



**BIOSÍNTESIS DE APOCAROTENOIDES EN
*PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS***

Tesis Doctoral

Humberto Ramírez Medina

Enero de 2013

**BIOSÍNTESIS DE APOCAROTENOIDES EN
*PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS***

Memoria presentada a la Universidad de Sevilla
por el M.C. Humberto Ramírez Medina
para aspirar al grado de Doctor.

El director de la Tesis

El doctorando

Prof. Dr. Enrique Cerdá Olmedo

M.C. Humberto Ramírez Medina

Sevilla, enero de 2013

Índice

Introducción

0.1 *Phycomyces blakesleeanus*

0.1.1 Taxonomía e historia	8
0.1.2 Ciclos de vida	9
0.1.3 Principales temas de investigación	11

0.2 Carotenoides

0.2.1 Características generales	13
0.2.2 Biosíntesis	14
0.2.2.1 Hongos	14
0.2.2.2 Otros organismos	17
0.2.2.3 Regulación de la carotenogénesis	17
0.2.3 Diversidad	18
0.2.4 Funciones y usos	20

0.3 Apocarotenoides

0.3.1 Conceptos generales	23
0.3.2 Señales químicas en Mucorales	23
0.3.2.1 Descubrimiento y efectos biológicos	23
0.3.2.2 Diversidad	24
0.3.2.3 Biosíntesis postulada	25
0.3.3 Pigmentos, aromas y moléculas reguladoras en plantas	27
0.3.4 Retinoides	29

0.4 Oxigenasas de carotenoides

0.4.1 Actividades	31
0.4.2 Estructura	31
0.4.3 Mecanismo de reacción	32

Parte I Oxigenasas de <i>Phycomyces</i> que cortan carotenoides	
1.1 Introducción	35
1.2 Resultados	
1.2.1 Presuntos genes para oxigenasas de carotenoides en el genoma de <i>Phycomyces</i>	37
1.2.2 Transcritos de varios genes	39
1.2.3 Actividades enzimáticas	41
1.2.3.1 Actividad <i>in vivo</i> de CarS y AcaA en <i>E. coli</i>	41
1.2.3.2 Actividades <i>in vitro</i>	44
1.2.3.2.1 Expresión heteróloga	44
1.2.3.2.2 Actividad de AcaA	44
1.2.4 Comparaciones de secuencias	47
1.2.4.1 Presuntos genes para oxigenasas de carotenoides en los Mucorales	47
1.2.4.2 Mutaciones en la secuencia de la proteína CarS	47
Parte II Carencia de apocarotenoides en mutantes <i>carS</i> de <i>Phycomyces</i>	
2.1 Introducción	51
2.2 Resultados	
2.2.1 Absorbancia atribuida a apocarotenoides	52
2.2.2 Extracción y fraccionamiento de apocarotenoides	53
2.2.3 Cuantificación e identificación de apocarotenoides	56
Parte III Apocarotenoides en el desarrollo sexual de <i>Phycomyces</i>	
3.1 Introducción	60
3.2 Resultados	
3.2.1 Absorbancia atribuida a apocarotenoides	61
3.2.2 Extracción y fraccionamiento de apocarotenoides	64
3.2.3 Cuantificación e identificación de apocarotenoides	71
3.2.4 Comparaciones analíticas de grupos de apocarotenoides	77

Discusión

4.1 Genes y enzimas	82
4.1.1 Transcritos	82
4.1.2 Ruptura del caroteno β en <i>Phycomyces</i>	82
4.1.3 Ruptura del caroteno β en otros Mucorales	84
4.1.4 Ruptura del caroteno β en otros organismos	84
4.1.5 Aspectos evolutivos	84
4.2 Apocarotenoides en <i>Phycomyces</i>	85
4.2.1 Absorbancia atribuida a apocarotenoides	85
4.2.2 Apocarotenoides en distintos cultivos	86
4.2.3 Efecto de las mutaciones <i>car</i>	87
4.2.4 Limitaciones del método	88
4.3 Biosíntesis de apocarotenoides en <i>Phycomyces</i>	88
4.3.1 Etapas iniciales	89
4.3.2 Rutas biosintéticas	89
4.3.3 Interacción de ambos sexos en la biosíntesis de apocarotenoides	91
4.4 Funciones de los apocarotenoides	92
4.4.1 Defensa contra el estrés oxidativo	92
4.4.2 Feromonas sexuales de <i>Phycomyces</i>	92
4.4.3 Regulación de la biosíntesis de caroteno y de apocarotenoides	93
4.4.4 Carotenogénesis sexual	95

Materiales y métodos	
5.1 Estirpes	
5.1.1 <i>Phycomyces</i>	97
5.1.2 Bacterias	97
5.2 Secuencias	97
5.3 Cebadores	99
5.4 Cultivos generales	99
5.5 Extracción y análisis de apocarotenoides	99
5.6 Clonación	99
5.7 Obtención de ARNm y su cuantificación	101
5.8 Construcción de plásmidos	102
5.9 Producción heteróloga de enzimas	
5.9.1 Expresión heteróloga	103
5.9.2 Obtención de lisados crudos	103
5.9.3 Purificación de proteínas quiméricas	103
5.10 Ensayos enzimáticos <i>in vitro</i>	
5.10.1 Substratos	104
5.10.2 Ensayos	104
5.11 Ensayos en células de <i>E. coli</i> que contienen carotenoides	104
Bibliografía	107
Conclusiones	121

Introducción

0.1 *Phycomyces blakesleeanus*

0.1.1 Taxonomía e historia

Phycomyces, un hongo filamentososo encontrado como saprofito en ambientes húmedos de diversas regiones del mundo (Fig. 1), se describió por vez primera en Suecia, pero fue tomado erróneamente por alga y llamado *Ulva nitens* (Agardh, 1817). El error inspiró el nombre del género *Phycomyces*, que etimológicamente significa ‘alga hongo’ (Kunze, 1823). El género tenía una sola especie, *Phycomyces nitens*, hasta que se dividió en dos aplicando criterios morfológicos y genéticos (Burgeff, 1925) y la mayoría de las estirpes comunes en el laboratorio se asignaron a la nueva, *Phycomyces blakesleeanus*. Esta división fue confirmada (Benjamin y Hesseltine, 1959) y sigue siendo válida.



Figura 1 *Phycomyces blakesleeanus* (fotografiado por J. Retamino Hernández).

Phycomyces blakesleeanus es una especie de los Mucorales (Zycha *et al.*, 1969), un grupo de hongos asignado en otros tiempos a los Ficomicetos y a los Cigomicetos y ahora a los Mucoromicota. Una comparación de secuencias génicas (James *et al.*, 2006) sugiere que *Phycomyces blakesleeanus* pertenece a la familia Mucoráceas que también incluye los géneros *Mucor*, *Parasitella*, *Rhizopus*, *Absidia* y otros. La presunta familia Ficomicetáceas (Von Arx, 1982), que incluía al género *Phycomyces*, se basó en rasgos morfológicos. La comparación de secuencias no la corrobora como alternativa a las Mucoráceas, sino como parte de ellas; las Ficomicetáceas será un buen nombre de familia cuando las Mucoráceas se repartan en muchas familias, como debería hacerse.

A las Mucoráceas parece corresponder un nivel filogenético equivalente al del conjunto de los Ascomicetos. Los Mucoromicota, los Dicaría (Ascomicetos más Basidiomicetos), las plantas y los animales están alejados unos de otros a distancias parecidas. Se debe ser cauto al extender a *Phycomyces* conclusiones obtenidas con otros organismos, aunque sean hongos.

Phycomyces se llevó a los laboratorios por el tamaño de sus cuerpos fructíferos vegetativos, los macróforos. Jean-Baptiste Carnoy, un sacerdote belga de la Universidad de Lovaina, lo encontró creciendo sobre excrementos humanos en una catacumba de Roma, lo llamó *Mucor romanus*, lo cultivó y describió su morfología, su desarrollo y varios aspectos de su conducta (Carnoy, 1870). Desde entonces se han publicado miles de monografías de investigación sobre este hongo, un libro (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987) y numerosas revisiones (Lipson y Horwitz, 1991; Corrochano y Cerdá-Olmedo, 1992; Avalos *et al.*, 1993; Cerdá-Olmedo y Martín-Rojas, 1996; Galland, 2001; Cerdá-Olmedo, 2001; Cerdá-Olmedo y Corrochano, 2001).

0.1.2 Ciclos de vida

Phycomyces, como los Mucorales en general, se reproduce de forma asexual (vegetativa) y sexual. Ambos procesos consisten en una sucesión de fases diferentes en morfología, bioquímica, fisiología y conducta (Fig. 2).

La estirpe silvestre NRRL1555, de sexo (–), es la más usada en los laboratorios. Sus esporas vegetativas son elipsoidales, con un tamaño medio de 9 µm de largo por 6 µm de ancho y contienen entre 1 a 6 núcleos, pero más del 80% son tri o tetranucleadas y solo 0,3% son uninucleadas (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968).

La inoculación sobre un medio de cultivo adecuado permite la germinación de unas pocas esporas cada día (Rivero y Cerdá-Olmedo, 1994), pero el calentamiento (48 °C durante 10 min) o la exposición a determinados compuestos químicos, como acetato o propionato, activa la germinación masiva (Robbins *et al.*, 1942; Borchert, 1963; van Mulders *et al.*, 1986; van Laere *et al.*, 1987).

Las esporas, tras la germinación, producen de uno a tres tubos germinativos que forman micelios de hifas cilíndricas (10 a 20 µm de diámetro), ramificadas y no tabicadas. Los micelios se extienden sobre la superficie de medios sólidos o líquidos sin agitación unos 2 cm cada día y desarrollan hifas aéreas, los esporangióforos. Estos cuerpos fructíferos, según las condiciones del medio, crecen como macróforos o micróforos. Ambos son cilíndricos y desarrollan una estructura apical esférica, el esporangio, que contiene esporas. Los macróforos miden varios centímetros y aún decímetros de largo y unos 0,1 mm de diámetro. Su esporangio, de unos 0,5 mm de diámetro, contiene unas 10⁵ esporas. Los micróforos son mucho más pequeños, de 1 a 3 mm de largo, y su esporangio contiene unas 10³ esporas. Las esporas se dispersan cuando la pared del esporangio se rompe porque se seca, choca con alguna superficie o se adhiere a animales.

La zona de crecimiento del macróforo adulto es una pequeña sección cilíndrica transparente bajo el esporangio. En cultivos líquidos en agitación, los micelios aparecen como masas esféricas y no esporulan. Casi todas las estructuras pueden crecer y regenerar micelios. A diferencia de otros hongos, las hifas no se fusionan unas con otras espontáneamente: no hay anastomosis.

Phycomyces se distingue de otros microorganismos de laboratorio por ser cenocítico. Los micelios, esporangióforos y esporangios jóvenes forman un citoplasma continuo (no interrumpido por septos o paredes celulares) que contiene muchos núcleos y es recorrido por fuertes corrientes.

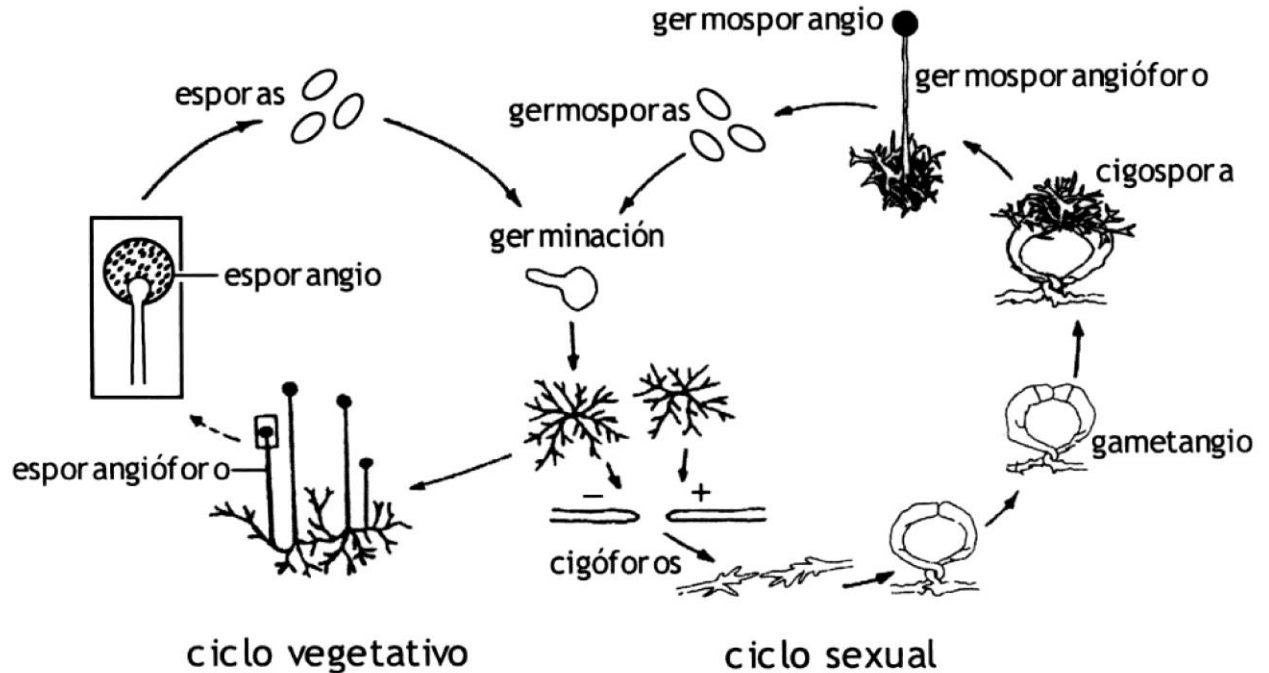


Figura 2 Ciclos de vida de *Phycomyces*. Las esporas en dormancia germinan para producir un micelio. A partir de este crecen dos tipos de esporangióforos: macróforos y micróforos. Ambos desarrollan un esporangio que contiene las esporas. La reproducción sexual se inicia cuando micelios de sexos opuestos crecen cerca uno del otro y desarrollan cigóforos, cuyo contacto y entrelazamiento produce los progametangios. En los extremos de estos se separan sendas células, los gametangios, que se fusionan para formar la cigospora. Tras algunos meses de reposo, la cigospora germina y da lugar a un germosporangióforo, un germosporangio y germosporas.

El ciclo sexual de *Phycomyces* se inicia cuando micelios de sexos opuestos se encuentran sobre una superficie sólida y desarrollan hifas gruesas, llamadas cigóforos, en respuesta a un intercambio de señales químicas. Estas contactan y se desarrollan en el aire adoptando una disposición en tenazas, en la que cada mitad está compuesta por la región distal de un cigóforo, el progametangio. Una pared transversal tabica los ápices de cada progametangio, separando una célula llamada gametangio; la parte restante se llama suspensor. La fusión de los gametangios origina una sola célula, la cigospora, que contiene citoplasma y miles de núcleos haploides de ambas parejas. Esta estructura esférica y negra mide unos 0,5 mm de diámetro y está rodeada por apéndices negros ramificados procedentes de los suspensores. La cigospora permanece en dormancia al menos dos meses y para germinar requiere solo agua.

Cada cigospora produce un germosporangióforo, un macróforo muy similar a los del ciclo asexual, con su germosporangio, que contiene germosporas multinucleadas. Las germosporas dan lugar a micelios de uno y otro sexo; unas pocas son heterocigotos intersexuales, con características de ambos sexos.

0.1.3 Principales temas de investigación

Phycomyces crece a 22 °C usando muchas fuentes de carbono y nitrógeno. Los micelios se expanden indefinidamente, pero pueden formar colonias si el medio está acidificado o contiene detergentes. Para *Phycomyces* se establecieron los primeros medios de cultivo químicamente definidos y por ello se descubrió que es un auxótrofo de tiamina, la vitamina B2 (Burgeff, 1934; Schopfer, 1934).

Phycomyces responde de varias maneras a muchos estímulos externos, como la luz, cuyos efectos se describieron en los primeros días de la fisiología microbiana (Carnoy, 1870; Sachs, 1879; Massart, 1888) y han permanecido como objeto de estudio.

Las investigaciones recibieron un gran impulso cuando Max Delbrück, probablemente el investigador que más influyó en el desarrollo de la Biología Molecular, cambió el estudio de los fagos por el de este hongo en busca de las bases biológicas de su comportamiento.

En el micelio, la luz azul estimula el desarrollo de macróforos y la acumulación de caroteno β e inhibe el desarrollo de micróforos. La respuesta más estudiada de los macróforos, pero no la única, es su fototropismo, o crecimiento hacia la luz azul y alejamiento de la radiación ultravioleta.

La respuesta más misteriosa de los macróforos es su “evitación” o alejamiento de objetos cercanos a su zona de crecimiento. Esta vieja observación (Elfving, 1881) no ha sido explicada satisfactoriamente todavía. Otra respuesta de los macróforos es su gravitropismo o crecimiento opuesto a la aceleración de la gravedad (Eibel *et al.*, 2000).

Phycomyces se usó hace un siglo en el primer estudio de sexo en hongos que descubrió la reproducción sexual de los Mucorales (Blakeslee, 1904). Los dos sexos, (+) y (–), son indistinguibles morfológicamente, pero identificables por su reacción mutua mediada por feromonas, las primeras descubiertas en cualquier organismo (Burgeff, 1924).

La genética de *Phycomyces* se inició con los estudios de Alfred Blakeslee (1906) y Hans Burgeff (1912, 1928), autor del concepto y del término *heterocarionte* e investigador de la recombinación sexual. La genética llegó a ser una herramienta en la fotobiología en 1967 cuando se aislaron los primeros mutantes del comportamiento en el laboratorio de Delbrück. Estos estudios contribuyeron las primeras rutas de transducción sensorial (Bergman *et al.*, 1973).

La naturaleza multinucleada de la mayoría de las esporas de *Phycomyces* dificulta su análisis genético. Muchos mutágenos inactivan núcleos y aumentan la proporción de esporas uninucleadas, entre las que se pueden aislar mutantes recesivos; además estas esporas se pueden seleccionar mediante un truco genético (Roncero *et al.*, 1984).

Las mutaciones se asignan a genes por pruebas de complementación en heterocariontes. Un pequeño porcentaje de marcadores genéticos ligados se ordenaron en un mapa genético con 11 grupos de ligamiento (Orejas *et al.*, 1987), pero el número de cromosomas se desconoce.

La bioquímica de *Phycomyces*, principalmente su pigmentación amarilla, se investiga desde hace más de cincuenta años (Goodwin, 1952; Schopfer, 1952). Las mayores contribuciones versan sobre la ruta biosintética para el caroteno β , cuya regulación se entiende mejor en este organismo que en cualquier otro.

La secuencia conocida del genoma de *Phycomyces* contiene 55,9 Mb de una secuencia total estimada de 62 a 67 Mb (Joint Genome Institute, Department of Energy, EE.UU.). La diferencia se atribuye a secuencias repetidas, difíciles de secuenciar y aislar. Los genomas de *Rhizopus oryzae* y *Mucor circinelloides* son menores, con secuencias conocidas de 46,1 Mb (Broad Institute, EE. UU.) y 36,5 Mb (JGI), respectivamente.

Los sexos de *Phycomyces* están determinados por sendas regiones alélicas, con secuencias muy diferentes para cada sexo. Cada una tiene un solo gen, *sexP* para el sexo (+) y *sexM* para el sexo (–), que determinan sendos factores de transcripción (Idnurm *et al.*, 2008). Los detalles de estas observaciones sugieren un modelo evolutivo para los primeros pasos de la determinación sexual y de los cromosomas sexuales en eucariontes.

La transformación estable de *Phycomyces* con ADN exógeno se ha intentado en varios laboratorios en tres partes del mundo desde hace más de treinta años, pero ha fracasado hasta ahora. *Phycomyces* modifica y destruye el ADN introducido ocasionando la pérdida del fenotipo transformado (Obraztsova *et al.*, 2004).

0.2 Carotenoides

0.2.1 Características generales

Los carotenos son isoprenoides o terpenoides, que es el nombre colectivo de decenas de miles de compuestos naturales en cuya estructura se aprecian repeticiones lineales de “unidades isopreno”, con esqueleto metilbutano (C₅), a veces muy modificado. Su tamaño va desde miles de unidades isopreno en el caucho natural a solo dos en los llamados monoterpenos, que incluyen muchos aromas, como el mentol. Los terpenoides más investigados de *Phycomyces* son los carotenos (Fig. 3), con ocho unidades isopreno, los esteroides, con seis, y la ubiquinona (coenzima Q), con nueve.

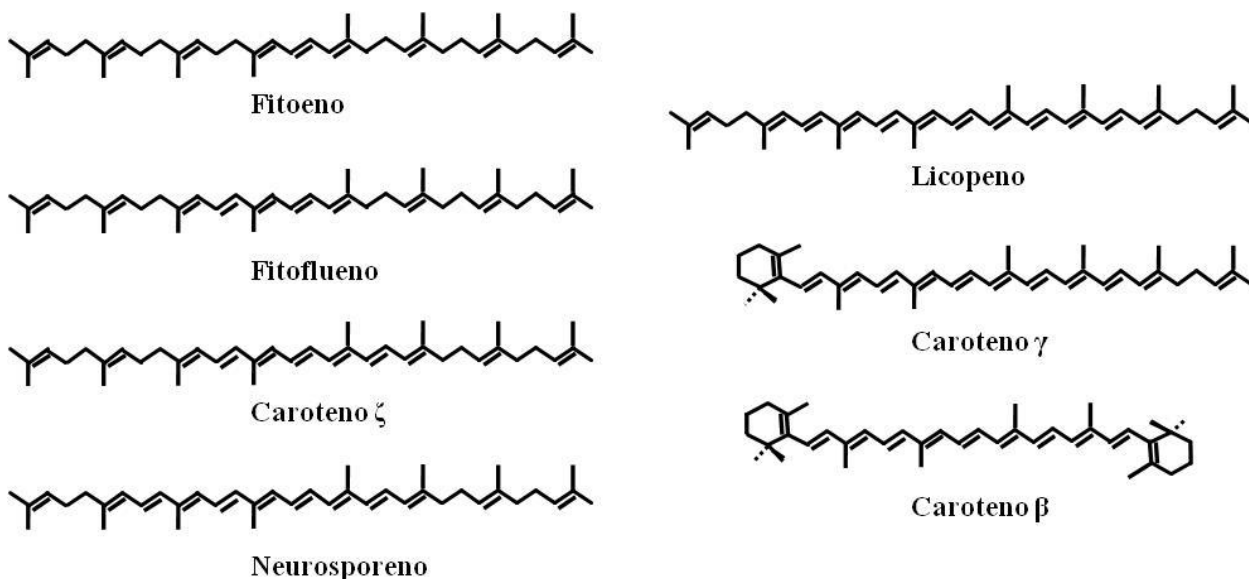


Figura 3 Carotenos de *Phycomyces*. El principal caroteno de *Phycomyces* es el caroteno β y el resto son precursores biosintéticos. Todos se extraen predominantemente en la forma todo *trans*, menos el fitoeno, que es *E*-15,15'-fitoeno (Than *et al.*, 1972). Se vienen usando los nombres tradicionales pero la nomenclatura de la IUPAC los llama a todos caroteno y reserva los prefijos griegos para señalar la estructura de los extremos de la molécula: Ψ indica la terminación lineal y β el anillo característico del caroteno β . El licopeno es el Ψ, Ψ -caroteno, porque los dos extremos son lineales; el caroteno β , el β, β -caroteno, porque ambos extremos son anillos β ; y el caroteno γ , el Ψ, β -caroteno por tener un extremo de cada tipo. Los precursores del licopeno se nombran señalando la presencia de hidrógenos adicionales; así, el caroteno ζ es el 7,8,7',8'-tetrahidro- Ψ, Ψ -caroteno.

Los carotenos contienen cuarenta carbonos (C₄₀), que están acompañados solo por hidrógeno. Sus derivados oxigenados se llaman xantofilas. Carotenoides es el nombre colectivo de carotenos y xantofilas y apocarotenoides el de moléculas con menos de cuarenta carbonos derivadas de carotenoides. Los carotenoides son sintetizados por todas las plantas, numerosas bacterias, arqueas y hongos (Armstrong y Hearst, 1996; Umeno *et al.*, 2005). Los animales no los producen, pero muchos los necesitan y adquieren a través de la dieta.

El color de los carotenoides depende de su cromóforo (Fig. 3), o sea, del número de dobles enlaces conjugados y de su distribución (Kohler, 1995). Una larga serie de dobles enlaces conjugados permite absorber fotones de menor energía en la región visible del espectro y confiere color mientras que una serie más corta solo absorbe fotones de alta energía en la región UV del espectro y no confiere color. Los anillos en los extremos de la molécula acortan el cromóforo y hacen que el caroteno γ sea anaranjado y el caroteno β amarillo.

0.2.2 Biosíntesis

Hay dos vías muy diferentes para sintetizar unidades isopreno. La vía del mevalonato (Fig. 4) parte de acetil-CoA o leucina (Goodwin y Lijinsky, 1951; Yokoyama *et al.*, 1960; McGarvey y Croteau, 1995). La vía independiente de mevalonato (Rohmer *et al.*, 1993) tiene 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato como intermediario (Eisenreich *et al.*, 2001). Los eucariontes, no fotosintéticos, como los hongos, usan exclusivamente la vía del mevalonato. La vía independiente de mevalonato se ha corroborado en muchas plantas y muchas bacterias (Rohmer, 1999; Lange *et al.*, 2000; Eisenreich *et al.*, 2001; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). *Phycomyces* usa la vía del mevalonato (Ruiz-Albert *et al.*, 2002) (Fig. 4).

0.2.2.1 Hongos

Las rutas biosintéticas de carotenoides en los hongos se inician con la unión de dos moléculas de pirofosfato de geranilgeranilo para producir fitoeno (C_{40}), un tetraterpeno lineal (Fig. 5), seguida de la introducción de cuatro, o cinco enlaces dobles conjugados. Estas deshidrogenaciones o desaturaciones generan diversos productos intermedios. El licopeno, final de la serie de desaturaciones, se cicla en uno de sus extremos para producir caroteno γ y en ambos para producir caroteno β . Esta biosíntesis de caroteno β , propuesta para *Lycopersicon esculentum* (tomate o jitomate) (Porter y Lincoln, 1950), se ha corroborado en varios Mucorales, como *Phycomyces* (De la Guardia *et al.*, 1971), *Mucor* (Fraser *et al.*, 1996) y *Blakeslea* (Mehta y Cerdá-Olmedo, 1995), y Ascomicetos, como *Aspergillus* (El-Jack *et al.*, 1988) y *Cercospora* (Norman, 1991; Ehrenshaft y Daub, 1994).

Los hongos tienen varias peculiaridades en la síntesis de sus carotenoides (Avalos y Cerdá-Olmedo, 2004). La primera, un solo gen, *carB*, es responsable de las desaturaciones del fitoeno. La segunda consiste en la combinación de las funciones enzimáticas sintasa y ciclasa en un gen bifuncional, *carRA*, que contiene el dominio R responsable de la ciclasa y el A responsable de la sintasa. Así las siete reacciones enzimáticas se llevan a cabo con los productos de solo dos genes estructurales y tres proteínas diferentes.

En *Fusarium fujikuroi* y *Neurospora crassa*, cinco desaturaciones y una ciclación generan toruleno, que pierde cinco carbonos del extremo no ciclado para producir neurosporaxantina (Prado-Cabrero *et al.*, 2007a; Estrada *et al.*, 2008).

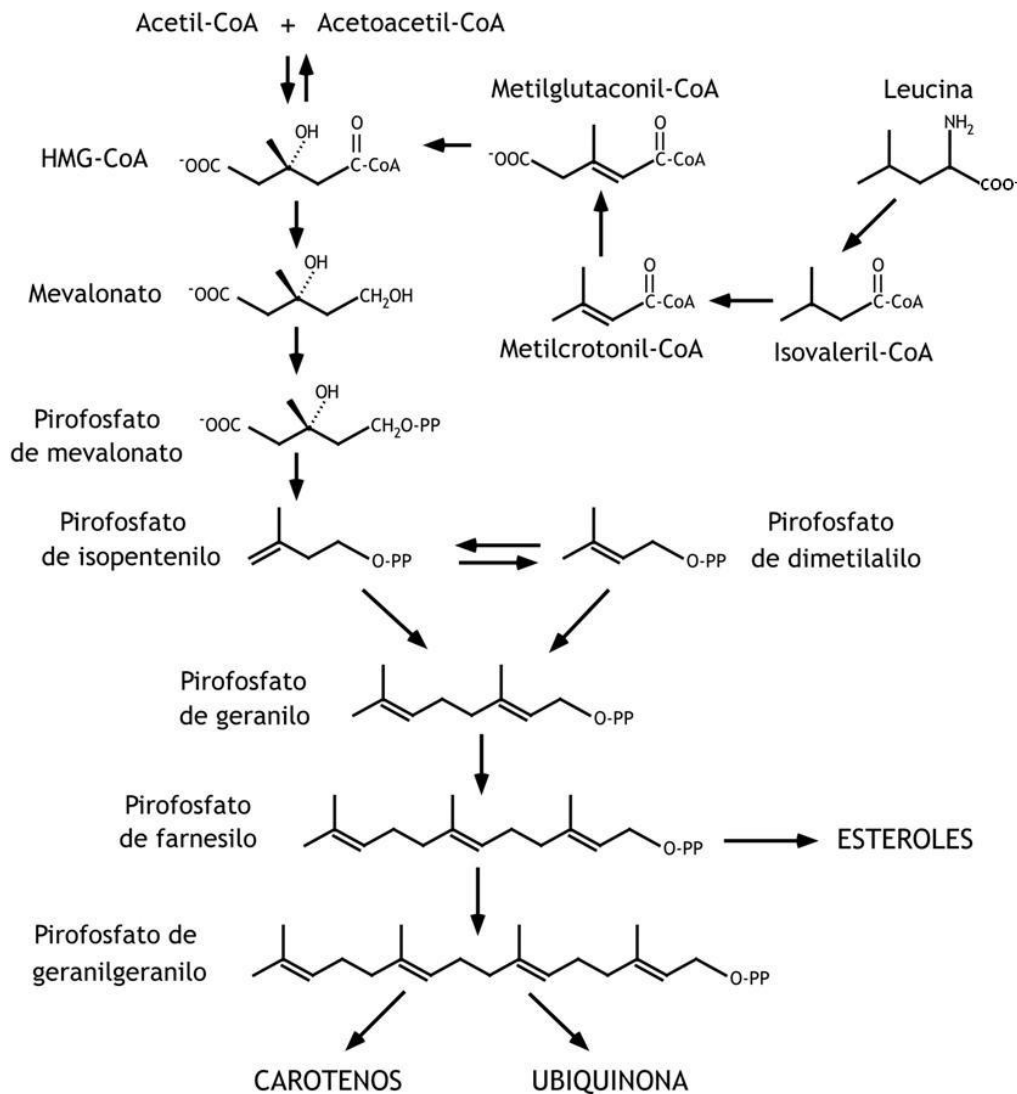


Figura 4 Síntesis de algunos terpenoides en *Phycomyces*. La adición sucesiva de pirofosfato de isopentenilo a pirofosfato de dimetilalilo hace crecer el número de unidades isopreno. CoA, coenzima A; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.

Para la carotenogénesis de *Phycomyces* se han identificado y caracterizado los genes estructurales *carRA* (Torres-Martínez *et al.*, 1980) y *carB* (Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974; Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997), y los genes reguladores *carC* (Revuelta y Eslava, 1983), *carD* (Salgado *et al.*, 1989), *carE* (Concha y Murillo, 1984), *carF* (Mehta *et al.*, 1997), *carI* (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982) y *carS* (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976). Los genes *carRA* y *carB* están ligados (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982) y se transcriben divergentemente desde una secuencia de 1381 pb que los separa (Arrach *et al.*, 2001).

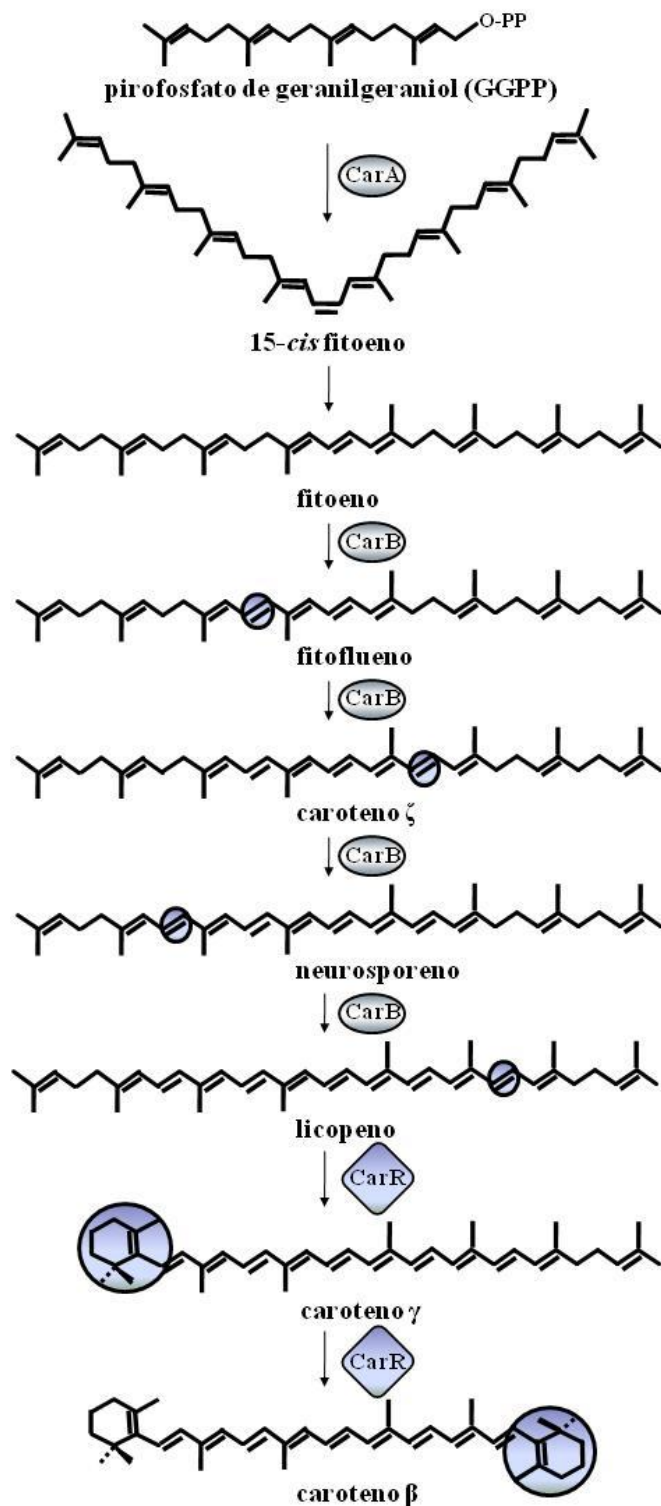


Figura 5 Biosíntesis de caroteno β en *Phycomyces*. Cuatro desaturaciones y dos ciclaciones (círculos) convierten el fitoeno en caroteno β. CarA, sintasa de fitoeno; CarB, desaturasa de fitoeno y

CarR, ciclasa de licopeno.

0.2.2.2 Otros organismos

La biosíntesis de carotenoides en otros organismos se parece a la de hongos. En plantas, hay dos deshidrogenaciones dobles, una para las reacciones de fitoeno a caroteno ζ y otra para las de este a licopeno, que se intercalan con dos reacciones de isomerización. Las cuatro reacciones se llevan a cabo con enzimas diferentes. Además del caroteno β , hay otros productos de ciclación, como el caroteno α (β, ϵ -caroteno). Para ello hay dos ciclasas de licopeno (Cunningham *et al.*, 1996).

En bacterias, la deshidrogenación del fitoeno ocurre como en hongos (Sandmann, 2009) y plantas, pero con una sola isomerasa y tres ciclasas para convertir el licopeno a caroteno β .

En algas, como *Dunaliella*, la biosíntesis de carotenoides se parece a la de plantas.

0.2.2.3 Regulación de la carotenogénesis

Los productos de los genes *carB* y *carRA* constituyen un complejo enzimático (Fig. 6, parte izquierda) que contiene cuatro proteínas CarB, una CarA y dos CarR (De la Guardia *et al.*, 1971; Aragón *et al.*, 1976; Candau *et al.*, 1991; Sanz *et al.*, 2002). Los productos de los genes *carC*, *carD*, *carI*, *carS* regulan la actividad del complejo (Cerdá-Olmedo, 2001; Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008). El gen *carRA* también tiene una función reguladora (Torres-Martínez *et al.*, 1980; Murillo *et al.*, 1981; Arrach *et al.*, 2001). La secuencia que separa a los genes *carB* y *carRA* media la estimulación de la expresión de genes por la luz e interacción sexual (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008; Sanz *et al.*, 2011).

