación por calor, acetato y propionato.

Otras designaciones genotípicas son nic, fol y lys, para mutaciones que causan auxotrofia para el ácido nicotínico, el ácido fólico y la lisina, respectivamente; car para mutaciones que afectan a la síntesis de beta-caroteno (la estirpe C242 es blanca); gal para mutaciones que causan resistencia a 2-desoxigalactosa e incapacidad de utilizar galactosa como fuente de carbono; (+) y (-) para los dos sexos.

Las estirpes cuyo origen se indica por NG se aislaron tras la exposición de esporas al mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en las condiciones que se describen más adelante, salvo que se indique otra cosa en la referencia.



Tabla 3. Estirpes utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Origen
A87	<u>lysA401</u> (-)	De NRRL1555, ultravioleta
B36	<u>nicA101</u> (+)	De C296xS102
C242	<u>carA5</u> <u>nicA101</u> (+)	De C170xS102
NRRL1555	(-)	Silvestre
S102	<u>nicA101</u> (-)	De NRRL1555 tras NG
S213	<u>dar-52</u> (-)	De NRRL1555 espontáneo
S347	<u>dar-52</u> <u>ger-1</u> (-)	De S213 tras NG.
S370	<u>fol-1</u> (-)	De NRRL1555 tras NG.
S376	<u>nicA101</u> <u>ger-2</u> (-)	De S102 tras NG
S377	<u>nicA101</u> <u>ger-3</u> (-)	De S102 tras NG
S378	<u>nicA101</u> <u>ger-4</u> (-)	De S102 tras NG
S400	<u>nicA101</u> <u>gal-10</u> (+)	De B36 tras NG
S410	<u>fol-1</u> <u>ger-5</u> (-)	De S370 tras NG
S411	<u>fol-1</u> <u>ger-6</u> (-)	De S370 tras NG
S412	<u>fol-1</u> <u>ger-7</u> (-)	De S370 tras NG
S413	<u>fol-1</u> <u>ger-8</u> (-)	De S370 tras NG
S414	<u>fol-1</u> <u>ger-9</u> (-)	De S370 tras NG
S415	<u>nicA101</u> <u>ger-10</u> (+)	De B36 tras NG
S433	<u>nicA101</u> <u>ger-11</u> (-)	De S102 tras NG
S434	<u>nicA101</u> <u>ger-12</u> (-)	De S102 tras NG
S435	<u>nicA101</u> <u>ger-13</u> (-)	De S102 tras NG
S436	<u>nicA101</u> <u>ger-14</u> (-)	De S102 tras NG
S437	<u>nicA101</u> <u>ger-15</u> (-)	De S102 tras NG
S438	<u>nicA101</u> <u>ger-16</u> (-)	De S102 tras NG
S439	<u>nicA101</u> <u>ger-17</u> (-)	De S102 tras NG
S440	<u>nicA101</u> <u>ger-18</u> (-)	De S102 tras NG
S441	<u>nicA101</u> <u>ger-19</u> (-)	De S102 tras NG

## Cultivos

Los cultivos se hicieron en medio mínimo (Sutter, 1975) con 2 g L-asparagina·H<sub>2</sub>O por litro como fuente de nitrógeno. La fuente de carbono usual fue 20 g D(+)-glucosa por litro; en algunos experimentos se sustituyó por 21.8 g acetato potásico o por 20 g D(+)-xilosa o 20 g D(-)-manitol por litro. Cuando fue necesario se suplementó con ácido nicotínico (1 mg l<sup>-1</sup>), ácido fólico (5 mg l<sup>-1</sup>) o lisina (200 mg l<sup>-1</sup>). Para la producción de micróforos se utilizó el denominado agar patata.

La activación se realizó rutinariamente por exposición de las esporas a 48°C durante 15 minutos, salvo que se indique otra cosa. La incubación siempre se realizó a 22°C.

Se determinó el número de esporas viables mediante siembra sobre medio sólido acidificado a pH 3.2-3.3 tras activarlas por choque térmico.

Obtención de esporas: las esporas utilizadas en los estudios de germinación procedían de micelio crecido sobre medio mínimo sólido. La cosecha se realizaba a los siete días de la siembra. Las esporas se lavaban tres veces mediante centrifugación y resuspensión en agua estéril. Nunca se utilizaron esporas que llevasen cosechadas más de 24 horas.

Todas las estirpes se conservaron como micelios congelados a -20°C.

## Germinación

Para la cuantificación de la germinación se utilizaron dos métodos alternativos: a) La suspensión de esporas en medio de cultivo se incubó en un agitador circular (30 rpm). b) Se pusieron 15-20 ul de la suspensión de esporas en medio de cultivo entre portaobjetos y cubreobjetos. Sólo se observaron campos del microscopio que incluyan el borde

del cubreobjetos para asegurarse que no hay limitaciones de oxígeno. La germinación se cuantificó en ambos casos a las 8-12 horas.

#### Tratamiento mutagénico

Se utilizó el mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina en una dosis de 0.4 M seg que provoca una supervivencia en torno al 5% (Roncero et al., 1984). Se sembraron sobre medio sólido las esporas supervivientes y se cosecharon las esporas producidas tras una semana de incubación. Estas esporas son las que se utilizaron para la búsqueda de mutantes.

#### Análisis químicos

Se determinó el fosfato por el método de Murphy y Rilley, descrito por Rodier (1981); la glucosa, por el método de la oxidasa de la glucosa; las proteínas, por el método de Lowry et al. (1951); el AMPc, por el método descrito por Van Mulders y Van Laere (1984); la fructosa-2,6-bisfosfato, por el método de Van Schaftingen et al. (1982).

Para determinar el ácido gálico se aprovechó su solubilidad en metanol. Se machacaron en un mortero con arena unos 90 mg de esporangióforos liofilizados y se extrajeron cuatro veces sucesivas con 10 ml de metanol. Se eliminó el metanol por evaporación en un destilador rotatorio a baja presión y unos 50°C, se resuspendió el precipitado en tampón glicina-ClH, 0.1 M, pH 2.5 y se determinó el ácido gálico atribuyéndole toda la absorbencia a 269 nm medida en un espectrofotómetro Spectronic 2000 (Bausch and Lomb) y un coeficiente de extinción de 550. En las condiciones de este trabajo, la absorbencia de otras sustancias es despreciable (Sandmann y Hilgenberg, 1974).

Para medir el glucógeno se lavó el micelio abundantemente con agua, se congeló y se liofilizó. Unos 100 mg se machacaron en mortero con arena y se extrajeron dos veces con 5 ml de agua removiendo fuertemente. A la solución resultante se aplicó el método de la amiloglucosidasa: se mezclaron 20 ul de extracto, 20 ul de amiloglucosidasa (10 mg/ml) y 960 ul de tampón acetato (0.5 M, pH 4.0), se incubaron sucesivamente a 30°C durante una hora y a 50°C durante otra hora y se tomaron 20 ul para medir la glucosa por el método de la oxidasa de la glucosa.

### Actividades enzimáticas

Se midió la actividad deshidrogenasa de los alcoholes según el método de Garcés (1983).

Para medir la actividad de la deshidrogenasa de los aldehidos se siguió el siguiente método:

El micelio se machacó con mortero y arena y se extrajo con tampón Tris-ClH 0.1 M pH 8.3 que contenía Cisteína 1 mM (1 ml de tampón por cada 20 mg de peso húmedo del micelio). Se centrifuga a 13000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante es el extracto crudo. Para el análisis se mezclaron sucesivamente: 0.3 ml de Tris-ClH 1 M pH 8.0, 0.1 ml de  $Cl_2Mg$  0.1 M, 0.1 ml de ClK 3 M, 0.9 ml de NAD 14.6 mM, 1.4 ml (en el blanco 1.5 ml) de  $H_2O$  y 0.1 ml de extracto crudo. La reacción se inicia al añadir 0.1 ml de acetaldehído 10 M, y se mide la aparición de NADH como el incremento de absorbencia a 340 nm en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 1700 (Philips)

Para medir la actividad trehalasa se siguió el método de Van Mulders y Van Laere (1984). Para aplicarlo al micelio se lavó éste con tampón fosfato 0.01 M pH 6.5 y se congeló; posteriormente se machacó con mortero y arena, se le añadió 1 ml de tampón fosfato 0.01 M pH 6.5 por cada 20 mg

de peso húmedo y se centrifugó durante cinco segundos en una centrífuga Eppendorf. El sobrenadante se utilizó para el ensayo según Van Mulders y Van Laere (1984).

### Metabolismo de la glucosa y el acetato

Para estudiar el crecimiento sobre acetato y sobre glucosa se inocularon matraces de 250 ml con 50 ml de medio líquido con unas  $5 \times 10^4$  esporas viables por ml activadas por choque térmico. Se incubaron en agitación circular a 22°C durante los tiempos marcados en cada caso. El micelio se recogía por filtración, y se secaba en una estufa a 105°C durante tres horas.

Para investigar la capacidad de las esporas para utilizar el acetato y la glucosa de los medios de cultivo, se inocularon 100 mg de esporas en 10 ml de los siguientes medios de cultivo:

MEDIO A =  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  10 mM, acetato amónico 10 mM y (U- $^{14}\text{C}$ ) acetato (actividad específica  $10^5$  cpm  $\mu\text{mol}^{-1}$ ) a razón de  $1.2 \times 10^6$  cpm  $\text{ml}^{-1}$  de medio.

MEDIO B =  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  10 mM, acetato amónico 10 mM, glucosa 10 mM y (U- $^{14}\text{C}$ ) acetato (actividad específica  $10^5$  cpm  $\mu\text{mol}^{-1}$ ) a razón de  $1.2 \times 10^6$  cpm  $\text{ml}^{-1}$  de medio.

MEDIO C =  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  10 mM, glucosa 10 mM y (3.4- $^{14}\text{C}$ ) glucosa (actividad específica  $10^5$  cpm  $\mu\text{mol}^{-1}$ ) a razón de  $1.2 \times 10^6$  cpm  $\text{ml}^{-1}$  de medio.

Se usaron matraces de 25 ml cerrados con un tapón del que colgaba un trozo de papel de filtro humedecido con 0.1 ml de KOH 1 N para fijar el  $\text{CO}_2$  producido. Después de una hora de incubación en agitación a 25°C, se separaron los cetoácidos del medio de cultivo. Se determinó la radiactividad del  $\text{CO}_2$  retenido y de los ácidos pirúvico y 2-oxo-glutárico siguiendo a Van Laere *et al.* (1982).

### Aislamiento de mutantes germinadores espontáneos

La estirpe S347 se aisló tras sembrar en medio sólido las esporas cosechadas tras tres ciclos de recolección y siembra y estudiar la germinación espontánea de 100 colonias. Para cada colonia se suspendió el contenido de 5 esporangios en 0.5 ml de medio filtrado y se cuantificó la germinación al cabo de 8-9 horas. Se seleccionó una de ellas tras tres ciclos de vida sucesivos y sus correspondientes comprobaciones del fenotipo. Las restantes estirpes (S376, S377, S378, S410, S411, S412, S413, S414 y S415) se aislaron por micromanipulación. Para cada mutagénesis se inoculó 1 ml de medio filtrado con  $1-2 \times 10^6$  esporas provenientes de tres ciclos de recolección y siembra y se incubaron en agitación a 22°C durante unas doce horas, tras lo cual se micromanipularon 20 germinulas sobre medio sólido; se comprobó el fenotipo de las colonias crecidas mediante la suspensión del contenido de 5 esporangios en 0.5 ml de medio filtrado y cuantificar la germinación al cabo de 8-9 horas. Se seleccionó una colonia de cada tratamiento mutagénico tras tres ciclos de vida sucesivos iniciados con germinulas micromanipuladas y sus correspondientes comprobaciones del fenotipo.

### Aislamiento de mutantes no activables

Se inoculó 1 ml de medio filtrado que contenía acetato potásico 10 mM o propionato potásico 10 mM con  $10^6$  esporas no activadas. A las trece horas de incubación a 22°C se añadió la N-glicosilpolifungina durante una hora, se calentó la suspensión a 48°C durante 15 minutos y se sembró en agar patata. Se indujo la formación de micróforos en las colonias obtenidas siguiendo el método descrito por Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo (1980). Estas colonias se replicaron

sobre medio sólido cuyos componentes, excepto el agar, habían sido esterilizados por filtración y que contenía acetato potásico 10 mM o propionato potásico 10 mM. La observación microscópica de la germinación sirvió como escrutinio primario para seleccionar unas pocas colonias de cada mutagénesis que presentaban una baja tasa de germinación. Finalmente, se seleccionó una sola colonia de cada tratamiento mutagénico tras tres ciclos de vida y sus correspondientes comprobaciones del fenotipo. Siempre se utilizó un testigo con esporas del tipo silvestre para asegurar la correcta preparación del medio y la ausencia de compuestos inhibidores de la germinación.

## R E S U L T A D O S

Esta Tesis se ha centrado en el análisis genético de la germinación de las esporas, pero incluye algunas investigaciones previas sobre aspectos metodológicos y fisiológicos generales, necesarios para el aislamiento y caracterización de mutantes de la germinación.

### I. GERMINACION DE ESPORAS SILVESTRES

#### Activación por 5-hidroximetilfurfural

Los medios esterilizados al autoclave tienen una capacidad activadora de las esporas de la que carecen los medios esterilizados por filtración. Esta sección pretende precisar el mecanismo de esta activación y determinar las condiciones idóneas para experimentos posteriores.

La absorción ultravioleta de las soluciones de glucosa aumenta considerablemente tras calentamiento en el autoclave (Figura 3). Este incremento se atribuye a la formación de 5-hidroximetilfurfural (Wolfrom et al., 1948) y de aldehídos insaturados con enlace doble entre los carbonos 2 y 3 (Evans y Gillam, 1943). Si se atribuye toda la absorbencia a 285 nm al 5-hidroximetilfurfural, la concentración final de este compuesto en el medio de cultivo sería de 35  $\mu\text{M}$  ó 25  $\mu\text{M}$  según se trate de glucosa de

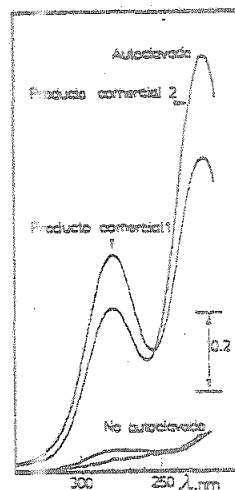


Figura 3. Absorbencia de soluciones de glucosa ( $40 \text{ g l}^{-1}$ ) autoclavadas ( $120^{\circ}\text{C}$ , 15 minutos). Cubeta de cuarzo de paso de luz 1 cm.



una u otra de las dos fuentes comerciales que se ensayaron. La aparición de aldehídos en la solución de glucosa también se refleja en su acidificación (Tabla 4A). La esterilización de los medios en el autoclave induce la germinación de una proporción apreciable de las esporas (Tabla 4B). Esta proporción, aunque sensiblemente mayor que la de los testigos sin autoclavar, nunca se acerca a la germinación masiva inducida por choque térmico.

La germinación inducida por medios autoclavados puede atribuirse al 5-hidroximetilfurfural que contienen, ya que éste activa las esporas de la estirpe silvestre cuando se añade a medio filtrado (Figura 4). Llama la atención que el 5-hidroximetilfurfural no llegue a producir una germinación masiva ni siquiera a altas concentraciones. Esta falta de germinación no se debe a toxicidad: tras lavar las esporas y activarlas por calor se obtienen tasas de germinación próximas al 100% (Figura 4). El furfural (1  $\mu$ M a 1 mM, en las mismas condiciones) no activa las esporas.

Como conclusión práctica, los medios líquidos usados en el resto de los experimentos (e incluso en la Figura 4) se prepararon con el producto comercial 2 y se esterilizaron por filtración. Estas precauciones aseguran una frecuencia de germinación "espontánea" siempre inferior al 1 %.

#### Germinación de las esporas a 22°C

Como se indica en la sección anterior, incluso en ausencia de activación conocida siempre hay esporas que dan muestras inequívocas de germinación tras 8 horas de incubación a 22°C. Nos preguntamos si el resto de las esporas permanece indefinidamente en reposo en esas condiciones o si van germinando espontáneamente poco a poco. Las germinaciones sucesivas no son fáciles de observar, porque los micelios que van apareciendo ocultan a las germinulas y a las esporas sin germinar.

Tabla 4A. Acidez de las soluciones de glucosa (40 g l<sup>-1</sup>). Media y desviación típica de tres determinaciones independientes del pH. Las muestras autoclavadas se calentaron a 120°C durante 15 minutos.

Glucosa	Antes de autoclavar	Después de autoclavar
Producto comercial 1	5,72 ± 0,15	4,25 ± 0,22
Producto comercial 2	5,67 ± 0,13	4,52 ± 0,19

Tabla 4B. Germinación de esporas, activadas o no, sembradas en medio esterilizado al autoclave o por filtración. Media y desviación típica de tres determinaciones independientes.

Glucosa	Activación	Medio	Germinación
Producto comercial 1	48°C, 15 min	Autoclavado	97,6 ± 2,0
	no	Autoclavado	7,4 ± 3,7
	no	Filtrado	2,8 ± 1,6
Producto comercial 2	48°C, 15 min	Autoclavado	98,0 ± 1,8
	no	Autoclavado	1,5 ± 0,6
	no	Filtrado	0,4 ± 0,2

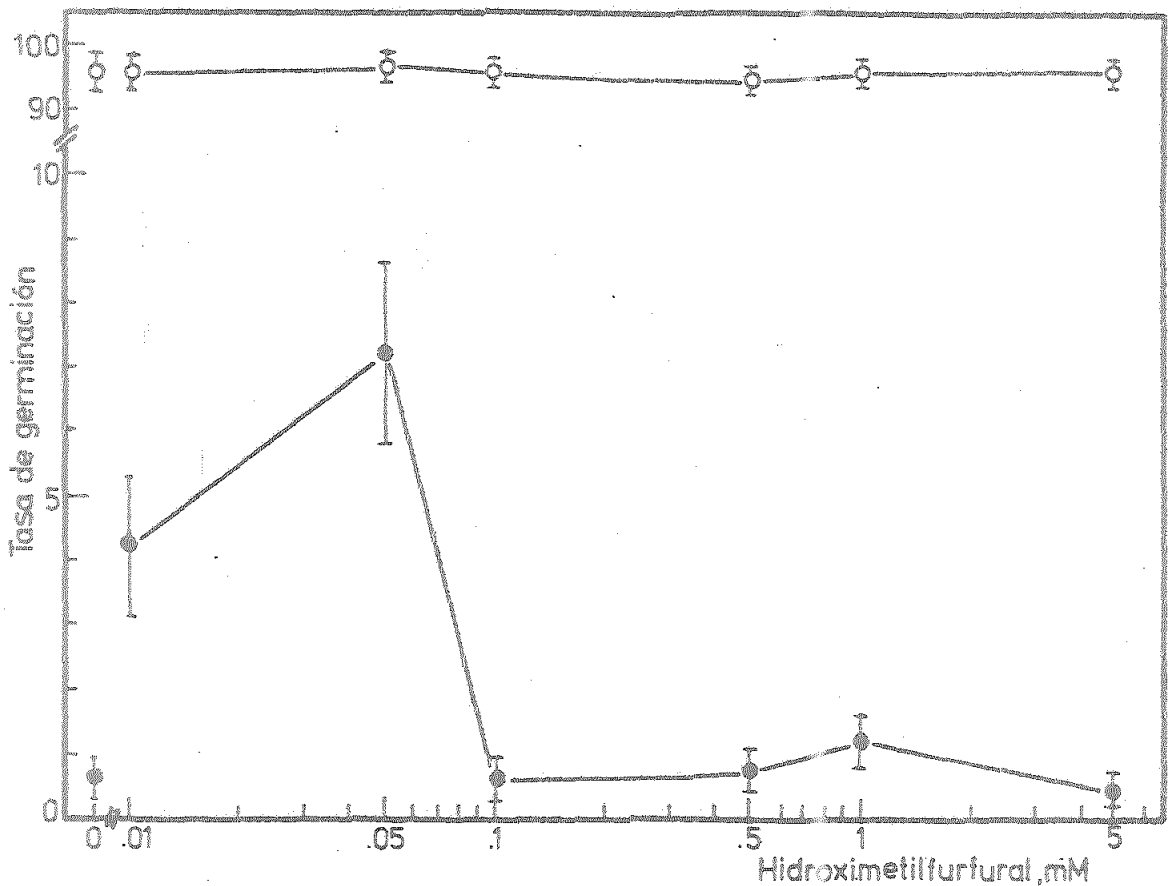


Figura 4. Germinación en presencia de 5-hidroximetilfurfural. Las esporas ( $10^6$  ml<sup>-1</sup>) se incubaron en medio líquido con 5-hidroximetilfurfural durante 8 horas a 22°C (●). Otras muestras se incubaron en medio líquido con 5-hidroximetilfurfural a 22°C durante 8 horas, se lavaron y resuspendieron en medio líquido y se incubaron sucesivamente a 48°C durante 15 minutos y a 22°C durante 8 horas (○).

Para resolver esta dificultad se prepararon 1000 viales, cada uno con 0.5 ml de medio filtrado y 1400 esporas viables (capaces de formar colonias en agar), y se incubaron a 22°C. En días sucesivos se contaron los viales con micelio visible a simple vista. La proporción de esporas germinadas (definidas como las que han formado micelio visible) se puede calcular a partir de la proporción de viales que contienen micelio visible. En efecto, si una proporción  $y_0$  de los viales aparecen vacíos (sin micelio visible) el día  $t$ , el número medio  $m$  de esporas que han formado micelio visible en cada vial viene dado por el término nulo de la distribución de Poisson:  $y_0 = e^{-m}$ .