Observaciones

El contenido de caroteno β de *Phycomyces* se modifica por mutaciones en varios genes *car* y por muchos agentes externos que se clasifican en cuatro grupos: retinol, interacción sexual, luz azul y ftalato de dimetilo cuyos mecanismos de acción son independientes (Cerdá-Olmedo, 2001).

Ciertas mutaciones en los genes *carD*, *carF* y *carS* incrementan el contenido de caroteno β mientras que en los de los genes *carC* y *carI* lo disminuyen, pero ninguna modifica los niveles de transcritos de los genes *carRA* y *carB* (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008). Otras mutaciones en otros genes *car* aumentan la actividad de la ruta, dando lugar a la acumulación de intermediarios de los pasos afectados (Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974; Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1989).

El retinol (Eslava *et al.*, 1974), la ionona β (Mackinney *et al.*, 1952; 1956; Reyes *et al.*, 1964) y otros compuestos que contienen un anillo β (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986) incrementan el contenido de caroteno β (Bejarano *et al.*, 1988), pero no los niveles de los transcritos de los genes *carRA* y *carB* (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008).

La interacción de micelios de sexos opuestos aumenta el contenido de caroteno β . Este aumento (carotenogénesis sexual), que se atribuye a los ácidos trispóricos (Caglioti *et al.*, 1966; Sutter *et al.*, 1974; Sutter, 1987), es sinérgico con el inducido por las mutaciones y otros agentes externos (Cerdá-Olmedo, 2001), pero inhibido por acetato (Kuzina y Cerdá-Olmedo, 2006). La carotenogénesis sexual también ocurre en cultivos separados de heterocariontes intersexuales (Murillo *et al.*, 1978; Mehta *et al.*, 2003) y de diploides parciales intersexuales (Mehta y Cerdá-Olmedo, 2001). La interacción sexual aumenta los niveles de transcritos de los genes *carRA* y *carB* (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008).

La luz azul incrementa el contenido de caroteno β (Bergman *et al.*, 1973; Jayaram *et al.*, 1979; López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980; Avalos *et al.*, 1993) y los niveles de transcritos de los genes *carRA* y *carB* (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Blasco *et al.*, 2001; Rodríguez-Romero y Corrochano, 2004).

El ftalato de dimetilo, el veratrol y otros agentes químicos con anillo aromático activan la ruta (Cerdá-Olmedo y Hüttermann, 1986), pero no aumentan los niveles de transcritos de los genes *carRA* y *carB* (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008).

Mecanismo

Estas observaciones y otras (Salgado y Cerdá-Olmedo, 1992) apoyan la regulación de la síntesis de caroteno β por realimentación (Fig. 6, parte central). La señal inhibitoria se propuso como un complejo formado por el caroteno β y la proteína CarS (Bejarano *et al.*, 1988). Se propuso también que el complejo actúa sobre CarA en presencia de la proteína Carl porque se encuentran mutantes en el dominio A del gen *carRA* y en el del gen *carI* insensibles a la inhibición por realimentación (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982; Arrach *et al.*, 2001).

La función de la proteína CarS (Fig. 6, parte derecha) se regula por los productos CarC y CarD (Salgado *et al.*, 1988). El retinol, las iononas y sus análogos compiten con el caroteno β y previenen la inhibición (Bejarano *et al.*, 1988). El ftalato de dimetilo y el veratrol actúan como activadores (Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1989).

0.2.3 Diversidad

La mayoría de los carotenoides derivan del fitoeno (Walter y Strack, 2011), pero otros intermediarios pueden producir carotenoides C_{30} y C_{50} en ciertas bacterias (Schmidt-Darnnert *et al.*, 2000). Las modificaciones del esqueleto lineal por ciclasas, hidroxilasas, cetolasas y otras enzimas generan la diversidad de carotenoides (Fig. 7). Los más comunes contienen dos anillos terminales unidos por una cadena lineal.

Las xantofilas, como la zeaxantina y la luteína, contienen anillos hidroxilados. En *Phycomyces* y otros Mucorales se encuentran carotenos con anillo β , pero no carotenos con

anillos α , frecuentes en las plantas, ni derivados hidroxilados.

El oxígeno también se introduce en forma ceto, con o sin hidroxilos adicionales, como en la astaxantina y la cantaxantina. Los anillos aromáticos son infrecuentes en los carotenoides, pero se encuentran en los de ciertas esponjas marinas, micobacterias y cianobacterias como *Synechococcus* sp. que produce sincoxantina, un derivado dicarboxílico (Graham y Bryant, 2008).

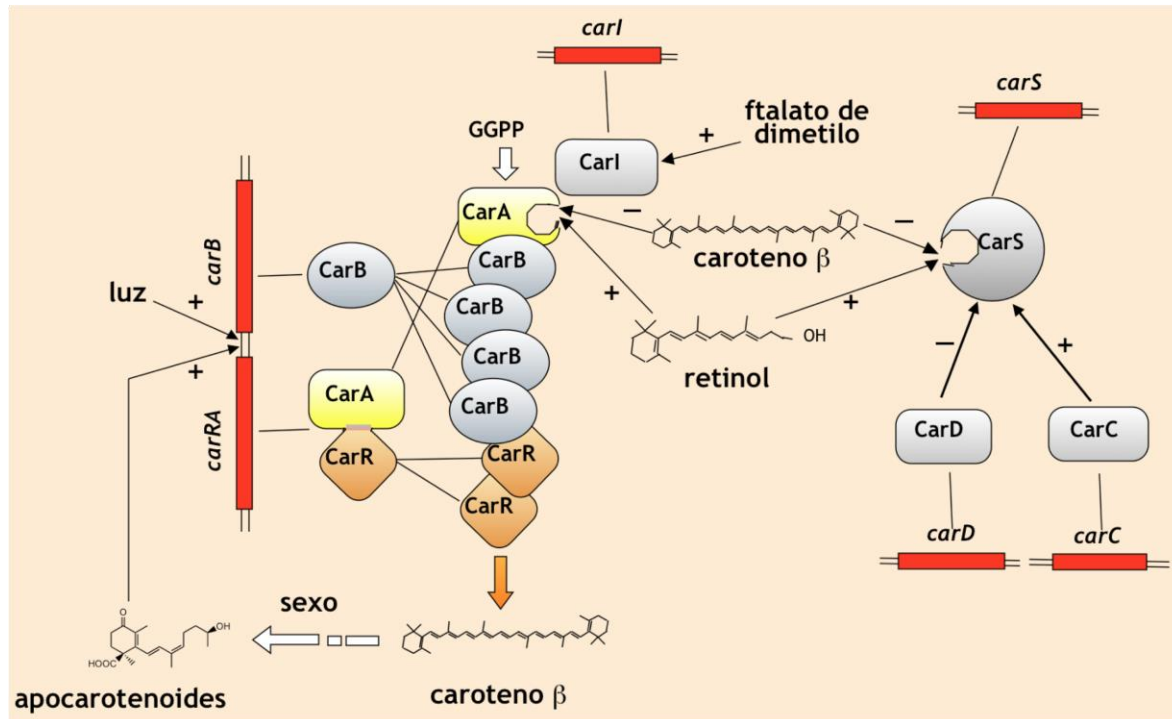
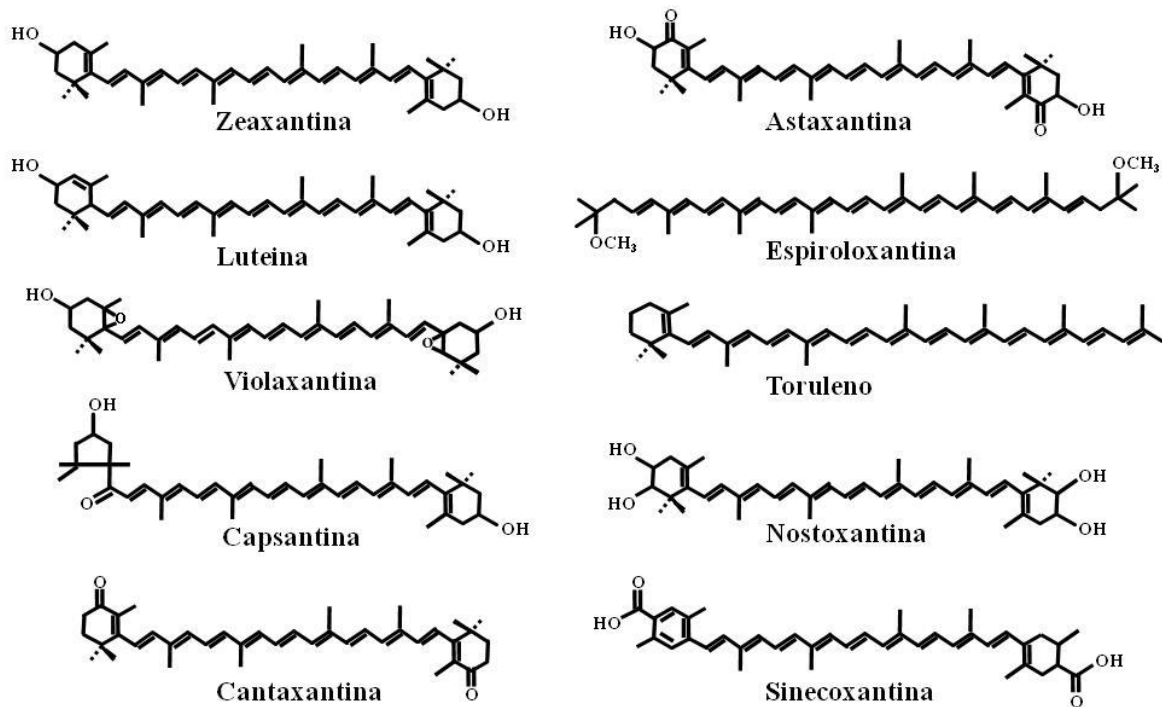


Figura 6 Regulación de la carotenogénesis en *Phycomyces*. Modificada de Almeida y Cerdá-Olmedo (2008). El agregado enzimático formado por los productos de los genes estructurales (izquierda) se regula por los productos de al menos otros cuatro genes. +, estimulación y -, inhibición.

Los carotenoides monocíclicos como el toruleno se producen raramente, pero se encuentran en levaduras carotenogénicas como las especies de *Rhodotorula* y *Phaffia* (Frengova y Beshkova, 2009) y en ascomicetos como *Fusarium fujikuroi* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007ab). La espiriloxantina, que contiene dos grupos metoxi en la cadena poliénica completamente desaturada, también se produce raramente, pero se encuentra en *Rubrivivax gelatinosus*, una bacteria fotosintética purpúrea (Steiger *et al.*, 2000).

Algunas bacterias sintetizan compuestos parecidos a los carotenoides más cortos o más largos, de treinta, cuarenta y cinco y cincuenta carbonos. Algunos de estos carotenoides exóticos son la estafiloxantina (C_{30}), encontrada en *Staphylococcus aureus* y unas pocas otras especies (Pelz *et al.*, 2005), y la decaprenoxantina (C_{50}), que contiene sendas unidades isopreno en los extremos de los dos anillos ciclohexeno, encontrada en



Corynebacterium glutamicum (Krubasik *et al.*, 2001).

Figura 7 Diversidad estructural de varios carotenoides en diversos organismos. Modificada de Walter y Strack (2011).

Se han descrito muchas más xantofilas, que las mostradas en la Figura 7, como esferoideno y esferoideneno en *Rhodobacter sphaeroides*, ceto-toruleno y mixobactona en *Myxococcus fulvus*, criptoxantina en varias especies *Erwinia*, equinona en diversas cianobacterias (Armstrong, 1997), y neuroporaxantina en *Neurospora crassa* y *Fusarium fujikuroi* (Aasen y Jensen, 1965).

0.2.4 Funciones y usos

Los carotenoides pueden actuar como pigmentos y modificar la apariencia de diversos organismos. En plantas proporcionan colores llamativos a sus flores y sus frutos con lo que resultan llamativos para los animales y se facilita la polinización y la dispersión de semillas. En los cloroplastos son indispensables como protectores del sistema fotosintético y como fotoreceptores que absorben luz y transfieren su energía a los centros activos (Edge *et al.*, 1997). En animales proporcionan los colores característicos de muchos pájaros, insectos e invertebrados marinos y pueden jugar un papel importante en su etología, por ejemplo, en la atracción sexual (Favre *et al.*, 2003; Blount *et al.*, 2003).

La zeaxantina, la luteína y otras xantofilas son necesarias como filtro de protección para el funcionamiento de la mácula del ojo (Snodderly *et al.*, 1995; Landrum y Bone, 2001). La deficiencia de luteína se asocia con diferentes anomalías de la visión como la

degeneración de la mácula del ojo, sin la que nuestra vista tendría una bajísima resolución (Moeller *et al.*, 2000).

El contenido de caroteno β en la dieta ha alcanzado un interés considerable debido a sus funciones como provitamina A (Olson y Hayaishi, 1965; Nagao *et al.* 1997) y antioxidante (Sies y Stahl, 1995). Este carotenoide es la principal fuente del retinol necesario para la recepción de la luz en la retina y por tanto se comprende que la visión dependa de su ingesta.

Al licopeno se le atribuyen efectos beneficiosos para la salud (Heber y Lu, 2002; Rao, 2002; Willcox *et al.*, 2003), incluso mayores que los de los carotenoides más comunes, presumiblemente porque es un antioxidante más potente (Di Mascio *et al.*, 1989), como prevención de ciertos tipos de cáncer (Giovannucci, 1999; Gann *et al.*, 1999) y mejora de la respuesta inmunológica (Jyocouchi *et al.*, 1991).

Las insaturaciones de los carotenoides permiten neutralizar especies de oxígeno reactivas (Conn *et al.*, 1991), como los radicales generados por la peroxidación lipídica (Sies y Stahl, 1995). Además, pueden actuar sinérgicamente con algunas vitaminas que protegen contra la fotooxidación (Edge *et al.*, 1997; Stahl y Sies, 2002).

La función de los carotenoides en hongos no se ha esclarecido en muchos casos, pero varias observaciones les atribuyen efectos antioxidantes y de protección frente a radicales libres (Gessler *et al.*, 2002; Ligusa *et al.*, 2005), con algunas contradicciones. La luz aumenta el estrés oxidativo de la célula, lo que podría explicar que en muchos organismos aumente la carotenogénesis con la luz (Avalos *et al.*, 1993). Excepto en *Blakeslea*, la luz disminuye el contenido de caroteno β (Kuzina y Cerdá-Olmedo, 2007).

En algunos hongos se han demostrado conexiones entre el estrés oxidativo y la regulación de la carotenogénesis. El oxígeno singlete estimula la carotenogénesis en cultivos de *Xanthophyllomyces dendrorhous* crecidos en oscuridad (Schroeder y Johnson, 1995). Las mutaciones en los genes *sod-1* (Yoshida y Hasunuma, 2004) y *cat-3* (Michan *et al.*, 2003), involucrados en la defensa frente al estrés oxidativo en *Neurospora*, aumentan el contenido de caroteno en la luz. En *Phycomyces*, la luz azul incrementa el contenido de caroteno β , pero ni este pigmento ni sus precursores lo protegen frente a las radiaciones gamma y ultravioleta C y el peróxido de hidrógeno (Martín-Rojas *et al.*, 1996).

El caroteno β es el precursor de otras moléculas como los ácidos trispóricos (Austin *et al.*, 1969; 1970), implicados en la sexualidad de los Mucorales y tiene un papel fundamental en la fotomorfogénesis de *Phycomyces*. El descubrimiento reciente de proteínas de la familia de las opsinas que requieren retinal en hongos ofrece nuevas perspectivas sobre las funciones de los carotenoides.

Los carotenoides se usan principalmente en la alimentación y en la fabricación de productos cosméticos, pero tienen muchos más usos, tan diversos como sus estructuras (Bramley, 2003; Namitha y Negi, 2010). La bixina y norbixina son colorantes de alimentos y cosméticos que se usan siguiendo hábitos tradicionales, como lo demuestra el uso del

azafrán, pimentón, achiote y otros productos vegetales.

El caroteno β y el licopeno también se usan como colorantes en la preparación de bebidas. La zeaxantina, luteína, cantaxantina y astaxantina se usan como aditivos de la dieta de varios animales. Estas xantofilas aumentan la pigmentación de pescados (salmón y truchas), crustáceos y pollos; y dan color a varios productos como la mantequilla y la yema de los huevos.

0.3 Apocarotenoides

0.3.1 Conceptos generales

Los apocarotenoides son compuestos semejantes a fragmentos de carotenoides que usualmente derivan de estos por corte o ruptura oxidativa (Walter *et al.*, 2010). La ruptura de la cadena poliénica en dobles enlaces específicos ocurre principalmente por la acción de las oxigenasas de carotenoides, de algunas de las cuales se conocen bien las reacciones y los productos (Kloer y Schulz, 2006; von Lintig, 2010; Walter y Strack, 2011). Todos los miembros de la familia de oxigenasas de carotenoides rompen un doble enlace C=C usando O₂ (Bouvier *et al.*, 2003b; Giuliano *et al.*, 2003; Camara y Bouvier, 2004) que da lugar a los correspondientes aldehídos o cetonas. Esta reacción es seguida por modificaciones que dan lugar a diversos apocarotenoides (Iuchi *et al.*, 2000; Rodrigo *et al.*, 2006; Simkin *et al.*, 2004). Otras enzimas también cortan carotenoides; por ejemplo, una peroxidasa del hongo *Lepista irina* rompe principalmente los enlaces 9,10 del caroteno β para producir ionona β (Zorn *et al.*, 2003ab).

La ruptura inespecífica de la cadena poliénica en cualquier doble enlace puede ocurrir por oxidación química cuyos mecanismos no están bien esclarecidos (Carail y Caris-Veyrat, 2006). Los radicales generados por la oxidasa de la xantina pueden mediar la ruptura de caroteno β para producir ionona β (Bossier y Belin, 1994). Los hidroperóxidos de ácidos grasos producidos por lipoxigenasas en homogeneizados de mucosa gástrica pueden mediar la ruptura de caroteno β en varios fragmentos de 18 a 30 carbonos (Yeum *et al.*, 1995). El licopeno también se corta en varias posiciones usando homogeneizados de intestino de rata (Anjos-Ferreira *et al.*, 2004).

No todos los apocarotenoides se sintetizan por ruptura de una molécula precursora más grande. El ácido abscísico de las plantas deriva del caroteno β, como se describe en la página 24. El de *Botrytis cinerea* sigue una ruta “directa”: el difosfato de farnesilo, un isoprenoide C₁₅, se cicla y se oxida en varios pasos para formar este compuesto (Inomata *et al.*, 2004).

0.3.2 Señales químicas en Mucorales

0.3.2.1 Descubrimiento y efectos biológicos

Los apocarotenoides mejor conocidos de los Mucorales son los trisporoides, compuestos de 18 carbonos, o 19 si poseen un grupo metiléster. Otros compuestos relacionados, pero con solo 15 carbonos, se llamaron apotrisporoides, porque se sugirió que proceden del corte de un fragmento de tres carbonos de los trisporoides. Entre ellos se encuentran presumiblemente las señales responsables de la comunicación y la carotenogénesis sexual de este grupo de hongos. *Blakeslea trispora* y *Mucor mucedo*

fueron los sujetos de la mayoría de las investigaciones iniciales. *Phycomyces blakesleeanus* se usó después.

El desarrollo sexual de estos hongos y otros Mucorales se inicia por la interacción de micelios de sexo opuesto y se caracteriza porque las hifas desarrollan cigóforos e intensifican su coloración amarilla, principalmente en la zona de contacto (Blakeslee, 1904).

El desarrollo de los cigóforos se media por señales químicas (Burgeff, 1924), llamadas feromonas. Se demostró que los cultivos separados (+) y (-) de *Mucor* contienen feromonas que estimulan el desarrollo de cigóforos (Plempel, 1957), pero el estudio que pretendía aislarlas solo encontró un compuesto que estimula el desarrollo de cigóforos en ambas estirpes (Plempel, 1963). La intensificación de la coloración amarilla de las hifas se ocasiona por el incremento del contenido de caroteno β (carotenogénesis sexual). Se demostró que los gametangios de *Phycomyces* acumulan este pigmento (Hocking, 1965).

La carotenogénesis sexual se estudió por varios grupos de investigación de industrias biotecnológicas. *Phycomyces* y otros Mucorales fueron considerados como posibles fuentes industriales de caroteno β , pero se prefirió a *Blakeslea* para desarrollar un proceso de fermentación (Ciegler, 1965). Se demostró que los ácidos trispóricos aislados del cultivo mixto de *Blakeslea* estimulan la carotenogénesis en cultivos separados (+) y (-) (Caglioti *et al.*, 1966). Los ácidos trispóricos también estimulan el desarrollo de cigóforos en estirpes (+) y (-) de *Mucor* (van den Ende, 1968). Se ha demostrado que los ácidos trispóricos derivan de caroteno β . Los cultivos de *Blakeslea* que se alimentaron con mevalonato marcado radiactivamente produjeron ácidos trispóricos marcados (Austin *et al.*, 1969; 1970). Varios precursores de los ácidos trispóricos, aislados de cultivos separados (+) y (-) de *Blakeslea*, se convierten a ácidos trispóricos solo en cultivos de sexo opuesto (Sutter, 1970; Sutter *et al.*, 1971, 1973, 1974; Werkman y van den Ende, 1973).

Otras observaciones también atribuyen las dos respuestas asociadas al desarrollo sexual, desarrollo de cigóforos y carotenogénesis sexual, a los ácidos trispóricos. Varios mutantes de la carotenogénesis de *Phycomyces* que carecen de caroteno β no estimulan ambas respuestas en estirpes de sexo opuesto, pero si son estimulados por ellas (Sutter, 1975). El trisporato de metilo C induce la formación de cigóforos en micelios de sexo (-) de *Phycomyces* (Drinkard *et al.*, 1982). El trisporato de metilo E y otros trisporoides sintéticos inducen la carotenogénesis en cultivos separados de *Phycomyces* (Govind y Cerdá-Olmedo, 1986).

0.3.2.2 Diversidad

Los ácidos trispóricos A, B (Cainelli *et al.*, 1967), C (Caglioti *et al.*, 1966), D y E (Sutter *et al.*, 1989) se identificaron en cultivos mixtos de *Blakeslea*. Estos varían en la oxigenación de la cadena lateral y en los sustituyentes del anillo. Los ácidos trispóricos absorben la radiación ultravioleta a 321-328 nm.

Otros trisporoides como la trisporina B (Sutter y Whitaker, 1981b) y C se han descrito en cultivos separados (–) de *Blakeslea* y *Mucor*; el trisporol B (Bu'Lock *et al.*, 1972; Prisbylla *et al.*, 1979) y C (Sutter y Whitaker, 1981b) en cultivos separados de *Blakeslea*; el trisporato de metilo B (Sutter y Whitaker, 1981b) de cultivos separados (+) de *Blakeslea*; el apotrisporol C (Sutter y Whitaker, 1981b) y la apotrisporina C (Sutter y Zawodky, 1984) de cultivos separados y mixtos de *Blakeslea*; el trisporato de metilo C (Sutter y Whitaker, 1981b), el dihidrotrisporato de metilo B y C (Bu'Lock *et al.*, 1976; Sutter y Whitaker, 1981b) de cultivos separados (+) de *Blakeslea* y *Mucor*; el trisporato de metilo E (Miller y Sutter, 1984) de cultivos separados (+) de *Mucor* y *Phycomyces*; y la apotrisporina E (Sutter, 1986) de cultivos mixtos de *Phycomyces* y *Blakeslea*. Se encuentran distintos apocarotenoides no solo entre especies, sino entre estirpes de una misma especie, como *Blakeslea trispora* (Barrero *et al.*, 2011).

Recientemente se ha aplicado un criterio genético que permite identificar los apocarotenoides de un cultivo de *Phycomyces*: se consideran apocarotenoides todos los compuestos que se detectan en el medio de cultivo de cinco días de edad de la estirpe silvestre, pero no en el de mutantes *carB* que carecen de caroteno β (Polaino *et al.*, 2010, 2012). Este estudio reporta 19 apocarotenoides nuevos. Cinco de ellos han sido identificados como Ma26 y su isómero, los metilhexanoides, compuestos con siete carbonos; Cn113, trispoxano, un compuesto con quince carbonos; y Cn122 y su isómero Cn123, los trientriolicos, compuestos con quince carbonos.

0.3.2.3 Biosíntesis postulada

Los ácidos trispóricos se producen en grandes cantidades en cultivos mixtos (Werkman y van den Ende, 1973), pero no se encuentran en cultivos separados, y se ha propuesto que su síntesis requiere la cooperación de ambos sexos (Sutter, 1987). En la ruta biosintética postulada (Fig. 8), ambos sexos comparten los pasos iniciales, empezando con el caroteno β vía retinal como el intermediario más probable (Austin *et al.*, 1969, 1970; Werkman y van den Ende, 1974), hasta la producción del último intermediario común, la dihidrotrisporina. El siguiente paso biosintético, específico en cada sexo (Sutter *et al.*, 1973; Nieuwenhuis y van den Ende, 1975), permite la formación de dihidrotrisporato de metilo en el sexo (+) y de trisporina y trisporol en el sexo (–). Las siguientes reacciones, en la estirpe (–) de *Mucor*, involucran a una deshidrogenasa dependiente de NADP, que cataliza la oxidación del dihidrotrisporato de metilo a trisporato de metilo, y probablemente también la de dihidrotrisporina a trisporina; y una esterasa, implicada en la última reacción a partir de trisporato de metilo (Werkman, 1976).

Un modelo alternativo considera el paso de dihidrotrisporato de metilo a trisporato de metilo en ambos sexos. El último, a partir del sexo (+), actuaría como una feromona.

Sin embargo, la trisporina y el trisporol están ausentes en cultivos de sexo (+), por lo que se sugirió un mecanismo de inactivación para estos compuestos que los convertiría en apotrisporina y apotrisporol, respectivamente (Sutter y Whitaker, 1981b).

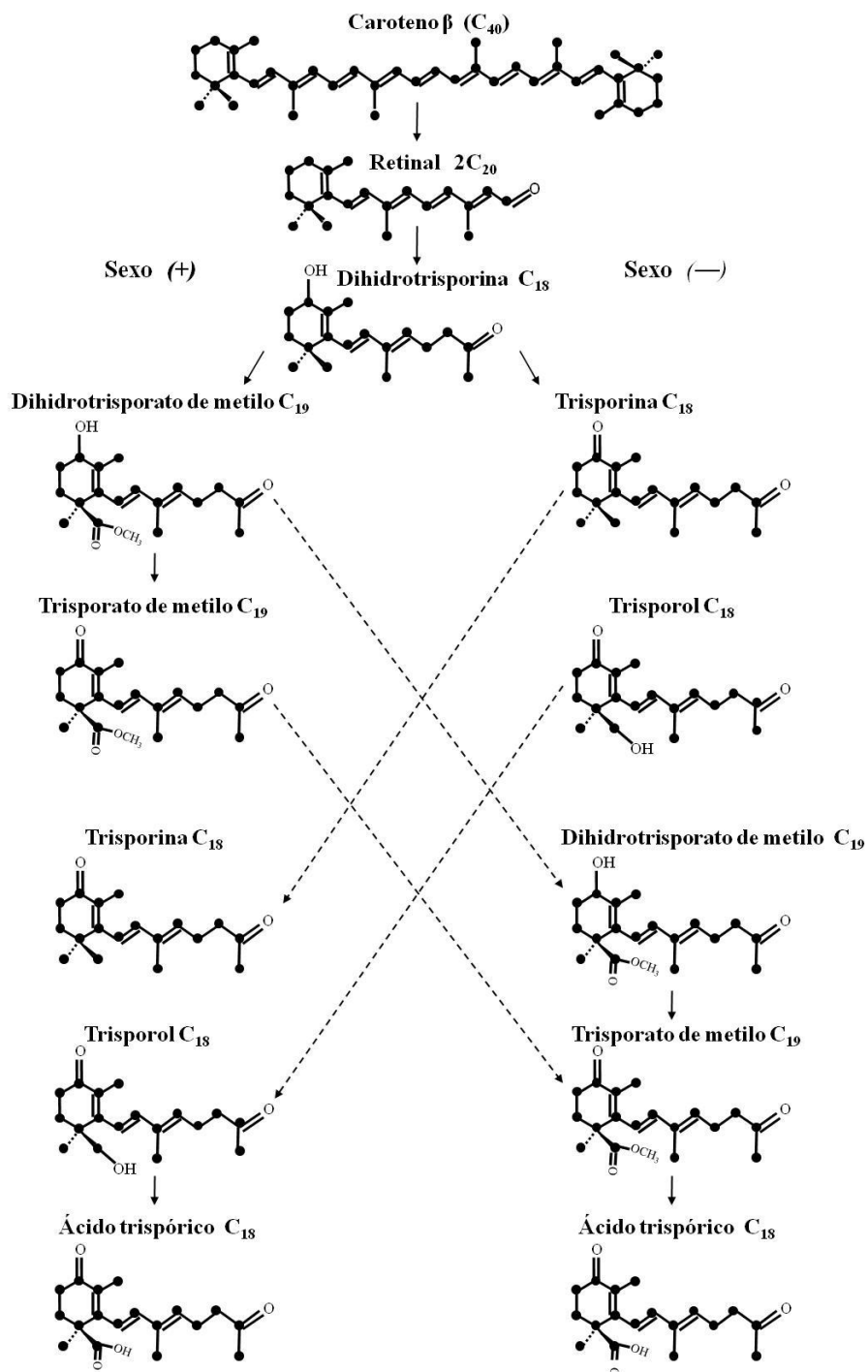


Figura 8 Biosíntesis postulada de trisporoides en Mucorales según (van den Ende, 1979; Sutter, 1987). Las flechas continuas representan reacciones enzimáticas y las discontinuas difusión de compuestos.

0.3.3 Pigmentos, aromas y moléculas reguladoras en plantas

Los apocarotenoides de plantas (Fig. 9) incluyen pigmentos, aromas y fragancias, moléculas reguladoras y compuestos con funciones desconocidas (Giuliano *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2007; Ohmiya, 2009).

La bixina, un C_{24} , deriva de la parte central del licopeno después de la ruptura de los dobles enlaces 5,6 y 5',6' (Fig. 9). Este apocarotenoide, el monometiléster de la norbixina, el correspondiente derivado dicarboxílico C_{24} , se obtiene de las semillas de *Bixa orellana* (achiote). *Escherichia coli* la produce cuando se le transfieren los genes responsables de su biosíntesis (Bouvier *et al.*, 2003a).

La crocetina, un C_{20} , deriva de la zeaxantina después de la ruptura de los dobles enlaces 7,8 y 7',8' (Fig. 9); se encuentra en los estigmas de *Crocus sativus* (azafrán), a los que confiere su color característico. El azafrán contiene también picrocrocina, un glucósido, que cuando se calienta da lugar al safranal, un C_{10} , responsable del aroma (Bouvier *et al.*, 2003b; Rubio *et al.*, 2008; Moraga *et al.*, 2009; Ahrazem *et al.*, 2010).

La ruptura sucesiva de los dobles enlaces 9,10 y 9',10' de carotenoides C_{40} de plantas produce un fragmento dialdehído C_{14} y dos ciclohexeno C_{13} (Fig. 9). Los derivados dicarboxílicos del C_{14} , como la micorradicina (Klingner *et al.*, 1995), se acumulan en raíces (Fester *et al.*, 2002), principalmente en las colonizadas por hongos micorrizas. En otros casos, ni la modificación del fragmento C_{14} ni sus derivados se conocen. Los derivados de los fragmentos del C_{13} se encuentran frecuentemente en flores, frutos y raíces colonizadas (Bouvier *et al.*, 2005; Auldridge *et al.*, 2006; Strack y Fester, 2006). Estos apocarotenoides proporcionan la fragancia de las rosas (Eugster y Märki-Ficher, 1991; Huang *et al.*, 2009), el aroma del tomate (Simkin *et al.*, 2004), el buqué del vino (Mendes-Pinto, 2009), entre otros. Algunos de estos apocarotenoides se glicosilan, con lo que se vuelven menos volátiles (Maicas y Mateo, 2005).

El apocarotenoide de plantas mejor estudiado es el ácido abscísico (Fig. 9), una hormona que se produce principalmente vía isómeros *cis* de carotenoides C_{40} (Schwartz *et al.*, 2003). Algunos de estos isómeros, como 9-*cis* violaxantina y 9-*cis* neoxantina, se cortan por una enzima específica. La ruptura produce xantoxina, el precursor C_{15} del ácido abscísico, y un compuesto C_{25} . Los isómeros de neoxantina parecen ser los substratos para la síntesis de ácido abscísico en *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés (North *et al.*, 2007). Con esta excepción, la mayoría del metabolismo del ácido abscísico se ha estudiado en maíz (Nambara y Marion-Poll, 2005).

Las estrigolactonas, otros apocarotenoides C_{18} , que actúan como hormonas en plantas, se producen por la ruptura sucesiva del caroteno β (Fig. 9). La primera ruptura ocurre en un enlace doble, 9',10', y produce β -apo-10'-carotenal, un C_{27} , e ionona β , un

C₁₃. La segunda ruptura ocurre en los enlaces 13,14 del C₂₇ y produce un compuesto C₁₈, el precursor de estas hormonas (Schwartz *et al.*, 2004).

Plantas

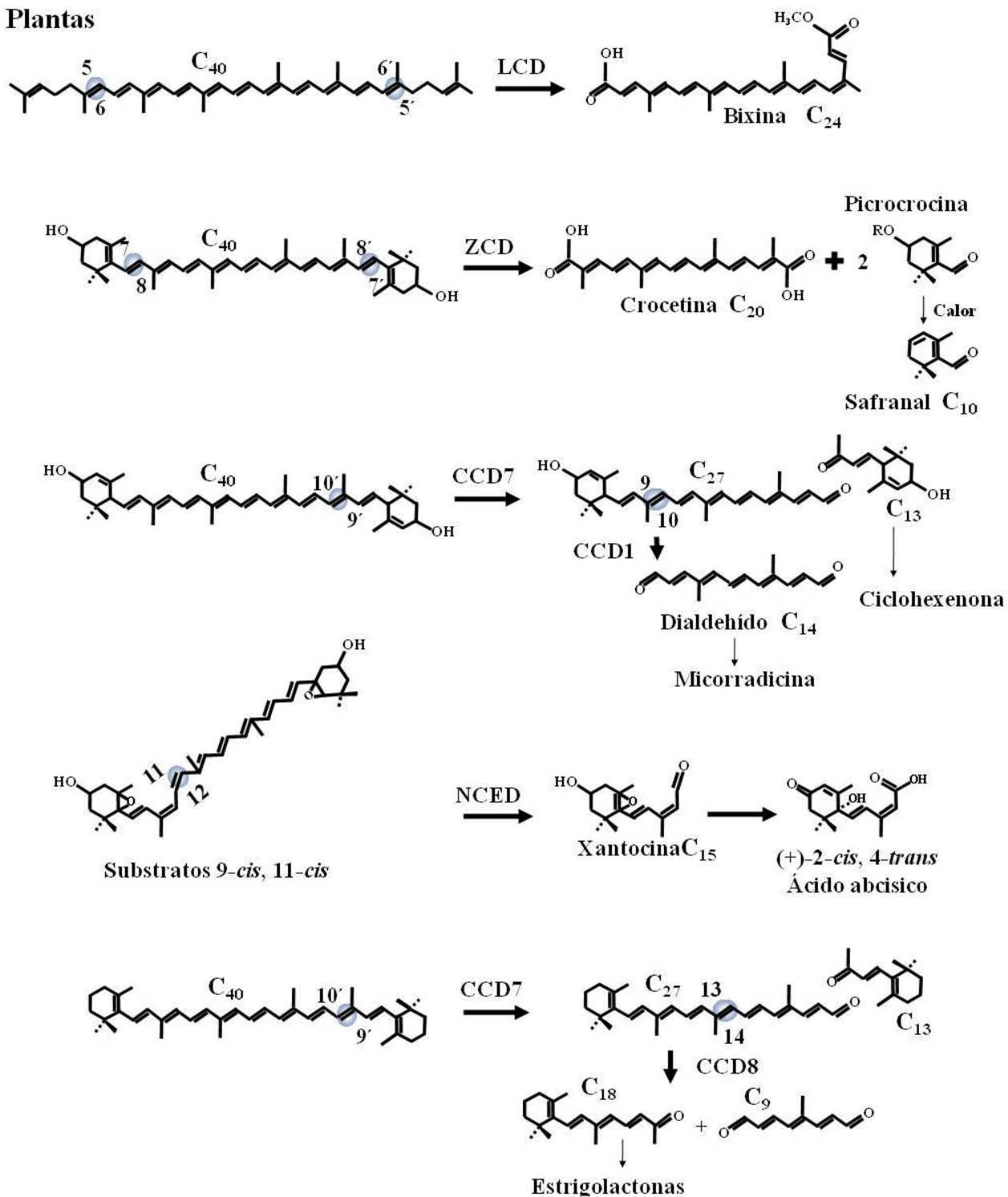


Figura 9 Apocarotenoides producidos por oxigenasas de plantas. LCD, dioxigenasa de licopeno;

ZCD, dioxigenasa de zeaxantina; CCD, dioxigenasa de carotenoides; y NCED, dioxigenasa de 9-*cis*-epoxicarotenoides. Los círculos señalan los sitios de corte. R, disacárido. Modificada de Walter y Strack (2011).

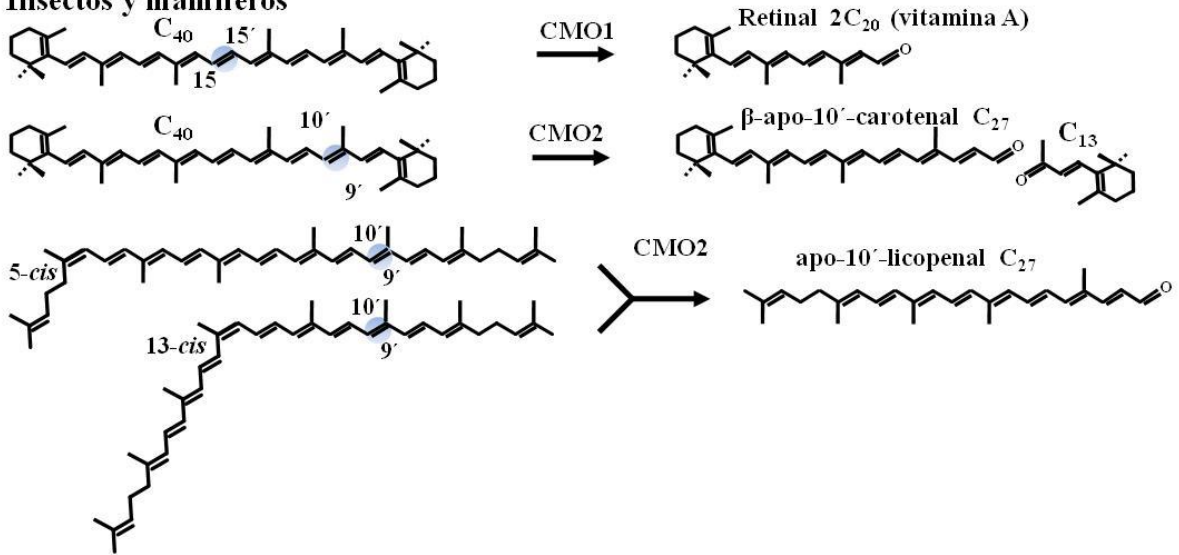
0.3.4 Retinoides

En insectos y mamíferos, incluyendo humanos, es frecuente la ruptura del doble enlace 15,15' de carotenoides C₄₀ (Walter y Strack, 2011) que da lugar a retinal C₂₀ (Fig. 10). Los retinoides como la vitamina A y el ácido retinoico tienen funciones en la visión del color y el desarrollo, respectivamente (von Lintig y Vogt, 2010).

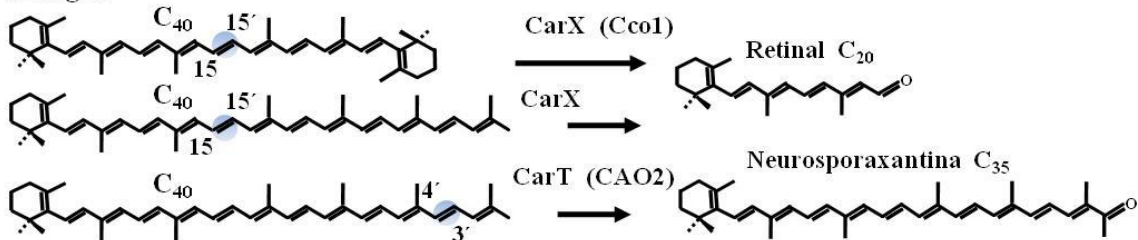
En hongos, como el ascomiceto *Fusarium fujikuroi* la ruptura del doble enlace 15,15' de caroteno γ y β (Fig. 10) produce retinal (Prado-Cabrero *et al.*, 2007b) que presumiblemente actúa como el cromóforo de proteínas fúngicas. En el basidiomiceto *Ustilago maydis* la ruptura del caroteno β también produce retinal (Estrada *et al.*, 2009).

En cianobacterias, la ruptura del doble enlace 15,15' del caroteno β y varios apocarotenoides (Fig. 10) produce retinal (Ruch *et al.*, 2005; Marasco *et al.*, 2006) mientras que la de los enlaces 9,10/9',10' o 7',8' produce apocarotenoides cuyo tamaño va de C₁₀ a C₁₇ (Scherzinger y Al-Babili, 2008).

Insectos y mamíferos



Hongos



Cianobacteria

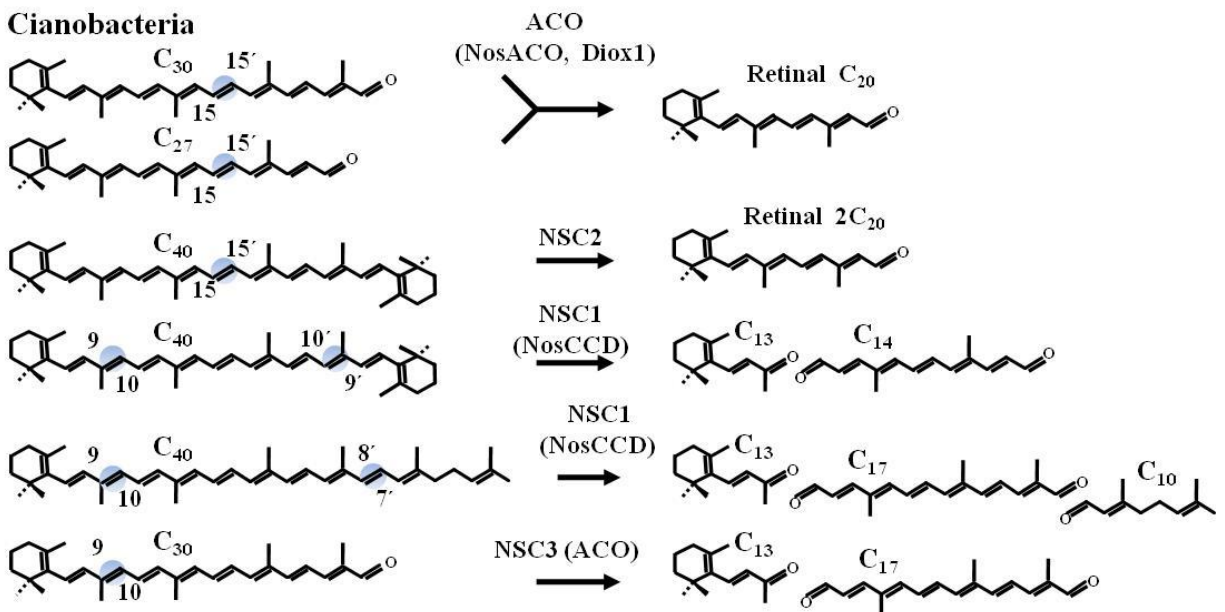


Figura 10 Apocarotenoides producidos por oxigenasas de varios organismos. ACO, oxigenasa de apocarotenoides; NSC, oxigenasa de caroteno β y apocarotenoides; CCD, oxigenasa de carotenoides; CarX, oxigenasa de caroteno β ; Cao2 y CarT, oxigenasa de toruleno; y CMO, monooxigenasa de carotenoides. Los círculos señalan los sitios de corte. Modificada de Walter y Strack (2011).

0.4 Oxigenasas de carotenoides

0.4.1 Actividades

Las oxigenasas de carotenoides son enzimas que catalizan la ruptura de estos isoprenoides y otros compuestos. Forman una familia de la que se conocen más de cien miembros. La primera, la dioxigenasa de un 9-*cis*-epoxicarotenoide (NCED1), se identificó en *Zea mays* (maíz) como el producto del gen *viviparous14* (VP14) y corta 9-*cis*-violaxantina para producir el precursor del ácido abscísico (Schwartz *et al.*, 1997). Las siguientes, las oxigenasas de ruptura de caroteno β (BCO-I y BCO-II), se identificaron en animales y producen retinal (von Lintig y Vogt, 2000; Wyss *et al.*, 2000; Redmond *et al.*, 2001) e ionona β (Kiefer *et al.*, 2001), respectivamente. Después se identificaron las dioxigenasas de ruptura de licopeno (LCD) y zeaxantina (ZCD) que producen bixina (Bouvier *et al.*, 2003b) y crocetina (Bouvier *et al.*, 2003a), respectivamente. Otros miembros como las proteínas del epitelio pigmentado de la retina (RPE65) no cortan carotenoides, si no que son isomerasas e hidrolasas que convierten *trans*-retinol a 11-*cis*-retinal (Redmond *et al.*, 1998).

La mayoría de las oxigenasas de carotenoides se agrupan en cinco subfamilias según el tipo de sustrato y la posición del doble enlace cortado. Dos subfamilias incluyen enzimas involucradas en el metabolismo de carotenoides en plantas, como las que cortan carotenoides en los enlaces 9,10 y 9',10' (Schwartz *et al.*, 2001) y las que cortan 9-*cis*-epoxicarotenoides (Taylor *et al.*, 2000). Otras dos subfamilias incluyen enzimas involucradas en el metabolismo de la vitamina A en animales, como las que cortan caroteno β en el enlace 15,15' (von Lintig y Wyss, 2001) y las que actúan como isomerasas e hidrolasas (Mata *et al.*, 2004). Esta subfamilia también incluye las oxigenasas que cortan carotenoides asimétricamente (Kiefer *et al.*, 2001). Otra subfamilia incluye enzimas involucradas en el metabolismo de lignina en bacterias, como las oxigenasas que cortan lignoestilbeno y otras moléculas parecidas, químicamente distantes de los carotenoides (Kamoda *et al.*, 2003). El lignoestilbeno, bifenol de lignina, tiene un doble enlace central como el de los carotenoides, que no forma parte de un sistema de dobles enlaces conjugados.

0.4.2 Estructura

Las oxigenasas de carotenoides se parecen por su secuencia y su estructura espacial. Siete aminoácidos, cuatro histidinas y tres glutamatos o aspartatos, se consideran esenciales para la actividad enzimática (Poliakov *et al.*, 2005; Redmond *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2005). Las histidinas coordinan un átomo de Fe^{2+} en el centro activo y los

otros se asocian a ellas.

La estructura secundaria es rica en láminas β . Se ha determinado la estructura tridimensional de tres enzimas de esta familia. ACO, una oxigenasa de apocarotenoides de *Synechocystis* sp. (Kloer *et al.*, 2005), RPE65, una isomerasa e hidrolasa de *Bos taurus* (Kiser *et al.*, 2009) y VP14, una oxigenasa de epoxicarotenoides de *Zea mays* (Messing *et al.*, 2010). Las tres conservan los citados aminoácidos esenciales y la abundancia de láminas β (Kloer y Schulz, 2006; von Lintig, 2010; Walter y Strack, 2011).

Las tres enzimas tienen una estructura general parecida (Fig. 11) a hélices de barco con siete láminas β dispuestas alrededor del átomo de Fe^{2+} y los aminoácidos esenciales. En cada una hay lazos de aminoácidos que completan la estructura y una superficie lipofílica que le permite asociarse a membranas. RPE65 tiene además una cisteína (el residuo 112) palmitoilada que refuerza la integración en la bicapa lipídica.

0.4.3 Mecanismo de reacción

Las reacciones catalizadas por las oxigenasas de carotenoides se conocen bien, pero se discuten sus mecanismos (Kloer y Schulz, 2006). El doble enlace C=C se rompe a los correspondientes aldehídos o cetonas usando oxígeno (O_2) como oxidante e ión ferroso (Fe^{2+}) como cofactor, pero se desconoce si la reacción sigue un mecanismo de monooxigenasa (Leuenberger *et al.*, 2001) o de dioxigenasa (Schmidt *et al.*, 2006). A menudo las oxigenasas de plantas son llamadas dioxigenasas y las de animales monooxigenasas (von Lintig, 2010; Walter y Strack, 2011).

Las reacciones *in vitro* se llevan a cabo en presencia de Fe^{2+} en exceso (von Lintig y Vogt, 2000) o con un agente como ascorbato (Schwartz *et al.*, 1997), ditiotreitól (Ershov *et al.*, 1993) y Tris (2-carboxi-etil) fosfina HCl (Lindqvist y Anderson, 2002) que lo mantenga reducido, pero no ha sido demostrado que estos agentes participen en la estequiometría de la reacción (Kloer y Schulz, 2006).

El sustrato tiene que entrar en la cavidad donde se encuentre el lugar activo. Si la entrada a la cavidad es suficientemente estrecha, solo pueden entrar moléculas con al menos un extremo lineal, lo que excluye sustratos como el caroteno β , por ejemplo. El lugar de acción sobre el sustrato está determinado por la distancia del Fe^{2+} al fondo de la cavidad.

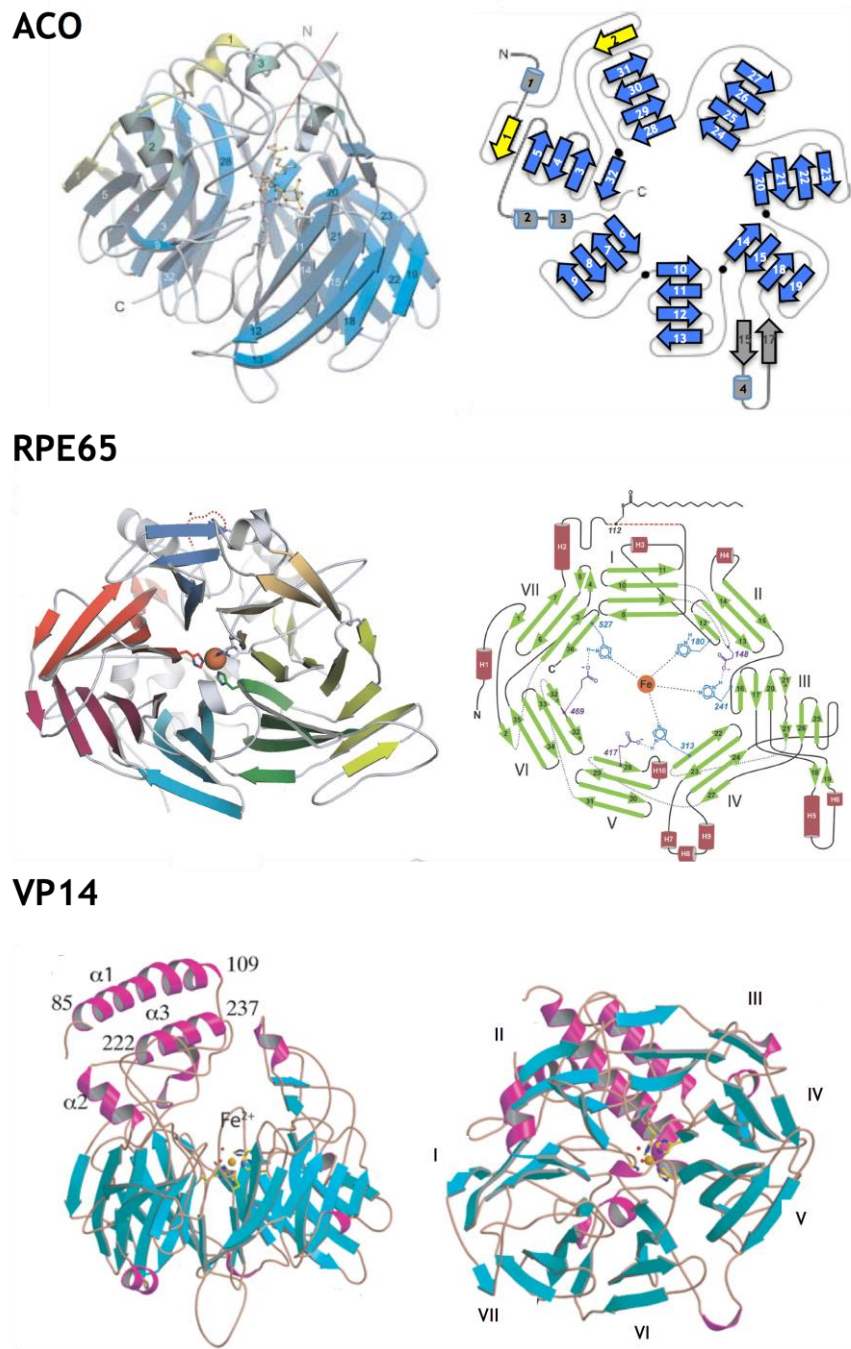


Figura 11 Estructura tridimensional de tres miembros de la familia de oxigenasas de carotenoides según (Kloer *et al.*, 2005, Kiser *et al.*, 2009 y Messing *et al.*, 2010). ACO, oxigenasa de apocarotenoides de *Synechocystis* sp.; RPE65, isómera e hidrolasa de *trans* retinol de *Bos taurus* y VP14, oxigenasa de epoxicarotenoides de *Zea mays*. Una hélice de siete láminas β constituye la estructura de estas proteínas.

Parte I

Oxigenasas de *Phycomyces* que cortan carotenoides

1.1 Introducción

Los ácidos trispóricos y otros trisporoides, compuestos C₁₈, entre los cuales presumiblemente se encuentran las feromonas que median la comunicación entre micelios de sexos opuestos de los Mucorales, derivan de caroteno β, un C₄₀ (Austin *et al.*, 1969). Son, por tanto, apocarotenoides.

Se propuso una ruta biosintética en la que dos moléculas de retinal, un C₂₀, son los primeros productos de la ruptura del caroteno β (Austin *et al.*, 1970; Werkman y van den Ende, 1974) (Fig. 12, Panel I). Se basó esta propuesta en la creencia de haber encontrado retinal en *Phycomyces* (Meissner y Delbrück, 1968) y que este puede dar lugar a ácidos trispóricos en *Blakeslea* (Austin *et al.*, 1970).

Como no se pudo confirmar la presencia de retinal en *Phycomyces*, se propuso una ruta biosintética alternativa, en la que dos compuestos C₁₈ son los primeros productos de la ruptura de caroteno β y dan lugar directamente a ácidos trispóricos y otros trisporoides conocidos, también C₁₈. Cuando se encontraron compuestos C₁₅ similares, se llamaron apotrisporoides porque se supuso que proceden de la pérdida de tres carbonos de la cadena lateral de los trisporoides (Fig. 12, Panel II) (Sutter y Whitaker, 1981; Sutter y Zawodny, 1984). Los fragmentos de 2, 3 y 4 carbonos predichos por estas hipótesis no han sido identificados. Ambas rutas han sido asumidas hasta hace poco (Schachtschabel *et al.*, 2005; Schachtschabel y Boland, 2007).

El descubrimiento en *Phycomyces* de dos ácidos hidroximetilhexadienoicos (Polaino *et al.*, 2010), ambos C₇, implica que el caroteno β se rompe en tres fragmentos (Fig. 12, Panel III). Estos compuestos, (2*E*,4*E*)-6-hidroxi-5-metilhexa-2,4-dienoico y (2*E*,4*E*)-6-hidroxi-2-metilhexa-2,4-dienoico, se derivan fácilmente del presunto producto del corte (2*E*,4*E*)-2-metilhexa-2,4-dienodial. Estos compuestos C₇ y otros metilhexanoides también se han identificado en *Blakeslea* (Barrero *et al.*, 2011).

El corte del caroteno β, esencial para la biosíntesis de los ácidos trispóricos y otros trisporoides, podría ser mediado por oxigenasas como las que cortan carotenoides en otros organismos (Kloer y Schulz, 2006; Walter y Strack, 2011). Nos propusimos identificar tales proteínas y las reacciones que catalizan (Fig. 12, Panel IV). En este trabajo hemos contado con la colaboración del Dr. Salim Al-Babili, de la Universidad de Friburgo, Alemania.

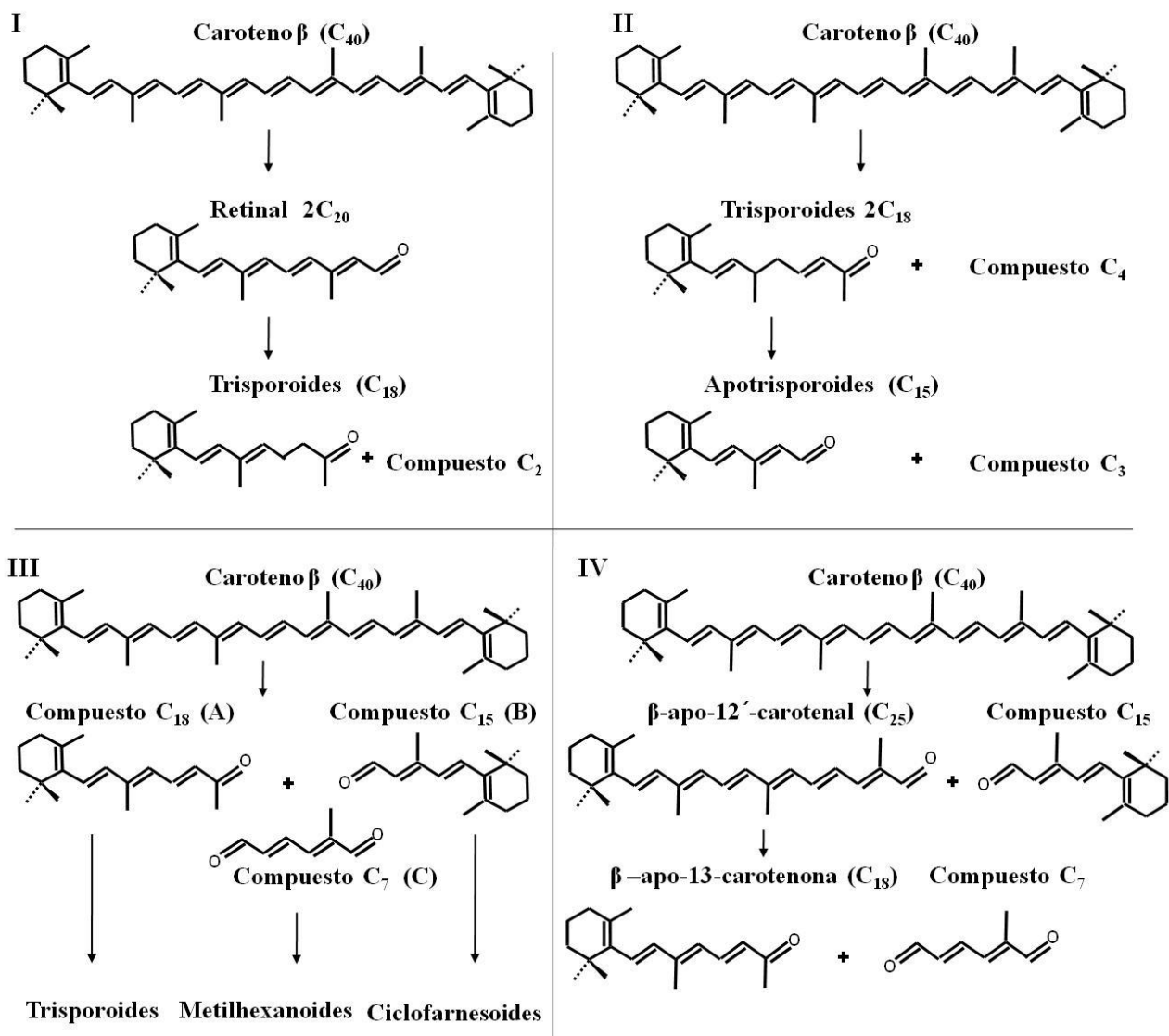


Figura 12 Propuestas de rutas biosintéticas de los trisporoides y otros apocarotenoides en **Mucorales**. I, Werkman y van den Ende, 1974; II, Sutter y Whitaker, 1981; Sutter y Zawodny, 1984; III, Polaino *et al.*, 2010, 2012; y IV, Esta Tesis.

1.2 Resultados

1.2.1 Presuntos genes para oxigenasas de carotenoides en el genoma de *Phycomyces*.

La comparación de secuencias de oxigenasas funcionales de carotenoides de diversos organismos con el proteoma de *Phycomyces* identificó cinco secuencias de éste (79747, $E=e^{-0,001}$; 77754, $E=e^{-144}$; 76627, $E=e^{-50}$; 64508, $E=e^{-126}$; y 58172, $E=e^{-50}$) como posibles oxigenasas de carotenoides. Se encontraron pocas coincidencias de aminoácidos, pero significativas, entre estas cinco secuencias y las de oxigenasas de otros organismos como ACO de *Synechocystis* sp. (Kloer *et al.*, 2005; Ruch *et al.*, 2005), CarT de *Fusarium fujikuroi* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007a), CCD8 de *Arabidopsis thaliana* (Schwartz *et al.*, 2004) y BCO1 de *Homo sapiens* (Yan *et al.*, 2001). El número de coincidencias fue de 52 entre 77754 y 64508 a solo 11 entre 64508 y ACO y en todos los casos representó una pequeña fracción del número de aminoácidos en las proteínas, que fue de 490 en ACO a 688 en 76627. Cuando se rastreó el proteoma de *Phycomyces* con todas las secuencias de oxigenasas de carotenoides (tomadas de Kloer y Schulz, 2006) no se identificaron otras secuencias.

Las secuencias 79747, 77754 y 64508 contienen los cuatro residuos de histidina y tres de glutamato o aspartato considerados esenciales para la actividad enzimática (Fig. 13). La secuencia 76627 conserva dos histidinas y dos glutamatos y la secuencia 58172 conserva solo un glutamato.

Los resultados descritos en las páginas siguientes mostrarán que la secuencia 79747 es el producto del gen *carS* que había sido definido hace mucho por sus mutantes y la secuencia 77754 es el producto de un gen hasta ahora desconocido que debe ser llamado *acaA*. Ambas tienen actividad oxigenasa de carotenoides. No se asignaron nombres a los genes responsables de las secuencias 76627, 64508 y 58172 porque su función sigue siendo desconocida.

<i>PhycomycesS</i>	-----MLTPAAENPLREQGLPAPSPTGYNNV	26
<i>PhycomycesA</i>	-----MILLSFIIALLTMVWVNPFLVSRFTTYFNGODLLAAQTTVF-RNT	47
<i>Phycomyces6</i>	-----MIYLLTILIIILAVIITWLDPLKSLDRLNFLPELIASFQVSTF-RNA	47
<i>Fusarium</i>	-----MALNGPGVYHRTREHEQEDASDITKNILAESKSWPNEAAFDRL-	44
<i>Homo</i>	-----MDIIFGRNR	9
<i>Arabidopsis</i>	MASLITTKAMMSHHVLSSTRITTLYSDNSIGDQKTKKQPVPHRLFARRIFGVTRAVINSAAPSPLEKEKVEGERRCHVAWTSV	86
<i>Synechocystis</i>	-----MVTSPPTSSPSQSRYSYPQDWLRGYQSQ	27
<i>PhycomycesS</i>	PAFNKPEVELTIEGTTIPEWVNGVMYRAGSGRYNL-LLENQDTFHIGHPFDGLAMLRH--FEIS-GET-QT-VQYSSRHTSH-G-VER	104
<i>PhycomycesA</i>	PEKRTPEWFPVKGRVDFWENGLMVRVGPVKYNI-EQANGTTTAINHAFDGMPPMHR--FEIS-SER-QA-VRYNSRNISEE--FES	125
<i>Phycomyces6</i>	PEIRHKVPIKICCPDWENGLMVRVE-----KEDGSTFSIKHAFDGMPLYLHR--FEIS-S-TSQT-VRYNSRNLAESEY--EV	118
<i>Fusarium</i>	EHHRGLRLRLTKCTIPSWAAGSLYRGTGQSRVEDTARCTHF-TTHFDFGFAQTHR--FDIIPSEDGETQVWYSSRRQADENIADV	127
<i>Homo</i>	KEQLEPVRRAKVTGKIPAWLQGLLRNGPGM-----HTVGEBSR-YNHWFDCGLALLHS--FTIRDGE-----VYRYSKYLRSDTYNTN	82
<i>Arabidopsis</i>	QQENWEGELTVCGKIPWLNGLTYLRNGPGL-----WNIQDHD-FRHFDFGMYSTLVKLCDFD--GRIFAAHRLLESDAYKAAKHNHR	164
<i>Synechocystis</i>	PQEWYVWVEDVEGSIPEPDLQGLTYLRNGPGL-----LEIQDRP-LKHPFDGDMVTAFRP--GD--GRVHFQSKFVRTQGYVEE	101
<i>PhycomycesS</i>	RIREKDPPLL-TF--GPDPCCTIFGRIQSVYHHISKFGANAQIQEGDPEFD--MVNVTITPNFPLGERLEAE-TGVKR-GDAL-VV	182
<i>PhycomycesA</i>	SIA-KDNGQGKIFF-GHQPTVTSVKQRLKDIYLRFDMSLLSRRLDETS PSSQPVGVTATPNFPIPPVYKAADKNNGESDRVL-VA	208
<i>Phycomyces6</i>	SVV-RDNGMCKIF-YGHVPMNMSIWQRIYNALRISTALYNSLFDISLPASSQAIQVTVSPNFPPIAACVEEDRNNGRDGRVL-VT	201
<i>Fusarium</i>	KKKQWRSGM--TFQKADPCVGIFAKVMTVFEPKLGNNVALLANVPGPKDEETEVSNGVPGP--LHRVN--TSN-----LVFV-	200
<i>Homo</i>	IEANRIVVSEFGTMAYPDCKNIFSKAFSYLSHTIP-----DF-----TDNCLI-NIMKCGEDFYA	137
<i>Arabidopsis</i>	LCYREFSETPKSVIINKNPFSGIIEIVRL-----FSGESLTDNANTGVIKLGDGRVMC	217
<i>Synechocystis</i>	Q-KAGKMIYRGVF--GSGPAGGWLKTI-----FDLR-LKNIANTNTIYWGDRLL-A	147
<i>PhycomycesS</i>	KRDANTLQ-LVDNKTLPKIKMFTYGHVNDKLGQQLCASHHQYDEETDEYVNFVTRLGPI--PSFQSYT-LGPYLPTEPESKEKMPA	264
<i>PhycomycesA</i>	KTDANMLQQL-NSDTEPKRRLFNYNFNEFKKLGKDSAAHHQYDPIKTEINFLVDM-----FPARLQVSSVTEPES-KITI--	281
<i>Phycomyces6</i>	KTDANMLQQL-HPDTEPERLNFYTSIDNRKIGDASAAHHQYDPIKTEINFLVDM-----FPTRQIFSSVTEPES-KITI--	274
<i>Fusarium</i>	STDYTGIRRI-DPSTHPLAETQYDLHPSLSGSCSQAQDDESDGLFNFNLAFG-----RVPTTYRIFRVDASTGETEVLAT	279
<i>Homo</i>	TSEFNIRKI-NPQTELETLEKVDYR--KYVAVNLAATSEPHYDEAGNVLMNGTSTIVEKGTKYVIFKIPATVPEGKQC-KSPWKH	218
<i>Arabidopsis</i>	LTEQKGSILVDHETETIGKFEYDDV--LSDHMIQSAHPVITE-T-EMWTLIPD-----LVKPGYRVVMEAGSNKREVV	289
<i>Synechocystis</i>	LWEGGQPHRL-EPSNLEATIGLDDLGGI--LAEQQLSAAFRIDPASTFDGQPCYVTFISI-KSSLST-LTLELLEDPQC-KLLRQ-	226
<i>PhycomycesS</i>	PQVRLHEPIYRHLGAWRTLEPLKPAIYHSPSMKRYNIIIPNFPYYSFGGMSALYSCAYQTFYW--DETRPTLPHVVD-R-NTGR	346
<i>PhycomycesA</i>	----LADFTHRLDEKTRVQV--VYTHFENIKDYIILPEQPLAYSNIGLDLMKSGTVITGMKW--DDTIDTYIHIIV-SRHGKH	356
<i>Phycomyces6</i>	----LATITHRLDGTQGSIRPS--YTHSFGMKDYIILPEQPLAYSNIGLDLMKSGTVITGMKW--DDTIDTYIHIIV-SRHGKH	350
<i>Fusarium</i>	-----ISDLNVPP--AYMHSFLEENHVVICIPASHYAWRGLKQWEGNIIDSMSK-PFDKERKCKWLVRHRHGK-	347
<i>Homo</i>	-----TEVFCSPRSLLSPS--YHBSGVTENNVVIFLEQPFRLDILKMATAYIRMSWASCLAFHREKTYIHIIDQR-TROP	294
<i>Arabidopsis</i>	-----GRVRCRSGSWGPEW-V--HSAVTEENNVVPEMPLRYSVKNLLRAEPTPLYKFE-WCPQDG--AFIHVM-SKLT-GE	358
<i>Synechocystis</i>	-----KTETFPEF-AFTHDEAIPHYAIYFLQNNVTLN--GLPYL-FGLRGAGECVQHPDKPAQIILV-PRDG-GE	291
<i>PhycomycesS</i>	HVATYDADPCFPHSANAWDEEVDLPCCGSKERVIYNDYCVYENTDIVDASFDLGKTPGFDASKVEPARFKIKRHTDDKKNDSISP	432
<i>PhycomycesA</i>	LVASVPVETEFPHVANAWDS--VDAQGRQ--VIDMDICAFENADIM-CQ-----LHTF-A--KPVROAEYDSHVKKQLLELSKQ	427
<i>Phycomyces6</i>	-ITTIADDPFLCFFHNSWQS--VNKNGFP--VINADLCTYLDADIM-FQ--VNTL--GD-----PVRO--SNYMDHLK-EQARRK	418
<i>Fusarium</i>	LVAFFSTPAFFPHSANAFENKIEDDEGTEQTDLFDLAKYNNMDIILKGFY--YDVL--MD-----RDDA--T-KKYWF--	414
<i>Homo</i>	VQTKFYDAMVVFHHVNAVE-----EDCC--IVBDVIAVE--DNSLYQLFYLANL-NQDF--KENSRLTSVP-PLRRFAV--	361
<i>Arabidopsis</i>	VVASVEVFAVYVTFHFNAYEED-KNGDGKA-TVIIAD-CCEHNADTRILDM-----LR-LD-----TLR--SSHGHV-----	420
<i>Synechocystis</i>	-IKRIPVQAGVFHHANAFEE-----NCK-----IIDSICY-NSLP--QVD-----TDGDF-----R--S--T-----	337
<i>PhycomycesS</i>	SQLRRYRLGNVPVSSNAPETSRWSPKGTIGLLSGIFDNKRRVASYTVLGSDIELPRFNSNPNLRKYRYVWGVCSKHAPSASYASGA	518
<i>PhycomycesA</i>	SQ--YNGMNI PPLRQPSFGDLRRYQ-----IVLENGTGEATYRTIASNVFARYSQDYAMRKHKFFVYG-C--QLISVTKSN	500
<i>Phycomyces6</i>	SQ--ATKVNIGITVP--PIKLESCLDRRYTITLGNKTSV-A-YRCITENEDFPRFSQDFMRESKYLYG-C-RFHP-P-TQSDG	493
<i>Fusarium</i>	--KNDRYKNCAPTTRYRFRPLSAPTDP--T-TFASAEQVLA--IPSPHAGELPTIHPRLNKGKPYRYVYS-----ASLRGLT	486
<i>Homo</i>	--PLHVD-KNAEVG-----TNLIKVASTTA-T-ALKEEDGQVYQPEFLYEGLELPRVNYAHNGKQRYRYV-----ATGVQWSP	430
<i>Arabidopsis</i>	-----LPDARIGRFRIFLDGSKYG-----KLETAVEA--EKHGRAMDMSINPLVYGQKRYRYVA-C--GAQ--RPN	481
<i>Synechocystis</i>	-----NFDNL--DPQLWRFTIDP-----AAATVEK-QLMVSRCCIEFPVHVPQVGRPYRYVYMG-----AAHSTGNA	398
<i>PhycomycesS</i>	VVNGLIKLDLDPKPTLCKNTEEGSSAKIWEPCGSCSEPHFAVHPQRAEDDGLVLISTVNTT-TPD-GKESCFLLIVDAA--TMVEV	600
<i>PhycomycesA</i>	ERYDLVKVND--D--GSVIRYSQ--E-GCACSEPHFAPRPGTEEDDGLVMSLVNKLKEDPSKDYCFLLLLDA--KTMQEV	574
<i>Phycomyces6</i>	EHTRLKLV--DT-E--TGTITQYGG--PGYCCSEPHFAPRPGSDDEDGLVMSLVNHFDFNEDPMDSCRNVLLDA--KTMKEV	567
<i>Fusarium</i>	SVDALVKTFDD--TSEAFIWTGP-E-GHTPGEVHVPREGAEEDDGLVFSLVV-----DGVNE--KAYILCLNGKTMEL	556
<i>Homo</i>	IPTKIKY--DIL-----TK--SSLK-WREDDCWPEPHFVAPGAKDEDDGVILSAIVST--DPQK-LPFLLLIDA--KSFTEL	500
<i>Arabidopsis</i>	FPNALSKV--DIVEK-----VKNWHEHGMIPSEPHFVPRGATHEDDGVVISVS--EENGGS-FAILLD--GSSFEEI	549
<i>Synechocystis</i>	PLQAILV--DL-E--SCTETLRS--FAPHG-FAGEPHFVPRGGVAEDDGNLLCLLYKA--DLHR-S-ELVILDAQDITAPAI	470
<i>PhycomycesS</i>	GRITTLGAFTAMTHGSAFVDTNGKGVAVN-----	628
<i>PhycomycesA</i>	ATCQVQGFATTTHGSAFVDHFNENVSIN-----	602
<i>Phycomyces6</i>	ASCEIGQFAITTHGSAFVDDYFESVSIN-----	595
<i>Fusarium</i>	GRAEADFAIGQGHGHLHPAA-----	577
<i>Homo</i>	ARASVDVDMHMDLHGLFITDMWDTKKQAASEEQDRASDCHGAPLT	547
<i>Arabidopsis</i>	ARAKFPYGLPYGLHGCWIPKD-----	570
<i>Synechocystis</i>	ATLKLKHHIYPPLHGSWAQT-----	490

Figura 13 Alineamiento de tres presuntas proteínas (CarS, AcaA y 64508) de *Phycomyces* con oxigenasas de carotenoides de un hongo (CarT de *Fusarium fujikuroi*), un mamífero (BCO1 de *Homo sapiens*) y una planta (CCD8 de *Arabidopsis thaliana*) y una bacteria (ACO de *Synechocystis* sp.). Los cuatro residuos de histidina y los tres de glutamato o aspartato considerados esenciales para su actividad se señalan con asteriscos. Los residuos compartidos por las siete secuencias se marcan en negro. Los compartidos por al menos cuatro secuencias aparecen en negritas.