La proporción de esporas que han formado micelio visible ( $m/1400$ ) aumenta con el tiempo  $t$  (Figura 5). Las esporas van despertando sucesivamente de su latencia. El buen ajuste lineal de los resultados de la Figura 5 (coeficiente de correlación 0.986) indica que la probabilidad de

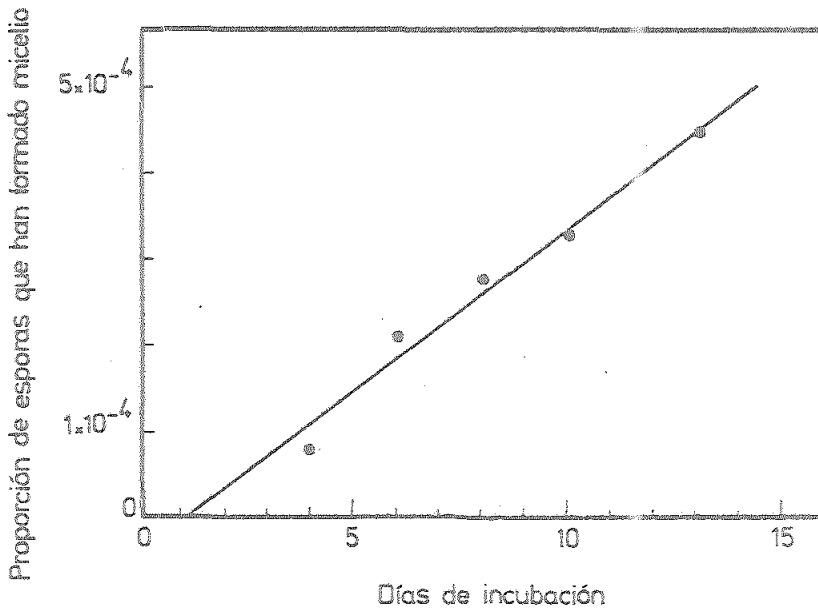


Figura 5. Germinación progresiva de esporas incubadas en medio filtrado a 22°C. Se indica la recta de regresión.

iniciar la germinación se mantiene constante durante al menos doce días (pendiente de la recta de ajuste:  $3.8 \times 10^{-5}$  día<sup>-1</sup>). El corte del eje de abscisa por la recta de ajuste sugiere que esta probabilidad de germinación se establece desde el comienzo de la incubación; téngase en cuenta que la producción de micelio visible requiere un día o poco más.

Los porcentajes de germinación de la Figura 5 son inferiores a los observados al microscopio y reflejados en la Tabla 5 y otros lugares de esta Tesis. Ello podría deberse (1) a la diferencia de criterios: muchas germinulas vacuolizadas podrían no formar micelios visibles a simple vista o retrasarse mucho en hacerlo, (2) a una posible escasez de oxígeno en los viales y (3) a un posible efecto cooperativo, si las germinulas excretan al medio sustancias que activan la germinación de las esporas vecinas. Se sabe que Phycomyces produce abundante ácidos orgánicos (Delvaux, 1973; Furch, 1972; Furch et al., 1976; Rudolph et al., 1966), algunos de los cuales inducirían la germinación.

### Germinación en el esporangio

Las esporas contenidas en el esporangio no presentan síntomas de germinación. Esto podría deberse a falta de activación de las esporas, a insuficiencia de nutrientes o a presencia de un inhibidor de la germinación.

La activación por choque térmico es mucho menos efectiva cuando las esporas están en el esporangio que cuando están en suspensión. Como tratamiento activador se sumergieron en agua a 48°C los esporangios, unidos a sus respectivos esporangióforos, o se pusieron los cultivos enteros en una estufa a 48°C durante 15 minutos. Tras una incubación de 8 horas a 22°C, se aplastaron 25 esporangios y se observó al microscopio que el 4.1 % de sus esporas mostraban síntomas de germinación. Este porcentaje varía

de unos esporangios a otros, como se refleja en la desviación típica de 2.7 observada. Tras una incubación de 24 horas los valores correspondientes fueron de  $6.7 \pm 3.9 \%$ , que no son significativamente distintos de los anteriores. Estas frecuencias de germinación, que están muy lejos del casi 100 % típico de esporas activadas en suspensión, podrían explicarse por insuficiencia de nutrientes o por la presencia residual de un inhibidor en el esporangio. Este inhibidor se perdería durante los lavados y diluciones de esporas que se hacen antes de los experimentos usuales.

Para poner de manifiesto la posible presencia de un inhibidor en los esporangios se estudió la germinación de esporas preactivadas en extractos de esporangios. Se cosecharon y aplastaron 200 esporangios maduros en 0.2 ml de medio filtrado. Se eliminaron las esporas y los fragmentos de esporangios mediante dos centrifugaciones sucesivas de 5 segundos y 15 minutos, respectivamente, en una centrífuga Eppendorf. En el sobrenadante final se inocularon esporas lavadas y activadas por choque térmico, a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ , y se incubaron a  $22^\circ\text{C}$  durante 12 horas. La tasa de germinación observada es de  $92 \pm 1\%$ .

No se encontraron, por tanto, indicios de la presencia de un inhibidor en los esporangios. El experimento tiene, sin embargo, la limitación de mezclar el contenido de los esporangios con un volumen aproximadamente doble de medio de cultivo.

### Inhibición por ácido gálico

Una peculiaridad de Phycomyces es la presencia de cantidades considerables de ácido gálico en los esporangióforos (6 mg  $\text{g}^{-1}$  peso seco, Sandmann y Hilgenberg, 1979) y en medios de cultivo viejos (115  $\mu\text{M}$ , Haslam et al., 1961). Se atribuye al ácido gálico el fototropismo negativo de los

esporangióforos a la luz ultravioleta (Dennison, 1959): ésta sólo puede estimular el crecimiento de la mitad proximal del esporangióforo porque la fuerte absorbencia del ácido gálico (máximo a 269 nm) le impide llegar a la mitad distal. Se ignora si el ácido gálico tiene alguna otra función en el hongo.

El ácido gálico (50  $\mu$ M - 100 mM) no induce la germinación de las esporas de Phycomyces en medio mínimo filtrado. Las concentraciones altas de ácido gálico en el medio de cultivo inhiben la germinación de las esporas activadas (Fig. 6). Una mayor inhibición se obtiene preincubando las esporas durante una hora en medio con ácido gálico antes del choque térmico (Fig. 7). Nótese que estos experimentos requieren concentraciones de ácido gálico mayores que las encontradas en las células y en medios de cultivo viejos.

Se puede demostrar un efecto inhibitorio a concentraciones de ácido gálico menos elevadas prolongando la preincubación de las esporas con ácido gálico. La tasa de germinación disminuye al aumentar la concentración o el tiempo de tratamiento. Entre estos parámetros se da una reciprocidad casi perfecta, es decir, los resultados dependen sólo del producto de ambos, que podemos llamar "dosis de preincubación" y medir en M s (Fig. 8).

La falta de germinación no se debe a muerte de las esporas: si entre la exposición a ácido gálico y la activación por choque térmico se lavan tres veces las esporas, se recuperan, en parte, las tasas de germinación (Fig. 9). Tampoco se debe a inhibición del crecimiento micelial por el ácido gálico: los cultivos (50 ml de medio líquido) inoculados con germínulas de 10.5 horas de edad alcanzan a los tres días un peso seco medio de 354 mg; en presencia de ácido gálico (100 mM), 321 mg. Las desviaciones típicas fueron, en ambos casos, de 14 mg. Por tanto el ácido gálico no es particularmente tóxico para Phycomyces.

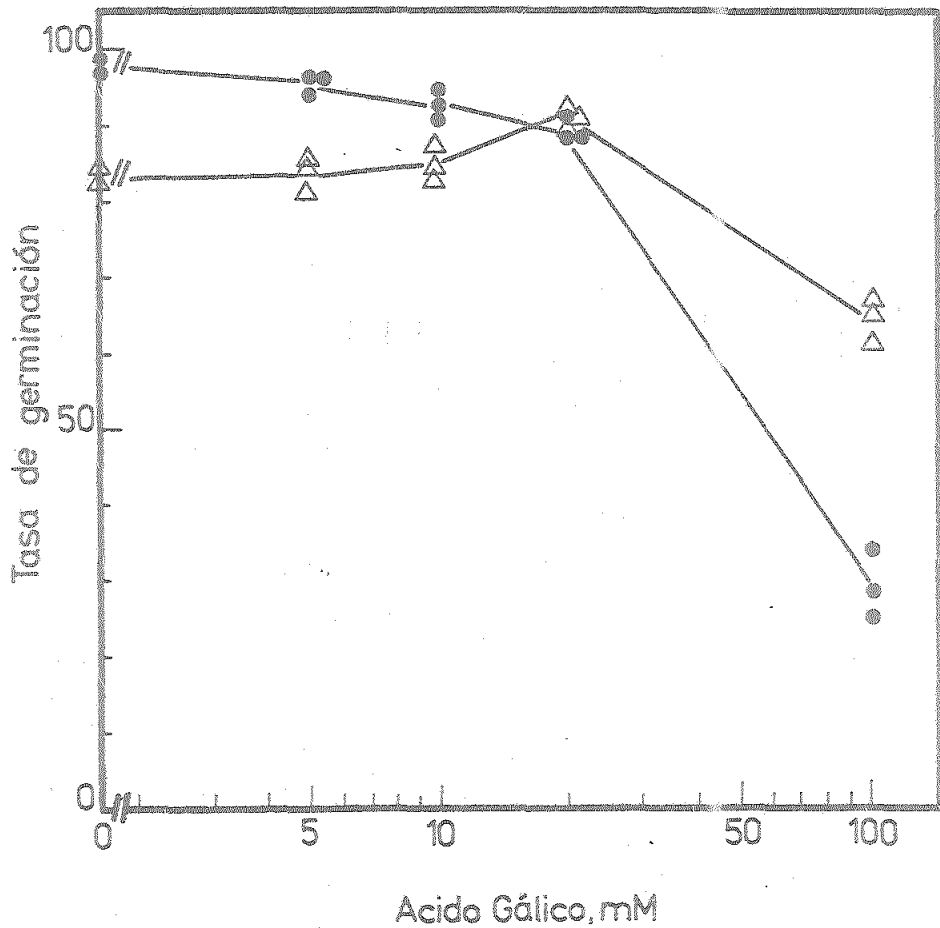


Figura 6. Germinación en presencia de ácido gálico. La suspensión de esporas en medio líquido con ácido gálico (●) se incubó sucesivamente a 48°C durante 15 minutos y a 22°C durante 8 horas. La suspensión de esporas en medio líquido con acetato potásico (10 mM) y ácido gálico se incubó a 22°C durante 8 horas (Δ). Se dan los resultados de tres experimentos independientes.



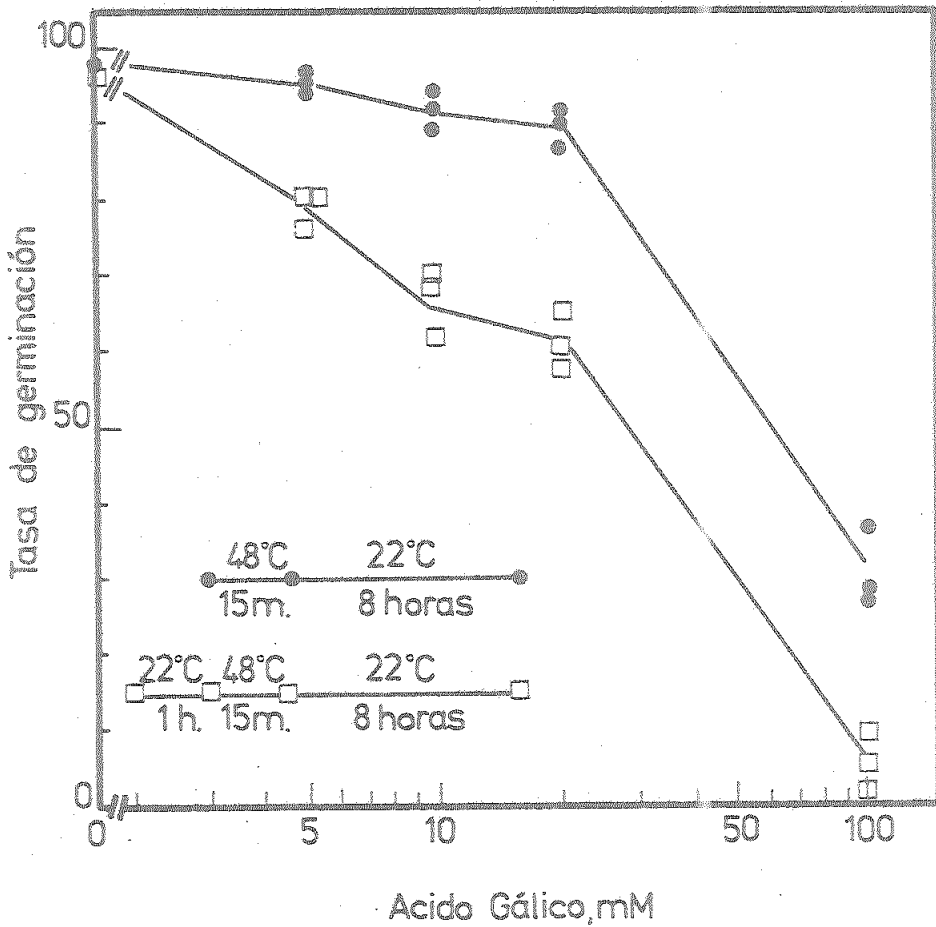


Figura 7. Germinación de esporas preincubadas en ácido gálico. La suspensión de esporas en medio líquido con ácido gálico se incubó sucesivamente a 22°C durante una hora, a 48°C durante 15 minutos y a 22°C durante 8 horas (●). En los testigos (□) se suprimió la primera incubación a 22°C. Se dan los resultados de tres experimentos independientes.

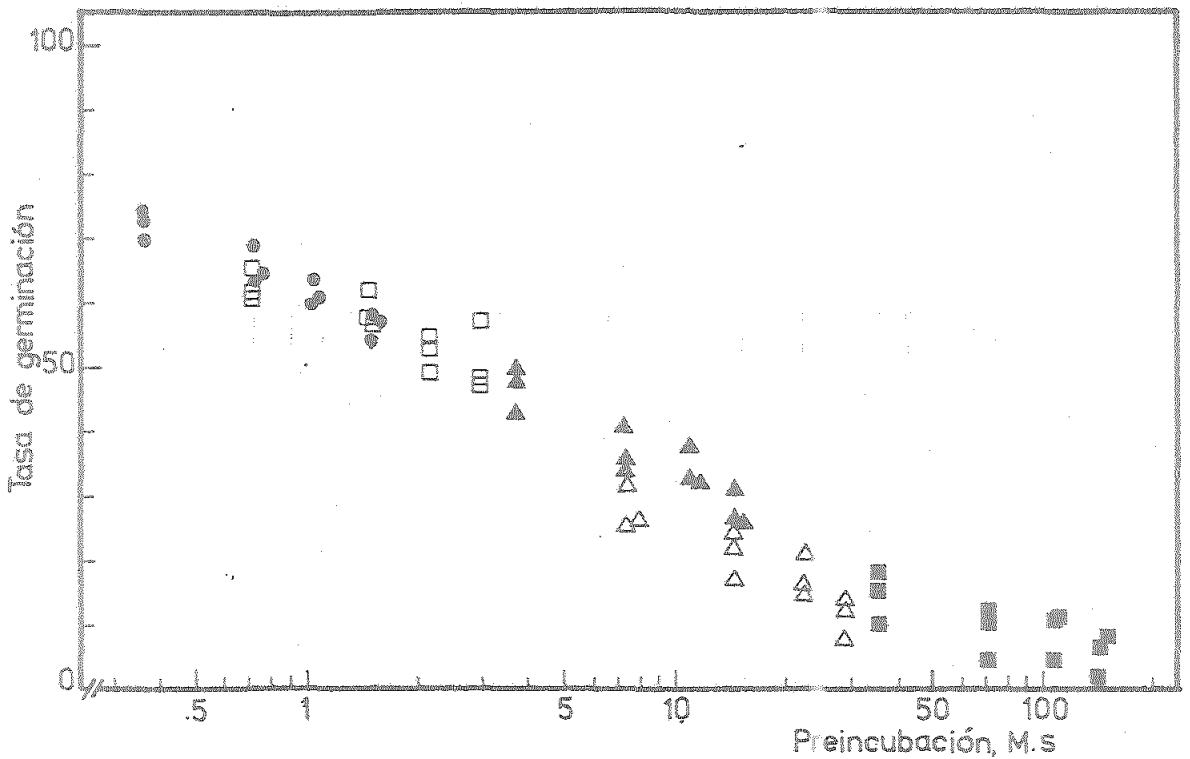


Figura 8. Germinación de esporas preincubadas con ácido gálico. Las suspensiones de esporas en medio líquido con cierta concentración molar  $\underline{C}$  de ácido gálico (● 50 uM, 100 uM, ▲ 500 uM, △ 1 mM, ■ 5 mM) se incubaron sucesivamente a 22°C durante un tiempo  $\underline{t}$  segundos, a 48°C durante 15 minutos y a 22°C durante 8 horas. Las abscisas indican el producto  $\underline{C} \times \underline{t}$ .

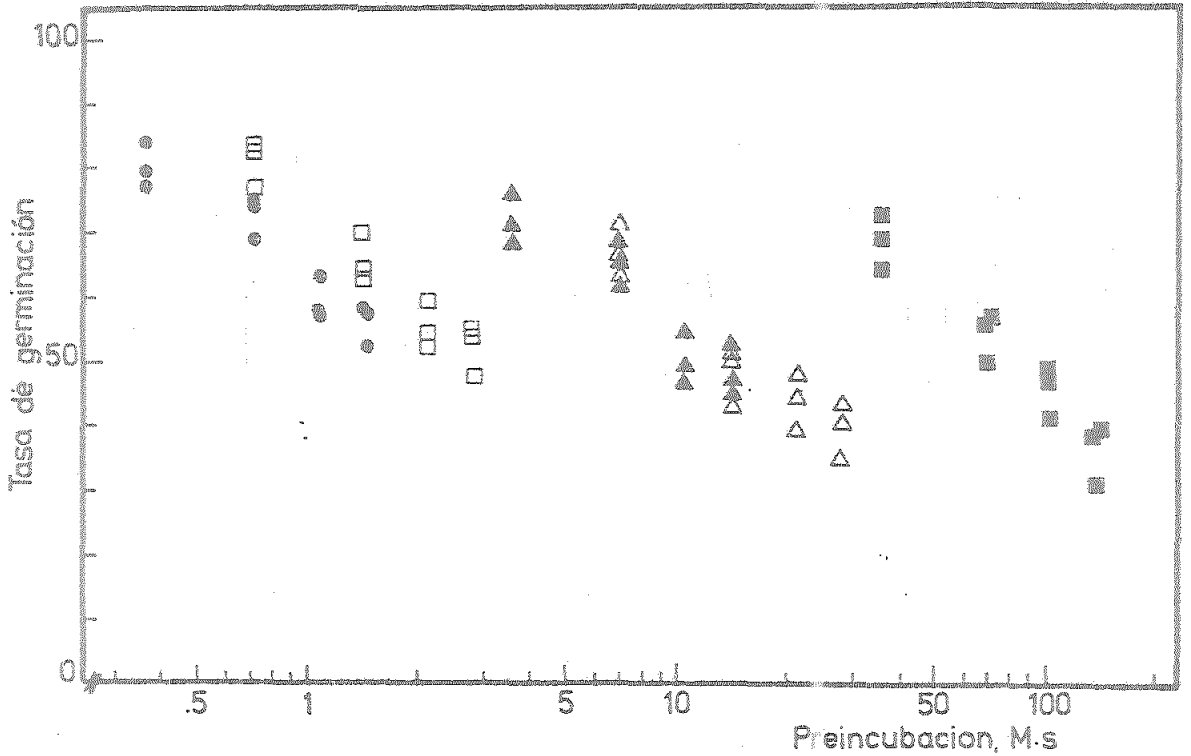


Figura 9. Germinación de esporas preincubadas con ácido gálico. Los experimentos son idénticos a los de la Figura 8, salvo que las esporas se lavaron tres veces antes de la incubación a 48°C.

## Inhibición por alta densidad de siembra

Estos experimentos se proponen comprobar si la germinación depende de la densidad de siembra de esporas en el medio de cultivo. Para ello se incubaron esporas en medio líquido filtrado, variando el título de esporas de unos experimentos a otros.

La tasa de germinación disminuye con la densidad de siembra, tanto si las esporas se activan por choque térmico como si se incuban en presencia de acetato (Fig. 10).

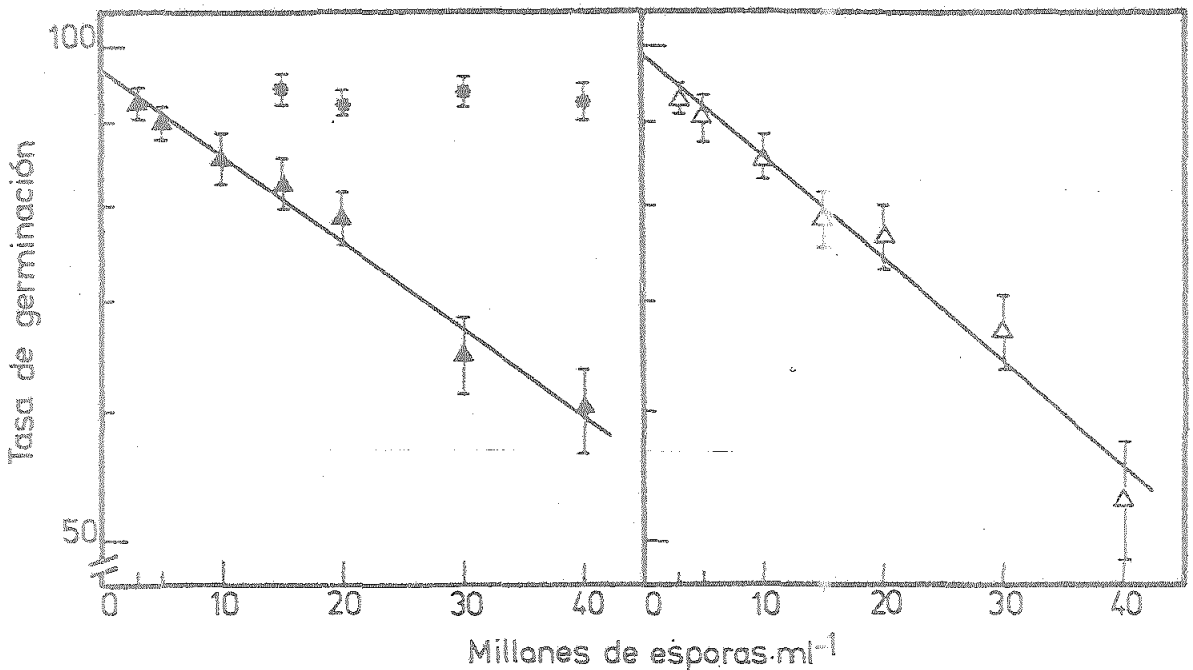


Figura 10. Germinación en función de la densidad de siembra de esporas. Las esporas, suspendidas en medio líquido con el título indicado en abscisas, se incubaron sucesivamente a 48°C durante 15 minutos y a 22°C durante 8 horas (▲) o bien se incubaron a 22°C durante 8 horas en medio líquido con acetato potásico 12 mM (△). Los asteriscos dan la tasa de germinación final observada cuando en un mismo medio se incuban (48°C durante 15 minutos y 22°C durante 8 horas) primero una suspensión de esporas con el título indicado en abscisas y a continuación otra con 10<sup>6</sup> esporas ml<sup>-1</sup>.