1.2.2 Transcritos de varios genes

Los transcritos de las cinco secuencias de *Phycomyces* se detectaron en micelios vegetativos de dos a cuatro días de edad (Fig. 14, Panel I), lo que sugiere que estas secuencias son genes activos. La interacción sexual incrementó los niveles de transcrito del gen *carS*. El efecto para el gen *acaA* fue menor, pero significativo. Los niveles de transcrito de los tres genes restantes no variaron durante la interacción sexual.

Los transcritos de los genes estructurales para la biosíntesis de caroteno de *Phycomyces* se incrementan durante la interacción sexual (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008). Tal es el caso de *carB* (Fig. 14, Panel II), responsable de la deshidrogenasa de fitoeno, una enzima esencial en la ruta. El efecto para *carRA*, responsable de la sintasa de fitoeno y la ciclasa de licopeno, dos enzimas esenciales en la ruta, fue menor pero significativo.

Los transcritos de los genes *sexM* y *sexP*, responsables de sendas proteínas con dominio HMG, dos presuntos factores de transcripción, se detectaron en el micelio vegetativo de dos a cuatro días de edad (Fig. 14, Panel III), lo que corrobora que son genes activos (Idnurm *et al.*, 2008). El efecto para el gen *sexM* fue considerable mientras que para *sexP* fue menor, pero significativo.

Los máximos niveles de transcritos de *carB*, *carRA* y *carS* exhibieron pautas similares; los de *sexP* y *sexM* ocurren antes, como cabe esperar de factores de transcripción para las funciones sexuales.

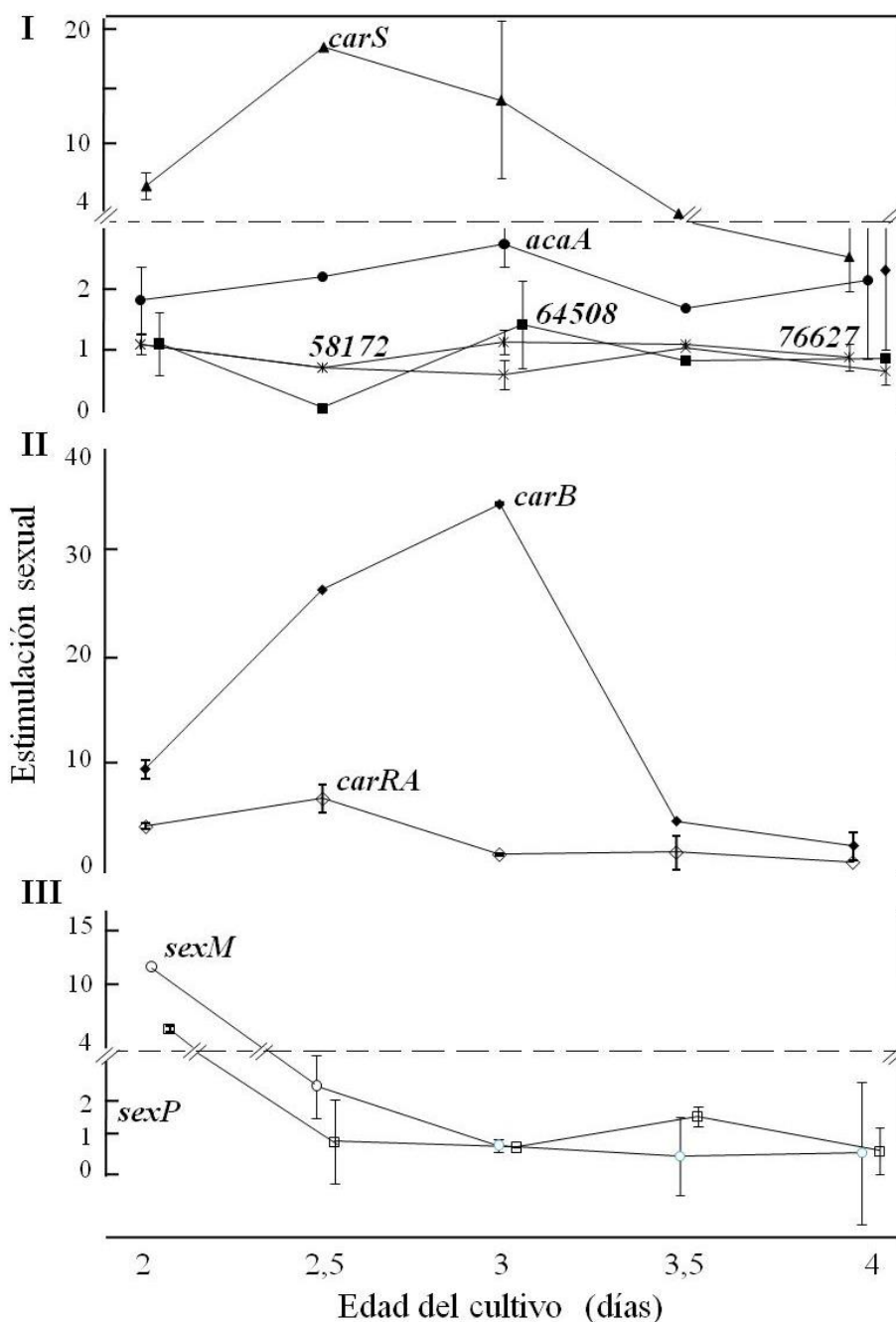


Figura 14 Efecto de la interacción sexual sobre los niveles de transcrito de nueve genes de *Phycomyces*: las cinco secuencias parecidas a las de oxigenasas de carotenoides, *carB* y *carRA*, genes estructurales para la carotenogénesis, y *sexM* y *sexP*, genes que determinan el sexo. Se presentan los niveles de transcrito (media y su desviación típica en tres experimentos independientes) en cultivos mixtos de las estirpes silvestres A56 (+) y NRRL1555 (—). En I y II, esos niveles se dividen por las medias de los cultivos separados de las mismas estirpes. En III, se dividen por las medias de los cultivos separados de las estirpes del sexo determinado por los genes: A56 para *sexP* y NRRL1555 para *sexM*. Los niveles de transcrito se obtuvieron por PCR en tiempo real. Todas las mediciones se calibraron con las del gen *actA* (para actina) en el mismo cultivo.

1.2.3 Actividades enzimáticas

1.2.3.1 Actividad *in vivo* de CarS y AcaA en *E. coli*

Los ADNc de los genes *carS* y *acaA* se insertaron en fase con el dominio tiorredoxina en los vectores pThio (LaVallie *et al.*, 1993) que expresarían las correspondientes proteínas quiméricas y facilitarían su solubilidad en el citoplasma. Las construcciones se introdujeron en células de *E. coli* que acumulan licopeno o caroteno β por transformación con los genes necesarios de *Erwinia herbicola* (Hundle *et al.*, 1994; Prado-Cabrero, *et al.*, 2007b; Estrada *et al.*, 2008).

En las células que acumulan caroteno β , la proteína quimérica tiorredoxina=CarS ocasionó la formación de β -apo-12'-carotenal (Fig. 15). Este C_{25} se identificó por comparación de su espectro de absorción, su tiempo de retención y su masa molecular $[M+H]^+$ (351.32) con los de un patrón auténtico (Fig. 16, Panel derecho). Las células acumularon también el correspondiente alcohol, β -apo-12'-carotenol.

La proteína quimérica tiorredoxina=AcaA no tuvo actividad detectable, pero la coexpresión de tiorredoxina=CarS y AcaA como proteínas separadas en un operón con un solo promotor ocasionó la formación de β -apo-13-carotenona (Fig. 15). Este C_{18} se identificó por comparación de su espectro de absorción, su tiempo de retención y su masa molecular $[M+H]^+$ (259,23) con los de un patrón auténtico (Fig. 16, Panel izquierdo).

En las células que acumulan licopeno, la coexpresión de tiorredoxina=CarS y AcaA como proteínas separadas en un operón con un solo promotor ocasionó la formación de apo-13-licopenona (Fig. 17). Este C_{18} se identificó por comparación de su espectro de absorción, su tiempo de retención y su masa molecular $[M+H]^+$ (259,24) con los de un patrón auténtico (Fig. 18). El mismo resultado se obtuvo en el experimento simétrico, con tiorredoxina=AcaA y CarS libre. La expresión separada de las proteínas quiméricas tiorredoxina=AcaA y tiorredoxina=CarS no dio actividad detectable.

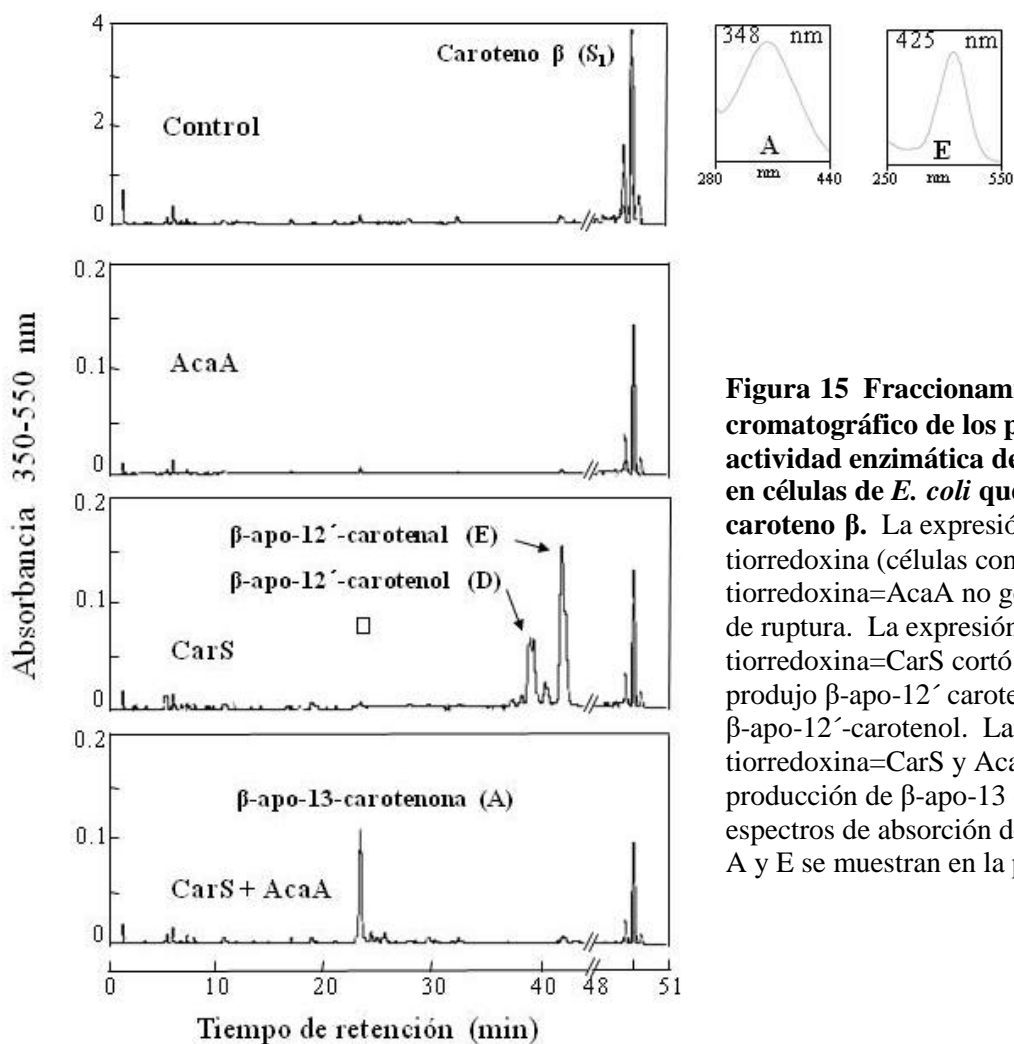


Figura 15 Fraccionamiento cromatográfico de los productos de la actividad enzimática de CarS y AcaA en células de *E. coli* que producen caroteno β. La expresión de tiorredoxina (células control) y tiorredoxina=AcaA no generó productos de ruptura. La expresión de tiorredoxina=CarS cortó el sustrato y produjo β-apo-12' carotenal y β-apo-12'-carotenol. La coexpresión de tiorredoxina=CarS y AcaA ocasionó la producción de β-apo-13 carotenona. Los espectros de absorción de los productos A y E se muestran en la parte superior.

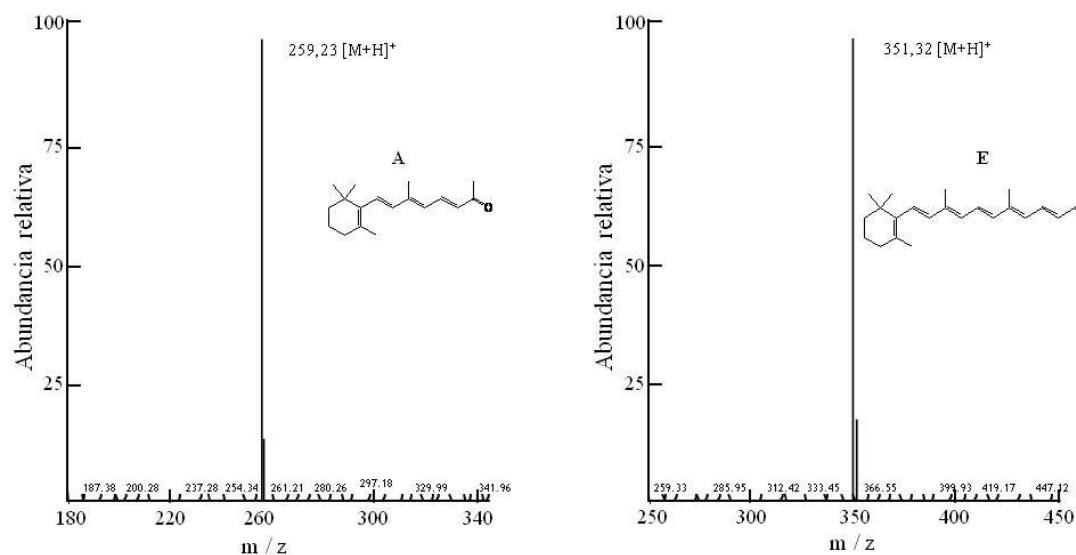


Figura 16 Espectrometría de masas de los productos A y E (Fig. 15). Las masas moleculares estimadas coinciden con las de los iones moleculares de β-apo-13-carotenona y β-apo-12'-carotenal, respectivamente. Los productos se purificaron previamente por dos cromatografías seguidas y distintas.

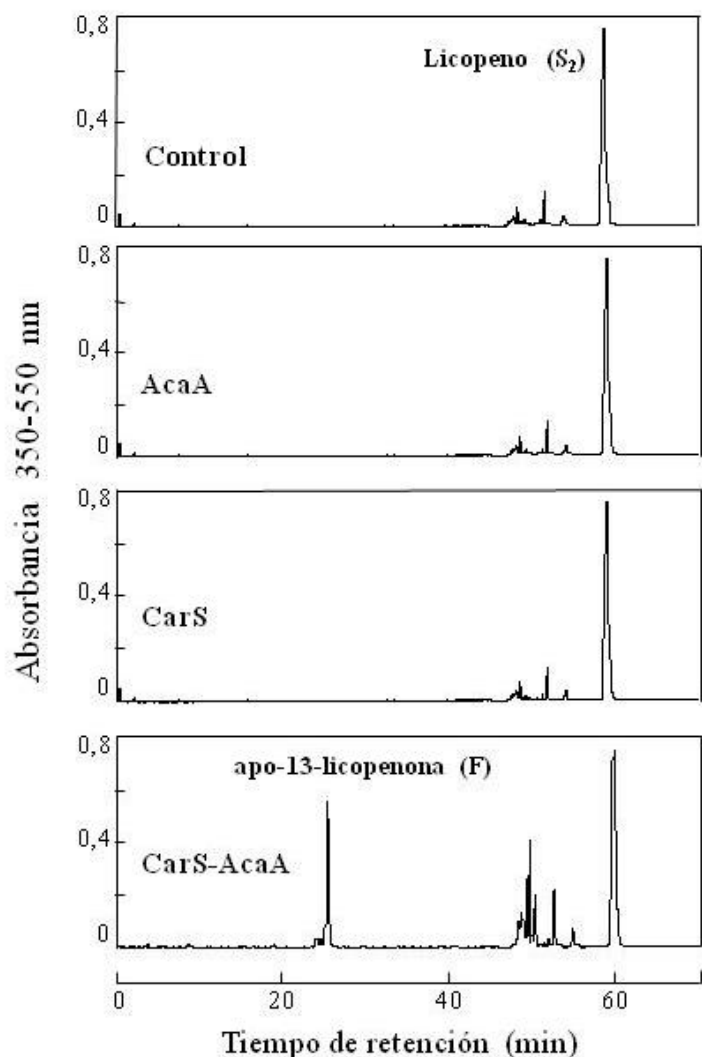


Figura 17 Fraccionamiento cromatográfico del producto de la actividad enzimática de CarS y AcaA en células de *E. coli* que acumulan licopeno. La expresión de tioredoxina (células control), tioredoxina=AcaA o tioredoxina=CarS no generó productos nuevos. La coexpresión de tioredoxina=CarS y AcaA condujo a la producción de apo-13-licopenona. El espectro de absorción del producto F se muestra en la parte superior.

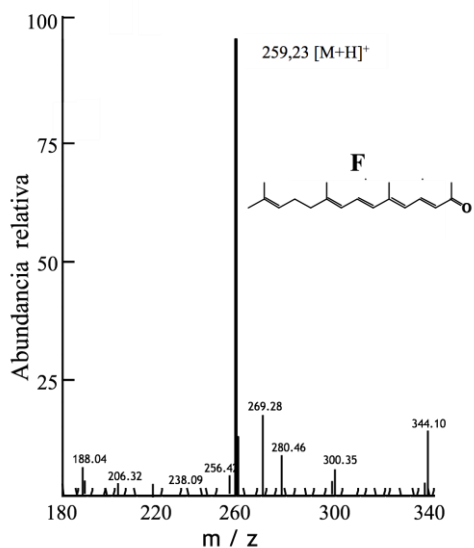


Figura 18 Espectrometría de masas del producto F (Fig. 17). La masa molecular estimada coincide con la del ion molecular de apo-13-licopenona. El producto se purificó previamente por dos cromatografías seguidas y distintas.

1.2.3.2 Actividades *in vitro*

1.2.3.2.1 Expresión heteróloga

Los ADNc de los genes *carS* y *acaA* se insertaron en fase con el dominio transferasa de glutatión (GST) en los vectores pGEX (Kaelin *et al.*, 1992) para la expresión y purificación de las enzimas tras su introducción en *E. coli*.

La movilidad electroforética de las proteínas quiméricas coincidió con el peso molecular estimado para 629 y 603 aminoácidos, respectivamente (Fig. 19).

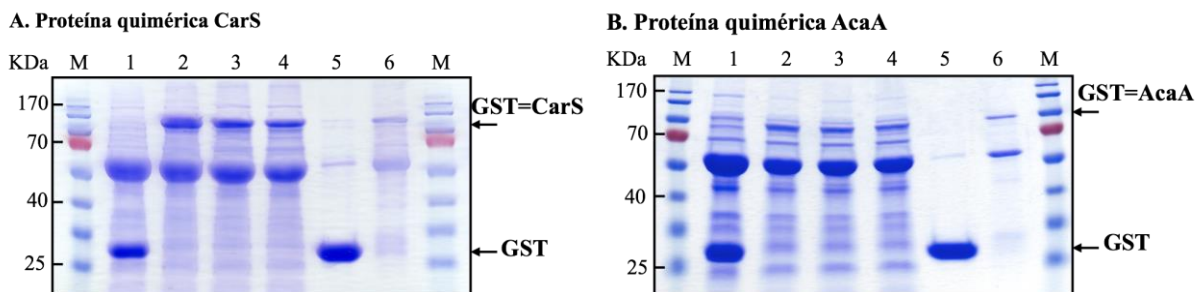


Figura 19 Expresión de CarS (Panel A) y AcaA (Panel B). Las proteínas expresadas por los plásmidos pGST=CarS y pGST=AcaA en *E. coli* se fraccionaron por SDS-PAGE y tiñeron con Azul Coomassie. 1, lisado total de células que expresan GST (control); 2, lisado total de células que expresan GST=CarS o GST=AcaA; 3, fracción soluble de (2); 4, fracción 3 después de la unión a sefarosa-glutatión; 5, proteína de la fracción soluble del control liberada con glutatión después de la unión a sefarosa-glutatión; y 6, proteína de (3) liberada con glutatión después de la unión a sefarosa-glutatión.

La proteína quimérica GST=CarS se recuperó en mayor cuantía que GST=AcaA. Los rendimientos fueron 0,97 g/L para GST=CarS y 0,16 g/L para GST=AcaA. Cada una se extrajo de la biomasa de un cultivo de 50 mL. Para algunos ensayos *in vitro* la proteína quimérica GST=AcaA se aisló de cuatro cultivos de 50 mL, y AcaA se separó de la GST con proteasa Factor Xa (Nagai y Thogersen, 1984).

El ADNc del gen responsable de la secuencia 64508 también se expresó como proteína quimérica, GST=64508, con un rendimiento de 0,22 g/L.

1.2.3.2.2 Actividad de AcaA

La incubación de β -apo-12'-carotenal (el compuesto E de la Figura 16), un C₂₅, con la proteína quimérica GST=AcaA purificada (Fig. 19) ocasionó la formación de β -apo-13-carotenona, un C₁₈ (Fig. 20). De esta manera, el producto de la acción de CarS sobre el caroteno β dio lugar al primer precursor de los trisporoides.

La proteína AcaA cortó varios substratos con 25 a 30 carbonos cuando estos se incubaron con lisados crudos de células de *E. coli* que expresan la proteína quimérica tiorredoxina=AcaA (Fig. 21). El apo-12'-licopenal, isómero acíclico de β -apo-12'-carotenal, ambos C₂₅, generó apo-13-licopenona, un C₁₈.

El β -apo-10'-carotenal, un C₂₇, generó tres productos, β -apo-13-carotenona, β -apo-15'-carotenal y β -apo-14'-carotenal, con 18, 20 y 22 carbonos, respectivamente. El β -apo-8'-carotenal, un C₃₀, generó dos productos, β -apo-13-carotenona y β -apo-14'-carotenal.

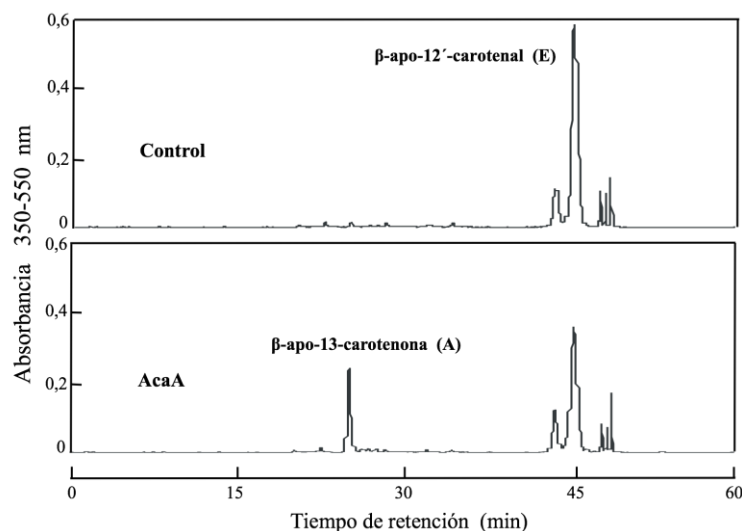


Figura 20 Fraccionamiento cromatográfico del producto de la actividad enzimática *in vitro* de AcaA sobre β -apo-12'-carotenal. Los ensayos se llevaron a cabo con AcaA (fusionada con GST) purificada o GST (como control). La enzima cortó el β -apo-12'-carotenal (E) para producir β -apo-13-carotenona (A). Los espectros de E y A se muestran en la Figura 15. Para las estructuras, ver Figura 16.

No se detectan productos en las incubaciones de lisados crudos de células de *E. coli* que expresan la proteína quimérica tiorredoxina=AcaA con β -apo-4'-carotenal, un C₃₅, β -apo-14'-carotenal, un C₂₂, β -apo-15'-carotenal, un C₂₀, y β -apo-13'-carotenal, un C₁₈. Esto sugiere que β -apo-12'-carotenal (C₂₅) y β -apo-8'-carotenal (C₃₀) son los sustratos, ambos monocíclicos, más corto y más largo rotos por la enzima. Además, tiorredoxina=AcaA no cortó licopeno, caroteno γ , caroteno β , apo-8'-licopenal, un C₃₀, zeaxantina, ni resveratrol.

Los mismos resultados se obtuvieron cuando los sustratos se incubaron con la enzima AcaA purificada y separada de la proteína GST.

A diferencia de AcaA, CarS no cortó *in vitro* ninguno de los sustratos ensayados: licopeno, caroteno γ , caroteno β , apo-8'-licopenal, apo-12'-licopenal, β -apo-4'-carotenal, β -apo-8'-carotenal, β -apo-10'-carotenal. No se detectaron productos de ninguno de estos sustratos incubados con la proteína quimérica GST=CarS purificada (Fig. 19) o con lisados crudos de células de *E. coli* que expresan GST=CarS o tiorredoxina=CarS.

La proteína CarS no mejoró la actividad de AcaA. Así, el licopeno, el caroteno γ y el caroteno β no fueron sustratos metabolizables por los lisados de células de *E. coli* que coexpresan CarS con AcaA en diferentes combinaciones, a saber GST=CarS con AcaA, GST=AcaA con CarS y tiorredoxina=CarS con AcaA.

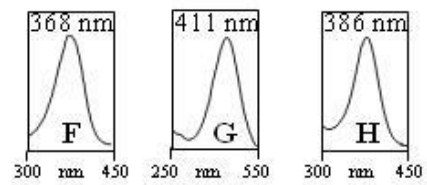
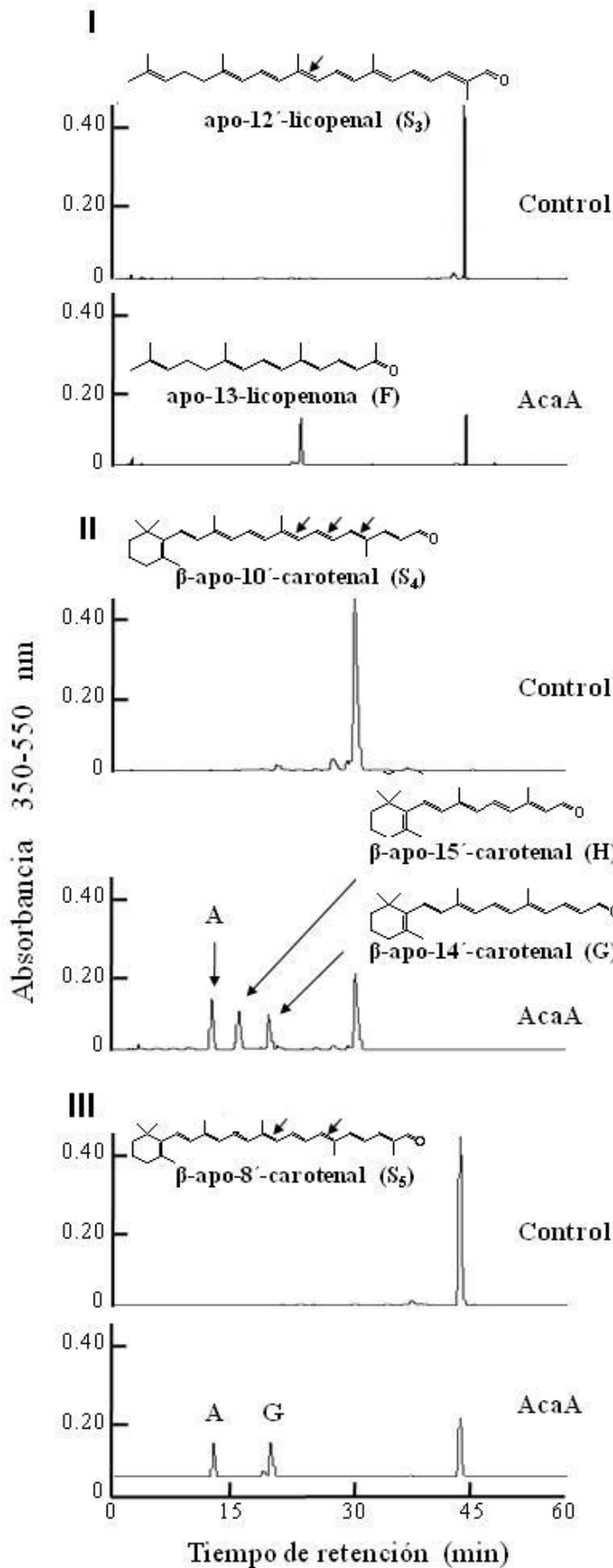


Figura 21 Fraccionamiento cromatográfico de los productos de la actividad enzimática *in vitro* de AcaA sobre diferentes apocarotenoides.

Los ensayos se llevaron a cabo con lisados crudos de células de *E. coli* transformadas con pThio=AcaA o con el plásmido vacío como control. Los lugares de corte se señalan con flechas sobre las estructuras. Arriba, espectros de absorción de los productos.

Panel I: Corte de apo-12'-licopenal (S_3), un C_{25} , para producir apo-13-licopenona (F, C_{18}).

Panel II: Corte de β -apo-10'-carotenal (S_4), un C_{27} , para producir los compuestos β -apo-13-carotenona (A, C_{18}), β -apo-15'-carotenal (H, C_{20}) y β -apo-14'-carotenal (G, C_{22}).

Panel III: Corte de β -apo-8'-carotenal (S_5), un C_{30} , para producir los compuestos A y G ya conocidos de la Figura 16 y Panel II, respectivamente.

1.2.4 Comparaciones de secuencias

1.2.4.1 Presuntos genes para oxigenasas de carotenoides en los Mucorales

Los genomas de *Mucor circinelloides* y *Rhizopus oryzae* contienen homólogos de los genes *carS* y *acaA* de *Phycomyces*. Las proteínas predichas CarS y AcaA conservan los aminoácidos característicos, con las excepciones de la presunta CarS de *Rhizopus*, que carece de una histidina, y la presunta AcaA de *Rhizopus*, que carece de un glutamato. Todas se parecen por su secuencia y por su tamaño, entre 572 y 629 aminoácidos. La proteína CarS de *Phycomyces* y sus dos homólogas coinciden en 381 aminoácidos. La proteína AcaA y sus dos homólogas han divergido algo más aprisa, pero aún coinciden en 194 aminoácidos.

Las proteínas de hongos formaron una rama aparte en el cladograma de oxigenasas de ruptura de carotenoides (Fig. 22). Las oxigenasas de caroteno CarS y AcaA y sus homólogos de los Mucorales se separaron de las de toruleno de los Ascomicetos *Fusarium fujikuroi* y *Neurospora crassa* (Prado-Cabrero *et al.*, 2007a; Saelices *et al.*, 2007) y las dos proteínas atípicas de *Phycomyces* y sus homólogos. Otras enzimas de estos Ascomicetos se encontraron en un grupo muy distante.

En la rama de las proteínas de vertebrados se distinguieron dos grupos: las oxigenasas de caroteno, que producen retinal, y las proteínas de 65 kDa del epitelio pigmentario de la retina (RPE65), que actúan como isomerasas e hidrolasas que convierten *trans* retinol a 11-*cis*-retinol en el ciclo visual (Redmond *et al.*, 2005). Comprendió también una oxigenasa, BCMO2 de ratón (Kiefer *et al.*, 2001), que corta caroteno β asimétricamente.

Las proteínas de plantas, exceptuando dos de *Arabidopsis*, también formaron una rama aparte, en la que oxigenasas que cortan 9-*cis*-epoxicarotenoides y licopeno se separan de las que cortan otros carotenoides.

Fuera de estas ramas se encontraron proteínas con diferentes funciones, la mayoría de bacterias.

1.2.4.2 Mutaciones en la proteína CarS

El gen *carS* se definió genéticamente porque sus mutaciones son recesivas y no complementan (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976). Recientemente, el Prof. Alexander Idnurm de la Universidad de Missouri-Kansas City propuso la localización de este gen (Tagua *et al.*, 2012) por su ligamiento con los genes *madI* (Campuzano *et al.*, 1990), *carB* y *carRA* (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982; Campuzano *et al.*, 1995) en una pequeña región del genoma y su identificación con uno de los genes presuntos que en ella se encuentran. La secuenciación de varios mutantes *carS* confirmó esta propuesta (Tagua *et al.*, 2012). En todas las secuencias se encontró una sola sustitución de un nucleótido por otro, como suele ser el caso de las mutaciones inducidas por *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina.

<i>Phycomyces</i>	-----MLTPAAENPLREQGLPAPSPTGYNN	25
<i>Homo</i>	-----MDIIFGRN	8
<i>Fusarium</i>	-----MKFLQQNSFTQTSMSQPHEDEVSPAIRHPYLTGNFAPIH	38
<i>Arabidopsis</i>	MSLPPIPPLKFLPPLKSPPIHHHQTPPLAPPRAAISISIPDTGLGRGTILDESTSSAFRDYQSLFVSQ	68
A <i>carS42</i>		
<i>Phycomyces</i>	VPAFNKVEL-TIECTIPEWV-NCVMYRAGS [*] CRYNLLLENGDTFHIGHPF [*] DGLAMLIH--RFEL---SG	86
<i>Homo</i>	RKEQLEPVRAK-VTKIIPAWL-QGTLRLNGEGMHT---VGES-RYNHWEDGLALIH--SFTI--RDG	65
<i>Fusarium</i>	KTTNLTIPC---TYSGCIPPELTGGQYVRNG-CNPVSHQDLGKD---AHWEDGDMISGVAERKASIDG	99
<i>Arabidopsis</i>	RSETIEIPVVIKPIEGSIFVNFPSGTYYLACFGLFT--DDHGST---VHPIDGHGYLR--AFHI---DG	126
X <i>carS180</i>		
<i>Phycomyces</i>	ET---QTVQYSSRH [*] TSH-GVER-R-IREKDPTLLTFGPD [*] CKTIFGRIQSVYHHISK-FGANACIQE	146
<i>Homo</i>	EVY---YRSKYLRS [*] DTYNTNIEANR-I-VV-SEFGTM-AYDPCKN-----IFSKAFSYLSHTIP	115
<i>Fusarium</i>	KTIPE-FVNGYI--LTDLYLSRKTTSIASIMPSTITLVNPLSTMFQI---MFATFRITFLVILSNLP	160
<i>Arabidopsis</i>	NKRKATFTAKYV--KTEA-KKEEHD--PVTDTWRETH-RGPF [*] SVLKG-----GKREGNTKV	173
L <i>carS153</i> * S <i>carS98</i>		
<i>Phycomyces</i>	GDEEFDMVNVTIT-PNFP-L--GER-LEA--*ETGVKR---GDALVVKRDANTLQLVDNKTLP [*] IKMF	203
<i>Homo</i>	---DFTDNCLI---NIM--K-CGED-FYATSE [*] TNYIRKINPQTL---E--TLEKVDYRK---	164
<i>Fusarium</i>	GS--QQAIKRISVANTAVLYHDG-RAL-ATCESGPPMRIQLPSL---D--TVGWFDGVEAEGEPEI	218
<i>Arabidopsis</i>	---MKN---VANTSVLKWAC-RLLCL-WE [*] GGEPEYIESGSL---D--TVGRFNVENNGCE---	225
*		
<i>Phycomyces</i>	TYGHVNDK-LQGQLCAS-----HHQYDEETDEYVNF [*] T--VRLGPIPSF-QSYTLGP---YLP [*] TPP	256
<i>Homo</i>	---YVAVNLA [*] T-----HPHYDEAGNVLNM-----GTSIVEK [*] GKTKY-VIF--KIPATVP	206
<i>Fusarium</i>	SQAGSDSPFGSGIFSFMKEWTTGHPKVD [*] PVTGEMLL-----YHNTFMP [*] PY-VHCS--VL---	272
<i>Arabidopsis</i>	---SCDDDDSSDRDLS-----GHDIWD [*] TAADLLKPI [*] LQGVFKMPPK [*] FLSH [*] KVDGRRKRL [*] LTVT	280
X <i>carS179</i> *		
<i>Phycomyces</i>	GSKEKMAP [*] QVRLHE---PIYRHLGAWRTLEPLKPAYI [*] HSF [*] MTKNYI [*] LVNFPY-YYSFGMSAL-Y	319
<i>Homo</i>	EGKQKQKSP [*] NKHTVEVFC [*] SIPSRLLS-----PSYH [*] SGV [*] TENYVI [*] FLEQPFRLDILK-M-ATAY	264
<i>Fusarium</i>	--KSNEKA [*] EG-----HR-LVNQPVLGVSGARMH [*] DFGASRSH [*] TI [*] MDLPLSLDPLN [*] TMK--G	325
<i>Arabidopsis</i>	CNAEDMLP [*] RSNFTFCEYDFE [*] KLIQ [*] TKFKI [*] DDHMMI [*] HDWAF [*] TDTHY [*] ILFANRVK [*] LNPIG [*] ISIA [*] AMCG	348
*		
<i>Phycomyces</i>	---YSQAYQTFYWD [*] ETRPTL---FHVVD-RNT-GRHVATYDA-DPCFS [*] FHSAN [*] AWDEEVDL [*] FGGKE	378
<i>Homo</i>	IRRMSWASCLAFHREK-TYI---HIID [*] QR-TR-QEVQTKFYTDAMVV [*] FHV [*] NAY-EE-D--GCIVF	322
<i>Fusarium</i>	--KEVVAY-----D--PT-KPSRF-GVFRHLP-SSVRWFHT-APCCI [*] FHTANTWD-SQSSE [*] GELSV	378
<i>Arabidopsis</i>	MSEPMVALSLNPSN [*] ESSPIYILPR [*] FS [*] DKYS [*] RGG [*] RDWR [*] FVEVS-SQLWLI [*] HSG [*] NAY-ETREDN [*] GDLKI	415
L <i>carS43</i>		
<i>Phycomyces</i>	RVIYMDYCVYENTDIVDASFDL [*] GKTP [*] TGF [*] DASKVEPARFKIKRHTDDK [*] DNSISE [*] SQLRRYRLGNVPV	445
<i>Homo</i>	DVIAYEDNSLYQLFYLA-----NLN [*] QDFKENSRLT [*] SVPTLRRFAVPLH	364
<i>Fusarium</i>	NLLACRMTSSTLVYTAGNIRPPVRSRCTQARVWSDEREETACRYKEAPALESPGESTG-LADYF-PIT	443
<i>Arabidopsis</i>	Q-IQASACSYRWFDFQK-----MFGYDWQSNKLD [*] FSVMN [*] LN [*] RGD [*] DKLL	456
*		
<i>Phycomyces</i>	SSNAPETSRWSPKGITGLLSGIFDFNKR [*] VASY-TVLGSDIE [*] ELPR [*] NSN [*] FNLRK [*] RYV [*] VW--GVCE [*] SKH	511
<i>Homo</i>	VDKNAE [*] VG [*] TN [*] L [*] IKV-ASTTATALKEEDGQY [*] Y [*] QPEFLYEGLE [*] ELPRV [*] N [*] YAHNGK [*] QY [*] RY [*] VFATGVQWSP [*] EI	430
<i>Fusarium</i>	AESDDYDQCRLYY---YEFDLAMESRN [*] HVKSQWALS [*] AIP [*] EP [*] SVR [*] PDREM [*] QEAR [*] YLYGCSTSTSCF	508
<i>Arabidopsis</i>	PHLVKVSMT-L-----DSTGN [*] CNSCD [*] VEPLN-GWNKPS [*] DE [*] EV [*] INSSWSG [*] KK [*] NY [*] MY--SAASS [*] GT	512
*		
<i>Phycomyces</i>	APSYASGAVVNGLIKLD---LDK-----PTLCKNTEEGSSA-----KIWDEPGCSCSE	556
<i>Homo</i>	PT-----KI [*] IKYD-IL---TKSSLK [*] W-R-----EDDCWPAE	458
<i>Fusarium</i>	GVALGRADKVDLLVKMDAKTLIQ [*] RGK [*] MNA [*] TSITGCVDRRSVCEILQEQRKDDPIYIFRLPPNH [*] YAQE	576
<i>Arabidopsis</i>	RSELPHF-PFDMVVKED---LDSN---LVR [*] WSTGA--RR-----FVGE	548
*		
<i>Phycomyces</i>	PIFVAHP---EQRAEDDGVLISTVN-----TTPDGKESCFLLIVDAATMVE--VGRTTIGAF [*] T--	609
<i>Homo</i>	PIFVAPAP---GAKEDDDGVILSAI-----VSTDPQKLPFL [*] LILDAKSFTE-----IARASVD	507
<i>Fusarium</i>	PRFV [*] PRA---CSTEEDDG [*] YLLFV [*] FDESQLLPSGDCPPSATSEL [*] WILD [*] AKNMRDVVA-KVRLPQRV--	637
<i>Arabidopsis</i>	PMFV [*] PKNSVEEGEEDDG [*] YIVVVE-----YAVSV [*] RCYL [*] VILDAK [*] KIGESDAVVSRL [*] EVPRNL	605
*		
<i>Phycomyces</i>	---AMT [*] HGSFVD [*] TNGKGVAVN-----	628
<i>Homo</i>	VDMHMDLHGLFITDMDWDTKKQAASEEQRDRASDCHGAPLT-----	547
<i>Fusarium</i>	---PYGLHGTW [*] FSSQDIESQRSVESLRSLEV [*] VQRKKEE [*] VN [*] SGGQIRKSW [*] VLREKLEKAVG	696
<i>Arabidopsis</i>	-TFPMGFHGLWASD-----	618

Figura 23 Mutaciones en la proteína CarS de *Phycomyces*. Las sustituciones y terminaciones (x) se muestran sobre la secuencia de CarS seguidas del correspondiente alelo. La secuencia predicha de la proteína CarS se comparó con las de oxigenasas que cortan caroteno β de un hongo (CarX de *Fusarium fujikuroi*), un mamífero (BCO1 de *Homo sapiens*) y una planta (CCD7 de *Arabidopsis thaliana*). Las cuatro histidinas y los tres glutamatos o aspartatos considerados esenciales para la actividad enzimática se señalan con asteriscos. Los aminoácidos compartidos por las cuatro secuencias se marcan en negro. Los compartidos por al menos tres secuencias aparecen en negritas.

Parte II
Carencia de apocarotenoides en mutantes *carS*
de *Phycomyces*

2.1 Introducción

La obtención de estirpes mutantes de la carotenogénesis, las mutantes *car* (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968; Meissner y Delbrück, 1968; Ootaki *et al.*, 1973), permitió identificar y caracterizar los genes estructurales *carRA* y *carB* y los presuntos reguladores *carC*, *carD*, *carE*, *carF*, *carI* y *carS* (ver pág. 14). Las mutantes *car* se clasifican, según el color del micelio, en cuatro fenotipos. Las mutantes blancas afectadas en el gen *carB* acumulan grandes cantidades de fitoeno y las afectadas en el dominio A del gen bifuncional *carRA* producen trazas de caroteno β . Las mutantes rojas están afectadas en el dominio R del gen *carRA* y acumulan grandes cantidades de licopeno. Las mutantes muy amarillas están afectadas en los genes *carS*, *carD* o *carF* y acumulan grandes cantidades de caroteno β . Hay mutantes de color amarillo claro afectadas en el gen *carC*, que producen menos caroteno β y son insensibles parcialmente a la estimulación por la luz. Otras mutantes de color amarillo, casi iguales al tipo silvestre, son insensibles a productos químicos, como el retinol y el ftalato de dimetilo. Dos de estas se han caracterizado: una define el gen *carI* y otra ha sido asignada al dominio A del gen *carRA*.

Las mutantes *car* también están afectadas en el desarrollo sexual (Bergman *et al.*, 1969). La mayoría son incapaces de estimular sexualmente a estirpes de sexo opuesto, pero son estimuladas por ellas (Sutter, 1975).

En la Parte I de esta Tesis se describió la identificación del gen *carS* con la secuencia 79747 del genoma de *Phycomyces*, la actividad de la proteína correspondiente como la oxigenasa de caroteno β que cataliza el primer paso en la biosíntesis de los trisporoides y la presencia de cambios de nucleótidos en esa secuencia de todos los mutantes *carS* investigados.

En esta Parte, estudiamos el contenido de apocarotenoides de estirpes silvestres y mutantes *carS*. Los apocarotenoides involucrados en el desarrollo sexual se estudiarán en la Parte siguiente; aquí solo se analizan los de cultivos separados.

Nuestro estudio de los apocarotenoides versa sobre el extracto del medio de cultivo de cinco días de edad que se obtiene por congelación, descongelación y presión sobre el agar. Se analizaron los extractos de tres cultivos de estirpes silvestres, dos de estirpes mutantes *carB*, dos de estirpes mutantes *carR* y siete de estirpes mutantes *carS*.

2.2 Resultados

2.2.1 Absorbancia atribuida a apocarotenoides

La estirpe C5, genotipo *carB10* (—), acumula fitoeno, pero no lo metaboliza a licopeno o caroteno β , por lo que carece de apocarotenoides (Polaino *et al.*, 2012). Su medio de cultivo contenía trazas de fitoeno que presumiblemente se liberaron por ruptura accidental de hifas.

Los apocarotenoides del silvestre se hicieron notar por la absorbancia entre 270 nm y 330 nm de sus medios de cultivo, mayor que en las mutantes *carB*. Esta indicación sencilla y medible de la presencia de apocarotenoides (Polaino *et al.*, 2012) nos anunció que las mutantes *carS* no los producen (Fig. 24).

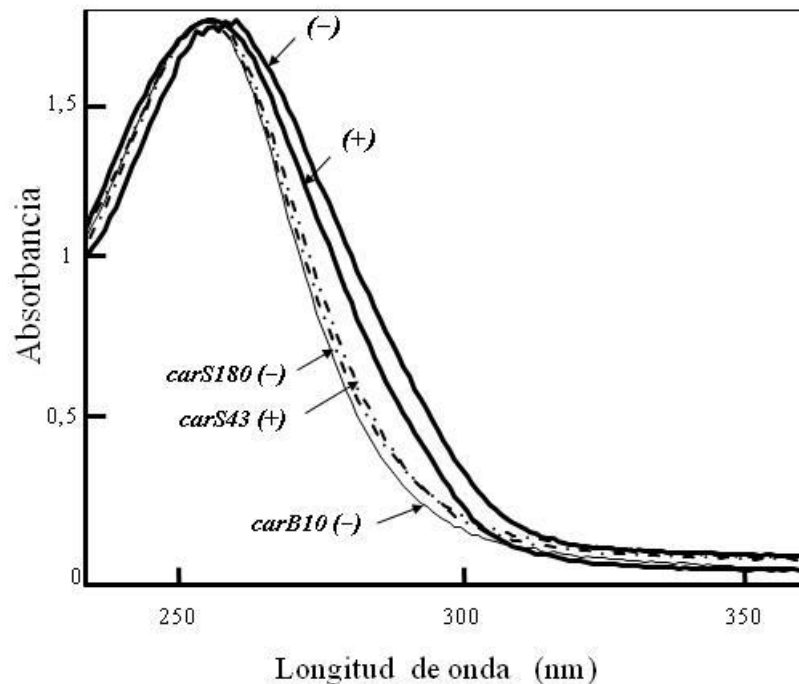


Figura 24 Comparación de espectros de absorción de los medios de cultivo de estirpes silvestres y mutantes. Estirpes silvestres NRRL1554, (+), y NRRL1555, (—), y mutantes C5, *carB10* (—), M1, *carS43* (+), y S324, *carS180* (—). Para facilitar las comparaciones de la distribución espectral, las absorciones se corrigieron linealmente de modo que todos los espectros tengan el mismo máximo.

2.2.2 Extracción y fraccionamiento de apocarotenoides

De los extractos de los medios de cultivo se obtuvieron dos fracciones, una neutra y otra ácida. La fracción neutra se obtuvo primero, ajustando el extracto a pH 8 con KOH y extrayendo los compuestos neutros con acetato de etilo. El extracto restante se ajustó a pH 2 con HCl y se extrajeron los compuestos con acetato de etilo. Ambas fracciones se analizaron por cromatografía líquida.

Se consideraron en principio como apocarotenoides los compuestos que no se detectan en los extractos de mutantes *carB* (Polaino *et al.*, 2010) y *carR* que carecen de caroteno β , porque los apocarotenoides de *Phycomyces* derivan de este pigmento (Austin *et al.*, 1969; 1970).

La ruptura del caroteno β en *Phycomyces* genera tres productos que dan lugar a tres familias de apocarotenoides: ciclofarnesoides, C₁₅; trisporoides, C₁₈; y metilhexanoides, C₇ (Polaino *et al.*, 2010; 2012). De esta manera, los compuestos detectados se nombraron anteponiendo las letras C, ciclofarnesoides; T, trisporoides; M, metilhexanoides; y X, compuestos no identificados. A cada una sigue otra letra "a", fracción ácida, o "n", fracción neutra, y el tiempo de retención en decenas de segundos (Polaino *et al.*, 2012).

Los cromatogramas de las fracciones neutra y ácida de los cultivos de estirpes silvestres fueron parecidos, mientras que los de las mutantes fueron muy diferentes (Fig. 25 y 26). Varios compuestos desaparecieron o se redujeron en las mutantes. Uno de los picos que eluye al principio de los cromatogramas del extracto ácido de algunas estirpes mutantes llamó la atención por su magnitud, comparable a la de las estirpes silvestres (Fig. 26).

Los compuestos que se observaron en los cromatogramas de las estirpes mutantes *carB* no son derivados de caroteno β porque estas mutantes carecen de este pigmento. Los compuestos que se observaron en los cromatogramas de algunas estirpes mutantes *carR* y *carS* podrían ser apocarotenoides, si esas estirpes son rezumantes.

Las estirpes silvestres y algunas mutantes produjeron el compuesto Cn115 ($\lambda_{\text{máx}}=303\pm 2,5$ nm; $t_R=18,9\pm 0,5$ min), un apocarotenoide que usamos como testigo de velocidad en la separación cromatográfica de los compuestos neutros. Todas las estirpes produjeron una pequeña cantidad de un compuesto, Xa160 ($\lambda_{\text{máx}}=278\pm 0,25$ nm; $t_R=26,5\pm 0,03$ min) que no es un apocarotenoide, pero sirve como testigo de velocidad en la separación cromatográfica de los compuestos ácidos. Otro compuesto, Xa80 ($\lambda_{\text{máx}}=282,5\pm 0,5$ nm; $t_R=13,29\pm 2,15$ min), llamó la atención por encontrarse en las estirpes silvestres y en las mutantes *carB* (+) y *carR* (+). Ambos compuestos podrían ser derivados del fitoeno o compuestos no relacionados con los carotenos.

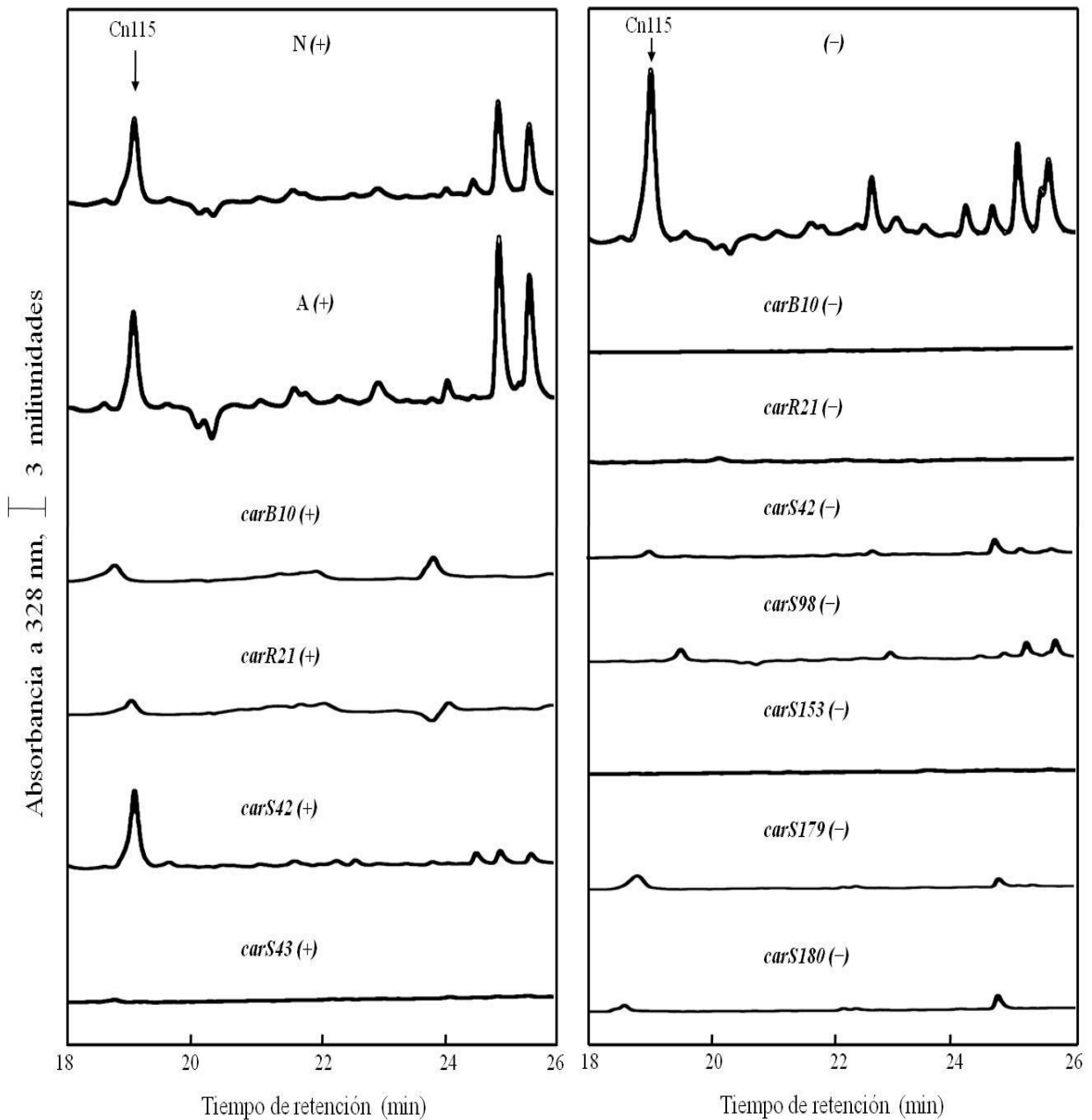


Figura 25 Fraccionamiento cromatográfico de compuestos del extracto neutro de cultivos de estirpes silvestres y mutantes.

Panel izquierdo. Estirpes silvestres NRRL1554, (+), y A56, (+), que comparte con NRRL1555 (—) la mayoría de su genoma (isogénica); y mutantes S342, *carB10* (+), S179, *carR21* (+), S276, *carS42* (+), y M1, *carS43* (+).

Panel derecho. Estirpe silvestre NRRL1555, (—), y mutantes C5, *carB10* (—), C9, *carR21* (—), C115, *carS42* (—), S100, *carS98* (—), S178, *carS153* (—), S303, *carS179* (—), y S324, *carS180* (—).

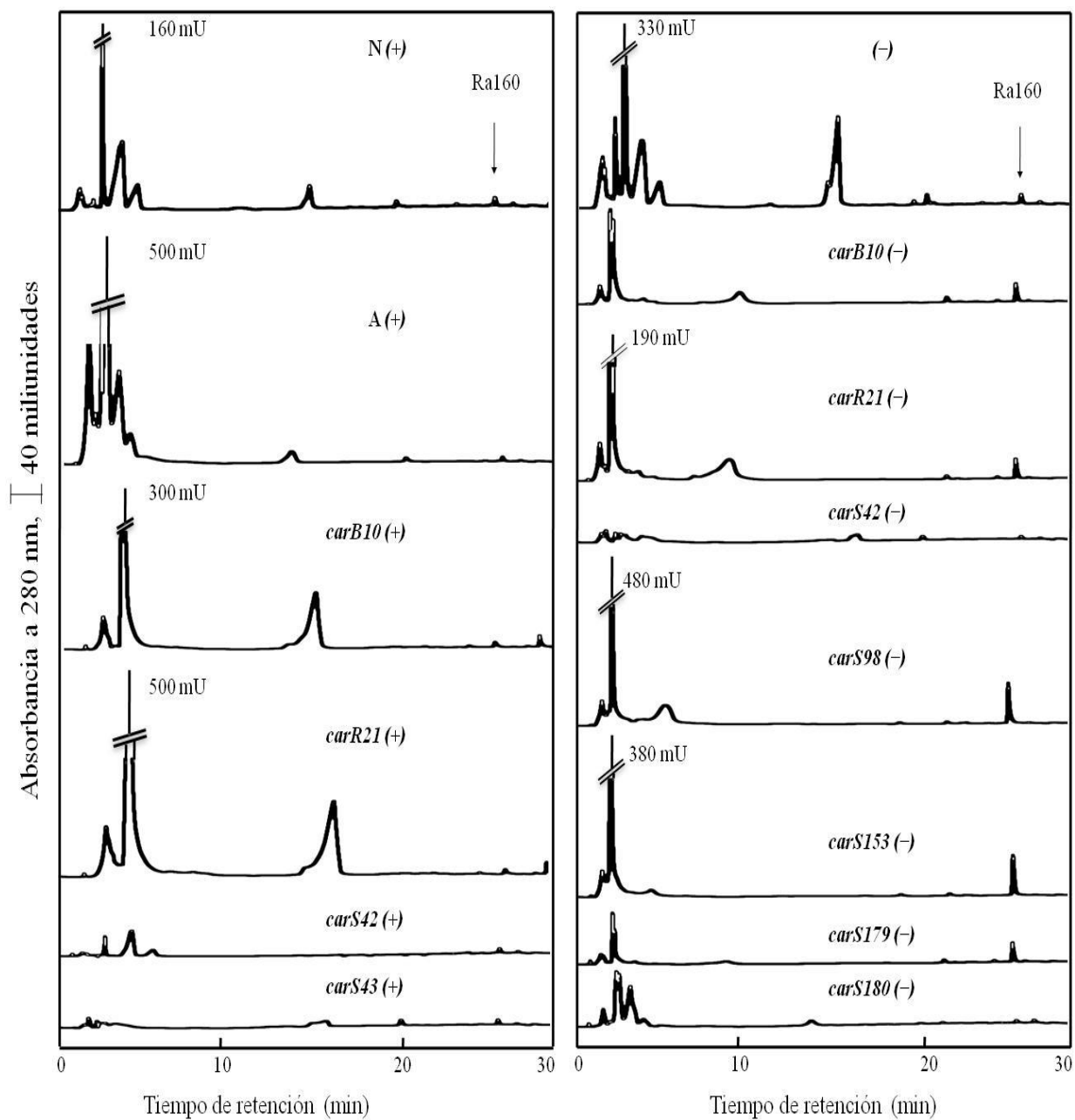


Figura 26 Fraccionamiento cromatográfico de compuestos del extracto ácido de cultivos de estirpes silvestres y mutantes. Se muestran las mismas estirpes que en la Figura 25.

2.2.3 Cuantificación e identificación de apocarotenoides

Los análisis completos de los apocarotenoides en las estirpes silvestres y mutantes pueden consultarse en el Material Suplementario. Muchos de los compuestos eran escasos y a veces difícilmente detectables, por lo que no han sido tenidos en cuenta. Los más abundantes han sido estimados a través de la integral de la absorción y el tiempo de retención en el cromatograma, expresada en AU s (unidades de absorción x segundos). Las variaciones de un análisis a otro fueron considerables. Para una mejor comprensión, hemos preparado una Tabla semicuantitativa. Algunos compuestos se identificaron tentativamente por su espectro de absorción y tiempo de retención reportados (Polaino *et al.*, 2010; 2012; Barrero *et al.*, 2012) y otros por la comparación de su masa molecular estimada con la de los correspondientes iones moleculares detectados por espectrometría de masas (Prof. A. F. Barrero y col., comunicación personal). Los compuestos desconocidos con $\lambda_{\text{máx}} < 300$ nm se consideraron ciclofarnesoides presuntos y los de $\lambda_{\text{máx}} > 300$ nm se consideraron trisporoides presuntos porque la absorción depende de la longitud del cromóforo (ver pág. 14). La identificación definitiva de todos los compuestos está en curso por el Grupo de Química Orgánica del Prof. A. F. Barrero.

Presentamos los resultados de doce apocarotenoides de las estirpes silvestres (Tabla 1). Siete de ellos eran bien conocidos (Fig. 27) y se encontraron en las tres estirpes silvestres en concentraciones similares, entre ellos están los cuatro más abundantes, Ma26, Cn113, Cn122 y Cn123. La estructura de Tn145 debe considerarse provisional; este solo se encontró en la estirpe silvestre (–) y en muy pequeña concentración. Otros cuatro compuestos, también poco abundantes, permanecen sin identificar; sus características se muestran en la Figura 28 y sugieren que son presuntos ciclofarnesoides.

Varios mutantes contenían algunos apocarotenoides, usualmente en pequeña concentración. Deben considerarse rezumantes o hipomorfos para la actividad enzimática afectada. Ninguno de ellos contenía apocarotenoides distintos de los detectados en las estirpes silvestres.

Tres de las estirpes mutantes, C5, S342 y S178, carecían por completo de apocarotenoides y deben considerarse nulimorfos. Son las más útiles para investigaciones posteriores. Llamó la atención la mutación *carR21*, que produce un bloqueo casi completo en el sexo (–), pero es muy rezumante en el (+).

Tabla 1

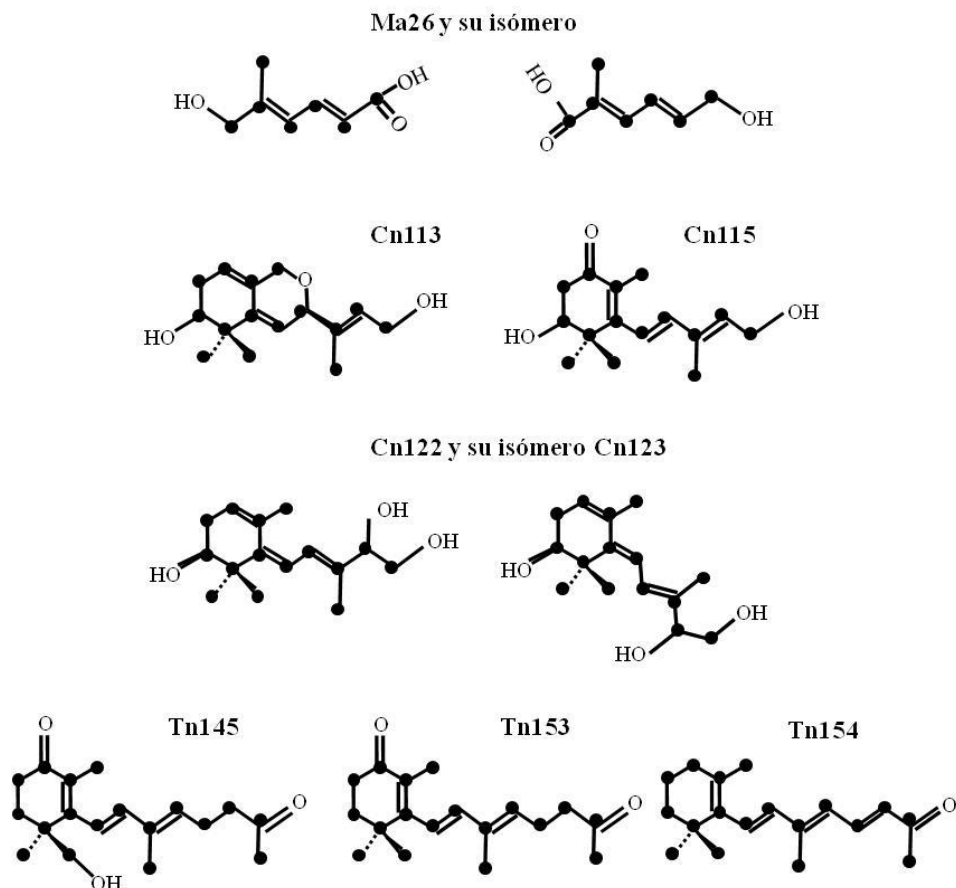


Figura 27 Estructuras de apocarotenoides de los cultivos de estirpes silvestres. El Ma26 y su isómero, los metilhexanoides; Cn113, un apocarotenoides heterocíclico; Cn115, la apotrisporina E; Cn122 y su isómero Cn123, los apocarotenoides trientriólicos; Tn145, el presunto trisporol B; Tn153, trisporina B; y Tn154, la β -apo-13-carotenona. Los apocarotenoides Ma26, Cn113, Cn115, Cn122 y Cn123 se han corroborado por espectrometría de masas (Prof. A.F. Barrero y col., comunicación personal). La trisporina B se detectó en dos de seis observaciones de nuestro análisis, pero en muy poca cantidad.

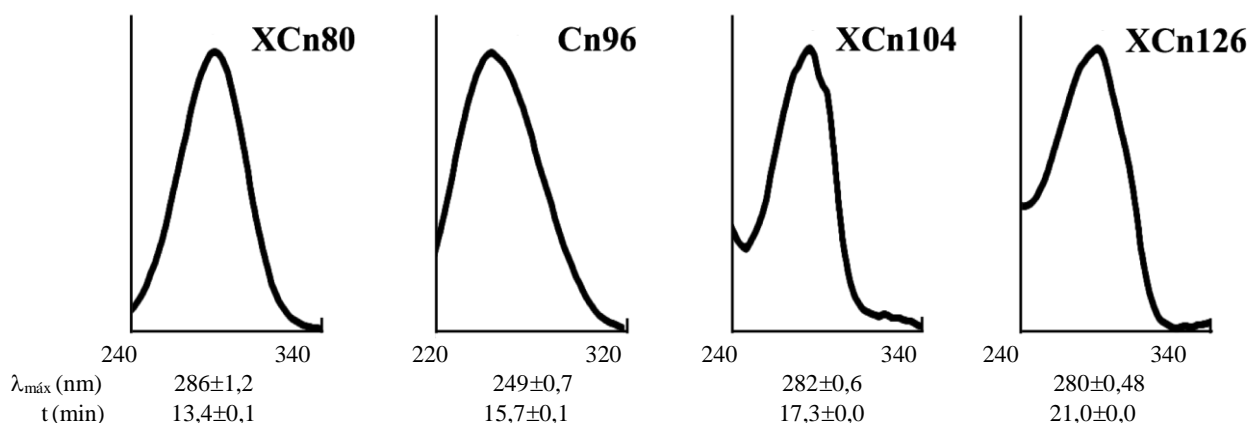


Figura 28 Otros apocarotenoides detectados en los cultivos de estirpes silvestres y mutantes. $\lambda_{\text{máx}}$, longitud de onda de máxima absorción, y t, tiempo de retención. Cada valor representa la media y su desviación típica en 2-6 mediciones de 1-3 experimentos independientes. El compuesto Cn96 es un isómero de Cn113 que se corroboró espectrometría de masas (Prof. A.F. Barrero y col., comunicación personal).

Parte III

Apocarotenoides en el desarrollo sexual de *Phycomyces*

3.1 Introducción

El desarrollo sexual de *Phycomyces* y muchos Mucorales inicia por el contacto de micelios de sexos opuestos cuya interacción modifica las puntas de las hifas, y las convierte en cigóforos, y estimula la síntesis de caroteno β (carotenogénesis sexual). Ambas respuestas son mediadas por el intercambio de apocarotenoides cuya biosíntesis requiere la cooperación de ambas estirpes (ver pág. 25). El medio de cultivo de *Phycomyces* y otros Mucorales contiene muchos apocarotenoides, entre los cuales se encuentran los ácidos trispóricos y otros apocarotenoides. Algunos de ellos se proponen como las señales que inducen el desarrollo de cigóforos y otros como apocarotenoides específicos de un tipo sexual (ver pág. 23). En la parte I de esta Tesis se demostró que la ruptura del caroteno β da lugar a los precursores de los ácidos trispóricos y otros trisporoides.

Muchas de las estirpes mutantes *car* están afectadas en el desarrollo sexual (Bergman *et al.*, 1969). La mayoría desarrolla cigóforos, pero no entra en el ciclo sexual ni estimula la formación de estas estructuras en sus parejas (Sutter, 1975). Las estirpes mutantes *carA* desarrollan algunas cigosporas en cultivos con la silvestre. Las estirpes mutantes *carB* (Fig. 29) y *carR* solo desarrollan cigóforos en cultivos con las silvestres. Las estirpes mutantes *carS* muestran distintas conductas sexuales, pero no completan el desarrollo sexual. Una estirpe *carS* (–) inicia el desarrollo de progametangios en cultivos mixtos con la silvestre e induce el desarrollo de cigóforos en otra *carS* (+). Esta estirpe *carS* (+) desarrolla cigóforos en cultivos con la silvestre o con una mutante *carA* (–), pero no con las *carB* (–) ni *carR* (–). La carotenogénesis sexual también ocurre en estos cultivos (Sutter, 1975). Las hifas de las estirpes *carS* y *carR* intensifican su coloración amarilla y roja, respectivamente. En la Parte II de esta Tesis se reportaron los apocarotenoides contenidos en el medio del cultivo separado de estirpes silvestres y se demostró que las mutantes *car* carecen de estos compuestos o los producen en poca cantidad si son rezumantes.

El análisis de los apocarotenoides producidos por la interacción de micelios de sexos opuestos de las estirpes silvestres con los de estirpes mutantes *car* podría identificar los apocarotenoides específicos de un tipo sexual.

En esta Parte, nos propusimos estudiar el contenido de apocarotenoides de los cultivos mixtos de estirpes silvestres y varios mutantes *car*. Nuestro estudio versa sobre el extracto del medio de cultivo de cinco días de edad que se obtiene por congelación, descongelación y presión sobre el agar, como en la Parte II de esta Tesis. A esa edad los cultivos casi han alcanzado la diferenciación sexual.

Se analizaron los extractos de cultivos mixtos con 26 combinaciones de estirpes silvestres y mutantes *carB*, *carR* y *carS*. Dos de ellas implicaban dos estirpes silvestres; ocho, dos estirpes mutantes; y diez y seis, una estirpe silvestre y otra mutante.

En este trabajo hemos contado con la colaboración de los Profesores A.F. Barrero y M. Mar Herrador, de la Universidad de Granada.



Figura 29 Comportamiento de un mutante *car* en la interacción sexual con una estirpe silvestre. Las hifas de la estirpe mutante S342, genotipo *carB10* (+), desarrollan cigóforos pero no inducen el desarrollo de estas estructuras en la estirpe silvestre NRRL1555 (-). Fotografía de D. Pérez de Camino.

3.2 Resultados

3.2.1 Absorbancia atribuida a apocarotenoides

Los medios de cultivo de estirpes silvestres absorbieron radiación ultravioleta mucho más que los de mutantes *carB10* (Fig. 30, Panel I y II). Atribuimos este incremento a los apocarotenoides. Las mutantes *carB* carecen de caroteno β , pero su medio de cultivo puede contener pequeñas cantidades de fitoeno que contribuyen a la absorción.

El incremento en la absorción ultravioleta fue relativamente grande en los cultivos de estirpes silvestres, mucho menos en los de una estirpe silvestre y otra mutante, y muy escaso en los de estirpes mutantes.

El cultivo mixto de estirpes mutantes *carB10* absorbió menos entre 270-300 nm que los de otras mutantes (Fig. 30, Panel I y II). La diferencia se puede atribuir a que los mutantes *carR* y *carS* sintetizaron pequeñas cantidades de apocarotenoides que absorben a esas longitudes de onda y aumentaron por la interacción sexual.