La inhibición no se debe a una modificación estable del medio de cultivo. Si en un mismo medio de cultivo se incuban sucesivamente dos tandas de esporas, la primera a título muy alto y la segunda bajo, no se encuentra inhibición en la segunda tanda (Fig. 10). No parece que se pueda achacar la inhibición ni a la acumulación de un inhibidor estable ni a agotamiento de un componente del medio.

Y sin embargo se puede contrarrestar la inhibición por densidad de siembra utilizando medios más concentrados (Fig. 11). Por tanto la inhibición no sólo depende del título de esporas, sino de la concentración de uno o varios componentes del medio.

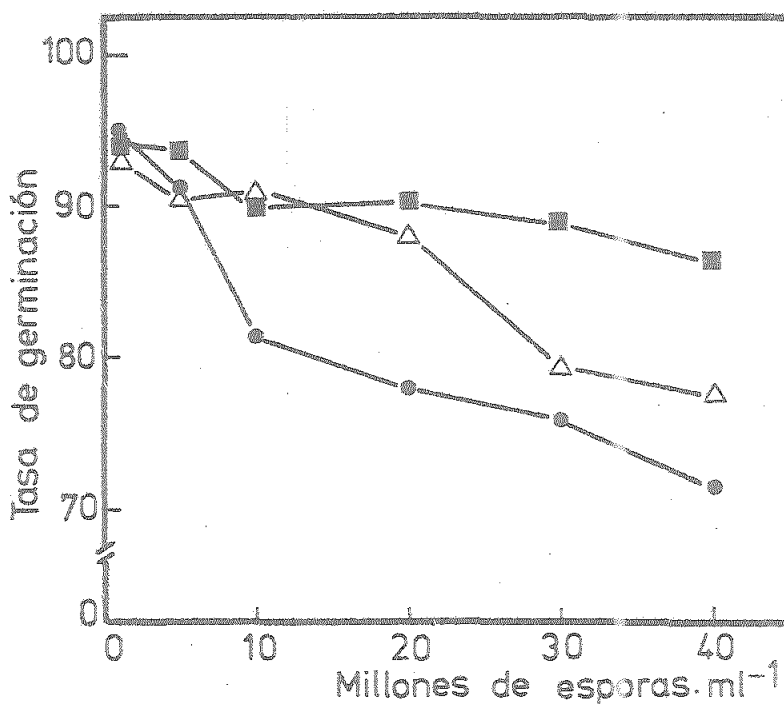


Figura 11. Germinación en función de la densidad de siembra y de la concentración del medio de cultivo. Las esporas se suspendieron en medio líquido de concentración normal (●), doble (Δ) o cuádruple (■) y se incubaron a 48°C durante 15 minutos y a 22°C durante 8 horas.

Se estudió, por consiguiente, la germinación en medios con concentraciones distintas de sus componentes y se encontró que el fosfato monopotásico es el único componente necesario para la germinación masiva de las esporas. La tasa de germinación disminuye cuando se utilizan concentraciones de fosfato monopotásico inferiores a la usual de  $5 \text{ g l}^{-1}$  (Fig. 12). Otras sales sustituyen desventajosamente al fosfato monopotásico (Tabla 5).

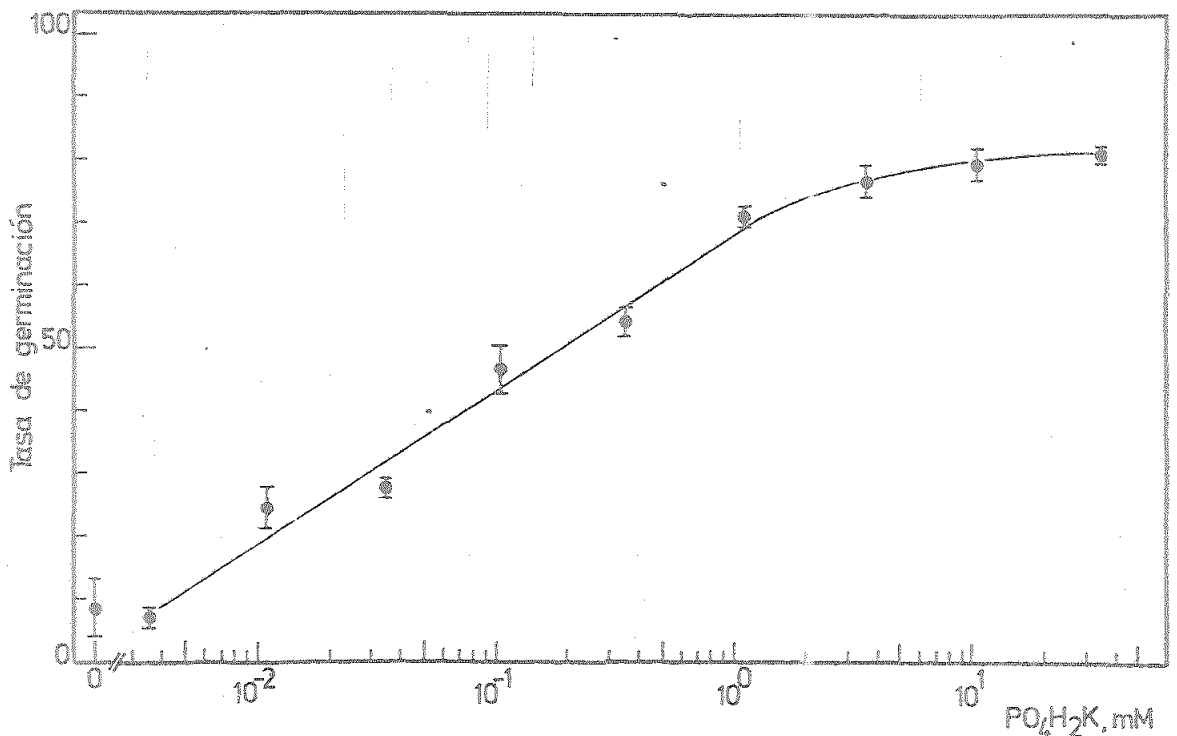


Figura 12. Germinación en función de la concentración de fosfato monopotásico. Las suspensiones de esporas ( $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) en medio líquido con distintas concentraciones de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  se incubaron sucesivamente a  $48^\circ\text{C}$  durante 15 minutos y a  $22^\circ\text{C}$  durante 8 horas.

---

Tabla 5. Efecto de distintas sales sobre la germinación. Las suspensiones de esporas ( $4 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ) en medio líquido se incubaron sucesivamente a  $48^\circ\text{C}$  durante 15 min y a  $22^\circ\text{C}$  durante 8 horas. En la preparación del medio se usaron  $5 \text{ g l}^{-1}$  de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  o una molaridad igual de otras sales.

---

Medio preparado con	Germinación (%)
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	$89.9 \pm 0.3$
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$	$56.1 \pm 2.8$
$\text{SO}_4\text{K}_2$	$67.0 \pm 1.6$
$\text{SO}_4\text{Na}_2$	$19.7 \pm 3.1$
Nada	$28.4 \pm 0.6$

---

## II. MUTANTES GERMINADORES ESPONTANEOS

## Aislamiento.

Entre los numerosos mutantes de Phycomyces aislados hasta ahora no se conocía ninguno cuyas esporas germinen masivamente sin necesidad de tratamiento activador. Se han aislado mutantes "germinadores espontáneos" mediante métodos originales que se describen a continuación. Se parte de una población de esporas mutagenizadas. Estas esporas se incuban sin activación en medio filtrado a una densidad de  $10^3$  esporas por mililitro, con lo que germinarán espontáneamente algunas esporas silvestres y masivamente los presuntos mutantes. Al cabo de una generación se recogen las esporas hijas y se incuban a su vez sin activación en medio filtrado. Haciendo suposiciones que parecen razonables, los ciclos de recolección y siembra de esporas incrementarían la proporción de esporas mutantes como se describe en la figura 13. Se decidió hacer tres ciclos sucesivos.

Este método se aplicó diez veces comenzando con esporas distintas y cada vez se aisló un solo mutante, para asegurar que todos los mutantes aislados contienen mutaciones independientes. Se obtuvieron así las estirpes S347, S376, S377, S378, S410, S411, S412, S413, S414 y S415. Siguiendo la nomenclatura genética de Demerec et al. (1966), las mutaciones de estas estirpes que alteran la germinación de las esporas se designan con las letras ger y un número de aislamiento correlativo (Tabla 3).

La evolución del porcentaje de germinación durante el proceso de aislamiento de los mutantes ger (Fig. 14) no se ajustó exactamente a las predicciones de la Fig. 13, seguramente porque las esporas mutantes no siempre son viables.



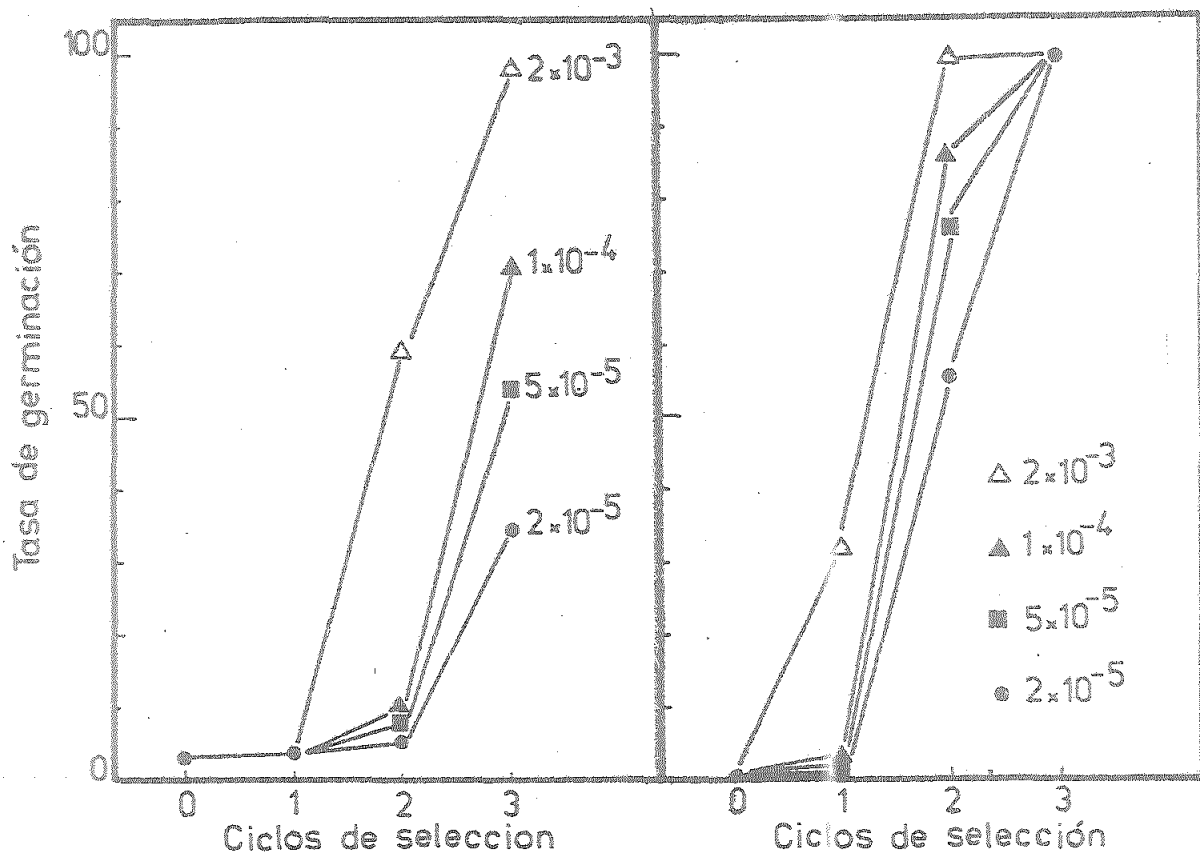


Figura 13. Enriquecimiento en mutantes germinadores espontáneos. Tasas de germinación que se espera encontrar al incubar en medio filtrado y sin activación una mezcla de esporas silvestres y mutantes directamente. La población inicial (ciclo 0) contiene la proporción de mutantes indicada en la figura. En cada ciclo sucesivo se incuban las esporas cosechadas en el ciclo anterior. Se supone que la tasa de germinación espontánea de las esporas silvestres es 3.5 % (izquierda) ó 0.4 % (derecha) y que la de las esporas mutantes es 100 %.

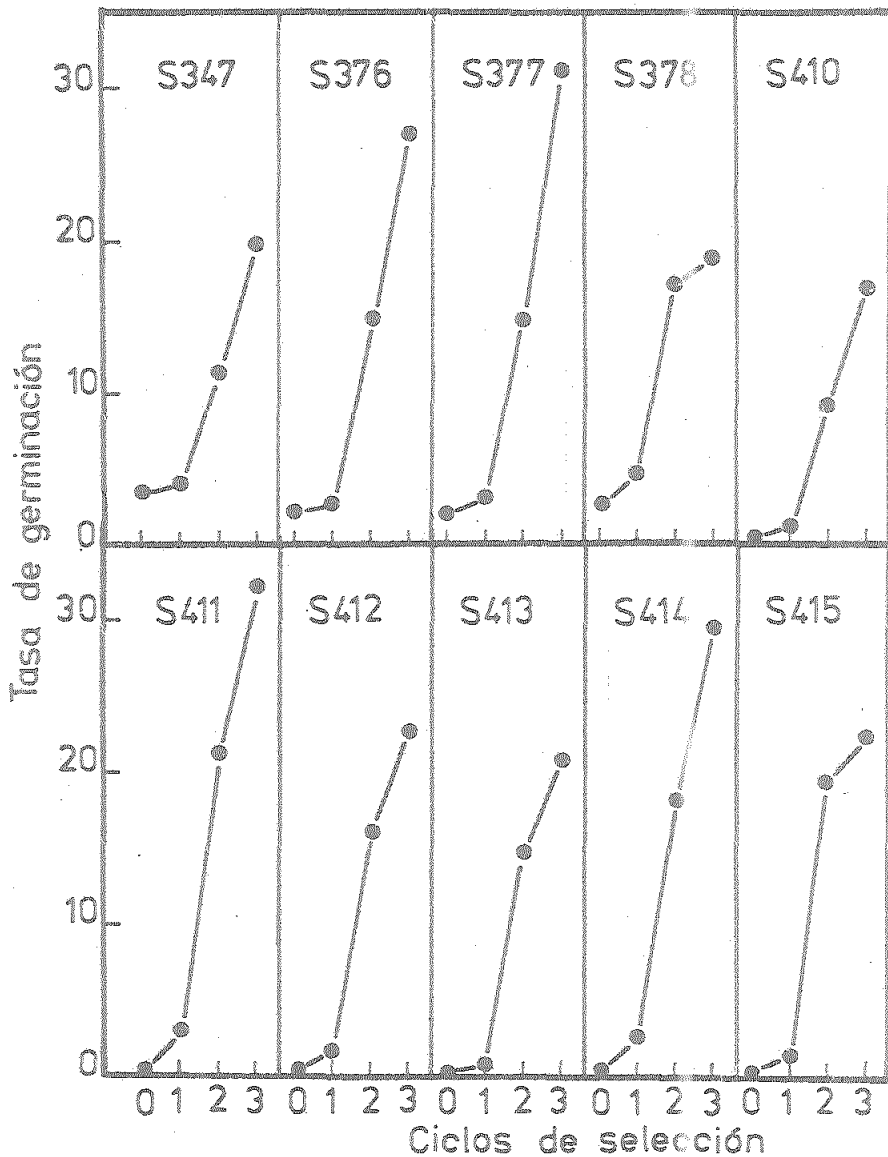


Figura 14. Aislamiento de diez mutantes germinadores espontáneos por ciclos sucesivos de germinación espontánea de esporas. Las gráficas indican las tasas de germinación encontradas al incubar sin activación en medio filtrado esporas mutagenizadas directamente (ciclo 0) y tras varios ciclos de cultivo y recolección de esporas. En cada repetición del experimento se aisló un solo micelio mutante, al que se designó con el nombre que aparece en la parte superior de cada gráfica.

## Morfología de esporas y germinulas.

Los esporangios de los mutantes "germinadores espontáneos" no contienen esporas latentes, como los esporangios silvestres, sino esporas en germinación. La mayoría de las esporas mutantes recién cosechadas son redondeadas y contienen vacuolas (Fig 15).

Al aplastar y observar al microscopio esporangios de las estirpes mutantes se observan con frecuencia esporas con tubos de germinación (Fig. 16), que, en condiciones de humedad apropiadas, pueden continuar su crecimiento hasta producir pequeños esporangióforos con sus correspondientes esporangios (Figura 17).

La forma atípica de las esporas de los mutantes germinadores espontáneos podría ser un efecto de la mutación ger sobre la estructura de la espora o corresponder a una germinación interrumpida de esporas de forma normal en el esporangio. En este último caso esperaríamos que las células contenidas en los esporangios de los mutantes tuvieran la misma forma y tamaño que las germinulas silvestres de cierta edad.

Los esporangios de la estirpe S347 contienen células casi perfectamente redondas (excentricidad 1.0), vacuolizadas, de tamaño muy variable, como media muy grande (diámetro  $11.5 \pm 2.6$   $\mu$ m). Estas células no se parecen a las germinulas de ninguna edad, por lo que rechazamos que representen germinaciones interrumpidas de esporas aparentemente normales. La investigación microscópica de esporangios inmaduros tampoco permitió observar células con aspecto de espora latente normal. Concluimos que en la estirpe S347 falla el mecanismo de formación de esporas; los primordios de esporas obtenidos por segmentación del contenido del esporangio constituyen "seudoesporas" que pueden dar lugar directamente a micelios.

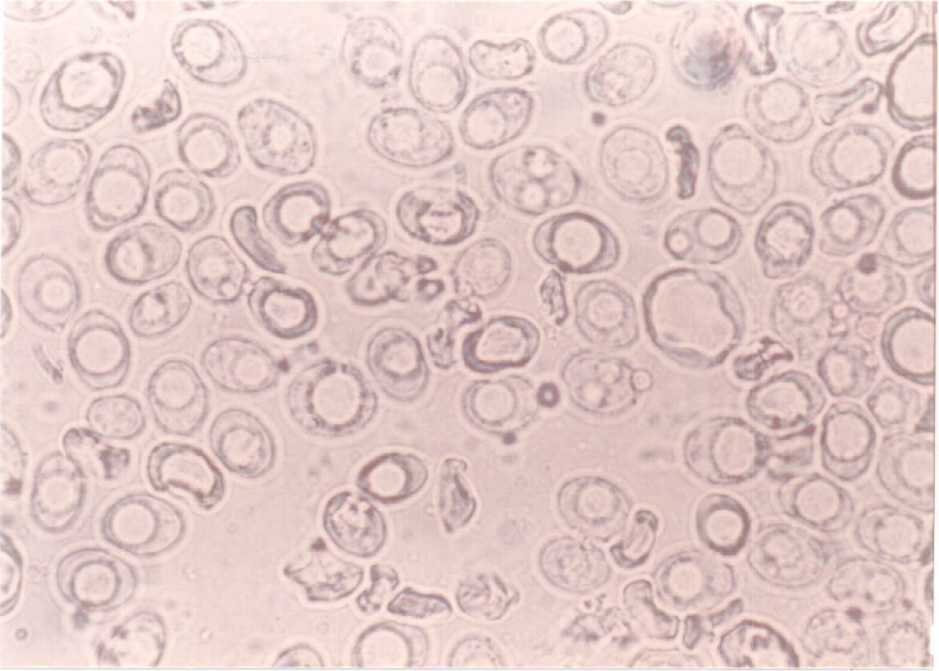


Figura 15. Esporas obtenidas tras incubar la estirpe S376 de una semana en las condiciones usuales.

---

---

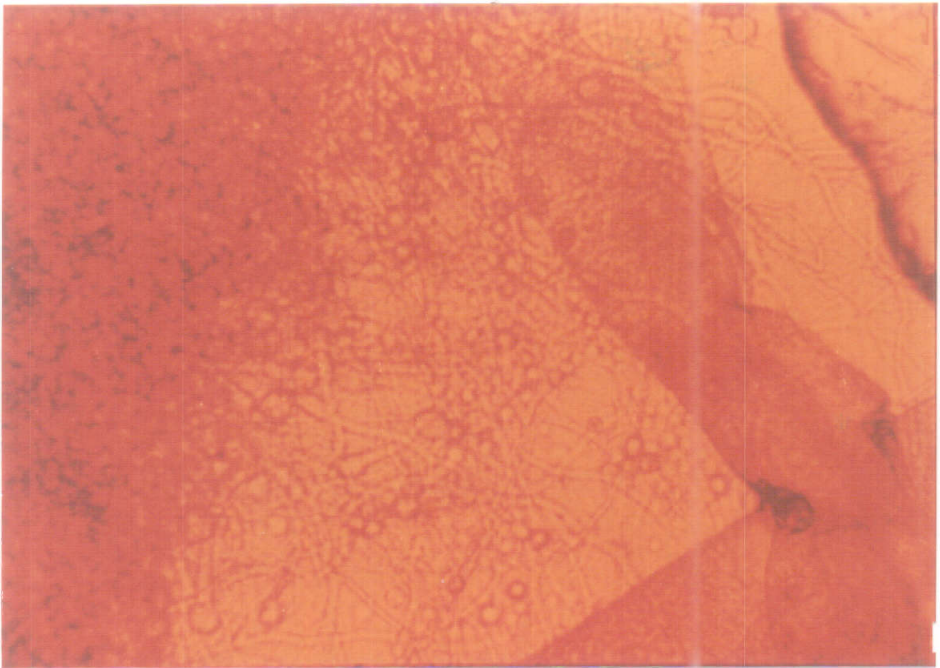


Figura 16. Esporas con tubos de germinación observadas al aplastar esporangios de la estirpe S347.