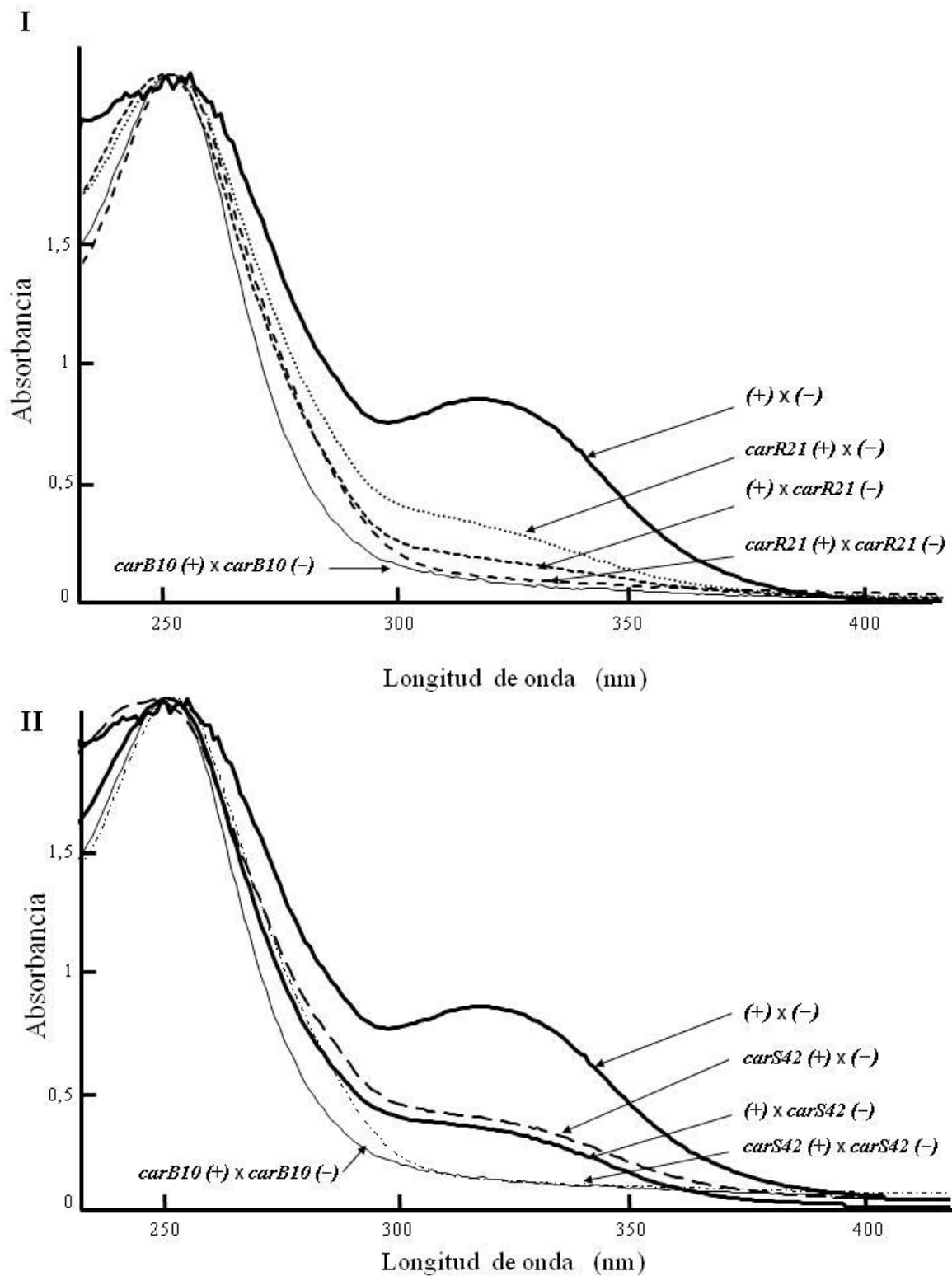


Figura 30 Comparación de espectros de absorción de los medios de cultivos de estirpes silvestres y mutantes. Panel I, mutantes *carR* y Panel II, mutantes *carS*. Estirpes silvestres NRRL1554, (+), y NRRL1555, (-); y mutantes S342, *carB10* (+), C5, *carB10* (-), S179, *carR21* (+), C9, *carR21* (-), S276, *carS42* (+), y C115, *carS42* (-). Las absorbancias máximas se igualaron para facilitar las comparaciones de la distribución espectral.

La absorción ultravioleta (Tabla 2) permitió estimar el contenido relativo de los apocarotenoides que absorben a 328 nm (Polaino *et al.*, 2012) en los medios de cultivo. Destacaron las abundancias estimadas para los cultivos mixtos de las estirpes silvestres. También fueron notables las de mutantes *carB10* (+), *carR21* (+) y *carS42* (-) con las silvestres de sexo opuesto.

Tabla 2 Estimación del contenido de apocarotenoides en los medios de cultivos mixtos de estirpes silvestres y mutantes.

		Absorción relativa a 260 nm y 328 nm						
	(-)	Silvestre	<i>carB10</i>	<i>carR21</i>	<i>carS42</i>	<i>carS153</i>	<i>carS179</i>	<i>carS180</i>
(+)								
Silvestre		66,5	1,0	3,5	8,8	2,6	3,7	2,2
Isogénica		60,9	1,0	2,0	4,9	1,7	0,6	1,1
<i>carB10</i>		11,4	0,1	—	—	—	—	—
<i>carR21</i>		11,2	—	0,6	—	—	—	—
<i>carS42</i>		5,8	—	—	-0,3	-0,2	—	-1,5
<i>carS43</i>		4,6	—	—	0,1	0,7	2,9	—

Los valores son 100 (B - 0,05 A), donde B es la absorbancia a 328 nm y A, la absorbancia máxima (próxima a 260 nm). Cada valor representa la media en 2-6 mediciones de 1-3 experimentos independientes. —, no determinado. Estirpes silvestres NRRL1554, (+), A56, (+) isogénica, y NRRL1555, (-); y mutantes S342, *carB10* (+), C5, *carB10* (-), S179, *carR21* (+), C9, *carR21* (-), S276, *carS42* (+), C115, *carS42* (-), M1, *carS43* (+), S100, *carS98* (-), S178, *carS153* (-), S303, *carS179* (-), y S324, *carS180* (-).

3.2.2 Extracción y fraccionamiento de apocarotenoides

Como en la Parte II de esta Tesis, de los extractos de los medios de cultivo se obtuvieron dos fracciones, una neutra y otra ácida, que se analizaron por cromatografía líquida. Se consideraron apocarotenoides todos los compuestos que no se detectan en los cultivos de mutantes *carB10* (Polaino *et al.*, 2010) y se nombraron como antes (ver pág. 53).

En la fracción ácida del medio de cultivo predominan compuestos oxigenados que fueron abundantes en las estirpes silvestres, pero escasos o ausentes en los mutantes (Fig. 31). Se observaron pequeñas diferencias entre los cultivos de la estirpe patrón, NRRL1555, de sexo (–), y dos estirpes (+) que difieren en el fondo genético: A56 se parece a la estirpe patrón porque deriva de una larga serie de cruzamientos con ella, mientras que NRRL1554 es una estirpe muy diferente aislada de la naturaleza.

Los compuestos que se observaron en el cromatograma de las estirpes mutantes *carB* no son derivados de caroteno β porque estos mutantes carecen de este pigmento, pero podrían ser derivados del fitoeno o compuestos no relacionados con los carotenos como el ácido gálico o el protocatético (Barrero *et al.*, 1996).

En todos los medios se detectó el compuesto Xa160 (ver pág. 53), que no es un apocarotenoide, pero sirve de control de velocidad en la separación cromatográfica de los compuestos ácidos. El compuesto Xa80 (ver pág. 53), que tampoco es un apocarotenoide, se detectó en muchos cultivos separados (Parte II de esta Tesis) y mixtos, pero sorprendentemente no en los cultivos mixtos de las estirpes silvestres.

En la fracción neutra del medio de cultivo predominaron compuestos menos polares que fueron abundantes en las estirpes silvestres, pero ausentes en los mutantes *carB*, *carR* y en muchos *carS* (Fig. 32). Se observaron pequeñas diferencias entre los cultivos de estirpes silvestres.

Los compuestos detectados en las estirpes mutantes *carR*, al parecer muy minoritariamente, podrían derivar del licopeno abundante en esas estirpes o del caroteno β , porque la mutación *carR21* (+) es rezumante (Parte II de esta Tesis). Los compuestos que se observaron en los cromatogramas de las estirpes *carS* son presumiblemente apocarotenoides porque la mayoría de estas estirpes son rezumantes (Parte II de esta Tesis).

En la mayoría de los extractos se detectó el apocarotenoide Cn115 que sirve de control de velocidad en la separación cromatográfica de los compuestos neutros.

Los apocarotenoides de los cultivos mixtos de una estirpe silvestre y otra mutante proceden del caroteno β de la silvestre, excepto por la pequeña cantidad que pueda ser aportada por estirpes mutantes rezumantes. Además, estas estirpes pueden aportar sus propias enzimas a los pasos posteriores.

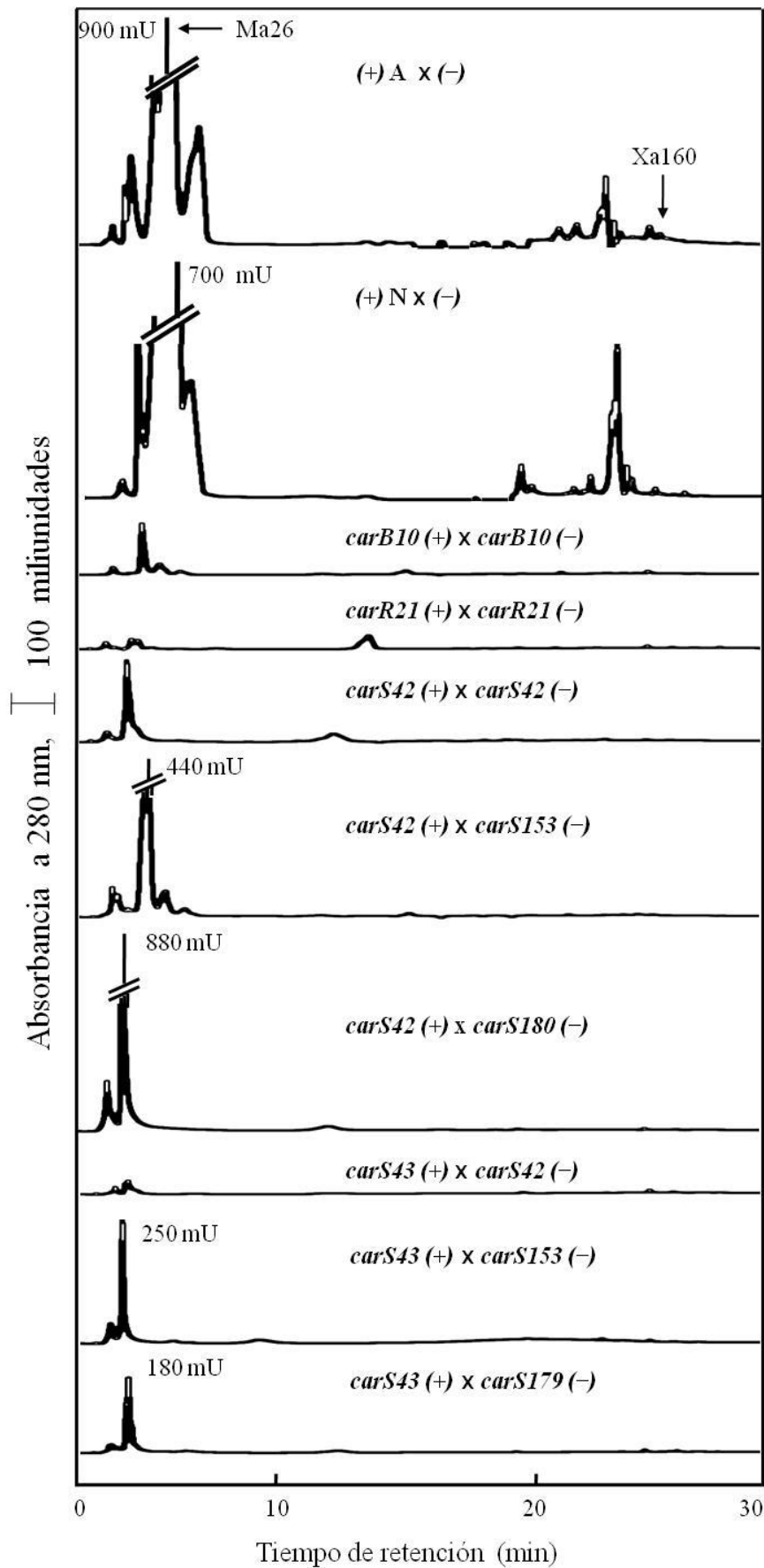


Figura 31
Fraccionamiento
cromatográfico de
apocarotenoides del
extracto ácido del medio
de cultivo de estirpes
silvestres y mutantes.

Estirpes silvestres:
 A56, A (+);
 NRRL1554, N (+); y
 NRRL1555, (-).
 Mutantes:
 S342, *carB* (+);
 C5, *carB10* (-);
 S179, *carR21* (+);
 C9, *carR21* (-);
 S276, *carS42* (+);
 C115, *carS42* (-);
 M1, *carS43* (+);
 S178, *carS153* (-);
 S303, *carS179* (-); y
 S324, *carS180* (-).

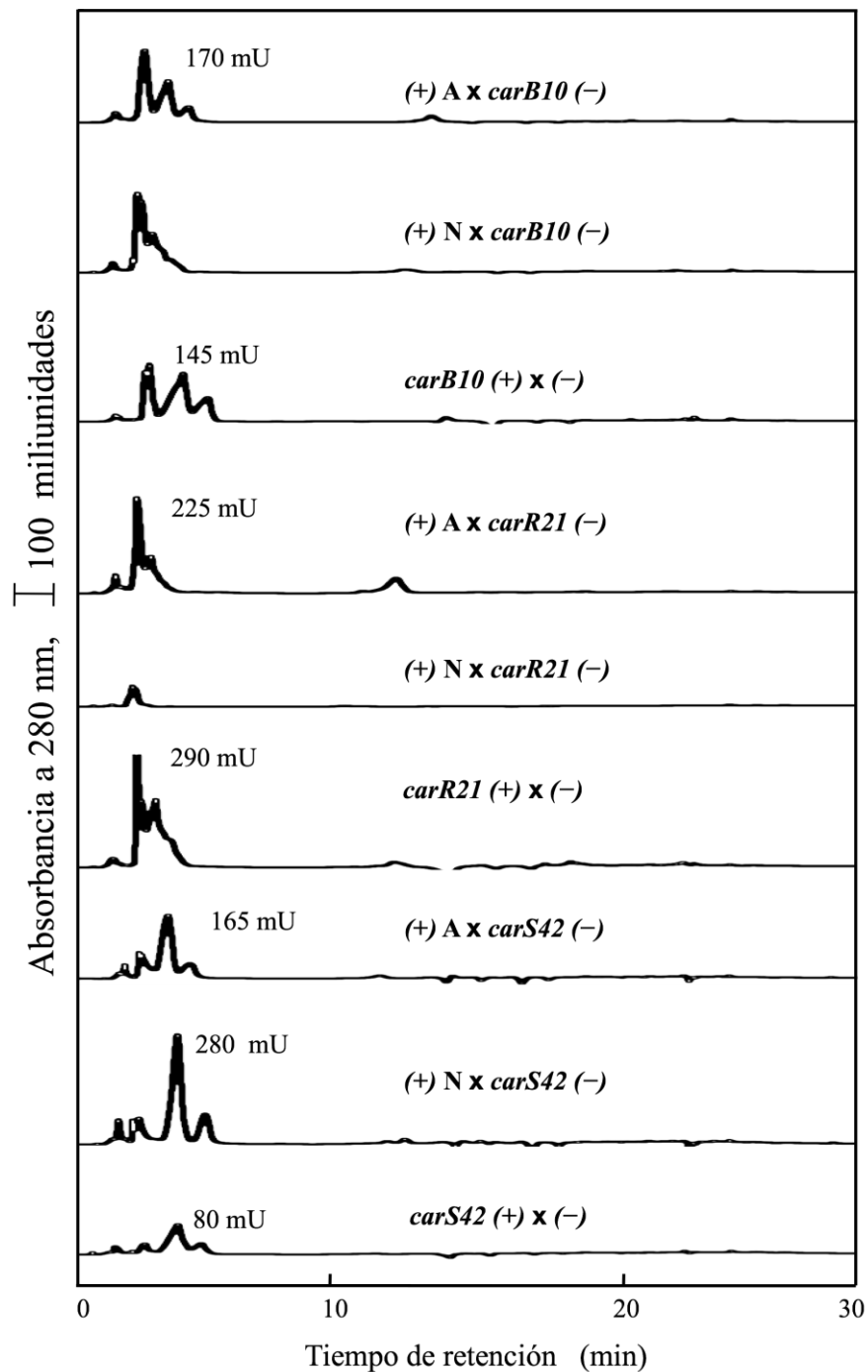


Figura 31 (continuación). Fraccionamiento cromatográfico de apocarotenoides del extracto ácido del medio de cultivo de estirpes silvestres y mutantes.

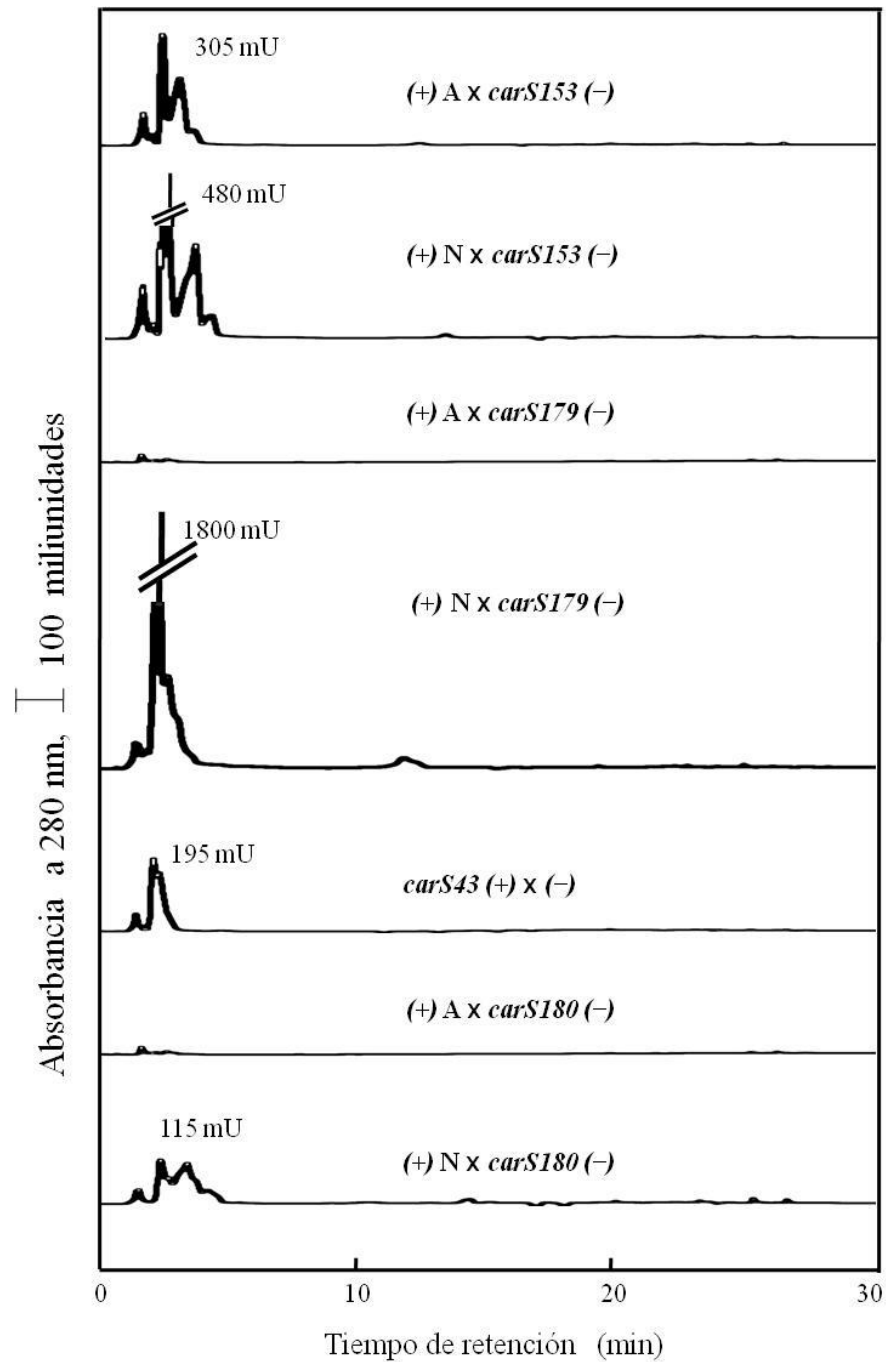


Figura 31 (conclusión). Fraccionamiento cromatográfico de apocarotenoides del extracto ácido del medio de cultivo de estirpes silvestres y mutantes.

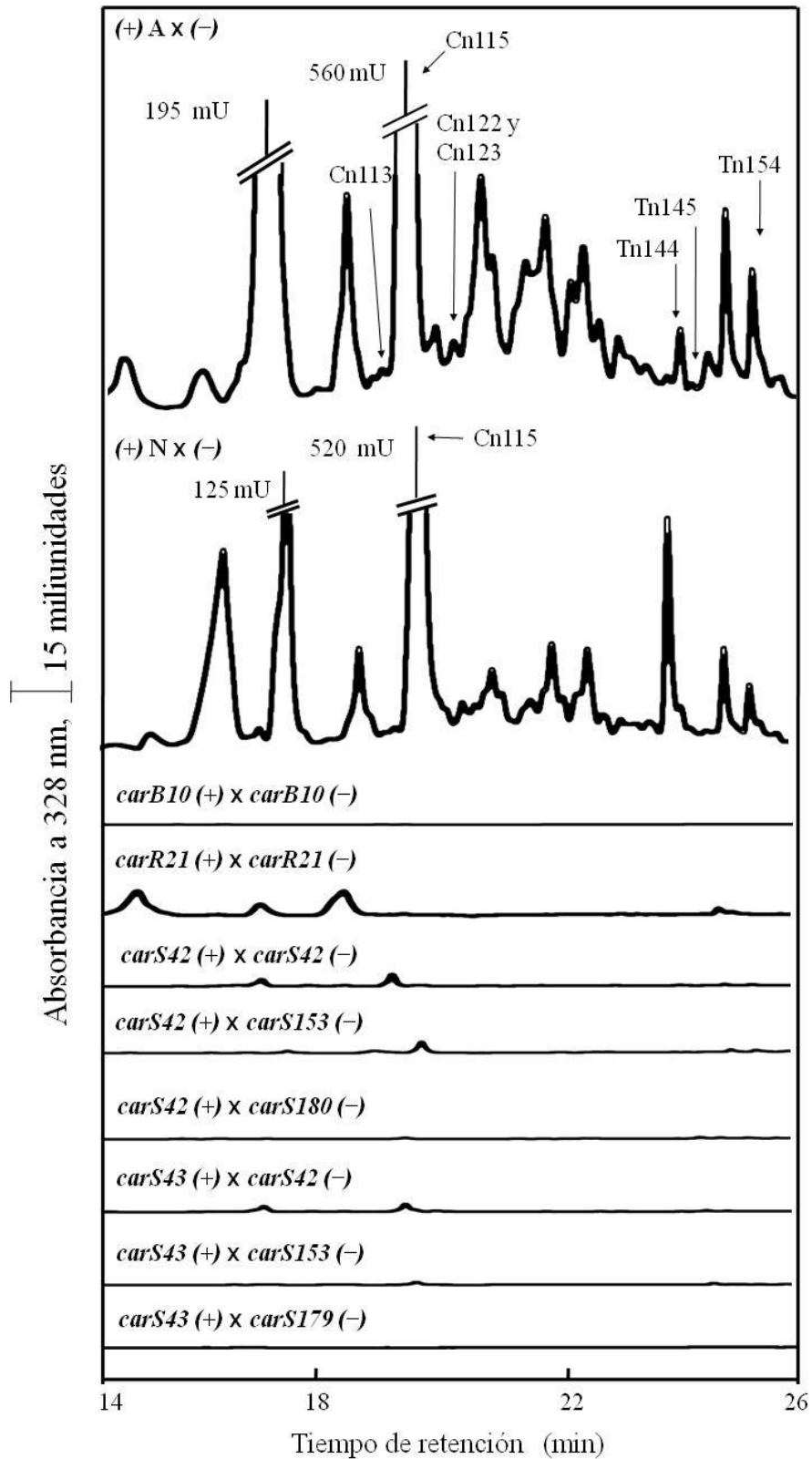


Figura 32 Fraccionamiento cromatográfico de apocarotenoides del extracto neutro de cultivos mixtos de estirpes silvestres y mutantes. Se usaron las mismas estirpes que en la Figura 31.

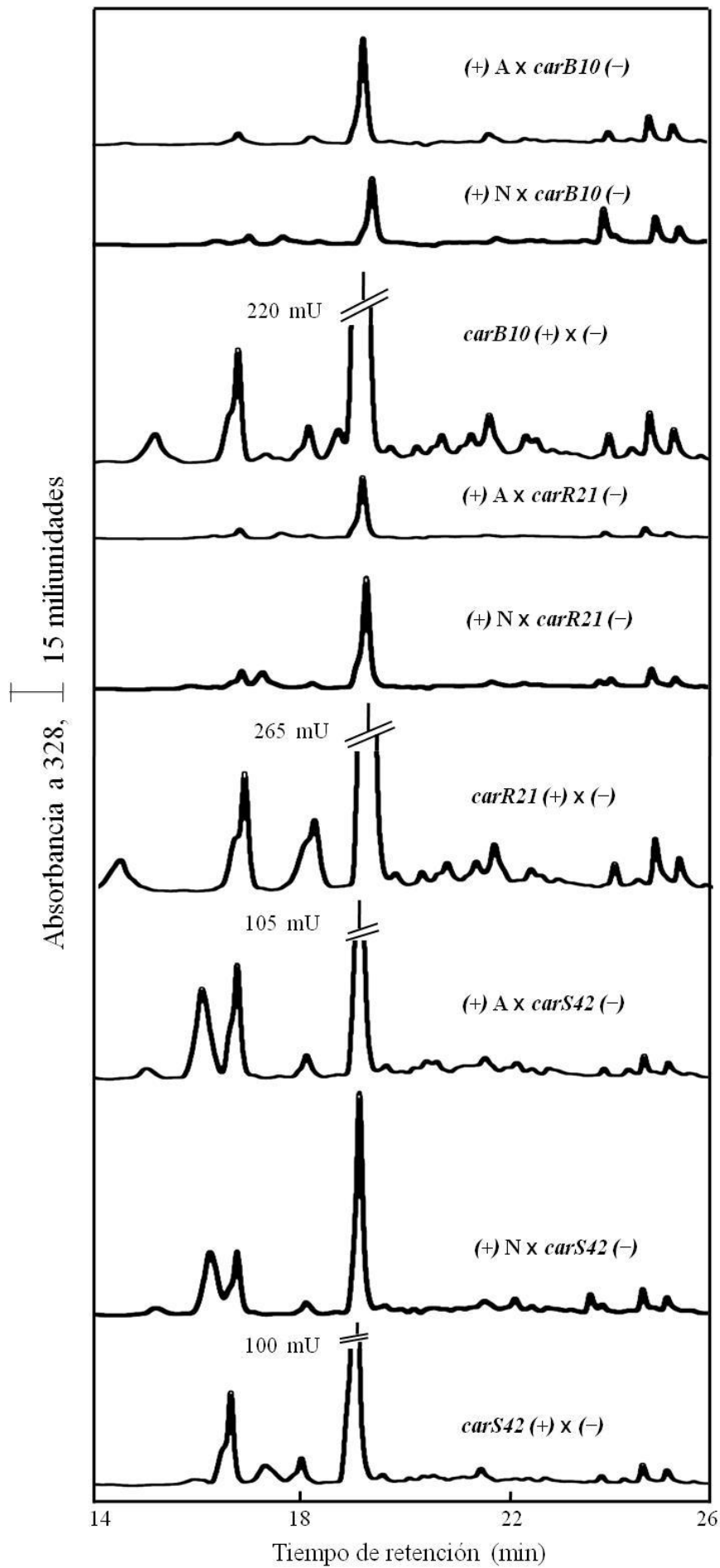


Figura 32
(continuación).
Fraccionamiento
cromatográfico de
apocarotenoides del
extracto neutro de
cultivos mixtos de
estirpes silvestres y
mutantes.

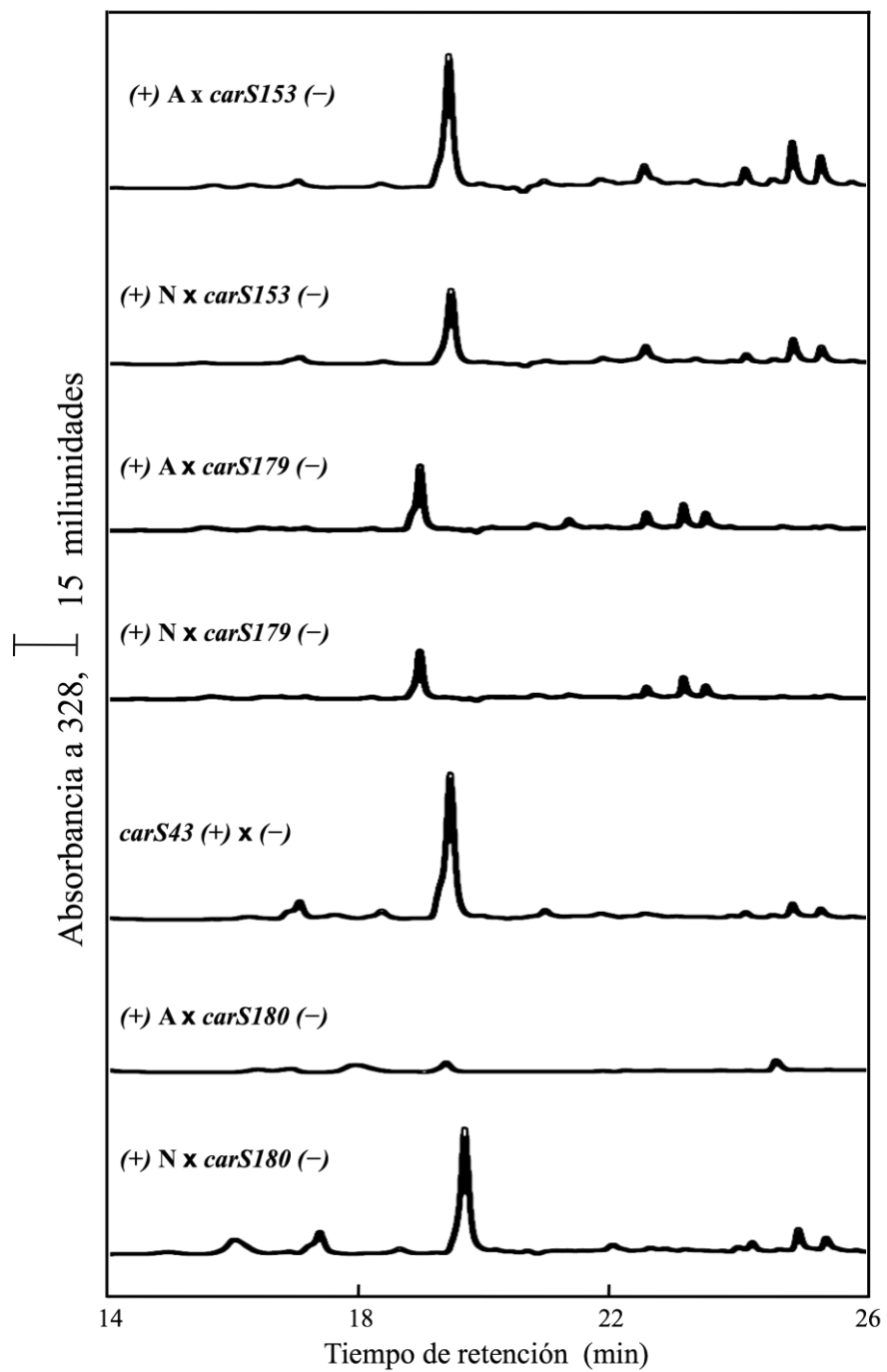


Figura 32 (conclusión). Fraccionamiento cromatográfico de apocarotenoides del extracto neutro de cultivos mixtos de estirpes silvestres y mutantes.

3.2.3 Cuantificación e identificación de apocarotenoides

Los cultivos mixtos contenían muchos más compuestos que los separados y casi siempre en concentraciones mayores. Las razones dadas en la pág. 56 nos llevaron también a la preparación de Tablas semicuantitativas. Los análisis completos de los apocarotenoides en los 26 cultivos mixtos de estirpes silvestres y mutantes pueden consultarse en el Material Suplementario. Como en la Parte II, algunos compuestos se identificaron tentativamente por su espectro de absorción y tiempo de retención reportados (Polaino *et al.*, 2010; 2012; Barrero *et al.*, 2012) y otros por espectrometría de masas (Prof. A. F. Barrero y col., comunicación personal). La identificación del resto de los compuestos está en curso.

Presentamos los resultados de 32 apocarotenoides detectados en los distintos cultivos mixtos: 6 en extractos ácidos (Tabla 3) y 26 en neutros (Tablas 4 y 5). Los más abundantes son los ciclofarnesoides Cn113, Cn115, Cn122 y Cn123. Las estructuras atribuidas a Ta116, Tn135, Tn137 y Tn145 deben considerarse provisionales (Figuras 27 y 33). Los ácidos trispóricos solo se detectaron en cultivos mixtos. Eran muy abundantes en los cultivos de dos estirpes silvestres, como era de esperar, pero en los de una estirpe silvestre y otra mutante eran poco abundantes o indetectables. Los ácidos trispóricos no se detectaron en los cultivos mixtos de una estirpe *carS* no rezumante, pero si en los de las *carB* no rezumantes. El resto de apocarotenoides y otros ocho compuestos (Fig. 34) permanecen sin identificar, pero sus espectros de absorción permiten clasificarlos en presuntos ciclofarnesoides y presuntos trisporoides.

Los apocarotenoides XCn117 y Cn136 no se encontraron en las estirpes silvestres si no en cultivos mixtos de una estirpe silvestre y otra mutante *carS*. El apocarotenoide Xn80 fue exclusivo de cultivos separados de dos estirpes silvestres.

Los cultivos mixtos de la estirpe silvestre A56 (+) con cualquier estirpe (–) dieron resultados parecidos a los de la estirpe NRRL1554 (+) con la misma estirpe (–). Eso indica que las diferencias de fondo genético no tuvieron un papel preponderante en los resultados.

Los apocarotenoides Ma26 y su isómero (Fig. 27), que son mucho más abundantes en cultivos mixtos que en separados (Polaino *et al.*, 2010), no se separaron bien con el método de fraccionamiento cromatográfico seguido (Fig. 31) y su estimación fue poco precisa. Los apocarotenoides Xa81, Xn118, Xn142 y Xn147, que ya habían sido detectados en el medio de cultivo de *Phycomyces* (Polaino *et al.*, 2012), no se encontraron en nuestro análisis.

Los cultivos mixtos de dos estirpes mutantes rezumantes contenían algunos apocarotenoides, usualmente en poca cantidad, que se detectaron en los cultivos mixtos de

dos estirpes silvestres. El cultivo mixto de las estirpes *carR* contenía varios compuestos que se consideraron presuntos apolicopenoides (Material Suplementario).

Tabla 3

Tabla 4

Tabla 5

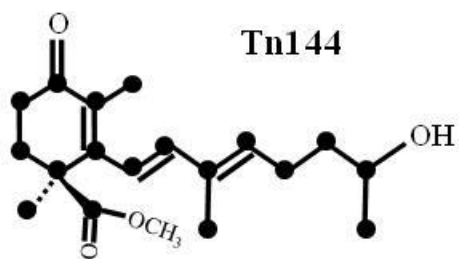
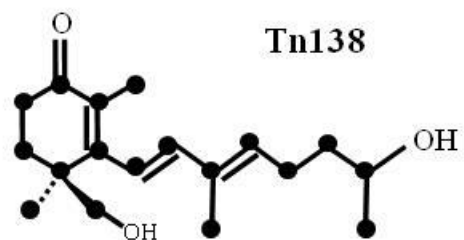
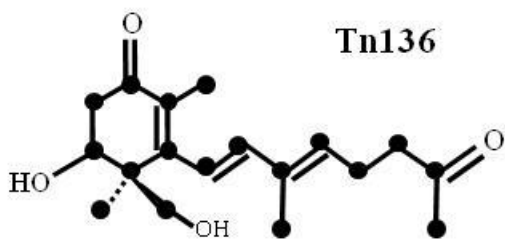
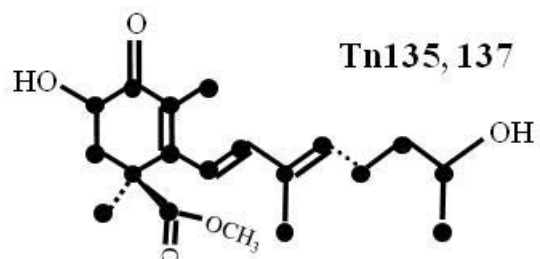
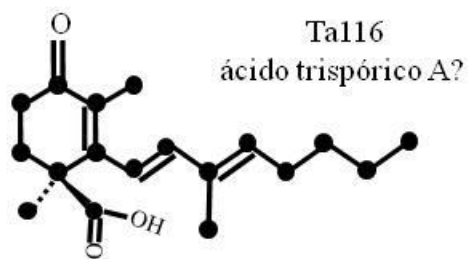
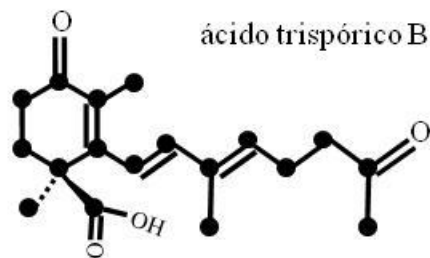
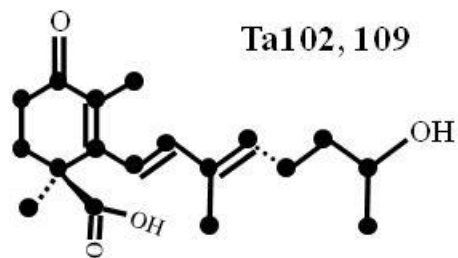
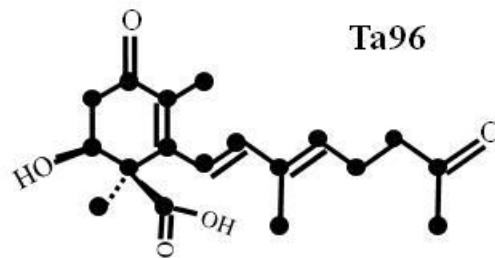
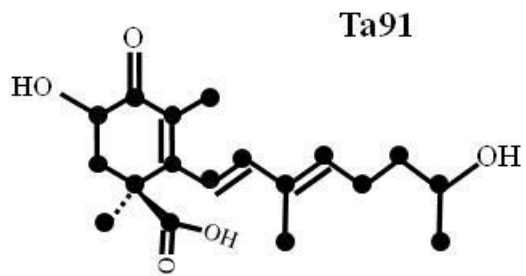


Figura 33 Estructuras probables de apocarotenoides de los cultivos mixtos de estirpes silvestres y mutantes. Ta91, ácido trispórico E; Ta96, ácido trispórico D; Ta102, 109, (9Z) y (9E) ácido trispórico C; Ta116, ácido trispórico A presunto; Tn135, 137, (9E) y (9Z) metiltrisporato E presunto; Tn136, trisporol D; Tn138, trisporol C; y Tn144, metiltrisporato C. Los apocatenoides Ta91, Ta96, Ta102, Ta109, Tn136, Tn138 y Tn144 se corroboraron por espectrometría de masas (Prof. A.F. Barrero y col., comunicación personal). El ácido trispórico B no se detectó en los análisis.

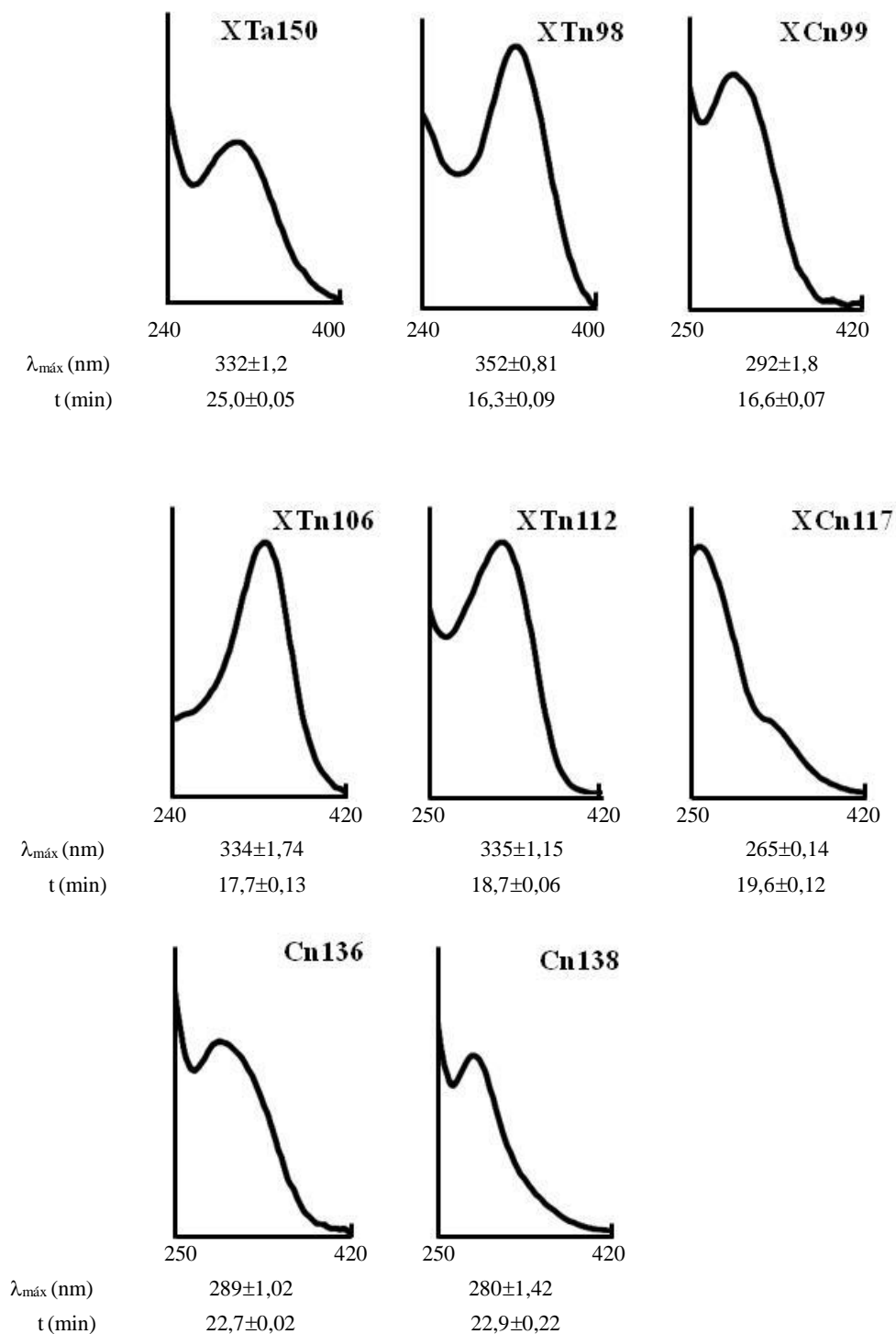


Figura 34 Otros apocarotenoides detectados en los cultivos mixtos de estirpes silvestres y mutantes. $\lambda_{\text{máx}}$, longitud de onda de máxima absorción, y t, tiempo de retención. Cada valor representa la media y su desviación típica en 2-6 mediciones de 1-3 experimentos independientes. Los compuestos Cn136 y Cn138 se corroboraron por espectrometría de masas (Prof. A.F. Barrero y col., comunicación personal).

3.2.4 Comparaciones analíticas por grupos de apocarotenoides

Los ácidos trispóricos solo se encontraron en cultivos mixtos. Para estimar la contribución de cada estirpe se consideró la absorbancia en el cromatograma (AU s) de los apocarotenoides en los distintos cultivos (Material Suplementario). Estos se clasificaron en seis grupos: el ácido Ma26; los ácidos trispóricos y el compuesto XTa150; los monociclofarnesoides Cn113, Cn122 y Cn123; el resto de compuestos neutros detectados a 280 nm; el monociclofarnesoide Cn115; y el resto de compuestos neutros detectados a 328 nm. Para cada grupo se calculó el efecto de la estimulación sexual y el daño ocasionado por la mutación (Tabla 6 y Fig. 35).

Los cultivos de una estirpe silvestre y otra mutante dieron valores similares del ácido Ma26; no se diferenciaron mucho según las mutaciones ni según la mutación esté en un sexo o en otro. Las parejas de estirpes silvestres acumularon ocho veces más ácido Ma26 que las parejas de una estirpe silvestre y otra mutante. Las mediciones del ácido Ma26 en los cultivos separados probablemente se sobrestimaron porque el pico de este compuesto se solapó al principio del perfil cromatográfico con otros que tienen espectros de absorción parecidos.

Los cultivos mixtos de las estirpes mutantes *carB10* y *carR21* con la silvestre (–) tuvieron bastantes ácidos trispóricos. No debe ser ruido experimental porque lo mismo ocurre con la estirpe *carS42* en análisis independientes. Los otros dos grupos de cultivos mixtos de mutantes tuvieron muy pocos ácidos trispóricos.

Los cultivos mixtos de las estirpes silvestres acumularon de siete a doce veces más Cn113, Cn122 y Cn123 que los cultivos de una estirpe silvestre y otra mutante. Los cultivos mixtos de las estirpes mutantes *carB10* y *carR21* con la silvestre (–) dieron valores más altos que todos los demás cultivos de una estirpe silvestre y otra mutante. La estimulación sexual de la síntesis de estos apocarotenoides fue baja; las estirpes silvestres acumularon siete veces más Cn113, Cn122 y Cn123 en cultivos mixtos que en los separados.

Los cultivos mixtos de estirpes silvestres acumularon al menos siete veces más apocarotenoides neutros (sin Cn113, Cn122 y Cn123) que los de una estirpe silvestre y otra mutante. Los cultivos mixtos de las estirpes mutantes *carB10* y *carR21* con la silvestre (–) dieron valores más altos que con cualquier otro cultivo de una estirpe silvestre y otra mutante. La estimulación sexual de la síntesis de estos apocarotenoides no fue muy alta porque las estirpes silvestres acumularon 13 veces más apocarotenoides neutros en cultivos mixtos que en los separados.

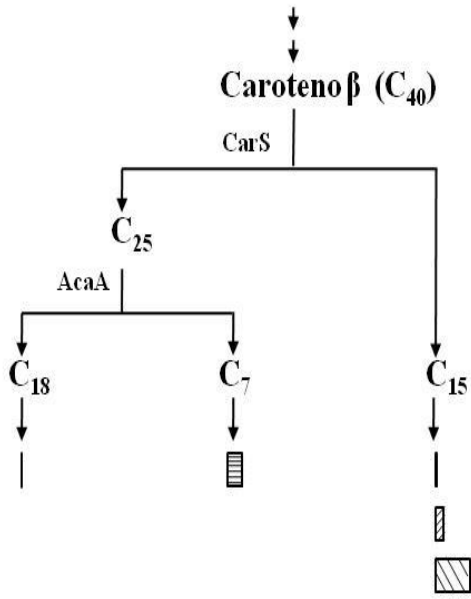
Los cultivos mixtos de estirpes silvestres acumularon ocho veces más Cn115 que los de una estirpe silvestre y otra mutante, pero estos cultivos dan valores muy heterogéneos. Los cultivos mixtos de las estirpes mutantes *carB10* y *carR21* con la silvestre (–) dieron valores más altos de Cn115 que con cualquier otro cultivo de una estirpe silvestre y otra mutante. Además tuvieron estimulación sexual normal (92 veces).

Los otros cultivos de una estirpe silvestre y otra mutante dieron resultados bastante parecidos. Su estimulación sexual fue apreciable (8-11 veces). La estimulación sexual de la síntesis de Cn115 fue altísima porque las estirpes silvestres acumularon 87 veces más Cn115 en los cultivos mixtos que en los separados.

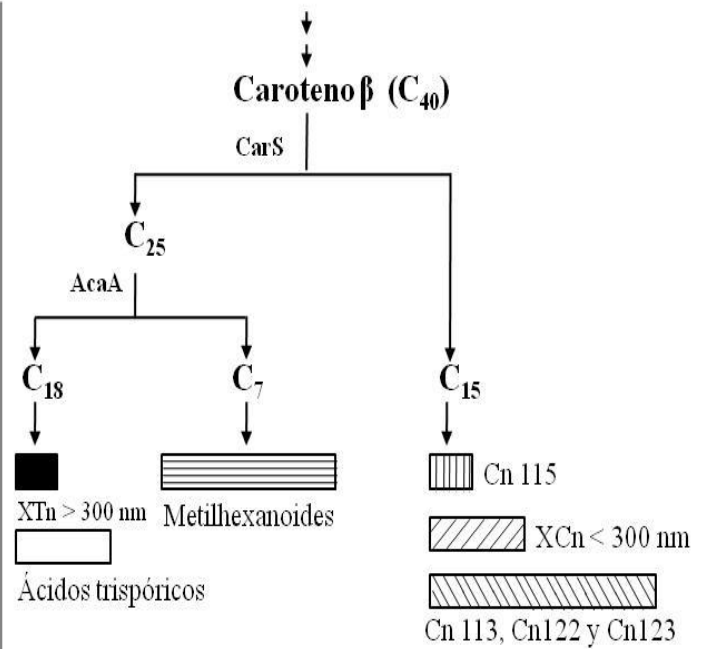
Los cultivos mixtos de estirpes silvestres acumularon 16 veces más apocarotenoides neutros (sin Cn115) que los de una estirpe silvestre y otra mutante, pero estos cultivos dieron valores muy heterogéneos. Los cultivos mixtos de las estirpes mutantes *carB10* y *carR21* con la silvestre (–) dieron valores más altos que con cualquier otro cultivo de una estirpe silvestre y otra mutante. La estimulación sexual de los apocarotenoides neutros que absorben longitudes de onda mayores de 300 nm fue altísima, las estirpes silvestres acumularon hasta 114 veces más en cultivos mixtos que en los separados.

Tabla 6

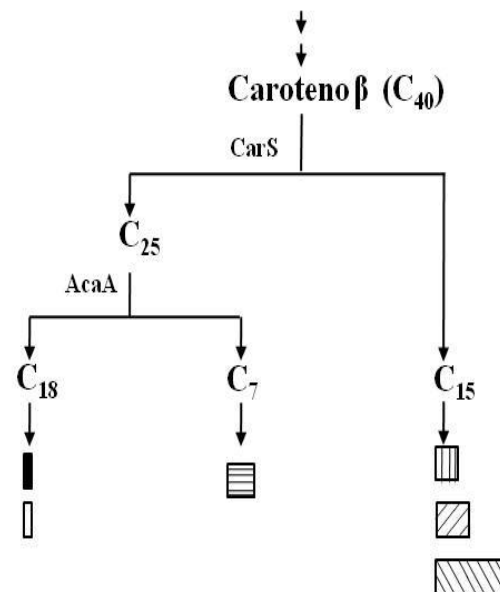
I Silvestres separados



II Silvestre (+) X silvestre (-)



III *carB* X silvestre (-) y *carR* X silvestre (-)



IV Los demás silvestre X mutante

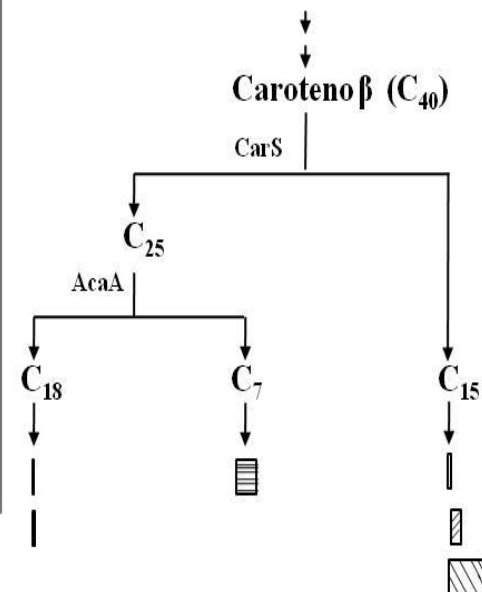


Figura 35 Producción de apocarotenoides en los distintos cultivos. Los rectángulos representan la suma de la absorbancia media en el cromatograma (AS s) de todos los compuestos en cada uno de los seis grupos de apocarotenoides. Los grupos XCn < 280 nm y XTn > 300 nm se consideraron presuntos C₁₅ y C₁₈, respectivamente. CarS, oxigenasa de caroteno β y AcaA, oxigenasa de apocarotenoides.

Discusión

4.1 Genes y enzimas

Como contribución al conocimiento de los apocarotenoides, la Parte I de esta Tesis se propuso estudiar los genes de *Phycomyces* que se parecen a los de las oxigenasas de carotenoides de otros organismos, presuponiendo que la producción de aquellos sea mediada por genes parecidos a estos. Se han descubierto así dos genes, *carS* y *acaA*, cuyos productos median dos rupturas sucesivas de la cadena carbonada del caroteno β , y otros tres genes de función desconocida.

4.1.1 Transcritos

Como la producción de apocarotenoides aumenta mucho durante la interacción sexual, no sorprende que los transcritos de los genes *carS* y *acaA* aumenten también (Fig. 14). Este aumento fue significativo, pero mucho menos acusado, en términos relativos, que el de la cantidad de apocarotenoides, analizada en Polaino *et al.* (2012) y en la Parte III de esta Tesis. Se puede proponer que el aumento de los transcritos no es la única causa del aumento de los apocarotenoides. Es fácil identificar una causa adicional: el aumento de la cantidad del sustrato inicial, el caroteno β , que se detecta fácilmente por la intensificación del color amarillo de los micelios durante la interacción sexual. Este aumento, la “carotenogénesis sexual”, es indispensable en la producción industrial de caroteno por *Phycomyces* y por *Blakeslea*.

Los transcritos de los genes estructurales para la producción de caroteno, *carB* y *carRA*, aumentan también durante la interacción sexual (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008). En esta Tesis se han repetido esos experimentos para que sirvieran de testigo a los de los genes *carS* y *acaA*. También se observa un aumento en la transcripción de otro gen, *carG*, que codifica una sintasa de pirofosfato de geranilgeraniol, la enzima que da lugar al fitoeno, primero de los carotenos por su orden de síntesis (V.G. Tagua, comunicación personal). En *Blakeslea*, la transcripción de *carG* aumenta por adición de ácidos trispóricos al medio de cultivo (Sun *et al.*, 2012).

Los transcritos de los genes *sexP* y *sexM*, que determinan el sexo en varios Mucorales (Polaino e Idnurm, 2012; Wetzel *et al.*, 2012), son más abundantes en cultivos mixtos que en cultivos separados, pero solo en micelios jóvenes, antes del aumento de los transcritos de los genes estructurales para la carotenogénesis (Fig. 14). La sucesión temporal de la abundancia de transcritos concuerda con la propuesta de que las proteínas SexP y SexM son factores de transcripción (Idnurm *et al.*, 2008).

4.1.2 Ruptura de caroteno β en *Phycomyces*

La Parte I de esta Tesis demuestra que las proteínas CarS y AcaA, expresadas en *E. coli*, son enzimas que cortan la cadena del caroteno β .

Los productos de su actividad *in vivo* e *in vitro* han confirmado que en *Phycomyces* el caroteno β se rompe en tres fragmentos de 18, 15 y 7 carbonos (Polaino *et al.*, 2010). Quedan descartadas las propuestas precedentes (Fig. 12) de un corte central, que produciría dos moléculas de retinal (Austin *et al.*, 1970; Werman y van den Ende, 1974), y de dos cortes simétricos, que producirían dos moléculas de 18 carbonos y otra de cuatro (Schachtschabel y Boland, 2007).

El caroteno β se fragmenta en dos pasos sucesivos, como se deduce de la detección de β -apo-12'-carotenal, un compuesto de 25 carbonos, en células de *E. coli* productoras de caroteno β en las que se expresó el gen *carS* (Fig. 15). Fue un demérito de estos experimentos no haber detectado en las mismas células un compuesto C_{15} , presumiblemente el β -apo-12-carotenal, que completara los 40 carbonos del caroteno β . No es probable que el C_{15} haya escapado a nuestros métodos, que detectan incluso compuestos más pequeños, como la ionona β (Scherzinger y Al Babili, 2008), pero es muy posible que *E. coli* lo metabolice rápidamente.

El segundo paso fue la fragmentación del C_{25} , y así lo demostró la detección de β -apo-13-carotenona, un compuesto C_{18} , en las mismas células de *E. coli* en las que se coexpresaron los genes *carS* y *acaA* (Fig. 15). De nuevo, se echó de menos otro compuesto, el fragmento C_7 , presumiblemente el 2-metilhexa-2,4-dienodial, que es volátil. Cuando solo se expresó *acaA* no se encontraron fragmentos, lo que sugiere la necesidad de colaboración entre ambas enzimas *in vivo*.

Los experimentos *in vitro* confirmaron y ampliaron la función asignada a AcaA por los experimentos *in vivo*. No se encontraron condiciones en las que las enzimas CarS y AcaA, juntas o separadas, purificadas o en extracto crudo, corten el caroteno β *in vitro*. La enzima AcaA, por sí sola, tanto purificada como en extracto crudo, cortó el compuesto C_{25} dando lugar al compuesto C_{18} (Fig. 20). También cortó los sustratos análogos de 27 y 30 carbonos (Fig. 21).

El anillo presente en el caroteno β y su fragmento C_{25} no es indispensable para la función de AcaA. Cuando se coexpresaron los genes *carS* y *AcaA* en células de *E. coli* que producían licopeno se detectó apo-13-licopenona, un compuesto C_{18} (Fig. 17). La expresión separada de *carS* y *acaA* en las mismas células de *E. coli* no produjo ningún fragmento de licopeno. *In vitro* AcaA por sí sola cortó varios sustratos de 25 a 30 carbonos, entre los cuales estaba el apo-12'-licopenal, pero no los mayores y menores que se ensayaron (Fig. 21).

En resumen, con la enzima CarS solo se consiguió cortar el caroteno β , y solo *in vivo*. La enzima AcaA es más versátil, puesto que, dentro de un cierto intervalo de tamaño, admite sustratos con y sin anillo β .

4.1.3 Ruptura de caroteno β en Mucorales

Las enzimas que rompen caroteno β deben ser activas en todos los Mucorales heterotáticos que usan apocarotenoides para la comunicación sexual.

La primera observación experimental, que sugiere, pero no demuestra, esa actividad fue la decoloración parcial de biomasa de *E. coli* que produce caroteno β por la expresión de un gen de *Blakeslea* llamado *tsp3* (Burmester *et al.*, 2007). El parecido de la secuencia de este gen con la del gen *carS* de *Phycomyces*, sugirió que en efecto es responsable de una oxigenasa de caroteno y que debe llamarse gen *carS* de *Blakeslea*, de acuerdo con la nomenclatura de Demerec *et al.* (1966) usada en estos hongos. Una comunicación preliminar de Yamuna y Boland (2012) identifica al β -apo-12'-carotenal (C_{25}) como el producto del corte de caroteno β en *Blakeslea*. Además este hongo debe tener actividad AcaA.

Las proteínas homólogas de CarS y AcaA de *Mucor circinelloides* también son oxigenasas que cortan caroteno β en dos pasos sucesivos (E. Alcalde, comunicación personal), como las de *Phycomyces*.

4.1.4 Ruptura de caroteno β en otros organismos

La proteína CarS es la única oxigenasa conocida por ahora que corta el caroteno β a fragmentos C_{25} y C_{15} . En plantas hay oxigenasas que también producen fragmentos de esos tamaños, pero a partir de 9-*cis*-epoxicarotenoides (Kloer y Schulz, 2006). Muchos organismos, de grupos muy diferentes, cortan el caroteno β a retinal (von Lintig y Vogt, 2000; von Lintig, 2010).

La síntesis de apocarotenoides en *Phycomyces* se parece a la de estrigolactonas en plantas (Schachtschabel y Boland, 2009; Walter y Strack, 2011) en que ambas involucran dos rupturas sucesivas de carotenoides. Sin embargo, los cortes son diferentes, dando un intermediario C_{25} en *Phycomyces* y un intermediario C_{27} en plantas (Schwartz *et al.*, 2004). Además, la segunda enzima de plantas es específica para el fragmento C_{27} (Alder *et al.*, 2008), mientras que la segunda enzima de *Phycomyces* corta varios sustratos.

4.1.5 Aspectos evolutivos

Las proteínas CarS y AcaA de *Phycomyces* y sus homólogas en otros Mucorales aparecen como sendas ramas separadas en el cladograma de las oxigenasas de carotenoides (Fig. 22). La separación génica debe haber resultado de la duplicación de un gen cuyo

producto habría cortado carotenoides y apocarotenoides, como la oxigenasa CCD1 de *Arabidopsis thaliana* (Schwartz *et al.*, 2001).

La proteína 64508 aparece muy próxima a AcaA y debe haber resultado de una duplicación reciente de este gen en *Phycomyces*. Aunque dieron resultados negativos las pruebas con esta proteína, *in vivo* e *in vitro*, sola o en combinación con otras, podría ser que ambas tengan la misma actividad en *Phycomyces*. Si este fuese el caso, sería difícil obtener mutantes de la ruptura del intermediario C₂₅.

Forman una rama separada las proteínas, dos por cada Mucoral, parecidas a las anteriores, pero carentes de varios aminoácidos considerados esenciales para la actividad oxigenasa. Esta rama se debe atribuir a una duplicación génica muy antigua, anterior a la separación de Mucoromicota y Ascomicota.

La especificidad de sustrato de las oxigenasas que rompen los carotenoides no se ha mantenido fija en el curso de la evolución. Las que cortan caroteno β se encuentran en varias ramas distantes, junto con otras que cortan otros carotenoides y apocarotenoides. Además, varios miembros de la familia cortan el enlace doble central de algunos estilbenos, compuestos muy diferentes a los carotenoides.

4.2 Apocarotenoides de *Phycomyces*

Las mejoras técnicas y la extensión de los análisis a compuestos que absorben a 280 nm y a varias mutantes han confirmado y ampliado los resultados del estudio precedente (Polaino *et al.*, 2012), que se limitaba a estirpes silvestres y a compuestos que absorben a 328 nm.

4.2.1 Absorbancia atribuida a apocarotenoides

El medio de cultivo empleado tiene una bajísima absorbancia en el intervalo ultravioleta-visible que nos interesa, pero los cultivos de cinco días, una vez libres de células, presentan una absorción considerable, con un máximo próximo a 260 nm. La composición química de estos medios es compleja (Barrero *et al.*, 1996) e incluyen compuestos aromáticos, como los ácidos gálico y protocatéquico. La absorción observada se debe mayoritariamente a metabolitos no relacionados con los apocarotenoides, como indican los cultivos de mutantes *carB* (Fig. 24, pág. 52). La presencia de apocarotenoides se refleja en un incremento de la absorción. Los cultivos separados de estirpes silvestres absorben más que los de mutantes *carB* en el intervalo de 270 a 310 nm, en el que absorben sobre todo los ciclofarnesoides; a mayores longitudes de onda hay un incremento muy pequeño, pero repetible, que indica la producción de algunos trisporoides neutros.

Las mutantes *carS* dan los mismos resultados que las *carB*, como se tenía que esperar porque no pueden romper el caroteno β , salvo un pequeño incremento atribuido a rezumancia. Las mutantes *carB* son testigos útiles, pero no perfectos, porque contienen trazas de fitoeno aparentemente vertido al medio por rotura de hifas.

El incremento es mucho mayor en los cultivos mixtos (Fig. 30, pág. 62) y se extiende hasta los 380 nm, con máximo hacia 320 nm. El incremento refleja el aumento en el contenido de apocarotenoides de todos los grupos, muy especialmente de los trisporoides neutros, y la abundante presencia de ácidos trispóricos, ausentes de los cultivos separados.

El incremento también se observó, en menor cuantía, en los cultivos mixtos de una estirpe silvestre y otra mutante y demostró que la contribución de los dos sexos no es simétrica: la producción fue mayor cuando el silvestre era de sexo (–) (Tabla 2, pág. 63).

4.2.2 Apocarotenoides en distintos cultivos

Los cromatogramas de cultivos de estirpes silvestres, separados o mixtos, revelan más de 50 compuestos químicos que debemos considerar apocarotenoides porque no se encuentran en los cultivos de mutantes *carB*. Algunos de ellos no se resuelven bien con la técnica empleada y la mayoría son poco abundantes, a juzgar por su absorbancia, o aparecen en algunos análisis pero no en otros. Se hicieron 177 análisis de 26 tipos de cultivos (separados o mixtos de tres estirpes silvestres y diez genotipos mutantes) y se presentan las medias de seis mediciones para cada tipo de cultivo (tres experimentos independientes con dos mediciones separadas cada uno, con algunas excepciones). Se descartaron los compuestos cuya absorbancia media fue menor de 0,1 AU s; los compuestos más abundantes superan 25 AU s. Las Tablas contienen 32 apocarotenoides, dos de los cuales se encontraron solo en cultivos separados, y a bajas concentraciones, 21 se encontraron solo en cultivos mixtos y 9 se encontraron en ambos tipos de cultivos. Como el apareamiento estimula la acumulación de apocarotenoides, las ausencias en los cultivos separados pueden ser en realidad presencias por debajo del umbral establecido.

En los cultivos separados no se encontraron ácidos trispóricos y fueron muy escasos los trisporoides neutros. Los flujos de carbono a metilhexanoides y a ciclofarnesoides son parecidos y debería serlo también el de los trisporoides, dada la estequiometría de la fragmentación del caroteno. La escasez de trisporoides podría deberse a inestabilidad o degradación enzimática: bastaría la pérdida de uno de los dobles enlaces centrales para que desaparecieran de nuestros análisis. No se puede excluir la posible conversión a ciclofarnesoides por pérdida de tres carbonos, pero no debe ser mayoritaria.

Las dos estirpes silvestres de sexo (+) no coinciden exactamente en su contenido de apocarotenoides; estas diferencias deben atribuirse a sus respectivos fondos genéticos. El medio de cultivo de la estirpe silvestre de sexo (–) contenía pequeñas cantidades de trisporol B, que no se encontraron en las estirpes de sexo (+). Este apocarotenoide se encuentra en otros Mucorales (Bu'Lock *et al.*, 1972; Prisbylla *et al.*, 1979) y se propone

que solo lo sintetiza la estirpe silvestre de sexo (–) de *Blakeslea* (Sutter y Whitaker, 1981; Sutter *et al.*, 1996).

Los cultivos mixtos de estirpes silvestres contienen todos los apocarotenoides presentes en los separados y muchos más. Diecinueve se han incluido en las Tablas 3 a 5 (pág. 72ss). La mayoría son poco abundantes y puede que se encuentren en cultivos separados por debajo del umbral de detección.

Los apocarotenoides son más abundantes en los cultivos mixtos que en los separados, unas 12 veces según la suma de absorbancias (Tabla 6). Las dos estirpes silvestres de sexo (+) dieron resultados muy parecidos, a pesar de sus diferencias de fondo genético. El aumento de los metilhexanoides y los ciclofarnesoides fue parecido en conjunto, pero encubre diferencias en la distribución. Así Cn115 aumentó mucho más que Cn122 y Cn123, los trientriólicos.

La diferencia crítica introducida por la interacción sexual es la carboxilación de los trisporoides. De esta manera son exclusivos de los cultivos mixtos los dos ácidos trispóricos más abundantes (C y E), el metiltrisporato C, el ácido trispórico D, escaso, y un presunto ácido trispórico (XTa150). De los más abundantes se encontraron isómeros 9E y 9Z. Los cultivos mixtos con mutantes no contienen ácidos trispóricos que no se encuentren en los cultivos mixtos de silvestres.

4.2.3 Efecto de las mutaciones *car*

Las mutantes *carB* y *carR*, que no producen caroteno β , y las mutantes *carS*, que no pueden cortarlo, tienen concentraciones muy altas y similares de los carotenos que producen, pero carecen de apocarotenoides o los tienen en pequeña cantidad. Podrían diferir en aspectos que dependan de si contienen fitoeno, licopeno o caroteno β .

La principal diferencia entre las distintas mutantes es su rezumancia, es decir, si carecen de actividad (nulimorfos) o conservan alguna (rezumantes, hipomorfos). Todas las mutantes utilizadas presentan sustituciones de una base por otra (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Arrach *et al.*, 2001; Parte I de esta Tesis y Tagua *et al.*, 2012), como era de esperar porque fueron obtenidas por exposición a *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina. Tales mutantes pueden ser rezumantes si las proteínas producidas conservan algún nivel de actividad o si la mutación es suprimida durante la traducción del ARNm a proteína. El nivel de supresión depende de la especificidad de los aminoacil-ARNt y de las sintetisas que los producen y por tanto del fondo genético de cada estirpe.

Excelentes mutaciones nulimorfos de este estudio son *carB10*, disponible en estirpes de ambos sexos, y *carS153*, disponible solo en el sexo (–). Las tres estirpes carecen por completo de apocarotenoides (Tabla 1), como era de esperar, y de ellas se obtienen los resultados más concluyentes. Como la conversión de fitoeno a caroteno β requiere cuatro ejemplares de la enzima CarB (pág. 26) es fácil obtener mutantes *carB* nulimorfos. Aunque cada ejemplar conserve una pequeña fracción de la actividad, el conjunto tendría una

actividad global de la cuarta potencia de esa fracción (Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974; Aragón *et al.*, 1976).

La carencia de función ocasionada por la mutación *carS153* indica que el aminoácido afectado, E₁₅₀, es esencial para la función de la enzima CarS en *Phycomyces*, pero no en otros organismos, en los que ni siquiera existe.

La mutación *carS43*, aunque tiene alguna actividad, indica que el aminoácido S₄₃₃ es importante para la función y de hecho está conservado en organismos muy distantes (Fig. 23).

Los cultivos mixtos *carB* (+) × *carB* (–) carecían por completo de apocarotenoides. Los mixtos *carB* × silvestre producen una colección amplia de apocarotenoides, todos en pequeñas cantidades, pero incluyendo los ácidos trispóricos y los principales apocarotenoides neutros. Cuando la estirpe silvestre es (–) la producción es más abundante que cuando es (+); este es uno de varios indicios de que la estirpe (–) empleada aporta un flujo de carbonos mayor que la estirpe (+).

Los demás mutantes empleados son hipomorfos, a juzgar por su contenido de apocarotenoides, a veces sorprendente (Tabla 1). Ningún mutante produce apocarotenoides que no se encuentren en las estirpes silvestres. La mutación *carR21* es muy poco rezumante en el sexo (–) y bastante en el sexo (+). Las mutaciones rezumantes *carR* deben producir más caroteno γ que β. Los cultivos mixtos *carR* (+) × *carR* (–) parecen tener pequeñas cantidades de derivados del licopeno hasta ahora desconocidos.

Los cultivos mixtos de mutantes rezumantes produjeron muchos apocarotenoides distintos, pero en poca cantidad, del orden de cien veces menos que los silvestres.

4.2.4 Limitaciones del método

La limitación principal es haber analizado solo cultivos de cinco días, de los que podían haber desaparecido muchos compuestos interesantes sea por metabolismo o por inestabilidad. Así ocurre con los tres productos primarios de la fragmentación del caroteno β. Los resultados deben confirmarse y ampliarse en cultivos más jóvenes.

El metilhexanoide Ma26 no se separó bien de su isómero, el (2*E*,4*E*)-6-hidroxi-2-metilhexa-2,4-dienoico (Figuras 26 y 31); para distinguirlos se debe usar otro método (Polaino *et al.*, 2010). La detección del trisporoide Tn154 implicaría la del Tn153, que se detectó en pequeña cantidad en dos de seis observaciones de nuestro análisis, por lo que no se reportó en las Tablas. El estudio precedente (Polaino *et al.*, 2012) lo encuentra, en pequeñas cantidades también, en los mismos cultivos.

4.3 Biosíntesis de apocarotenoides en *Phycomyces*

Dada la gran diversidad de los apocarotenoides en los hongos Mucorales (apartado 0.3.2.2), que podría extenderse a sus rutas metabólicas, las propuestas biosintéticas se basarán solo en resultados obtenidos con *Phycomyces*.

Es improbable que todos los apocarotenoides detectados sean productos enzimáticos, sino que pueden derivar de reacciones espontáneas y de hecho muchos son inestables en las condiciones del medio.

4.3.1 Etapas iniciales

Las reacciones iniciales de la biosíntesis (Fig. 36) convierten el caroteno β , en los precursores respectivos de las tres series de apocarotenoides. Estos precursores, presumiblemente aldehídos, no se han encontrado, pero los resultados enzimológicos (Parte I de esta Tesis) establecen claramente las reacciones implicadas. El punto de partida es el caroteno β , como se sabía desde hace mucho tiempo (Austin *et al.*, 1969; 1970), pero las reacciones iniciales son distintas de las que se habían imaginado.