---

---

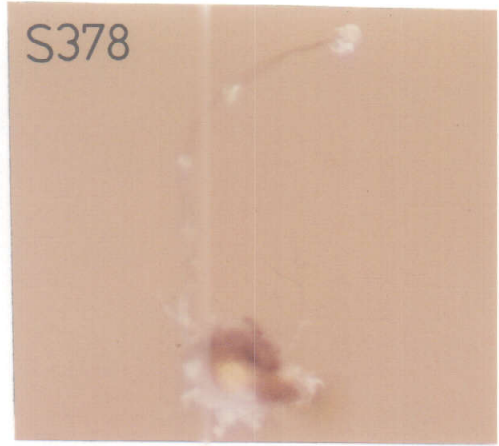
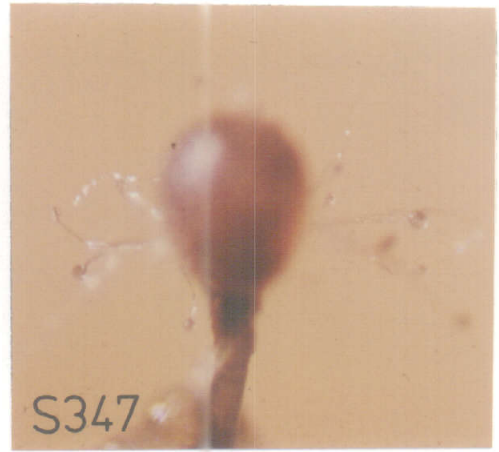


Figura 17. Los esporangios de la estirpe silvestre (arriba a la izquierda) suelen ser esferas lisas. Los de los mutantes germinadores espontáneos presentan muchas veces crecimiento micelial y aun pequeños esporangióforos y esporangios secundarios. Observaciones a los diez días de cultivo en medio sólido en un ambiente saturado de humedad.

Las "esporas" contenidas en los esporangios de las demás estirpes mutantes son elipsoidales y parecidas, pero no idénticas, a las germinulas del tipo silvestre (Fig. 18). En los esporangios inmaduros de esos mutantes se ven células semejantes a las esporas silvestres latentes (Fig. 19). Se puede pensar que estos mutantes esporulan normalmente, pero que las esporas inician espontáneamente su germinación en el esporangio y se detienen en una etapa posterior. El problema surge al tratar de determinar exactamente esa etapa. Los valores del eje mayor de las "esporas" mutantes corresponden a los de las esporas silvestres o los de germinulas muy jóvenes. Los valores del eje menor corresponden casi todos a germinulas de 2-3 horas de edad, mientras que por su forma (excentricidad) se parecen a germinulas más viejas (Tabla 6). Las desviaciones típicas de las mediciones de los mutantes son mayores que las de las germinulas, es decir, las "esporas" de los mutantes son más heterogéneas que las germinulas de una edad determinada.

#### Viabilidad.

No todas las "esporas" de los mutantes germinadores espontáneos son viables: entre las incapaces de formar un micelio cuando se incuban en medio de cultivo están las que presentan un citoplasma granular.

La idea de que las "esporas" de los mutantes germinadores espontáneos son en realidad germinulas se ve apoyada por la alta sensibilidad al calor (Fig. 20) y la escasa supervivencia cuando se almacenan a 4°C (Fig. 21). Las curvas de sensibilidad al calor son aproximadamente de primer orden (lo que sugiere sensibilidades similares en todas las células) y parecidas de unos mutantes a otros. Entre las "esporas" de los mutantes no se encuentran verdaderas esporas, que se hubieran revelado por su resistencia a 50°C; los

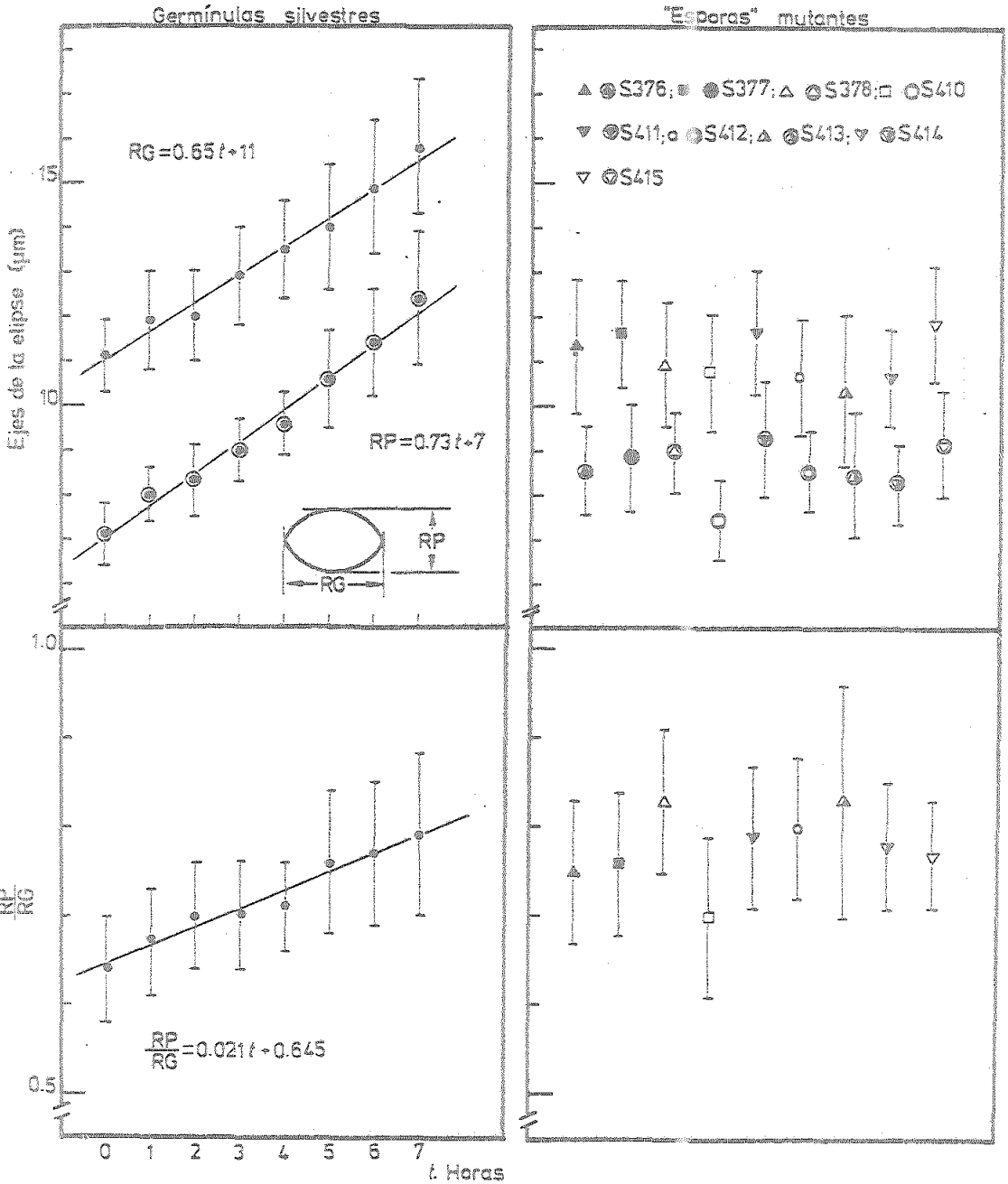


Figura 18. Comparación de tamaño y forma de las "esporas" de los mutantes germinadores espontáneos y las germinulas silvestres de distintas edades. Se indican media y desviación típica de los ejes menor y mayor y el cociente de ambas (excentricidad), determinados con un microscopio dotado de retículo micrométrico.



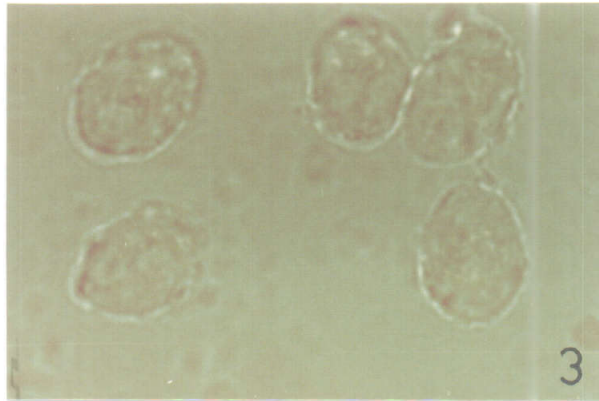
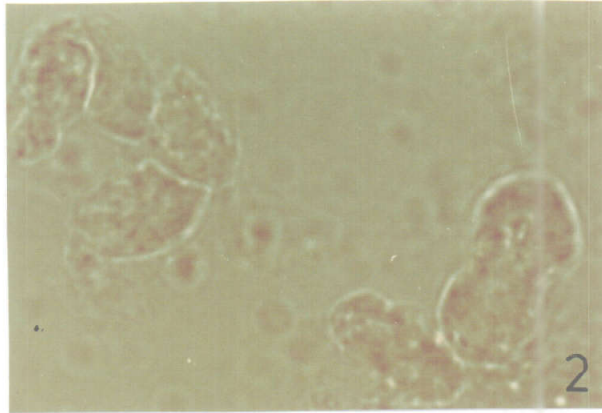
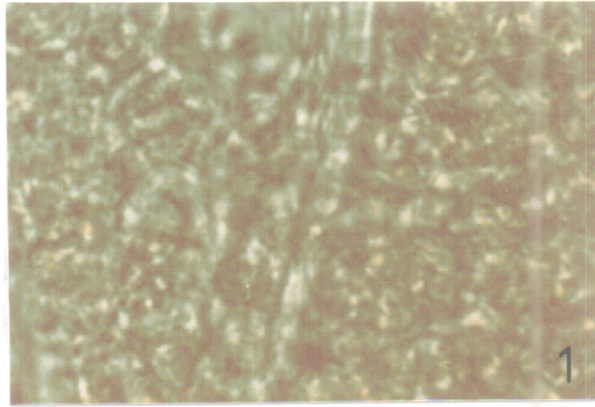


Figura 19a. Esporogénesis de la estirpe silvestre NRRL1555.

---



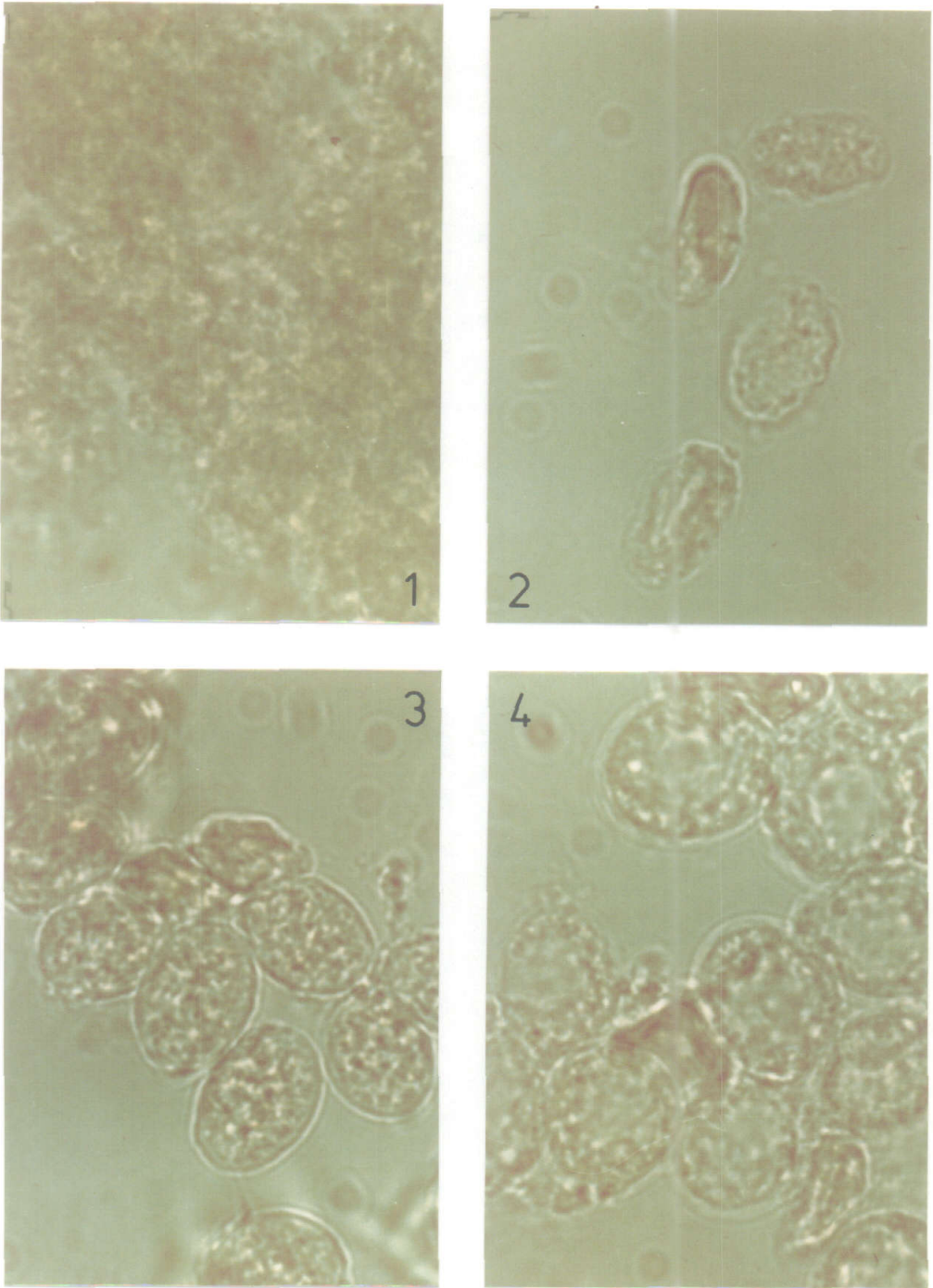


Figura 19b. Esporogénesis de una estirpe germinadora espontánea (S377).

---

=====  
Tabla 6. Edad en horas de las germinulas silvestres que tienen las mismas dimensiones (ejes mayor y menor) o la misma forma (excentricidad) que las "esporas" de los mutantes germinadores espontáneos. Estos valores se han obtenido de la Figura 18, interpolando cuando ha sido necesario.

---

Estirpe	Eje mayor	Eje menor	Excentricidad
S376	0.6	2	5
S377	1.1	2.5	5.5
S378	0	2.6	8.8
S410	0	0.5	2.6
S411	0.9	3.0	6.9
S412	0	2	7.4
S413	0	1.9	8.8
S414	0	1.8	6.4
S415	1.15	2.9	6.0

---

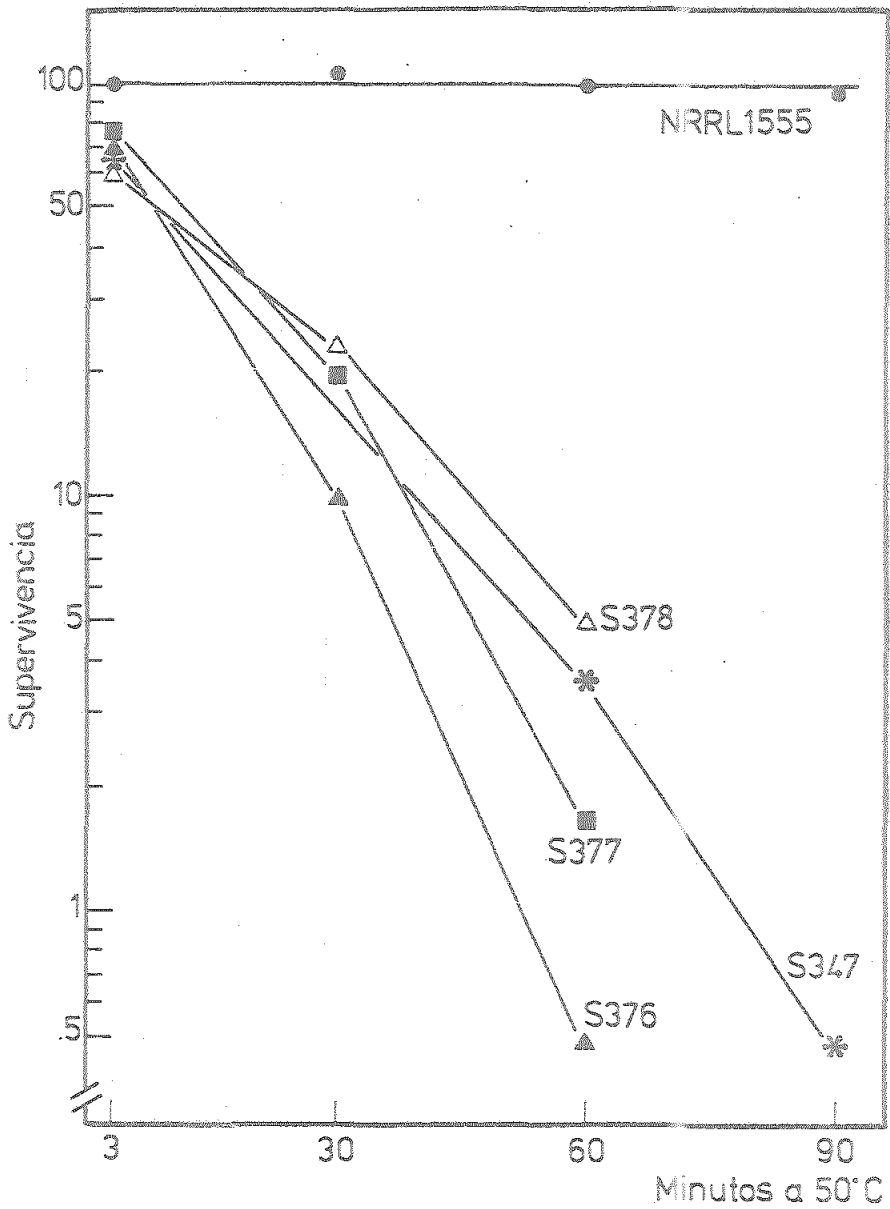


Figura 20. Supervivencia a la exposición a 50°C de esporas silvestres y "esporas" de varios mutantes germinadores espontáneos suspendidas en agua.

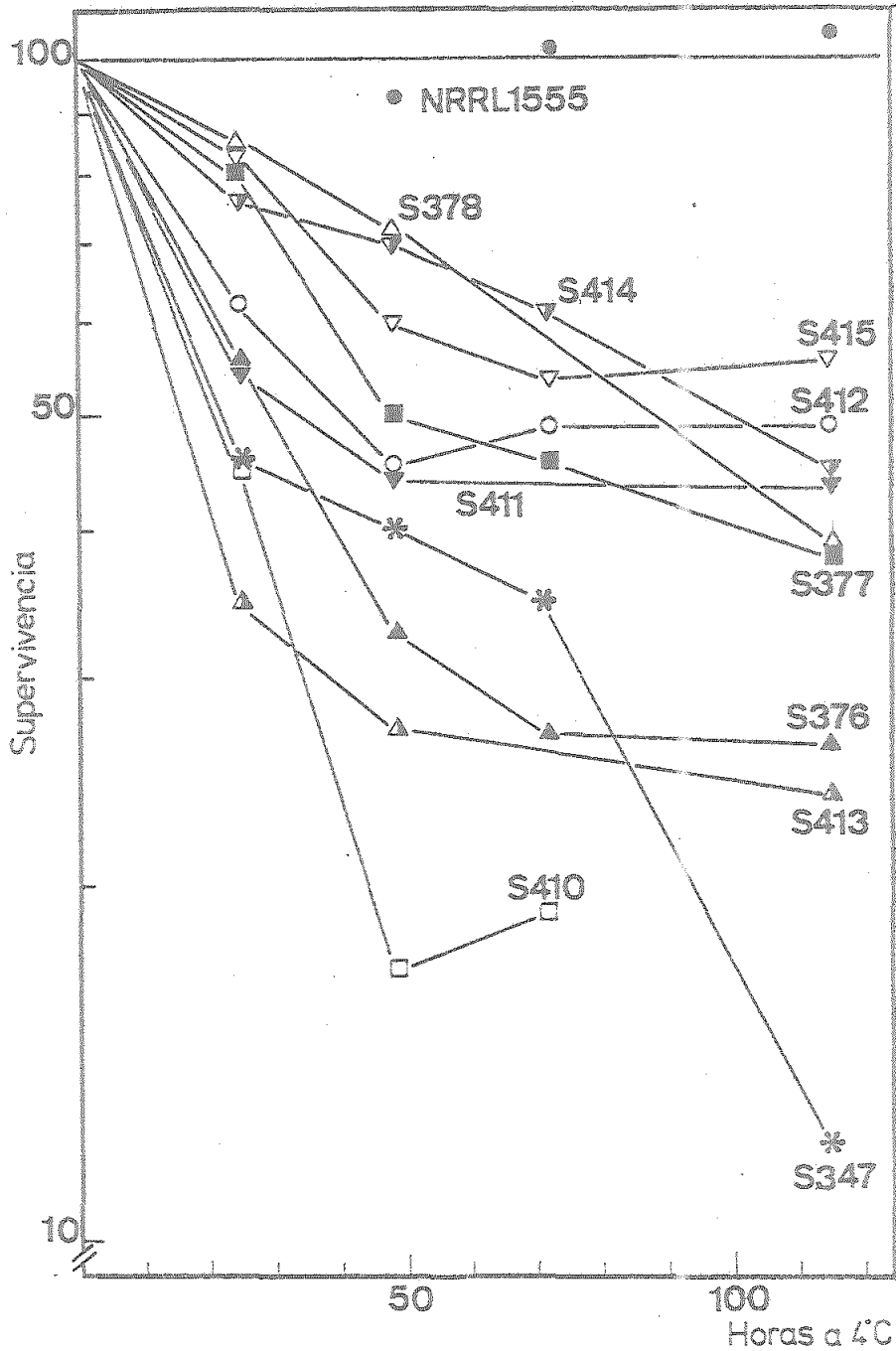


Figura 21. Supervivencia a 4°C de esporas silvestres y "esporas" de los mutantes germinadores espontáneos mantenidas en agua.

datos de la Fig. 20 establecen que la proporción de verdaderas esporas, si las hubiera, no alcanza el 1% entre las "esporas" de los mutantes S347 y S376. Por el contrario, hay mucha heterogeneidad en la supervivencia a 4°C, tanto de unos mutantes a otros como por la presencia aparente en muchos mutantes de subpoblaciones de esporas con distinta esperanza de vida a esa temperatura (estas subpoblaciones se reflejan en la forma arqueada de las curvas). La mejor forma de conservar estas estirpes es congelarlas o liofilizarlas. Siempre que sea posible, los experimentos se deben hacer con "esporas" de edad definida, por ejemplo, las recién cosechadas de cultivos de siete días en medio mínimo.

#### Estudios bioquímicos y fisiológicos.

En esta sección se comparan los mutantes germinadores espontáneos con el tipo silvestre en cuanto a varios aspectos bioquímicos íntimamente relacionados con la germinación de las esporas. Es imposible comparar las esporas o estudiar su germinación, porque las "esporas" de los mutantes no se corresponden fisiológicamente con las silvestres y porque los mutantes o no tienen necesidad de germinar (estirpe S347) o germinan asincrónicamente durante el desarrollo del esporangio. Por tanto puede que nos resulte imposible detectar diferencias bioquímicas esenciales que sólo afectan a la germinación.

Los mutantes germinadores espontáneos no parecen diferenciarse del tipo silvestre en cuanto a la actividad trehalasa de sus micelios vegetativos (Tablas 7 y 8). Fluctúan mucho los valores encontrados en micelios cultivados en glucosa. Como la glucosa activa la trehalasa (Thevelein *et al.*, 1983), estas fluctuaciones podrían deberse a la presencia en el extracto micelial de cantidades variables de glucosa procedente del medio de cultivo. Refuerzan esta

Tabla 7. Actividad trehalasa (nmol de glucosa liberados por minuto y por mg de proteína) y contenido de glucosa ( $\mu\text{g}$  por g peso seco) en extractos de micelios obtenidos por incubación de esporas durante 36 horas en medio líquido.

Estirpe	Trehalasa	Glucosa
Estirpes silvestres		
NRRL1555	27	202
S102	16	171
S370	22	107
B36	15	147
Mutantes germinadores espontáneos		
S376	18	111
S377	29	744
S378	24	511
S411	23	381
S413	11	189
S414	21	123
S415	6	36

=====  
 Tabla 8. Actividad trehalasa (nmol glucosa por min y mg de proteína) en micelios incubados durante 72 horas en medio con acetato o durante 36 horas en medios con xilosa o manitol como fuentes de carbono. Se dan los resultados de dos experimentos independientes.

Estirpe	Acetato	Xilosa	Manitol
Estirpes silvestres			
NRRL1555	29	59	15
	25	61	18
S102	20	42	17
	21	52	13
Mutantes germinadores espontáneos			
S376	26	39	19
	27	46	19
S377	25	31	23
	28	43	21
S378	25	-	21
	24	-	20

=====

explicación el haber encontrado mucha menos glucosa que la presente en el medio y el que las fluctuaciones sean mucho menores cuando se utilizan otras fuentes de carbono. El único mutante que parece contener mucha menos trehalasa que el tipo silvestre es S415, que también parece contener muy poca glucosa libre. Este mutante merecería un estudio más detallado.

Aparecen sin embargo considerables diferencias entre los mutantes y el silvestre en dos enzimas del metabolismo fermentativo, las deshidrogenasas de alcohol y de aldehído. Estas enzimas, que son poco específicas, se ensayaron con etanol y etanal, respectivamente, que son presumiblemente sus productos naturales. Todos los mutantes estudiados presentan actividades inferiores a la silvestre (Tabla 9).

=====  
 Tabla 9. Actividad de las deshidrogenasas de alcohol y de aldehído en micelios obtenidos incubando esporas durante 60 horas en medio líquido. Las actividades se dan en nmol de cofactor reducido por minuto y por mg de proteína. El cofactor de la deshidrogenasa de alcohol es el NADP y el de la deshidrogenasa de aldehído es el NAD. Se dan media y desviación típica de tres determinaciones independientes.

Estirpe	Deshidrogenasa del alcohol	Deshidrogenasa del aldehído
NRRL1555	22.7 ± 1.0	4.7 ± 1.2
S376	2.9 ± 1.1	1.0 ± 0.5
S377	7.3 ± 2.0	1.3 ± 0.5
S378	4.2 ± 2.1	trazas

=====



Asimismo, y también en relación con el metabolismo de la glucosa, se estudió el contenido en glucógeno del micelio de estas estirpes (Tabla 10). El mutante S347 es normal en este punto, pero todos los demás contienen menos glucógeno que el silvestre.

Es poco probable que varios mutantes independientes hayan mutado simultáneamente en varios genes distintos que gobiernen el metabolismo del alcohol y la producción de glucógeno, por lo que se pensó que podrían estar afectados en un mecanismo regulador general. A la vista de las observaciones descritas en la Introducción (página 24), este mecanismo regulador alterado podría provocar altos niveles de AMPc y de fructosa-2,6-bisfosfato durante la formación

=====  
 Tabla 10. Contenido de glucógeno (mg por g de materia seca) en micelios obtenidos cultivando esporas durante 36 horas en medio mínimo. Se dan media y desviación típica de tres experimentos independientes.  
 =====

Estirpe	Glucógeno
NRRL1555	106 ± 20
S347	133 ± 16
S376	55 ± 11
S377	22 ± 1
S378	22 ± 3
S411	33 ± 5
S412	61 ± 7
S413	31 ± 5
S414	54 ± 12
S415	60 ± 8

=====

de la espora, que inducirían su germinación inmediata. Se midieron los niveles de ambos compuestos reguladores en esporangios inmaduros, de color amarillo vivo, en los que se forman las esporas (Tabla 11). No hay diferencias de gran consideración entre las estirpes mutantes y silvestres en ninguno de los dos casos.

Tabla 11. Contenido de adenilato cíclico y fructosa-2,6-bisfosfato en esporangios inmaduros. Para cada análisis se tomaron 200 eg (esporangios) de color amarillo intenso.

Estirpe	Adenilato cíclico		Fructosa-2,6-bisfosfato	
	pmol/ 200 eg	nmol/ g proteína	pmol/ 200 eg	nmol/ g proteína
Estirpes con germinación normal				
NRRL1555	5.6	20.7	20.5	76.0
S102	5.5	24.0	37.5	164.0
Mutantes germinadores espontáneos				
S376	3.7	15.3	-	-
S377	5.1	17.9	25.0	87.6
S378	4.4	20.8	21.5	101.8
S410	5.7	18.4	41.5	43.3
S411	6.4	25.3	19.5	77.0
S412	7.9	39.1	55.0	272.4
S413	5.3	28.75	18.0	97.6
S414	3.9	22.7	37.5	218.0
S415	-	-	61.5	324.5

Como el fosfato es indispensable en la germinación, según se documenta en la literatura y en los experimentos preliminares de la página 50, se consideró la posibilidad de que el fosfato escaseara en los esporangios silvestres y abundara en los mutantes germinadores espontáneos. Los análisis de la Tabla 12 rechazan esta hipótesis, ya que los esporangios mutantes no difieren de los silvestres en este aspecto y todos contienen más fosfato del que produce la más activa germinación (alrededor de  $0.5 \text{ g l}^{-1}$  de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , según la Fig. 12 de la página 50).

=====  
 Tabla 12. Contenido en fosfato (dado como  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ) de esporangios inmaduros de la estirpe silvestre y nueve estirpes germinadoras espontáneas.  
 =====

Estirpe	Fosfato		
	ug/ug proteína	ug/eg	$\text{g l}^{-1}$
NRRL1555	$0.40 \pm 0.01$	1.5	2.9
S347	$0.31 \pm 0.07$	1.1	2.1
S376	$0.38 \pm 0.01$	1.3	2.5
S377	$0.32 \pm 0.03$	1.3	2.5
S378	$0.30 \pm 0.05$	1.2	2.3
S411	$0.32 \pm 0.02$	0.9	1.7
S412	$0.39 \pm 0.01$	1.2	2.3
S413	$0.44 \pm 0.04$	1.5	2.9
S414	$0.42 \pm 0.16$	1.3	2.5
S415	$0.49 \pm 0.08$	1.7	3.3

=====

La inhibición de la germinación por el ácido gálico (página 43) puede hacer sospechar que las esporas del tipo silvestre fueran inhibidas por el ácido gálico contenido en los esporangios, mientras que los mutantes no contendrían bastante. No se consiguió detectar ácido gálico en esporangios maduros o inmaduros. En cuanto al ácido gálico presente en los esporangióforos (Tabla 13), las estirpes mutantes tienen niveles similares a la silvestre.

=====

Tabla 13. Contenido de ácido gálico ( $\text{mg g}^{-1}$  peso seco) en esporangióforos obtenidos de cultivos de cinco días en medio sólido. Se dan la media y desviación típica de tres análisis independientes.

Estirpes	Acido gálico
NRRL1555	24 $\pm$ 2
S347	30 $\pm$ 2
S376	21 $\pm$ 1
S377	26 $\pm$ 4
S378	24 $\pm$ 5
S410	26 $\pm$ 6
S411	19 $\pm$ 2
S412	25 $\pm$ 2
S413	27 $\pm$ 5
S414	22 $\pm$ 0
S415	27 $\pm$ 2

=====

## Análisis genético

Para establecer la dominancia o recesividad de las mutaciones, se obtuvieron heterocariontes entre las estirpes S376, S377 y S378 (germinadoras espontáneas y auxótrofas para ácido nicotínico) y A87, una estirpe silvestre para la germinación y auxótrofa para lisina. Los heterocariontes se seleccionan porque crecen en medio mínimo.

El estudio de estos heterocariontes demuestra que las mutaciones que afectan a la germinación de las estirpes S376, S377 y S378 son recesivas. Los heterocariontes segregan siguiendo la distribución de Heisenberg y Cerdá-Olmedo (1968).

Los esporangios viejos de los tres heterocariontes presentan un 8-9% de germinulas entre sus esporas. Este porcentaje está próximo al esperado para las esporas homocarióticas germinadoras espontáneas. Las germinulas, separadas por micromanipulación, producen colonias auxótrofas para el ácido nicotínico y sus esporangios contienen sólo germinulas (fenotipo de S376, S377 ó S378). Las esporas normales, separadas por micromanipulación, producen dos tipos de colonias: 1) las que crecen en medio mínimo, cuyos esporangios que contienen aproximadamente el 10% de germinulas (fenotipo de heterocarionte), y 2) aquéllas que son auxótrofas para la lisina y, además, sus esporangios contienen sólo esporas. La frecuencia del primer tipo de colonias es de un 85% del total de esporas micromanipuladas, mientras que el segundo tipo de colonias aparece el 15% restante.

## III. MUTANTES NO ACTIVABLES.

## Aislamiento.

Esta parte de la Tesis se ha centrado en el aislamiento y estudio de mutantes cuyas esporas no fueran activadas por acetato o por propionato, pero sí por calor.

Los antibióticos poliénicos son mucho más tóxicos para células en crecimiento que para células en reposo. Esta propiedad se puede aplicar a la contraselección de auxótrofos en mezclas de células mutantes y silvestres incubadas en medio mínimo en presencia del antibiótico. La N-glicosilpolifungina tiene la ventaja adicional de ser bastante soluble en medio de cultivo y ha sido utilizada con éxito para el aislamiento de auxótrofos en Aspergillus (Bal et al., 1974) y Saccharomyces (Polaina y Conde, 1981).

Nuestro método para aislar mutantes de Phycomyces defectuosos en la activación química se basa en que las esporas en reposo son resistentes al antibiótico y las germinulas, sensibles. La capacidad del antibiótico de discriminar entre ambos tipos de células se puso de manifiesto en una serie de experimentos de reconstrucción.

En experimentos realizados en este laboratorio por H. I. Yazán y F. Rivero se había encontrado que la exposición de germinulas de 13 horas de edad a N-glicosilpolifungina (1000 unidades por ml) durante una hora mata más del 95 % de ellas.

Se expusieron al antibiótico por ml, varios millones de esporas activadas por calor de una estirpe A y varios miles de esporas no activadas de otra estirpe B fenotípicamente distinta. Antes y después del tratamiento con el antibiótico se tomaron muestras, se activaron por calor y

se sembraron en medio ácido para contar las colonias de ambas estirpes. Se encontró que la proporción de células viables de la estirpe B entre el total de células viables aumenta tras el tratamiento.

El enriquecimiento E de la estirpe B en la población se puede definir como la relación entre las frecuencias de las células viables B después y antes del tratamiento, o sea,

$$E = m_0 N_t / N_0 m_t$$

donde

$m_0$  es el número de células viables por mililitro de la estirpe B antes del tratamiento.

$N_0$  es el número total de células viables por mililitro antes del tratamiento.

$N_t$  es el número total de células viables por mililitro tras el tratamiento.

$m_t$  es el número de células viables por mililitro de la estirpe B tras el tratamiento.

La ecuación anterior se puede escribir:

$$E = S_m / S_p$$

donde

$S_p = N_t / N_0$  es la supervivencia al tratamiento de la población total.

$S_m = m_0 / m_t$  es la supervivencia de la estirpe B.

Los resultados experimentales (Fig. 22) indican que el enriquecimiento es tanto mayor cuanto menor es la supervivencia de la población. No todas las esporas de la estirpe B sobreviven al tratamiento; en nuestros experimentos la supervivencia  $S_m$  fluctuó entre un 50% y un 80%.

Para el aislamiento de mutantes no activables por acetato o propionato se expusieron al antibiótico esporas mutagenizadas y recicladas (Materiales y Métodos, página 34), incubadas en un medio con acetato o propionato. Se suponía que los mutantes no activables seguirían en forma de esporas y serían más resistentes al antibiótico.

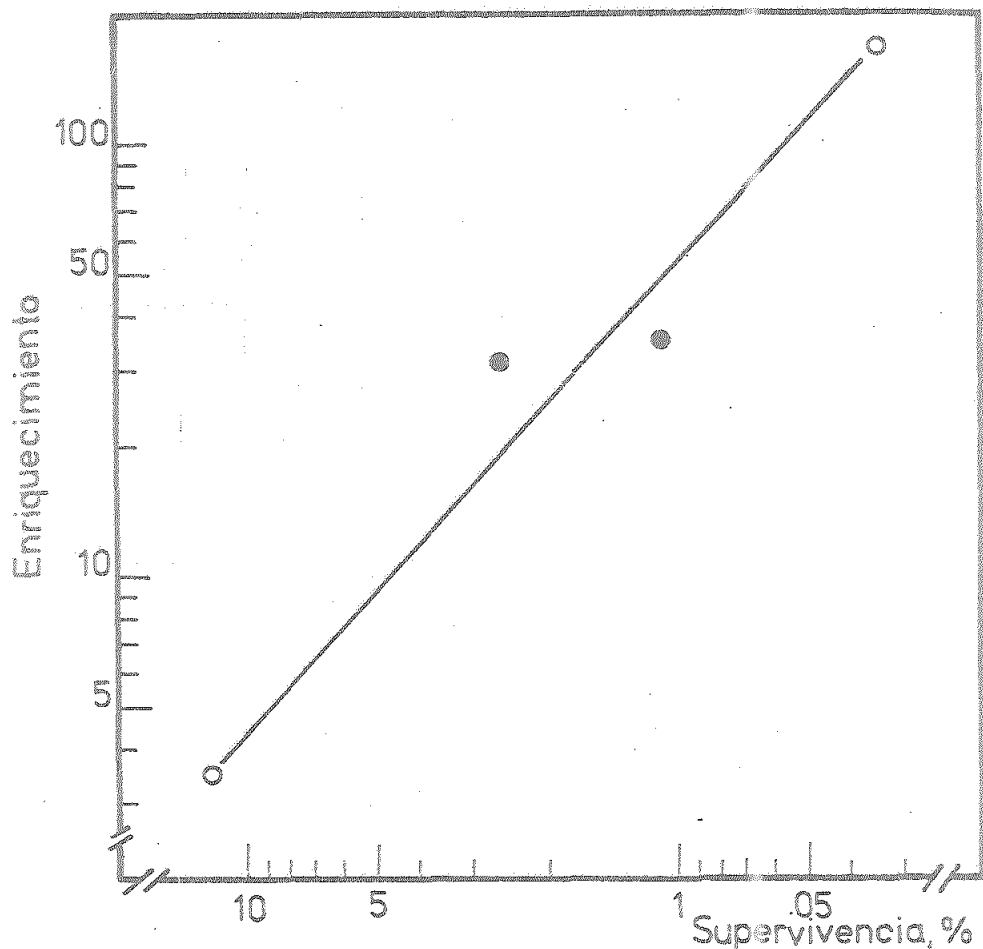


Figura 22. Enriquecimiento de las esporas no activadas tras el tratamiento conjunto de germinulas y esporas no activadas con N-glicosilpolifungina. Los parámetros y manipulaciones experimentales se definen en el texto. Las germinulas pertenecían siempre a la estirpe silvestre NRRL1555; las esporas no activadas a las estirpes C242 (●) o S400 (○), de germinación normal pero con características fenotípicas rápidamente identificables.



Se aplicó nueve veces el protocolo descrito en la página y cada vez se aisló un solo mutante. Los mutantes no activables por acetato son las estirpes S433 a S439, ambas inclusive. Las no activables por propionato son las estirpes S440 y S441. Las mutaciones responsables de su defectuosa activación química se designan con las letras ger y un número de aislamiento correlativo (Tabla 3).

Activación de los mutantes por acetato, propionato y choque térmico.

Aunque los mutantes se obtuvieron como no activables por acetato o por propionato, todos resultan ser defectuosos en su activación por calor y por ambos productos químicos.

En el caso de la activación química, los mutantes de la activación muestran curvas dosis-respuesta desplazadas hacia concentraciones superiores de acetato y de propionato (Fig. 23). La pérdida de eficacia no es necesariamente la misma para los dos productos químicos, y así los mutantes S435 y S436, que son de los que peor responden a propionato, no están entre los que peor responden a acetato. La mayoría de los mutantes no alcanza nunca una germinación masiva, próxima al 100 %.

La exposición a 48°C durante 3 minutos basta para activar prácticamente el 100 % de las esporas silvestres y la exposición puede prolongarse durante varias horas sin que se observe decrecimiento de la viabilidad (Robbins et al., 1942). Todos los mutantes de la activación difieren del tipo silvestre de una forma u otra (Fig. 24). Sólo dos de ellos alcanzan tasas de activación próximas al 100 %, pero exigen unos diez minutos de exposición y sufren un decrecimiento de la germinación con exposiciones inferiores a una hora. Las demás estirpes mutantes no alcanzan tasas de germinación del 100 % y algunas sobrepasan apenas los

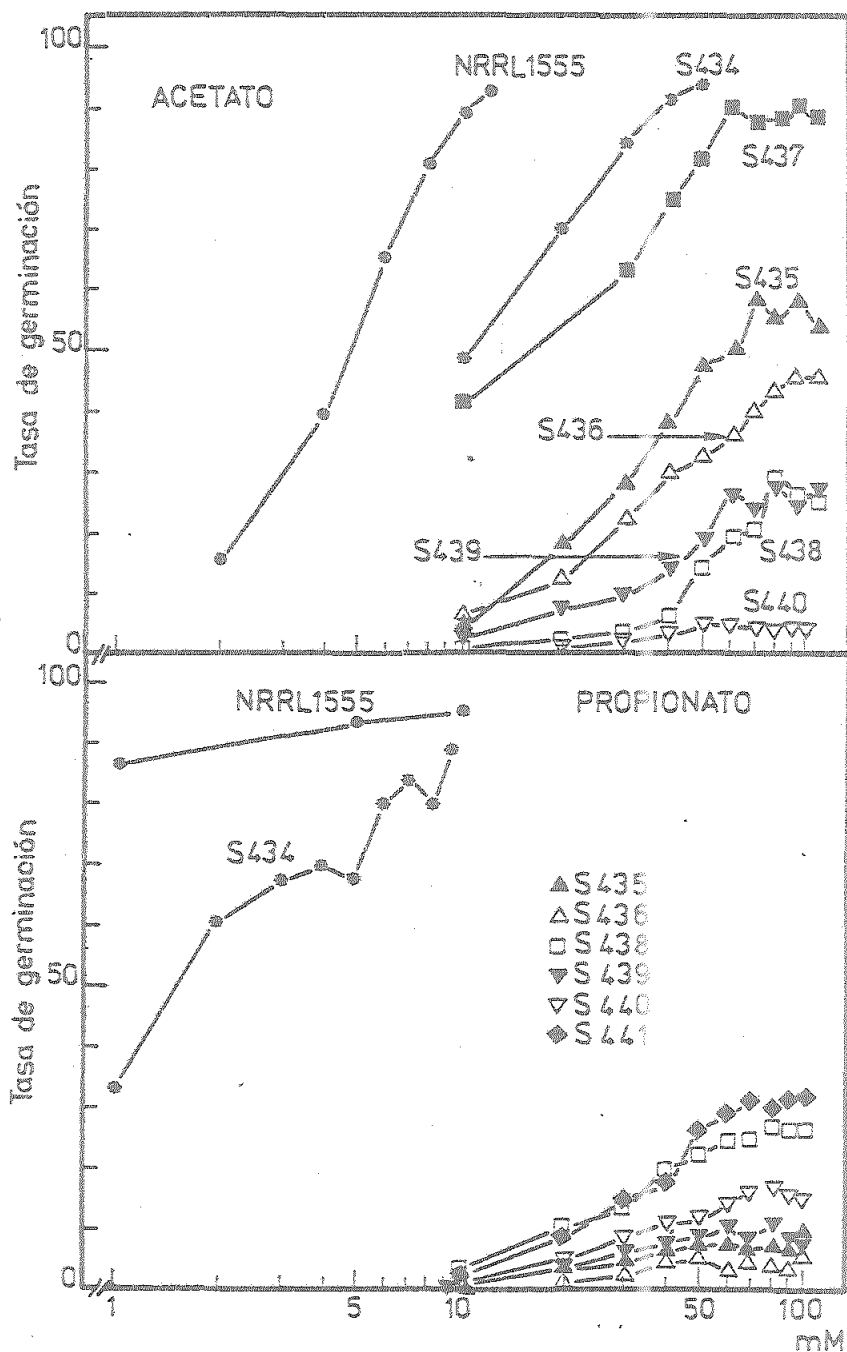


Figura 23. Germinación de esporas de la estirpe silvestre NRRL1555 y de varios mutantes incubadas en medio líquido con las concentraciones de acetato potásico o propionato potásico que se indican.

niveles espontáneos de germinación. Las estirpes mutantes son todas menos sensibles que el silvestre al efecto activador del calor, pero parecen ser más sensibles a su efecto tóxico.

Las esporas de varios mutantes no son activadas masivamente por ningún tratamiento. El caso extremo es S440, que no llega en ningún caso al 20 % de germinación. Sin embargo, las esporas de estas estirpes no están muertas, en el sentido de que no se tiñen con azul de metileno (Arnold, 1972).

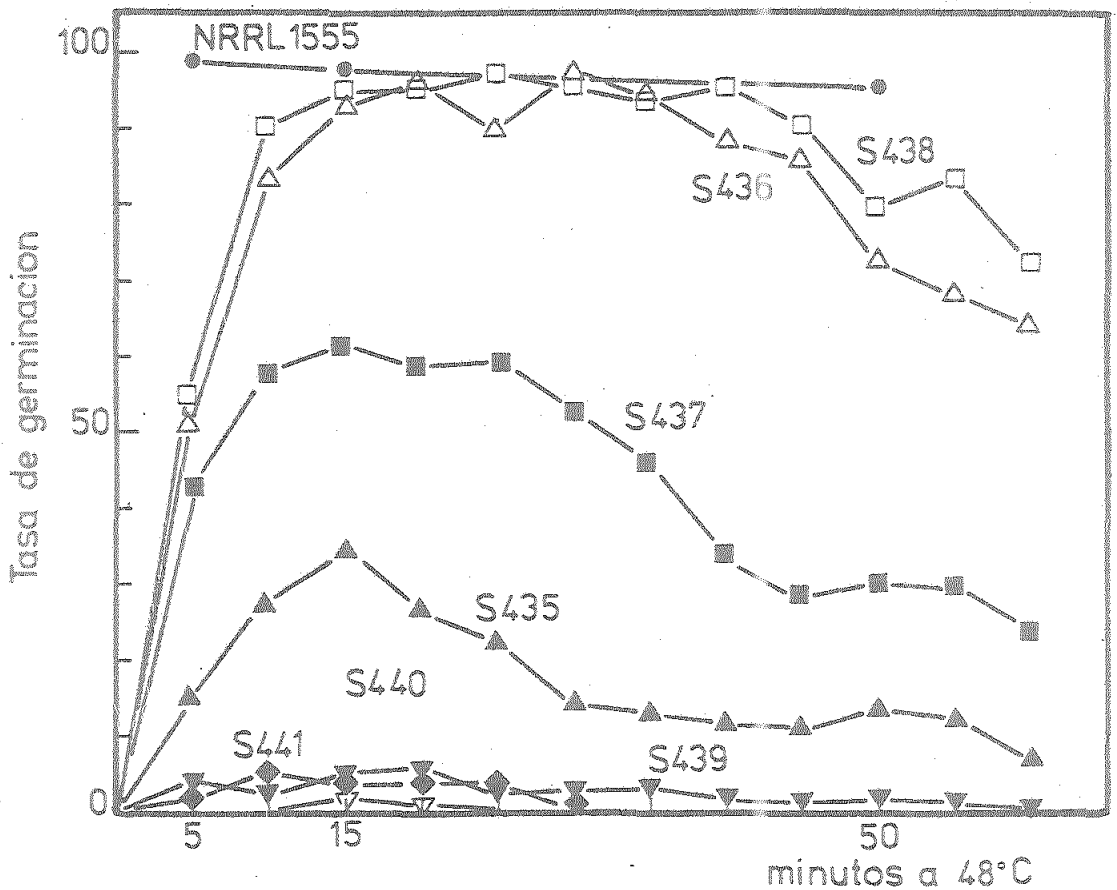


Figura 24. Germinación de la estirpe silvestre NRRL1555 y de varios mutantes tras diversas exposiciones a 48°C.

## Utilización del acetato.

Los mutantes de la activación utilizan como fuentes de carbono glucosa y acetato con la misma eficacia que la estirpe silvestre (Fig. 25), por lo que no parece que estén afectadas en el metabolismo de esos compuestos, y en particular en el del acetato.

Podría haber diferencias en el metabolismo del acetato en la espora que no se reflejaran en el crecimiento micelial. Para discernirlas realizamos los experimentos con marcaje radioactivo descritos en Material y Métodos, cuyos resultados se resumen en las Fig. 26. Los mutantes suelen utilizar la glucosa un poco peor que el silvestre, como se pone de manifiesto midiendo producción de CO<sub>2</sub>, ácido 2-oxo-glutárico o ácido pirúvico. Una disminución general del vigor se suele encontrar en todo tipo de mutantes aislados tras exposición a mutágenos poderosos y refleja probablemente la inducción de otras mutaciones desconocidas en el genómico.

Es curioso que la presencia de glucosa no sólo no inhibe la utilización de acetato, sino que la estimula. Esta estimulación ya había sido descrito anteriormente en Phycomyces (Van Laere et al., 1980b) y fenómenos análogos se han descrito en Mucor (Tripp y Paznokas, 1982).

La mayoría de los mutantes de la activación utilizan peor el acetato que el tipo silvestre, tanto como única fuente de carbono, como en combinación con glucosa. Los resultados de la Fig. 26, sin embargo, no señalan cambios claros y definidos en el metabolismo central de los mutantes. Las diferencias metabólicas entre los mutantes y el silvestre pueden deberse más bien a la disminución de vigor que se observa en aquéllos y no a mutaciones específicas para el proceso de germinación.

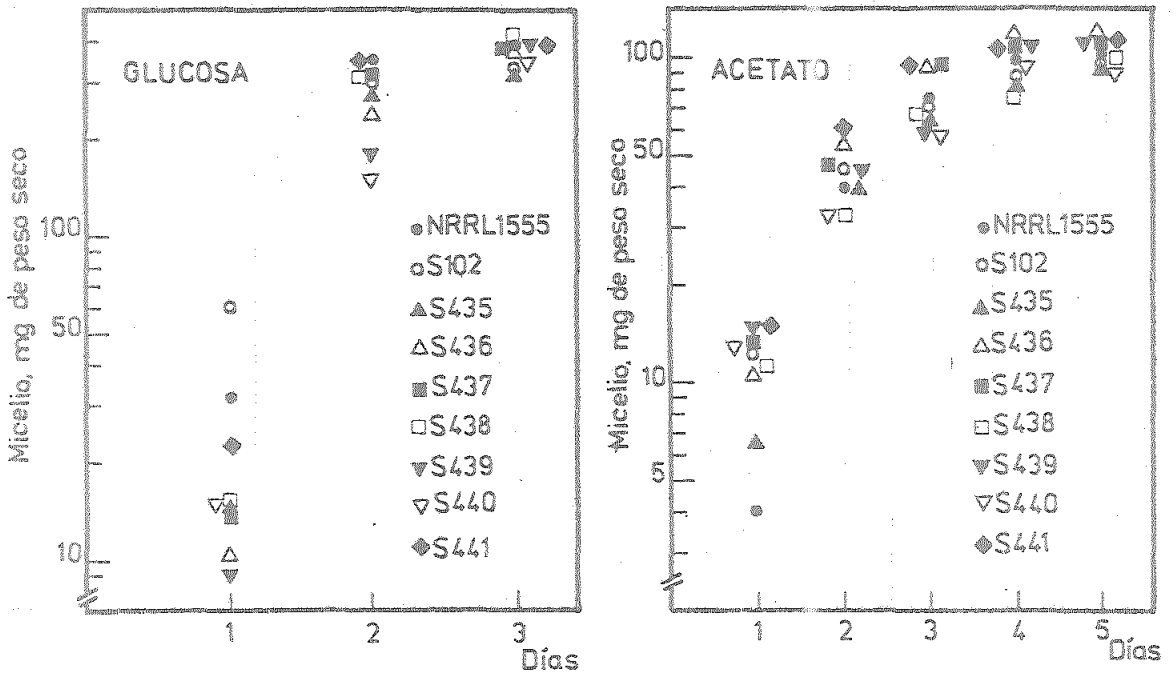


Figura 25. Crecimiento de tipos silvestres y mutantes de la activación en medio líquido con glucosa ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ) o acetato potásico ( $21.8 \text{ g l}^{-1}$ ) a  $22^\circ\text{C}$ . Las esporas sembradas en glucosa fueron preactivadas a  $48^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

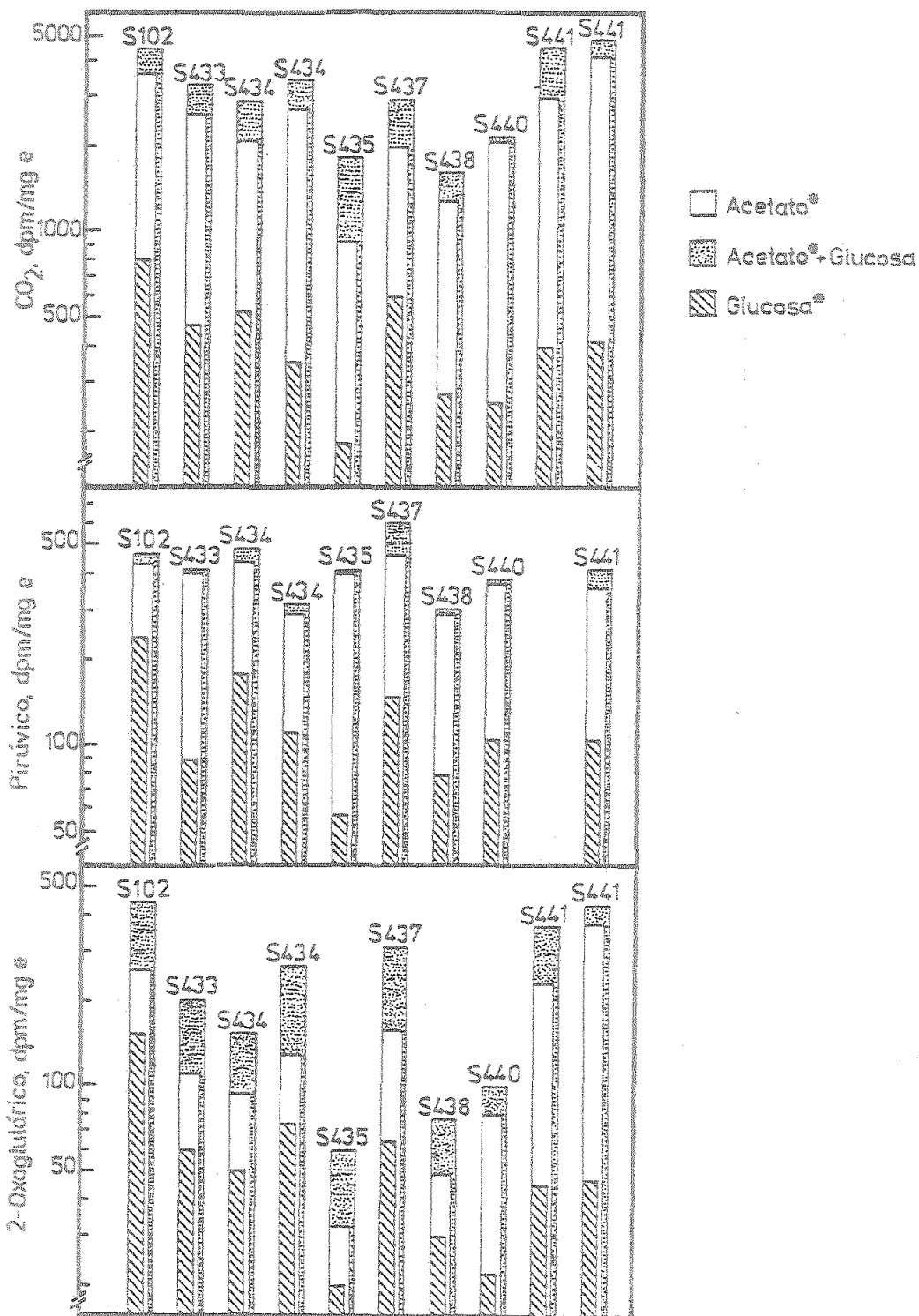


Figura 26. Actividad metabólica durante la primera hora de la germinación de esporas del tipo silvestre y de varios mutantes de la activación.

## El AMPc al principio de la germinación.

El aumento transitorio en la concentración de AMPc que se observa en esporas silvestres al principio de la germinación puede ser la clave de todo el proceso (ver Introducción, página 23). En algunos mutantes de la activación (S434, S440 y S441) no se observa el incremento transitorio de la concentración de AMPc y en otros (S436, S437, S438 y S439) el incremento es muy pequeño. Dos de los mutantes (S433 y S435) dan una respuesta casi normal (Fig. 27).

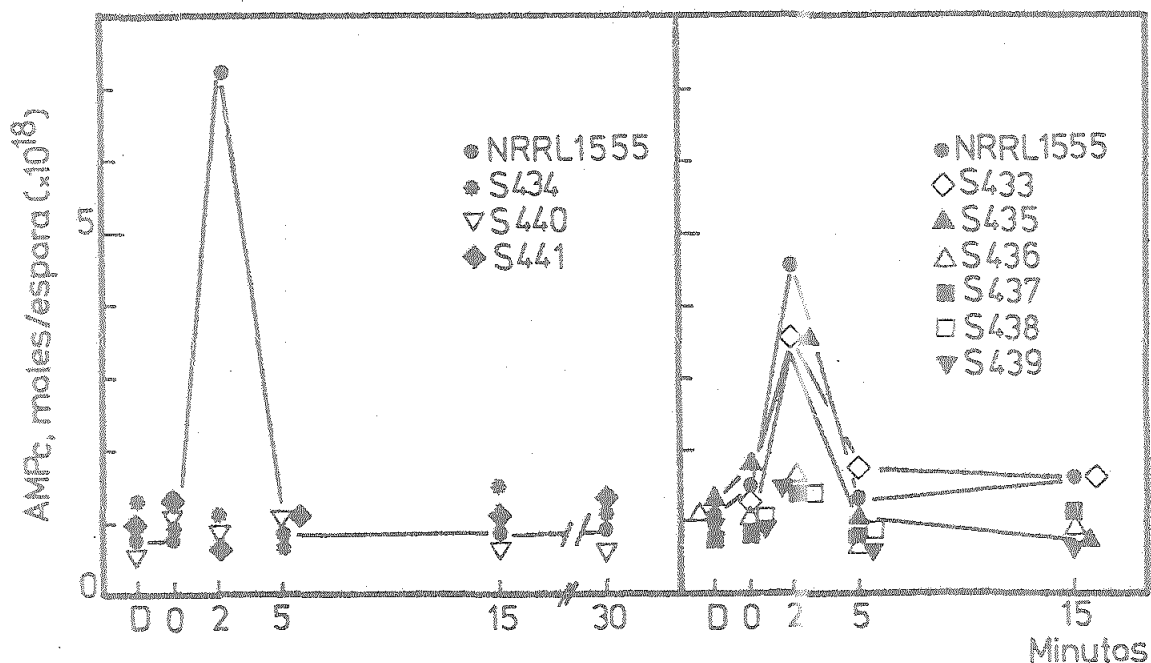


Fig. 27. Efecto de la activación térmica (50°C, 3 minutos) sobre el contenido en adenilato cíclico en esporas silvestres (NRRL1555) y de los mutantes de la activación. En abscisas, el tiempo de incubación a 25°C en medio líquido con glucosa a continuación del choque térmico; D, antes del choque térmico. Los dos recuadros incluyen sendas tandas de experimentos, cada uno con el testigo silvestre.

## La trehalasa en los mutantes de la activación.

Como la trehalasa se activa por un sistema de fosforilización dependiente de AMPc al principio de la germinación (ver Introducción, página 21), el nivel de esta enzima es un indicador de la marcha del proceso.

Se incubaron las esporas en un medio sin glucosa pero con acetato y se midió la glucosa liberada al medio (procedente presumiblemente de la rotura de la trehalosa por la trehalasa) y la actividad trehalasa en extractos libres de células. Como ya se había comprobado en otras estirpes silvestres, en NRRL1555 se observa una fuerte activación de la trehalasa acompañada de excreción de glucosa al medio. Las respuestas de los cinco mutantes investigados se pueden reunir en dos grupos: algunos no alcanzan el nivel de actividad del silvestre, mientras que otros lo alcanzan, pero son incapaces de mantenerlo. Los mutantes de baja actividad trehalasa excretan muy poca glucosa, mientras que los que alcanzan el nivel del silvestre excretan inicialmente tanta como éste, si bien con tendencia a disminuir en paralelo con la disminución de la actividad (Fig. 28).

Más tarde, a las setenta y dos horas de crecimiento en medio líquido con acetato y sin glucosa, los micelios silvestres y los de la estirpe S440 no difieren en cuanto a trehalasa. Los extractos de la estirpe NRRL1555 produjeron  $20.7 \pm 0.15$  nmoles de glucosa por minuto y por mg de proteína (media y desviación típica de tres experimentos). Otra estirpe silvestre, S102 dio  $16.8 \pm 0.9$ , mientras que el mutante S440 dio  $19.4 \pm 4.7$ .



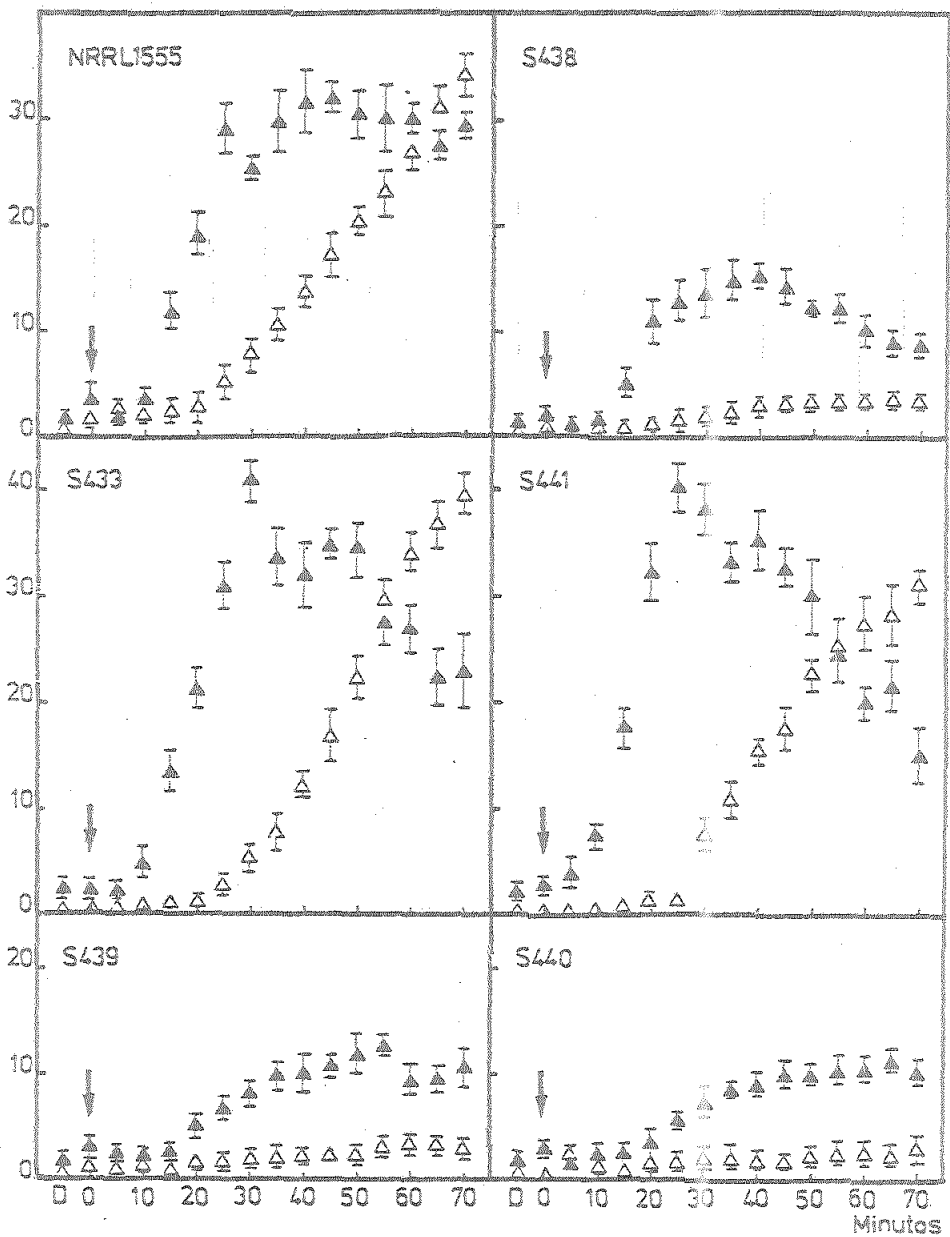


Figura 28. Glucosa excretada al medio ( $\Delta$ , nmoles por mg de esporas) y actividad trehalasa ( $\blacktriangle$ , nmoles de glucosa por minuto y por mg de proteína) en extractos de esporas del tipo silvestre y de cinco mutantes de la activación. La abscisa indica el tiempo de incubación en medio líquido con acetato como fuente de carbono. D, esporas antes de la inoculación. Se dan la media y desviación típica de tres experimentos independientes.

## D I S C U S I O N

## I. UNA HIPOTESIS GENERAL SOBRE LA REGULACION DE LA GERMINACION

Sirva de hilo conductor de esta Discusión la hipótesis presentada en la Fig. 29. Esta propuesta se inspira en el pensamiento actual sobre el papel regulador del adenilato cíclico, por ejemplo en la regulación del nivel de fructosa-2,6-bisfosfato en Saccharomyces por la glucosa (François et al., 1984). Queremos poner especial énfasis en que se trata de una hipótesis de trabajo y no de una conclusión definitiva.

El centro del mecanismo regulador es el nivel intracelular de adenilato cíclico. La ciclasa del adenilato podría ser activada por distintos mecanismos, como despolarización de la membrana, interacción con productos químicos o choque térmico. El resultado sería un aumento del nivel de AMPc. El AMPc activaría una o varias cinasas de proteínas uniéndose a la correspondiente proteína reguladora R e inactivándola. La fosforilación activaría una serie de enzimas, entre ellas, la trehalasa, la fosfofructocinasa 2 y la fosfatasa del glicerol-3-fosfato. El aumento de la concentración de fructosa-2,6- bisfosfato activa a la fosfofructocinasa 1, llave de paso de la glucólisis. Otras actividades reguladas directa o indirectamente por el nivel de AMPc serían el metabolismo mitocondrial del piruvato, la utilización de la glutamina y la acumulación de glucógeno.

## Indicios experimentales previos que apoyan esta hipótesis

La activación de las esporas, sea por choque térmico o por exposición a acetato dan lugar a un incremento transitorio de la concentración de AMPc (Van Mulders y Van Laere, 1984). En Mucor racemosus, un pariente próximo de Phycomyces, la adición de AMPc induce la germinación de las esporas (Wertman y Panozkas, 1981).

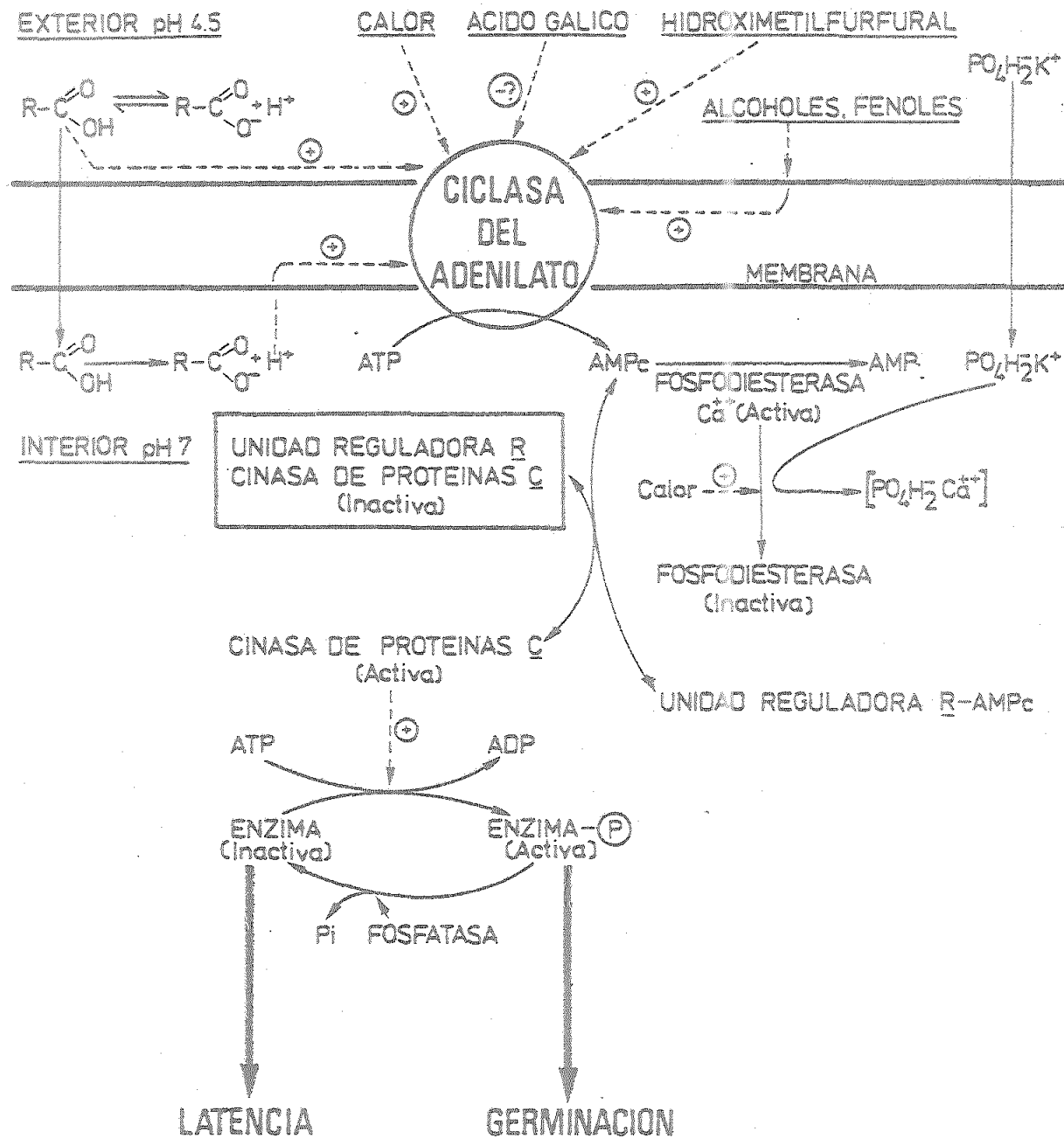


Figura 29. Hipótesis propuesta sobre los mecanismos de activación y puesta en marcha de la germinación de las esporas de *Phycomyces*. La figura integra datos de esta Tesis y datos bibliográficos.

Una fosforilación dependiente de AMPc activa la trehalasa (Van Laere y Hendrix, 1983) y a la fosfatasa del glicerol-3-fosfato (Van Schaftingen y Van Laere, 1985). La adición de AMPc al medio de cultivo hace disminuir el contenido de glucógeno en el micelio (Tu y Malhotra, 1977a).

## II. GERMINACION DE ESPORAS SILVESTRES

Nuestra ignorancia de la ecología de Phycomyces y de los demás cigomicetos dificulta la interpretación de muchos aspectos de la germinación, tanto los descubiertos en esta Tesis como los conocidos antes. Lo único claro es que Phycomyces es un saprofito cuyas esporas se han encontrado con frecuencia en materiales oleosos y en heces de animales.

Llama la atención que la bajísima tasa de germinación observada en medio esterilizado por filtración se mantenga constante durante al menos dos semanas. Es como si la germinación dependiera de una sencilla transición estructural dependiente de la temperatura. En nuestra hipótesis se trataría de un cambio de conformación de la ciclasa del adenilato. La baja tasa de germinación correspondería a una baja frecuencia de cambio de conformación a 22°C.

No es probable que los complejos medios naturales tengan los mismos efectos que el medio filtrado. Estas experiencias de laboratorio pueden ser irrelevantes para la historia natural del organismo.

La germinación masiva por choque térmico también puede ser un mero artefacto de laboratorio, porque no es fácil encontrar en la naturaleza temperaturas de 48°C durante unos minutos, con el riesgo de que con sólo pasarse en unos pocos grados mueran las esporas. Los medios en que se han encontrado esporas de Phycomyces probablemente no alcanzan las concentraciones de acetato o propionato necesarias para

una germinación masiva. En la naturaleza es probable, por tanto, que Phycomyces utilice la estrategia de dejar germinar algunas esporas y mantener latentes a las demás.

#### Efecto de la densidad de siembra

La alta densidad de siembra inhibe la germinación de las esporas de Phycomyces, aunque hayan sido activadas por choque térmico o por incubación en acetato 10 mM. La literatura posee muchos ejemplos de inhibición de la germinación por alta densidad de inóculo (revisión por Sheridan et al., 1981). En algunos casos, la inhibición se debe a que las esporas excretan un inhibidor químico. No tenemos indicios de un inhibidor químico en Phycomyces, ni siquiera en el esporangio, que contiene unas  $1.9 \times 10^8$  esporas por ml. En el caso de Phycomyces, los medios de cultivo muy concentrados compensan la alta densidad de siembra. Un resultado análogo se encontró con Geotrichum (Park y Robinson, 1970).

El componente del medio que limita la germinación de las esporas de Phycomyces es el fosfato monopotásico ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ). Puede resultar extraño que  $5 \text{ g l}^{-1}$  (36.7 mM) de esta sal sean limitantes, pero bastaría que un picomol de fosfato monopotásico entrase en una espora para equilibrar la concentración externa, es decir, un millón de esporas por mililitro consumiría un micromol de los 36.7 micromoles de fosfato presentes en ese mililitro. El fosfato secuestraría el calcio presente en la espora y le impediría actuar como cofactor de algunas enzimas, por ejemplo la fosfodiesterasa (Sharma y Wang, 1979). Tendremos ocasión de volver sobre el papel de la fosfodiesterasa en la germinación. Los experimentos realizados no excluyen totalmente una limitación por un oligoelemento presente como contaminante en nuestras sales. Tampoco puede excluirse totalmente la existencia de un inhibidor unido a la espora y lavable

por el fosfato. Llama la atención, sin embargo, la doble exigencia de fosfato ( $\text{PO}_4\text{H}_2^-$ ) y de potasio ( $\text{K}^+$ ) para la germinación masiva. Esto sugiere un sistema de cotransporte, tal vez relacionado con el potencial electroquímico de la membrana.

### Inhibición por ácido gálico

La preincubación de las esporas en concentraciones relativamente bajas de ácido gálico disminuye su germinación tras el choque térmico. Phycomyces es uno de los pocos hongos en que se ha descrito una importante excreción de ácido gálico. En los cultivos de Phycomyces el ácido gálico se acumula linealmente con el tiempo, aun varios días después del cese del crecimiento (H.I. Yazán, comunicación personal). La inhibición de la germinación por el ácido gálico tendría una función ecológica: impediría a las esporas germinar en ambientes donde ya estuviera presente el micelio de la misma especie y las reservaría para otra ocasión.

Al mismo tiempo, el ácido gálico podría inhibir la germinación de las esporas de otros hongos o su crecimiento (Fawcett y Spencer, 1969). El ácido gálico tendría la segunda función ecológica de dificultar el crecimiento de otros hongos competidores de Phycomyces.

### Activación por 5-hidroximetilfurfural

Los resultados con este compuesto añaden un nuevo activador a la breve lista de los conocidos y explican a nivel molecular la activación por medios autoclavados, estudiada por Brinckmann (1960). El 5-hidroximetilfurfural activa parte de las esporas cuando se aplica a ciertas concentraciones (10 y 50  $\mu\text{M}$ ); a concentraciones mayores no activa, pero tampoco es tóxico. Un efecto similar tiene el

furfural en las esporas de Peronosclerospora (French y Smith, 1980). Sin embargo el furfural, que es también un buen activador de las esporas de Neurospora (Emerson, 1948), no indujo la germinación de Phycomyces en nuestros experimentos. La activación de las esporas de Neurospora por el furfural puede deberse a la solubilización de alguna proteína externa de la membrana (Eilers y Sussman, 1970).

### III. MUTANTES DE LA GERMINACION

#### Mutantes germinadores espontáneos

Las estirpes mutantes denominadas germinadoras espontáneas han roto la barrera de la densidad de siembra. Los aproximadamente  $2.5 \text{ mg ml}^{-1}$  de fosfato permiten germinar las  $1.9 \times 10^8$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  que hay los esporangios inmaduros. Podemos suponer que estos mutantes están afectados en un paso posterior a aquél en el que es crítica la concentración de fosfato monopotásico.

Los niveles de AMPc y fructosa-2,6-bisfosfato (Tabla 11) y de fosfato (Tabla 12) en los esporangios inmaduros y el de ácido gálico (Tabla 13) en esporangióforos son similares en las estirpes germinadoras espontáneas y en la silvestre. La actividad de dos enzimas del metabolismo fermentativo (Tabla 9) y el contenido de glucógeno (Tabla 10) son menores en los micelios mutantes que en los silvestres.

Los mutantes germinadores espontáneos, excepto S347, pueden tener inactiva o carecer de la proteína R, reguladora de una o varias cinasas de proteínas. Tales mutaciones serían recesivas, como ocurre en los tres casos que hemos estudiado genéticamente. La inactividad de R haría constitutiva a la fosforilación e induciría todos los mecanismos dependientes de ella, aún cuando los niveles de AMPc fueran normales. Las esporas de estas estirpes se formarían

normalmente, pero la actividad de la cinasa de proteínas supliría a la señal de germinación y haría que germinaran en el propio esporangio. La estirpe S347 no entra en este modelo, puesto que no forma esporas típicas.

Los mutantes germinadores espontáneos presentarían alteraciones sistemáticas en todos los procesos regulados por la proteína mutada. Entre ellos estarían el contenido de glucógeno y la actividad de las deshidrogenasas del alcohol y el aldehído. La actividad trehalasa y la concentración de fructosa-2,6-bisfosfato dependen también de cinasas de proteínas, pero no hemos detectado alteración en los mutantes. Puede ser que no hayamos conseguido detectar las variaciones existentes, o que dependan de cinasas de proteínas no gobernadas por la proteína R afectada en los mutantes, o que haya varias isoenzimas con regulación distinta. Algunos de nuestros datos sugieren que Phycomyces tiene trehalasas distintas en las esporas y el micelio.

#### Mutantes no activables

Los mutantes no activables no difieren significativa ni específicamente del tipo silvestre en su metabolismo del acetato. Refuerzan de esta manera la independencia de la activación y el metabolismo del acetato, ya propuesta por trabajos anteriores.

Todos los mutantes no activables difieren del tipo silvestre en el escaso o nulo incremento transitorio de la concentración de AMPc con que responden al tratamiento con agentes activadores de la germinación (Figura 27). Estos mutantes deben estar afectados por consiguiente en la ciclasa del adenilato o en proteínas anejas encargadas de detectar los estímulos externos y regular a la ciclasa. Todos los mutantes, independientemente del criterio seguido en su aislamiento, son poco activables por calor, acetato y



propionato. Las mutaciones deben afectar a elementos implicados en la respuesta a los tres agentes. Es improbable que Phycomyces tenga productos génicos especializados para detectar separadamente a los tres agentes y comunicar su presencia al lugar apropiado (la ciclasa del adenilato); su existencia debería haberse reflejado en mutantes no activables solamente por cada uno de estos agentes.

Para iguales concentraciones molares, el propionato activa más que el acetato a la estirpe silvestre y a varios mutantes, que podemos llamar grupo A (S434, S438 y S440). Otras estirpes mutantes, el grupo B (S435, S436, S439), son más sensibles al acetato que al propionato. Así aparece claramente demostrado en la Figura 30, que reinterpreta los resultados de la Figura 23 y añade otros nuevos.

Una hipótesis sencilla supone que la ciclasa está regulada por una proteína receptora de acetato y propionato. Las mutaciones del grupo B habrían afectado al lugar de reconocimiento de ácidos orgánicos en la proteína receptora, alterando desigualmente su afinidad por ellos. Las pérdidas de actividad de la proteína receptora que no afectaran a su capacidad de discriminar entre los ácidos, así como las alteraciones de la ciclasa del adenilato, darían lugar a mutantes del grupo A.

Las estirpes no activables estudiadas también difieren del tipo silvestre en la actividad trehalasa al comienzo de la germinación (Figura 28). Podemos hacer dos grupos: (1) Las estirpes que no alcanzan los niveles de trehalasa del silvestre. (2) Las estirpes que alcanzan niveles de trehalasa similares al del silvestre, pero son incapaces de mantenerlos. La incapacidad de activar la trehalasa o de mantenerla activa puede deberse a no poseer unos niveles de AMPc suficientemente altos. Se establece así una correlación entre escaso aumento transitorio de AMPc, escasa actividad trehalasa y no germinación.

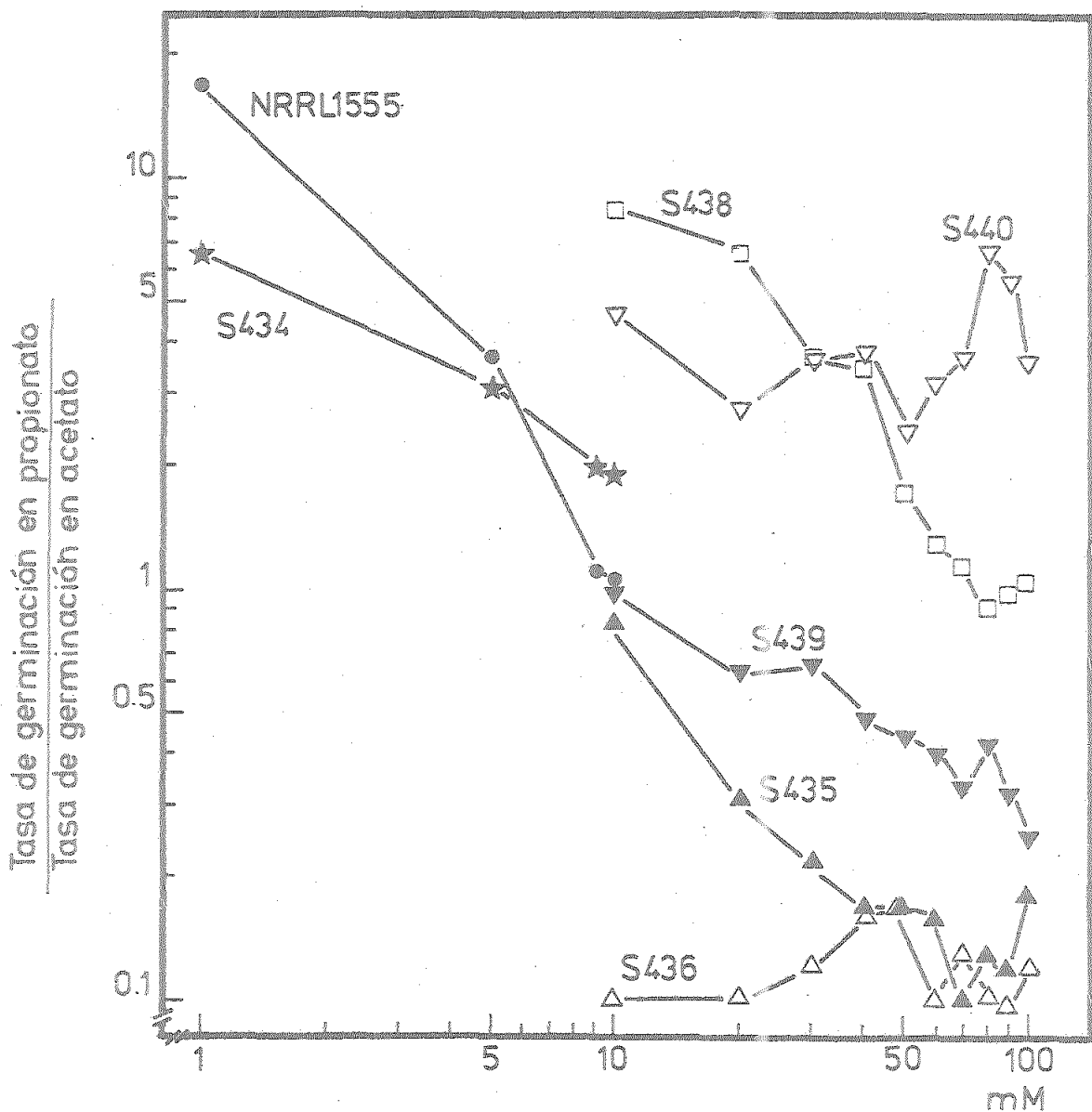


Figura 30. Relación entre la tasa de germinación inducida por propionato y la inducida por acetato en esporas de la estirpe silvestre y de varios mutantes no activables. El valor 1 en ordenadas corresponde a igual sensibilidad a ambos ácidos orgánicos.

La excreción de glucosa al medio correlaciona con la actividad trehalasa: los mutantes del grupo (1) apenas excretan glucosa y los del grupo (2) excretan glucosa inicialmente, pero dejan de hacerlo cuando se les inactiva la trehalasa.

La actividad trehalasa de los mutantes, relativa a la del silvestre, es mayor que la proporción de esporas mutantes que llegan a germinar; por tanto el acetato consigue activar la trehalasa incluso en esporas mutantes que no llegan a germinar. La trehalasa y la germinación dependen de niveles distintos de AMPc.

La estirpe S440 tiene menos trehalasa que la silvestre durante la germinación, pero la misma durante el crecimiento micelial. Esto sugiere la existencia de isoenzimas distintas en esas dos etapas o al menos de mecanismos de regulación distintos.

#### IV. CONSIDERACIONES FINALES

La hipótesis representada en la Fig. 29 puede servir de guía para caracterizar los mutantes de la germinación, sean del tipo germinador espontáneo o del no activable.

#### Mutaciones de la ciclasa del adenilato.

Los mutantes de la ciclasa del adenilato que tuvieran una actividad enzimática desusadamente alta serían germinadores espontáneos, aunque no es seguro que este tipo de mutaciones fuera viable.

La escasa actividad enzimática produciría el fenotipo no activable; podrían estar afectados en la recepción de la señal externa o en la producción del AMPc. Los mutantes S434, S436, S437, S438, S439, S440 y S441, podrían ser de este tipo, ya que producen poco o nada de AMPc inmediata-

mente después de la activación. Se está caracterizando con particular detalle S440 (resultados no incluidos en esta Tesis, Van Laere y Rivero, en preparación).

#### Mutaciones de la fosfodiesterasa.

Los mutantes pde de Phycomyces, cuyos micelios tienen menos fosfodiesterasa del AMPc que los silvestres, poseen una actividad fosfodiesterasa normal en las esporas. Los mutantes sin fosfodiesterasa en la espora serían germinadores espontáneos, y se caracterizarían por un alto nivel de AMPc ya en el esporangio. También podría generar germinadores espontáneos la mutación en la calmodulina, que podría afectar indirectamente a la fosfodiesterasa alterando la regulación de ésta por calcio. Quizás podría investigarse en esta dirección la estirpe S347.

Los mutantes con excesiva actividad fosfodiesterasa en el esporangio y en la espora tendrían presumiblemente fenotipo no activable.

#### Mutaciones en la cinasa de proteínas dependiente de AMPc.

La desregulación de la cinasa de proteínas podría producir el fenotipo germinador espontáneo, ya sea por carencia de la subunidad reguladora o por pérdida de la interacción entre ésta y la cinasa. Los germinadores espontáneos estudiados, excepto S347, pueden incluirse en este grupo, ya que su contenido en adenilato cíclico es normal, en cuanto ha podido averiguarse.

El fenotipo no activable podría deberse a una subunidad reguladora con poca o ninguna afinidad por el AMPc o a una escasa actividad de la cinasa de proteínas. En este grupo podrían estar las estirpes S433 y S435, no activables con respuesta AMPc casi normal.

## Mutaciones en la membrana.

El empaquetamiento o la fluidez de la membrana provocará sin duda cambios en las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas unidas a ellas. Estos cambios pueden reflejarse en variaciones de las propiedades físicas o químicas de dichas proteínas. Las modificaciones en la membrana pueden afectar, por tanto, a la ciclasa del adenilato o su regulación.

Para finalizar habría que decir que se han aislado recientemente un gran número de mutantes de Phycomyces con germinación termosensible en la Universidad de Murcia (Micol, 1985). Su estudio podría servir para comprobar o refutar algunas de las hipótesis aquí expuestas.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

En esta Tesis se ha estudiado el mecanismo de la latencia y la activación de las esporas de Phycomyces blakesleeanus Burgeff mediante el aislamiento y caracterización de estirpes mutantes. Previamente se estudió parcialmente la fisiología de la germinación con objeto de normalizar las condiciones para la búsqueda de los mutantes. De ambas líneas de trabajo se concluye:

1. El 5-hidroximetilfurfural, que aparece al autoclavar la glucosa, induce la germinación de las esporas.

2. La germinación es un fenómeno probabilístico. Aún en las condiciones de mínima germinación, las esporas latentes tienen una probabilidad de germinar baja pero constante en el tiempo.

3. La alta densidad de siembra inhibe la germinación. Un exceso de fosfato monopotásico ( $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ) en el medio de cultivo revierte este efecto.

4. La preincubación de las esporas con ácido gálico disminuye su capacidad de ser activadas. El ácido gálico excretado por Phycomyces puede ser un inhibidor natural de la germinación de las esporas en medios ya colonizados por micelios de este organismo.

5. Se han aislado diez estirpes mutantes germinadoras espontáneas. Una de ellas, S347, forma directamente germínulas en el esporangio. Las otras nueve estirpes forman esporas normalmente pero éstas germinan y completan un ciclo de vida normal sobre el propio esporangio.

6. Varios mutantes germinadores espontáneos presentan actividades de la deshidrogenasa del alcohol y de la del aldehído menores que el tipo silvestre. También contienen menos glucogéno que la estirpe silvestre.

7. Se han aislado nueve estirpes mutantes cuyas esporas responden menos que las silvestres a la activación por acetato, propionato o por choque térmico. Por tanto, los tres tratamientos activadores tienen un mecanismo de acción común sobre la espora latente.

8. Estos mutantes no activables metabolizan el acetato de manera practicamente normal. La activación por acetato y propionato no depende del metabolismo de estos compuestos, sino de una interacción específica con alguna estructura celular.

9. Varios de estos mutantes no presentan el aumento transitorio en el contenido de AMPc que ocurre después de la activación en el tipo silvestre.

10. Los mutantes no activables estudiados presentan al principio de la germinación una actividad trehalasa distinta del tipo silvestre.

11. Se propone que la activación de la espora depende de la acumulación transitoria de AMPc y que la ciclasa del adenilato es el blanco de los distintos mecanismos activadores.

## B I B L I O G R A F I A

- Arnold, W. V. (1972) *J. Biol. Chem.* 247: 1161-1169.
- Bal, J., E. Balbin y N. J. Pieniazek (1974) *J. Gen. Microbiol.* 84: 111-116.
- Bergman, K., P. V. Burke, E. Cerdá-Olmedo, C. N. David, M. Delbrück, K. W. Foster, E. W. Goodell, M. Heisenberg, G. Meissner, M. Zalokar, D. S. Dennison y W. Shropshire Jr. (1969) *Bacteriological Review* 33: 99-157.
- Borchert, R. (1962) *Beitr. Biol. Pflanz.* 38: 31-61.
- Brinckmann, M. (1960) *Arch. Mikrobiol.* 37: 161-187.
- Carnoy, J. B. (1870) *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 9: 157-321.
- Cotter, D. A. (1973) *J. Theor. Biol.* 41: 41-51.
- Crofts, A. R., D. W. Deamer y L. Packer (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 131: 97-118.
- David, C. N. (1974) en *Microbial Iron metabolism*, J. B. Nielands Ed., p. 149-158, Academic Press, New York.
- Delvaux, E. (1973) *Arch. Mikrobiol.* 88: 273-284.
- Delvaux, E. (1974) Doctoral thesis, Faculty of Sciences, K. U. Leuven.
- Demerec, M., E.A. Adelberg, A.J. Clark y P.E. Hartman (1966) *Genetics* 54: 61-76.
- Dennison, D.S. (1959) *Nature* 184: 2036.
- Dewerchin, M. A. y A. J. Van Laere (1984) *J. Bacteriol.* 158(2): 575-579.
- De Smedt, H., H. Olbrechts y K. Heremans (1975) *Europhys. Conf. Abstr.* 1A, 98.
- Dowler, W. M., P. D. Shaw y D. Gotlieb (1963) *J. Bacteriol.* 86: 9-17.
- Eilers, F. I. y A. Sussman (1970) *Planta* 94: 265-272.
- Eliasz, A. W., D. Chapman y D. F. Ewing (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 448: 220-233.



- Emerson, M.R. (1948) J. Bact. 55: 327-330.
- Evans, L. K. y A. E. Gillam (1945) J. Chem. Soc. 565.
- Fawcett, C.H. y D.M. Spencer (1969) en Fungicides vol. II. D.C. Torgeson Ed., p. 637-669. Academic Press. New York.
- François, J., E. Van Schaftingen y H. G. Hers (1984) Eur. J. Biochem. 145: 187-193.
- French, R. C. y C. G. Smith (1980) Phytopathology 70: 877-880.
- Furch, B. (1969) Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82: 221-222.
- Furch, B. (1971) Arch. Mikrobiol. 80: 293-299.
- Furch, B. (1972) Protoplasma 75: 371-379.
- Furch, B. (1974) Arch. Mikrobiol. 98: 77-84.
- Furch, B. (1978) Z. Pflanzenphysiol. 88: 269-272.
- Furch, B. (1979) Habilitationsschrift vorgelegt dem Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereich der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Furch, B. (1981) en The fungal spore: morphogenetic controls. G. Turian and H. R. Hohl Eds., p. 413-433. Academic Press. New York.
- Furch, B. y L. Pambor (1978a) Microbios Letters 4: 211-219.
- Furch, B. y L. Pambor (1978b) Microbios Letters 8: 71-80.
- Furch, B., J. Poltz y H. Rudolph (1976) Biochem. Physiol. Pflanzen. 169: 249-256.
- Furch, B. y Ch. Steinberg (1977) Z. Pflanzenernähr. Bodenkd. 140: 531-541.
- Gamow, E. y D. M. Prescott (1972) Biochim. Biophys. Acta 259: 223-227.
- Gancedo, J. M., M. J. Mazón y P. Eraso (1985) TIBS 10(5): 210-212.
- Garcés, R. (1983). Genética de la deshidrogenasa del alcohol de Phycomyces. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.

Grove, S. N. (1976) en *The fungal spore*: D. J. Weber y W. M. Hess Eds., p. 559-592. J. Wiley and Sons, New York.

Gutiérrez-Corona, F. y E. Cerdá-Olmedo (1980) *PHYCOMYCES* 4: 33-35.

Halbsguth, W. y H. Rudolph (1959) *Arch. Mikrobiol.* 32: 296-308.

Haslam, E., R. D. Haworth y P. F. Knowles (1961) *J. Chem. Soc.* 361.

Heisenberg, M. y E. Cerdá-Olmedo (1968) *Molec. Gen. Genet.* 102: 187-195.

Hers, H.G. y E. Van Schaftingen (1982) *Biochem. J.* 206: 1-14.

Johannes, H. (1950) *Arch. Mikrobiol.* 15: 13-41.

Jones, B. E. y J. D. Bu'lock (1977) *J. Gen. Microbiol.* 103: 29-36.

Keyhani, J., E. Keyhani y S. H. Goodgal (1972) *Eur. J. Biochem.* 27: 527-534.

Kirillov, V. A., E. I. Zaichkin y S. V. Konev (1979) *Cytologia* 21: 520-523.

Lowry, O. H., N. S. Rosebrugh, A. L. Farr y R. J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Malhotra, S. K. y J. P. Tewari (1973) *Proc. R. Soc. Lond. B.* 184: 207-216.

Malhotra, S. K., J. C. Tu y J. P. Tewari (1975) en *Regulation of growth y differentiated functions in eukariotic cells*. Editor G. P. Talwar. p. 57-68. Raven Press, New York.

Marouf, B. A. y S. K. Malhotra (1976) *Microbios Letters* 1: 117-123.

Micol, J. L. (1985) *Aislamiento y caracterización de mutantes de Phycomyces blakesleeenans termosensibles para la germinación*. Tesis doctoral, Universidad de Murcia.

Murphy y Rilley (1963) en *Análisis de las aguas*. J. Rodier. Ed. OMEGA. 1981.

- Pall, M. L. (1977) J. Biol. Chem. 252: 7146-7150.
- Pambor, L. (1978) Arch. Microbiol. 117: 35-40.
- Pambor, L. (1979) Microbios Letters 8: 143-153.
- Park, D. y P. M. Robinson (1970) Trans. Brit. Mycol. Soc. 54: 83-92.
- Polaina, J. y J. Conde (1981) Mut. Res 91: 111-114.
- Reau, P. (1972) Planta 108: 153-160.
- Robbins, W. J., V. W. Kavanagh y F. Kavanagh (1942) Bot. Gaz. 104: 224-242.
- Robinow, C. F. (1957) Can. J. Microbiol. 3: 791-798.
- Roncero, M. I. G., C. Zabala y E. Cerdá-Olmedo (1984) Mut. Res. 125: 195-204.
- Rudolph, H. (1958) Biol. Zbl. 77: 385-437.
- Rudolph, H. (1960a) Planta 54: 505-529.
- Rudolph, H. (1960b) Planta 55: 424-437.
- Rudolph, H. (1961a) Naturwissenschaften 13: 482-483.
- Rudolph, H. (1961b) Naturforschung 16b: 611-614.
- Rudolph, H. (1961c) Planta 57: 284-312.
- Rudolph, H. (1972) Z. Pflanzenphysiol. 67: 212-222.
- Rudolph, H. y B. Furch (1970) Arch. Mikrobiol. 72: 175-181.
- Rudolph, H., Ch. Krüger y J. Siebelds (1966) Z. Pflanzenphysiol. 55: 415-428.
- Rudolph, H. y B. Ochsen (1969) Arch. Mikrobiol. 65: 163-171.
- Sánchez Monteseirín, H. (1984) Acumulación de glucógeno y actividad glucógeno sintasa en Phycomyces blakesleeanus. Tesina de licenciatura. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.
- Sandman, G. y W. Hilgenberg (1974) Z. Naturforsch. 34c: 747-750.

Sharma, R.K. y J.H. Wang (1979) Adv. Cyclic. Nucl. Res. 10: 187-198.

Sheridan, J. J., D. McGrath y J. Sherington (1981) J. Life Sci. R. Dubl. Soc. 2: 161-170.

Simon, E. W. (1978) en Dry biological systems. J. H. Crowe and J. S. Clegg Eds., p. 205-224. Academic Press, New York, London.

Solomos, T. (1977) Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 279-297.

Sommer, L. y W. Halbsguth (1957) Forschungsberichte des Wirtschafts- und Verkehrsministeriums Nordrhein-Westfalen. 411.

Sussman, A. S. (1969) en The bacterial spore. G. W. Gould and A. Hurst Eds. p. 1-38. Academic Press, London-New York.

Sussman, A. S. (1976) en The fungal spore. D. J. Weber and W. M. Hess Eds. p. 101-139. J. Wiley and Sons, New York.

Sutter, R. P. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. 72: 127-130.

Suzuki, K., Y. Taniguchi y T. Enomoto (1972) Bull. Chem. Soc. Japan 45: 336-338.

Thevelein, J. M. (1981) Doctoral thesis, Faculty of Sciences, K. U. Leuven.

Thevelein, J. M. (1984) Microbiological Review 48: 42-59.

Thevelein, J. M. y J. A. Van Assche (1978) PHYCOMYCES 2: 6-8.

Thevelein, J. M., J. A. Van Assche y A. R. Carlier (1983) J. Gen. Microbiol. 129: 727-733.

Thevelein, J. M., J. A. Van Assche, A. R. Carlier y K. Heremans (1979) J. Bacteriol. 139: 478-485.

Thevelein, J. M., J. A. Van Assche y K. Heremans (1980) Eur. J. Biochem. 111: 171-175.

Thevelein, J. M., J. A. Van Assche, K. Heremans, S. Y. Gerlsma y A. R. Carlier (1981) Antonie Van Leeuwenhoek 47: 393-404.

Thevelein, J. M., A. J. Van Laere, M. Beullens. J. A. Van Assche y A. R. Carlier (1983) J. Gen. Microbiol. 129: 719-726.

Trevillyan, J. M. y M. L. Pall (1979) J. Bacteriol. 138: 397-403.

Tripp, M. L. y J. Paznokas (1982) J. Gen. Microbiol. 128: 477-483.

Tu, J. C. y S. K. Malhotra (1976) Microbios 15: 15-25.

Tu, J. C. y S. K. Malhotra (1977a) Can. J. Microbiol. 23: 378-388.

Tu, J. C. y S. K. Malhotra (1977b) Cytobios 20: 121-132.

Ullman, A. y A. Danchin (1983) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 15: 1-53.

Uno, I. y T. Ishikawa (1981) Biochim. Biophys. Acta 672: 108-113.

Uno, I., K. Matsumoto, K. Adachi y T. Ishikawa (1984) J. Biol. Chem. 258(18): 10867-10872.

Vale, V. L., S. L. Gomes, J. C. C. Maia y L. Mennucci (1976) FEBS Letters 67: 189-192.

Van Assche, J. A. y A. R. Carlier (1973) Arch. Mikrobiol. 93: 129-136.

Van Assche, J. A. y A. R. Carlier (1975) Biochim. Biophys. Acta 391: 154-161.

Van Assche, J. A., A. R. Carlier y H. I. Dekeersmaeker (1972) Planta 103: 327-333.

Van Assche, J. A., A. R. Carlier y L. L. C. Van Tieghem (1977) Arch. Microbiol. 113: 95-97.

Van Assche, J. A. y H. I. Dekeersmaeker (1973) Arch. Int. Physiol. Biochim. 81: 389.

Van Assche, J. A., A. J. Van Laere y A. R. Carlier (1978) Planta 139: 171-176.

Van Cauwelaert, F. H. y M. N. Verbeke (1979) Biochem. Biophys. Res. Com. 89: 414-419.

Van der Plaats, J. B. y P. Van Solingen (1974) Biochem. Biophys. Res. Com. 56: 580-586.

Van Laere, A. J. (1983) J. Gen. Microbiol. 129: 3281-3285.

Van Laere, A. J. y A. R. Carlier (1975) Planta 125: 217-225.

Van Laere, A. J. y A. R. Carlier (1978) Arch. Microbiol. 116: 181-184.

Van Laere, A. J., A. R. Carlier y J. A. Van Assche (1976) Arch. Microbiol. 108: 113-116.

Van Laere, A. J., A. R. Carlier y J. A. Van Assche (1977) Arch. Microbiol. 112: 303-306.

Van Laere, A. J. y P. Hendrix (1983) J. Gen. Microbiol. 129: 3287-3290.

Van Laere, A. J. y J. A. Van Assche (1978) PHYCOMYCES 2: 4-5.

Van Laere, A. J., J. A. Van Assche y A. R. Carlier (1980a) Arch. Microbiol. 124: 289-291.

Van Laere, A. J., J. A. Van Assche y A. R. Carlier (1980b) Exp. Mycol. 4: 96-104.

Van Laere, A. J., J. A. Van Assche y A. R. Carlier (1980c) Exp. Mycol. 4: 260-268.

Van Laere, A. J. y R. R. Van Den Bosch (1981) Arch. Int. Physiol. Biochim. 89: B81-82.

Van Laere, A. J., R. R. Van Den Bosch y A. R. Carlier (1982) J. Gen. Microbiol. 128: 1537-1545.

Van Laere, A. J., E. Van Schaftingen y H. G. Hers (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6601-6605.

Van Mulders, R. M. y A. J. Van Laere (1984) J. Gen. Microbiol. 130: 541-547.

Van Schaftingen, E., B. Lederer, R. Bartrons y H. G. Hers (1982) Eur. J. Biochem. 129: 191-195.

Van Schaftingen, E. y Van Laere, A.J. (1985) Eur. J. Biochem. 148: 399-404.

Verbeke, M. N., F. H. Van Cauwelaert y R. Jadot (1981) Biochem. Biophys. Res. Com. 98: 915-921.

Verbeke, M. N. y A. J. Van Laere (1982) Exp. Mycol. 6:

Verbeke, M. N. Y A. J. Van Laere (1984) Exp. Mycol. 8: 73-79.

Villar-Palasi, C., J. Larner y L.C. Shen (1971) Ann. N. Y. Acad. Sci. 185: 74-84.

Wertman, K. F. y J. L. Panozkas (1981) Exp. Mycol. 5: 314-322.

Wolfson, M. L., R. D. Schnetz y L. F. Cavalieri (1948) J. Am. Chem. Soc. 70: 514-517.

Wood-Baker, A. (1955) Trans. Brit. Mycol. Soc. 38: 291-297.

## I N D I C E

INTRODUCCION.....	4
I. LA ESPORA LATENTE.....	7
II. ACTIVACION DE LA ESPORA.....	10
III. GERMINACION.....	16
IV. RESUMEN DE HIPOTESIS.....	24
MATERIALES Y METODOS	
Estirpes.....	28
Cultivos.....	30
Germinación.....	30
Tratamiento mutagénico.....	31
Análisis químicos.....	31
Actividades enzimáticas.....	32
Metabolismo de la glucosa y el acetato.....	33
Aislamiento de mutantes germinadores	
espontáneos.....	34
Aislamiento de mutantes no activables.....	34
RESULTADOS	
I. GERMINACION DE ESPORAS SILVESTRES	
Activación por 5-hidroximetilfurfural.....	36
Germinación de las esporas a 22°C.....	37
Germinación en el esporangio.....	41
Inhibición por ácido gálico.....	42
Inhibición por alta densidad de siembra.....	48
II. MUTANTES GERMINADORES ESPONTANEOS	
Aislamiento.....	52
Morfología de esporas y germínulas.....	55
Viabilidad.....	58
Estudios bioquímicos y fisiológicos.....	65
Análisis genético.....	73
III. MUTANTES NO ACTIVABLES	
Aislamiento.....	74
Activación de los mutantes por acetato	
propionato y choque térmico.....	77
Utilización del acetato.....	80
El AMPc al principio de la germinación.....	85
La trehalasa en los mutantes de la activación.....	86



## DISCUSION

I. UNA HIPOTESIS GENERAL SOBRE LA REGULACION DE LA GERMINACION.....	86
II. GERMINACION DE ESPORAS SILVESTRES.....	88
Efecto de la densidad de siembra.....	89
Inhibición por ácido gálico.....	90
Activación por 5-hidroximetilfurfural.....	90
III. MUTANTES DE LA GERMINACION	
Mutantes germinadores espontaneos.....	91
Mutantes no activables.....	92
IV. CONSIDERACIONES FINALES	
Mutaciones de la ciclasa del adenilato.....	95
Mutaciones de la fosfodiesterasa.....	96
Mutaciones en la cinasa de proteínas dependiente de AMPc.....	96
Mutaciones en la membrana.....	97
RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	98
BIBLIOGRAFIA.....	100
INDICE.....	108
AGRADECIMIENTOS.....	110

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al profesor Enrique Cerdá Olmedo su inapreciable ayuda en mi "germinar" científico.

Agradecer a todos los compañeros y amigos del Departamento de Genética sus consejos, ideas, sugerencias, críticas y apoyo constante; así como la ayuda de todos aquellos amigos y conocidos extradepartamentales que me soportaron, y sobre los que muchas veces recaían las frustraciones del trabajo.

Un agradecimiento especial a Loli, por escribir y procesar la tesis.

Quiero dar las gracias muy especialmente a Asun, porque sin su ayuda en la realización de las gráficas y figuras de la tesis ésta sería mucho peor.

Un agradecimiento muy especial a Rafi y a Eduardo, por las fotos y por iniciarme en el maravilloso vicio de la fotografía científica.

Y un agradecimiento muy muy especial al Doctor André J. Van Laere y a los componentes del Laboratorium voor Plantenbiochemie de la KULeuven, que me soportaron durante tres meses y que hicieron que un español fuese conquistado por Flandes.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

Reunido el Tribunal integrado por los señores señores  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

Francisco Rivera Pallares

titulada " Permutación de las Isoporas de PH<sub>4</sub>-  
COMPLEX BLAKESLEEANUS "

se otorgaría la calificación de 1 PTO CUM LAUDE

Sevilla 20 de Marzo

El Vocal,

*[Signature]*  
El Presidente,

El Vocal,

*[Signature]*

El Secretario,

*[Signature]*

Fra: Chua

1.986

El Vocal,

*[Signature]*

El Presidente,

*[Signature]*



500273250

EXX 0 75 408

293210