4.3.2 Rutas biosintéticas

Los apocarotenoides identificados se pueden ordenar en rutas metabólicas (Fig. 36). Para ello se tienen en cuenta las estructuras moleculares y las reacciones enzimáticas conocidas o plausibles y se trata de minimizar el número total de reacciones. Las rutas propuestas incluyen los compuestos más abundantes, a juzgar por la absorción detectada a 328 nm y a 280 nm y sugieren probables intermediarios que se debe intentar identificar.

Las rutas metabólicas propuestas deben confirmarse y ampliarse con nuevas identificaciones de apocarotenoides, con biotransformaciones de sustratos sintéticos y con el estudio de los genes y las enzimas implicados.

En la ruta de los metilhexanoides el precursor se reduce a alcohol en un extremo y se oxida a ácido en el otro. Los dos metilhexanoides principales de *Blakeslea trispora* (Barrero *et al.*, 2011) son los de *Phycomyces*, pero se encuentran además compuestos hidroxilados pero no carboxilados. Esto sugiere la actuación inicial de una hidroxilasa capaz de actuar sobre cualquier extremo del precursor y así suponemos que ocurre también en *Phycomyces* (Fig. 36).

Es fácil asignar un precursor común, el compuesto hipotético H1, a los cinco ciclofarnesoides identificados (Fig. 36). Del β -apo-12-carotenal al H1 se necesitan dos hidroxilaciones y una reducción que darían lugar a varios intermediarios: dos, si ocurrieran en un orden fijo, y seis, si en cualquier orden. El Cn115 resultaría de la oxidación del C4 de H1. El apocarotenoide heterocíclico Cn113 y su isómero Cn96 procederían de la hidroxilación del metilo 14 de H1 y de la ciclación con eliminación de hidroxilo siguiendo un mecanismo S_N2' . Los trioles Cn122 y Cn123 procederían del ataque de agua al C10 de H1 con eliminación de hidroxilo siguiendo también un mecanismo S_N2' .

Figura 36 Biosíntesis de trisporoides y otros apocarotenoides en *Phycomyces*. La fragmentación de caroteno β por las oxigenasas CarS y AcaA (Parte I de esta Tesis) da lugar a tres familias de apocarotenoides: la de los trisporoides (Parte III de esta Tesis), la de los metilhexanoides (Polaino *et al.*, 2010) y la de los ciclofarnesoides (Polaino *et al.*, 2012). Las flechas representan reacciones enzimáticas, las que se muestran en líneas discontinúas representan reacciones que se activan por interacción sexual. Los paréntesis indican intermediarios presuntos (Barrero *et al.*, 2011). Los compuestos encerrados en una elipse solo se encontraron en cultivos mixtos.

La biosíntesis de los trisporoides presenta una oxidación progresiva (trisporinas, trisporoles, ácidos trispóricos). La escasez de los trisporoides neutros hace necesarias investigaciones adicionales. Como los ácidos trispóricos no se han encontrado más que en cultivos mixtos, solo estos deben tener la oxidasa capaz de convertir el grupo hidroximetilo en carboxilo. Una hipótesis atractiva es que la feromona de cada sexo induce en el sexo opuesto la transcripción de muchos genes necesarios para la morfogénesis, como la producción de cigóforos, y para muchas modificaciones del metabolismo. Entre estas se encuentran también el incremento de la respiración y de la producción de caroteno β . Durante el ciclo sexual de *Blakeslea* aumenta la transcripción de varios centenares de genes y disminuye la de algunos (Kuzina *et al.*, 2008).

4.3.3 Interacción de ambos sexos en la biosíntesis de apocarotenoides

La colaboración metabólica entre los sexos es el brillante factor común a varias propuestas sobre la biosíntesis de apocarotenoides (van den Ende, 1979; Sutter y Whitaker, 1981b; Sutter, 1987). Atribuyen a cada sexo al menos una actividad enzimática exclusiva (Fig. 8, pág. 26), de modo que cada sexo produce metabolitos distintos que se intercambian para producir los mismos compuestos finales. La colaboración metabólica parece lógica e incluso inevitable porque los apocarotenoides se aislan del medio de cultivo y son escasos o inexistentes en el citoplasma. Las enzimas estarían en el espacio periplásmico y actuarían sobre sustratos de cualquier origen. El intercambio dependería de la distancia entre las hifas, la cinética de las enzimas y la difusión de los sustratos.

Esta Tesis no invalida la propuesta de la colaboración, pero tampoco la apoya claramente, porque no resuelve nítidamente si hay metabolitos exclusivos de cada sexo en las estirpes silvestres de *Phycomyces*. En los cultivos separados de sexo (–), pero no en los (+), hay Tn153, trisporina B (Polaino *et al.*, 2012), y Tn145, trisporol B (esta Tesis), pero en ambos casos las concentraciones fueron tan bajas que podría dudarse de la exclusividad. No se encontraron metabolitos exclusivos del sexo (+).

Si se confirmara que la trisporina es exclusiva del sexo (–), la saturasa del enlace 11,12 sería la enzima exclusiva de ese sexo, como se propuso para varios Mucorales. Las estirpes de sexo (+) podrían hidroxilar el C18 dando 11,12-deshidrotrisporoles.

Como no se confirmó la presencia de trisporatos en cultivos de sexo (+), no parece aceptable que la conversión del C18 a carboxilo sea una reacción exclusiva de ese sexo, contra la propuesta de Sutter (1987).

Se puede proponer una alternativa que implica solo un nivel muy bajo de colaboración metabólica. Ambos sexos tendrían todos los genes para la biosíntesis de apocarotenoides, pero la transcripción de los usados para sintetizar los trisporoides neutros y ácidos sería inducida por las feromonas sexuales del sexo opuesto. Los genes reprimidos tendrían un nivel basal de transcripción que podría ser diferente para cada gen y cada estirpe y que daría lugar a los escasos trisporoides en los cultivos separados; el nivel basal para la oxidasa que crea el grupo carboxilo sería prácticamente nulo.

Esta Tesis encuentra colaboración metabólica entre estirpes mutantes *carB* y silvestres para producir la baja concentración de ácidos trispóricos que se encuentran en sus cultivos mixtos. La feromona del silvestre induciría las enzimas del mutante y éstas metabolizarían los trisporoides basales del silvestre a ácidos trispóricos. Las feromonas podrían ser trisporoides, pero también podrían ser ciclofarnesoides específicos de sexo, con tal de que hubiera un nivel basal de trisporoides convertibles a ácidos trispóricos.

4.4 Funciones de los apocarotenoides

4.4.1 Defensa contra el estrés oxidativo

Muchas familias de compuestos a veces llamados secundarios son ricos en oxígeno: los carotenos y sus derivados, los esteroides, las giberelinas y otros derivados de caureno, los poliquétidos. La gran diversidad de sus fórmulas estructurales, incluso dentro de una sola célula, y las diferencias entre individuos genéticamente próximos hacen impensable atribuir funciones específicas a cada uno.

Las reacciones que consumen oxígeno molecular, por ejemplo, la desaturación de los carotenos, contrarrestan la entrada de oxígeno a las células y la formación en ellas de especies reactivas de oxígeno. Se puede pensar que esos metabolitos confieren colectivamente una ventaja evolutiva: aumentar la resistencia al oxígeno, particularmente necesaria cuando escasean la glucosa y demás sustratos del metabolismo oxidativo.

Entre la diversidad de moléculas producidas por un organismo, algunas podrían ser reconocidas como señales y adquirir un papel regulador, sea en el interior de las células, entre las células de un organismo o entre organismos diferentes. Este debió ser el origen de muchos reguladores, hormonas y feromonas.

4.4.2 Feromonas sexuales de *Phycomyces*

La observación de que las estirpes silvestres de cualquiera de los dos sexos estimulan sexualmente a las estirpes mutantes carentes de caroteno, pero no a la inversa,

demuestra que cada sexo emite una señal específica que tiene que ser un apocarotenoide (Sutter, 1975). Su identificación debe comenzar con la de apocarotenoides exclusivos de un sexo.

Como se indica en el apartado 4.3.3, esta Tesis presenta un candidato a feromona del sexo (–), el trisporol B (compuesto Tn145). Este compuesto fue detectado en cultivos separados de la estirpe silvestre (–) y en los mixtos de ésta y la estirpe mutante *carB* (+), pero no en cultivos separados de las estirpes silvestres (+) ni en los mixtos de las estirpes (+) y la mutante *carB* (–). Otro posible candidato es la trisporina B (compuesto Tn153), detectada por Polaino *et al.* (2012). Antes de seguir adelante se deben confirmar las candidaturas analizando a gran escala cultivos separados más jóvenes. No se puede excluir aún que se encuentren otros candidatos, incluso entre los ciclofarnesoides.

Los metiltrisporatos C y E (compuestos Tn144, Tn135 y Tn137) han sido propuestos como feromonas del sexo (+) e inductores de la formación de cigóforos en *Phycomyces* (Sutter y Whitaker, 1981a; Drinkard *et al.*, 1982; Miller y Sutter, 1984; Sutter, 1987). Esta Tesis no apoya esta propuesta porque no los encontró en los cultivos separados de ningún sexo. Es posible que una vez establecida la interacción sexual se produzcan nuevos apocarotenoides, como los citados, que incrementen la formación de cigosporas.

Las feromonas pueden haber escapado a nuestra detección por ser poco abundantes, por ser inestables, o por producirse mucho antes del momento elegido para nuestros análisis.

4.4.3 Regulación de la biosíntesis de caroteno y de apocarotenoides

La proteína CarS tiene una función esencial en la inhibición de la carotenogénesis por realimentación (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976; Bejarano *et al.*, 1988; Salgado y Cerdá-Olmedo, 1992). Se ha propuesto que este mecanismo inhibe a CarA, la sintasa del fitoeno, la primera enzima de la ruta, en presencia del producto de otro gen, *carI* (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982; Arrach *et al.*, 2001).

La producción de caroteno aumenta cuando la inhibición se pierde, sea por la presencia de grandes cantidades de retinol, iononas y sus análogos o por mutaciones *carS* (Eslava *et al.*, 1974; Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976; Bejarano *et al.*, 1988). La actividad de la ruta aumenta cuando es obstruida por inhibidores o mutaciones *carB* y *carR* y da lugar a la acumulación de los metabolitos intermedios de los pasos afectados (Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974; Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1989), aunque ni siquiera llegue a producirse caroteno β .

Una buena prueba del incremento en la actividad biosintética en las mutantes *carS* se observa en el marcaje radioactivo *in vivo* con mevalonato, el precursor de todos los terpenoides: la radioactividad específica es mucho más baja en la mutante *carS* que en la estirpe silvestre, mientras la cantidad de caroteno y su radioactividad total son mucho más altas (Murillo *et al.*, 1981; Bejarano y Cerdá-Olmedo, 1992; Kuzina *et al.*, 2006).

Para explicar estas observaciones se propuso como señal inhibitoria un complejo formado por el caroteno β y la proteína CarS (Bejarano *et al.*, 1988). Nuestras observaciones debilitaron esta hipótesis, porque la actividad oxigenasa de CarS destruiría al caroteno β asociado a ella. Además, una mutante *carS* que produjera una proteína sin actividad enzimática permitiría la formación del complejo CarS-caroteno β y su contenido de caroteno β sería como el de la silvestre, pero esto no ocurre; la estirpe mutante *carS153* no mostró actividad enzimática, pero acumuló mucho más caroteno β que la silvestre. De todas maneras no se puede excluir que la señal sea el complejo CarS-caroteno β , estabilizado tal vez por asociación con CarI. Aun así habría que atribuir a la proteína CarS dos funciones: la enzimática que rompe caroteno β y la inhibitoria que bloquea a CarA. Ambas funciones deben ser dependientes porque de otra manera se esperaría encontrar mutantes que sobreacumularían caroteno β pero conservarían la actividad enzimática. Estas mutantes no se han encontrado, ya que todas las mutantes *carS* ensayadas son deficitarias en la producción de apocarotenoides.

Se debe proponer por tanto que la señal inhibitoria es un producto de la ruptura del caroteno β , que sería quien actuase con CarA y CarI. Las mutantes de los genes estructurales *carB* y *carR* y las del regulador *carS* no tienen inhibición por realimentación porque no pueden sintetizar el precursor ni cortarlo, respectivamente. La activación de la ruta biosintética en estas mutantes se debería a un mismo fenómeno: la carencia de señal inhibitoria. Esta señal inhibitoria podría ser cualquier derivado del caroteno β . Como el fenotipo de las mutantes *carS* no se encuentra en mutantes de ningún otro gen, es probable que la señal inhibitoria sea un producto directo de la ruptura por CarS. Una comparación de activadores e inhibidores sugiere al β -apo-12'-carotenal (el producto C₂₅) más que al β -apo-12-carotenal (el producto C₁₅). La ruta se activa por retinol, iononas y otras moléculas con 20 carbonos o menos, pero se inhibe por una molécula con una cadena más larga, (2E,4E,6E,8E)-9-(4-metoxi-2,3,6-trimetilfenil)-3,7-dimetil-2,4,6,8-nonatetraenoato de etilo, un C₂₃ (Bejarano *et al.*, 1988). Por supuesto que este indicio es insuficiente, ya que otras diferencias, más que la longitud, pueden ser responsables de las acciones opuestas.

La inhibición de la carotenogénesis se pierde en presencia de retinol. Sin embargo, dos mutantes muestran poco incremento en el contenido de caroteno β en la presencia de retinol cuando se comparan con la estirpe silvestre: uno se ha asignado al dominio A del gen *carRA* (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982) y el otro define al gen *carI* (Arrach *et al.*, 2001; Bejarano *et al.*, 1988; Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982). Estas observaciones se explican si el β -apo-12'-carotenal (C₂₅) inhibe a CarA y detiene la biosíntesis cuando la cantidad de caroteno es suficiente.

El retinol y otros compuestos con anillo β compiten por el mismo sitio y frustran la inhibición, presumiblemente porque estos también pueden unirse a CarA y prevenir el efecto inhibitorio. El presunto sitio de regulación de CarA debe distinguir las pequeñas

diferencias estructurales de varios compuestos con anillo β para permitir a unos inhibir la actividad de la enzima y a otros aumentarla.

No se debe descartar la posibilidad de que CarA tenga varios sitios regulatorios. Elucidar este mecanismo requiere información acerca de la estructura de la proteína CarA, preferiblemente con las moléculas unidas a ésta.

Todas las estirpes *carS* analizadas tienen mucho más caroteno β (Tagua *et al.*, 2012) que las silvestres, pero carecían de apocarotenoides o los producían en cantidades mucho menores que las silvestres. El incremento del contenido de caroteno β debe ser una consecuencia de la carencia de apocarotenoides porque entre ellos se encuentra el β -apo-12'-carotenal, la presunta señal inhibitoria.

Se propuso que esta señal inhibitoria debe ser producida en cierta cantidad porque este apocarotenoide es el sustrato de AcaA, la segunda oxigenasa en la ruta de los trisporoides. Presumiblemente, la poca cantidad de señal inhibitoria producida en las mutantes *carS* rezumantes se destruye por la actividad de esta enzima. La detección de casi todos los apocarotenoides de la estirpe silvestre en el mutante *carS42* apoyó esta propuesta porque este mutante tiene la mayor actividad rezumante y el menor incremento en el contenido de caroteno β , en comparación con otras mutantes *carS* (Tagua *et al.*, 2011).

4.4.4 Carotenogénesis sexual

Se propone que el incremento en la producción de caroteno β (carotenogénesis sexual) y la formación de cigóforos, dos respuestas asociadas al desarrollo sexual, son mediados por diferentes apocarotenoides (Tagua *et al.*, 2012) y que ambas pueden ser reguladas por mecanismos independientes, como lo demuestra el hecho de que el acetato inhibe la carotenogénesis sexual pero induce el desarrollo de las estructuras sexuales (Kuzina y Cerdá-Olmedo, 2006).

La sospecha de que el β -apo-12'-carotenal es la señal inhibitoria y la demostración de que este apocarotenoide es cortado por la oxigenasa AcaA (Parte I de esta Tesis) debilitaron esta propuesta. El β -12'-apocarotenal se corta para producir otros apocarotenoides, entre los cuales se encuentran las señales sexuales. La carotenogénesis sexual podría ser ocasionada por la destrucción de la señal inhibitoria.

La inhibición de la carotenogénesis sexual podría ser ocasionada por la ausencia de algunos apocarotenoides metilados en el medio de cultivo. El acetato inhibiría la metilación de apocarotenoides como el Ta102 (ácido trispórico C), el precursor del metiltrisporato C (compuesto Tn144). El metiltrisporato C y otros apocarotenoides sintéticos inducen la carotenogénesis en *Phycomyces* (Govind y Cerdá-Olmedo, 2006). Este apocarotenoide se detectó en el cultivo mixto de dos estirpes silvestres, pero no se encuentra en el mismo cultivo crecido con acetato (Polaino *et al.*, 2012).

Materiales y métodos

5.1 Estirpes

5.1.1 *Phycomyces*

Las estirpes de *Phycomyces blakesleeenanus* utilizadas en esta Tesis se indican en la Tabla 7. Su nomenclatura sigue las reglas de Demerec *et al.* (1966).

5.1.2 Bacterias

Las células de la estirpe DH5 α de *Escherichia coli* se utilizaron para el mantenimiento y multiplicación de plásmidos. Las células competentes se obtuvieron siguiendo el método reportado por Hanahan (1983), modificado por Inoue *et al.* (1990), y las recomendaciones descritas en el manual de Sambrook *et al.* (1989).

Las células Tuner DE3 (Studier *et al.*, 1990) (Novagen, Darmstadt, Alemania) se utilizaron para la expresión de proteínas quiméricas. En estas células el nivel de inducción es alto porque la mutación en la permeasa *lacY* facilita la entrada de isopropil- β -D tiogalactósido (IPTG), un análogo de lactosa. Además, las células Tuner DE3 llevan el plásmido pGro7 (Nishihara *et al.*, 1998) (Takara Bio, Chiga, Japan), que ayuda al pliegue correcto de las proteínas porque expresa las chaperonas groES-groEL bajo el promotor BAD, inducible por arabinosa.

En los ensayos de actividad enzimática se usaron células TOP10 de *E. coli* que acumulan licopeno o caroteno β . Las que producen licopeno se obtuvieron por transformación con un plásmido que contenía los genes biosintéticos *crtE*, *crtB* y *crtI* de *Erwinia herbicola* (Hundle *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 2008); para producir caroteno β el plásmido contenía además el gen *crtY* del mismo microorganismo (Prado-Cabrero *et al.*, 2007b). Ambas estirpes fueron proporcionadas por el Dr. S. Al Babili, del laboratorio del Prof. Dr. P. Beyer, en la Universidad de Friburgo, Alemania.

5.2 Secuencias

Los números de acceso de las secuencias utilizadas para la comparación son AAY89370 para NCED1 de *Citrus sinensis*; Q8LP14 para NCED4 de *Pisum sativum*; AAT68187 para CCD1A y O24023 para NCED1, ambas de *Solanum lycopersicum*; Q94IR2.1 para NCED2 de *Phaseolus vulgaris*; AAX48772 para CCD1 de *Vitis vinifera*; AAT68189 para CCD1 de *Petunia hybrida*; Q84KG5.1 para CCD de *Crocus sativus*; Q93FA4 para SIM14 de *Streptomyces antibioticus*; Q53353 para LSD, Q8RQW2 para LSDA y Q52008 para LSDB, las tres de *Sphingomonas paucimobilis*; Q28175.3 para RPE65 de *Bos taurus*; Q9YGX2.1 para RPE65 de *Gallus gallus*; Q8AXN9.3 para RPE65 de *Cynops pyrrhogaster*; Q9YI25.3 para RPE65 de *Ambystoma tigrinum*; CAD33263 para LCO de *Bixa orellana*; y otras publicadas (Giuliano *et al.*, 2003; Brefort *et al.*, 2011).

Tabla 7 Estirpes utilizadas en esta Tesis. (+) y (—) designan los sexos. Los genotipos *car*, *geo* y *mad* designan mutaciones que afectan a la carotenogénesis, el geotropismo y el fototropismo, respectivamente. El genotipo *nicA101* designa la mutación que causa auxotrofia para el ácido nicotínico. En el origen de las estirpes, x separa los parentales de los cruzamientos; * separa los genotipos de los núcleos de los heterocariontes. (NG), indica exposición a *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina. Las estirpes se designan con una o más letras mayúsculas según su procedencia. Las estirpes silvestres de *Phycomyces* designadas con NRRL se obtuvieron del Northern Regional Research Laboratory (ahora llamado National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, EE.UU.). La estirpe A56 procede de la colección del Prof. A. Pérez Eslava, Universidad de Salamanca. Las estirpes mutantes C5, C9 y C115 proceden de la colección que tuvo el Prof. Max Delbrück, California Institute of Technology (Pasadena, CA, EE.UU.). Las estirpes mutantes designadas con S son originales de nuestra colección en el Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla. La estirpe M1 procede de la colección del Prof. R. P. Sutter, University of West Virginia (Morgantown, WV, EE.UU.).

Estirpe	Genotipo	Origen	Referencia
NRRL1554	(+)	Desconocido	
A56	(+)	Isogénica a NRRL1555	Álvarez <i>et al.</i> , 1983.
NRRL1555	(—)	Desconocido	
C5	<i>carB10 geo-10</i> (—)	NRRL1555 (NG)	Cerdá-Olmedo y Reau, 1970; Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1988.
S342	<i>carB10 nicA101</i> (+)	((UBC21 x NRRL1555(NG)) x NRRL1555(NG)) x (((UBC21 x NRRL1555(NG)) x (C9*((UBC21 x NRRL1555(NG)) x NRRL1555(NG)) x (C115*NRRL1555(NG)))) * (C5 Espontáneo))	
C9	<i>carR21</i> (—)	NRRL1555 (NG)	Cerdá-Olmedo y Reau, 1970; Pueyo y Cerdá-Olmedo, 1981; Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982.
S179	<i>carR21 nicA101</i> (+)	(UBC21 x NRRL1555(NG)) x (C9* (((UBC21 x NRRL1555(NG))) x (NRRL1555(NG))) x (C115* (NRRL1555(NG))))	
S276	<i>carS42</i> (+)	((UBC21 x (NRRL1555(NG))) x NRRL1555(NG)) x (C115*(NRRL1555(NG)))	Garcés <i>et al.</i> , 1985; Bejarano <i>et al.</i> , 1988.
C115	<i>carS42 mad-107</i> (—)	NRRL1555 (NG)	Meissner y Delbruck, 1968; Bejarano <i>et al.</i> , 1988.
M1	<i>carS43</i> (+)	NRRL1554 (NG)	Sutter, 1975.
S100	<i>carS98</i> (—)	NRRL1555 (NG)	Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976; Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1988.
S178	<i>carS153 madB104</i> (—)	(NRRL1555(NG)) (NG)	Bejarano <i>et al.</i> , 1988.
S303	<i>carS179 dar-52</i> (—)	(NRRL1555(NG))*(NRRL1555 Espontáneo) (NG)	De la Concha y Murillo, 1984; Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo, 1988
S324	<i>carS180</i> (—)	(NRRL1555(NG))*(NRRL1555 Espontáneo) (NG)	De la Concha y Murillo, 1984.

Los números de identificación de las proteínas predichas de los Mucorales se tomaron de los genomas de las estirpes NRRL1555 de *Phycomyces blakesleeanus* (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Phybl2>); 99-880 de *Rhizopus oryzae* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/rhizopus_oryzae/MultiHome.html) y CBS277.49 de *Mucor circinelloides* (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>).

5.3 Cebadores

Los oligonucleótidos (Tabla 8) se diseñaron con los programas Oligo Calc (Oligonucleotide Properties Calculator) (Kibbe, 2007) y Primer Express (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido).

5.4 Cultivos generales

Las estirpes silvestres y las mutantes se cultivaron por separado o juntas (cultivos “mixtos”) sobre cajas de Petri que contenían 25 mL de agar mínimo (Cerdá-Olmedo y Lipson, 1987). Para auxótrofos, el medio se suplementó con ácido nicotínico (1 g/L) y para la estirpe S303, con extracto de levadura (1 g/L).

Las esporas se activaron suspendiéndolas en agar (8 g/L) a 48° C durante 15 min. Las cajas se inocularon con 2,5 mL de suspensión que contenían 10⁴ esporas para análisis de apocarotenoides y 10⁵ esporas para estimación de transcritos; en el caso de cultivos mixtos fueron la mitad de cada sexo. Los cultivos se incubaron a 22° C en oscuridad y las muestras se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a –70° C.

5.5 Extracción y análisis de apocarotenoides

Los cultivos, la eliminación del agar, la extracción de apocarotenoides y la cromatografía líquida en fase reversa de las fracciones neutra y ácida fueron descritas por Polaino *et al.* (2012).

5.6 Clonación

El ADNc total, usado para rastrear los genes *carS*, *acaA*, *76627*, *64508* y *58172*, fue sintetizado a partir de ARNm aislado de micelio cultivado sobre agar mínimo durante 48 h en oscuridad y expuesto a luz azul (17 kJm⁻²) durante 30 min (Rodríguez-Romero y Corrochano, 2004) y proporcionado generosamente por el Dr. J. Rodríguez-Romero.

Los cinco genes se amplificaron por PCR con la enzima Expand High Fidelity (Roche, Mannheim, Alemania) (Barnes, 1994). La mezcla de reacción se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y las recomendaciones del manual de Sambrook *et al.* (1989). La amplificación se llevó a cabo aplicando 30 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 50-53° C, y 90 s a 72° C, seguidos de 5 min a 72° C, en un termociclador Techne FTC3/02 (Bibby Scientific, Stone, Staffs., Reino Unido).

Los productos de PCR se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa (8 g/L) y se purificaron siguiendo el protocolo Illustra GFX (Volgelstein y Gillespie, 1979) (GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks., Reino Unido).

Tabla 8 Cebadores utilizados en esta Tesis. D e I, secuencias directa e inversa.

Cebador	Secuencia	Gen
<i>Para clonación</i>		
poxyPb58172-D	5'-GGGCTCGAGATGTCTGTCGGTAAACTA-3'	58172
poxyPb58172-I	5'-CCCTCAATAATGACGCACTAGACGGGT-3'	58172
poxyPb64508-D	5'-GGGGGATCCATGATTTATATTCTTACC-3'	64508
poxyPb64508-I	5'-CCCTTAGTTGATAGACACGCTTTC-3'	64508
poxyPb76627-D	5'-GGGATGGCCGAACAAATGAACCCT-3'	76627
poxyPB76627-I	5'-CCCCGGCCGAGAATCCTAATTTCTGAAG-3'	76627
poxyPb77754-D	5'-GGGGTCGACATGATCATCC-3'	acaA
poxyPb77754-I	5'-GCCAGTAAATGCATCAATTGATT-3'	acaA
phoxi-D	5'-GGGCTCGAGATGCTTACTCCTGCCGCC-3'	carS
phoxi-I	5'-CCCCAAGCTTTTGCGCCCTTTAGTTAA-3'	carS
pD1-D	5'-TGGGTAAATGGTGTTCATGTAC-3'	carS
pD1-I	5'-GACAAAAATGGGCTCGGAACA-3'	carS
catri-F	5'-ATGCTTACTCCTGCCGCCGAAAAC-3'	carS
catri-R	5'-TTAGTTAACAGCAACACCTTTGCC-3'	carS
<i>Para estimación de transcritos</i>		
poxyPb58172-2-D	5'-CCCGTCCTCAACTTCGACAA-3'	58172
poxyPb58172-2-I	5'-GAGTAAAACGGCACACTTGAGAAGA-3'	58172
poxyPb64508-2-D	5'-GCGGCTTGTGTCGAAGAAG-3'	64508
poxyPb64508-2-I	5'-AGCATATTAGCATCTGTTTTGGTAACA-3'	64508
poxyPb76627-2-D	5'-CGTTCCTTGTGTCGACGATCA-3'	76627
poxyPb76627-2-I	5'-CCGTGCTTGGAGGAAAAGG-3'	76627
poxyPb77754-D	5'-CGCCAACCCAGCTTTGG-3'	acaA
poxyPb77754-I	5'-GCCTCACCTGTTCCGTTCTC-3'	acaA
pd2-D	5'-CTTAGACGTTATCGCCTTGGA-3'	carS
pd2-I	5'-GCGACCAGCGCAAGT-3'	carS
pCarB-D	5'-TGGTTCCCATCGGTCACAT-3'	carB
pCarB-I	5'-GCACGCTTGACAATCATGGT-3'	carB
pact1-D	5'-AGGCTGTCTTTCCCTTTACG-3'	act-1
pact1-I	5'-GACACCATCACCGGAATCG-3'	act-1
sexPPb-D	5'-CGGGAAACGTGGTTTTGATT-3'	sexP
sexPPb-I	5'-AAACGGCCATCAAATGCATT-3'	sexP
sexMPb-D	5'-CACGAACGGCAGGGAAAAT-3'	sexM
sexMPb-I	5'-CATCCGCTTTTCGCTCGTAA-3'	sexM
pCarRA-D	5'-TGCCTTCCGCAGCTTCAC-3'	carRA
pCarRA-I	5'-TCCTCGACGGCCTTGATTT-3'	carRA

Los productos de PCR purificados se ligaron por separado al pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EE.UU.), con ligasa de T4 (Promega), siguiendo las recomendaciones del manual de Sambrook *et al.* (1989).

Las construcciones pGEM-T Easy-*carS* (4902 pb), pGEM-T Easy-*acaA* (4848 pb), pGEM-T Easy-76627 (5085 pb), pGEM-T Easy-64508 (4838 pb) y pGEM-T Easy-58172 (4839 pb) se utilizaron para transformar por separado células de la estirpe DH5 α de *E. coli*. La introducción de las construcciones, por choque térmico, y la selección de transformantes se llevó a cabo como se describe en el manual de Sambrook *et al.* (1989). Varios presuntos transformantes se inocularon por separado en 3 mL de medio LB con ampicilina (100 mg/L). El cultivo se incubó a 37° C en agitación (250 rpm) toda la noche. La suspensión de células se concentró por centrifugación a 12,000 x g durante 5 min, se mezcló con glicerol estéril (0,85:0,15 en vol.), se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a – 70° C.

El ADN plasmídico se aisló con el protocolo Wizar Plus SV Minipreps (Guntelberg y Otteson, 1954; Ahle *et al.*, 1993) (Promega, Madison, WI, EE.UU.), se cortó con la enzima *EcoR* I (Takara Bio, Shiga, Japan) y se corroboró por secuenciación.

5.7 Obtención de ARNm y su cuantificación

El ARN total se aisló siguiendo el protocolo PerfectPure RNA Culture Cell (5 Prime, Hamburg, Alemania). El micelio congelado (50 mg) se adicionó a un tubo que contenía 0,25 g de esferas (0,5 mm) de óxido de zirconio y óxido de silicio (Biospec Products, Bartlesville, OK, EE.UU.) suspendidas en 0,6 mL de solución de lisis y se homogenizó en un Mini-Beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, OK, EE.UU.). El ARNm se purificó en una columna de afinidad siguiendo las instrucciones del fabricante y se eluyó con 25-40 μ L de dietil pirocarbonato (1 mL/L). Se midió su concentración en un espectrofotómetro ND-1000 UV-Vis (Nano Drop, Wilmington, DE, EE.UU.) y se corroboró su integridad por fraccionamiento en gel de agarosa (8 g/L). La concentración promedio de ARN fue 170 mg/L.

El efecto de la estimulación sexual sobre la abundancia de los transcritos se estimó por PCR en tiempo real de su ADN complementario (Pfaffl, 2004). La retrotranscripción y la PCR en tiempo real se llevaron a cabo como describen Winer *et al.* (1999) y Kuzina *et al.* (2008). El cambio en el nivel de expresión se estimó con el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). El programa Sequence Detection (Applied Biosystems) calculó C_t , el número de ciclos necesario para que la fluorescencia en la fase exponencial de la reacción de PCR alcance el umbral establecido (Bustin, 2005). Cada resultado se normalizó con el de *actA*, en la misma muestra, y con el de la estirpe NRRL1555 a los dos días de edad, en el mismo experimento. La transcripción del gen *actA*, responsable de una actina (Voigt y Wöstemeyer, 2001), se supone constitutiva. Se usaron como testigos los genes *carB* y *carRA*, cuya abundancia de transcritos se incrementa durante la interacción sexual (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008).

5.8 Construcción de plásmidos

Todas las reacciones se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del manual de Sambrook *et al.* (1989).

El gen *carS* se obtuvo del plásmido pGEM-T Easy-*carS* por PCR con los cebadores *catri-F* y *catri-R* (Tabla 8) y la polimerasa de ADN Phusion High Fidelity (Finnzymes, Espo, Finland) y se insertó en el plásmido pCR2.1-Topo (Shuman, 1994). De este se obtuvo de la misma manera y se insertó en el vector de expresión pBAD-Thio-Topo (LaVallie *et al.*, 1993) (Invitrogen, Paisley, UK), dando el plásmido pThio=CarS (6341 pb), que bajo el promotor BAD expresa en *E. coli* una quimera de tiorredoxina y la proteína clonada, lo que aumenta la solubilidad de esta. Para pThio=AcaA (6371 pb), el gen *acaA* se escindió con *Sall* del plásmido pGEM-T Easy-*acaA* y se insertó en el plásmido pBAD-Thio-Topo en el que se había insertado la multidiana SK de pBluescript.

El plásmido pThio=CarS-AcaA (8185 pb) contiene un operón bajo el promotor BAD que expresa una proteína quimérica de tiorredoxina y CarS y una AcaA separada. Para construirlo, el gen *acaA* se escindió con *Sall* del plásmido pThio=AcaA, se rellenaron sus extremos con polimerasa de T4 y se ligó en pThio=CarS tratado con *PmeI* y fosfatasa alcalina de intestino bovino (CIAP) (Fermentas, Burlington Ontario, Canada).

A partir de los plásmidos de expresión pGEX (Kaelin *et al.*, 1992) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) se construyeron plásmidos que, bajo el control del promotor Ptac, expresan proteínas quiméricas con transferasa de glutatión (GST). Para pGST=CarS (6874 pb), el gen *carS* se escindió con *EcoRI* de pCR-CarS y se insertó en pGEX-4T-1. Para pGST=AcaA (6825 pb), el gen *acaA* se escindió con *NotI* de pGEM-T Easy-AcaA y se insertó en pGEX-5X-3. Para pGST=64508 (6831 pb), el gen *64508* se escindió con *NotI* de pGEM-T Easy-64508 y se insertó en pGEX-5X-3. Para pGST=CarS-AcaA (8741 pb) y pGST=CarS-64508 (8731 pb), los genes respectivos, *acaA* y *64508*, se insertaron de la misma forma en pGST=CarS. Para pGST=AcaA-CarS (8778 pb), el gen *carS* se escindió de pCR-*carS* como un fragmento *Ecl136II/NotI* y se insertó en pGST=AcaA tratado con *SmaI/NotI*.

El tamaño de los vectores y los insertos se corroboró por fraccionamiento en gel de agarosa (8 g/L). Cada uno se purificó siguiendo el protocolo Illustra GFX. Los vectores se trataron con fosfatasa alcalina (Fermentas).

El producto de ligación (7,5-15 μ L) se añadió a 100 μ L de células Z-competentes de la estirpe DH5 α de *E. coli* (Zymo Research, Orange, CA, EE.UU.). La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min y se esparció sobre cajas de Petri (8 mm de diámetro interno) que contenían 25 mL de agar LB con ampicilina (100 mg/L) y se incubó a 37 °C toda la noche. Una colonia de células transformantes se inoculó en 4 mL de medio LB con ampicilina y se incubó a 37 °C en agitación (250 rpm) toda la noche. Las células se cosecharon y se guardaron como en el apartado 2.2.

El ADN plasmídico se aisló siguiendo el protocolo Wizar (Promega) y se cortó con la enzima correspondiente para corroborar la ligación y orientación del inserto. Los fragmentos se fraccionaron en gel de agarosa (12 g/L).

5.9 Producción heteróloga de enzimas

5.9.1 Expresión heteróloga

Los plásmidos de expresión se usaron para transformar células Tuner DE3 (Studier *et al.*, 1990) (Novagen, Darmstadt, Alemania). Una muestra de 1 µg de ADN plasmídico se adicionó a 100 µL de células competentes. La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min y se esparció sobre cajas de Petri (8 mm de diámetro interno) que contenían 25 mL de agar LB con ampicilina (100 mg/L) y clorafenicol (20 mg/L) y se incubó a 37 °C toda la noche. Una colonia de células transformantes se inoculó en 4 mL del mismo medio selectivo, se incubó a 37 °C en agitación (150 rpm) toda la noche, se vertió en un matraz que contenía 50 mL de medio 2YT (Sambrook *et al.*, 1989) suplementado con arabinosa (100 mg/L), ampicilina (50 mg/L) y cloranfenicol (10 mg/L) y se incubó a 28 °C en agitación (180 rpm) hasta alcanzar la densidad óptica (D.O._{600 nm}) de 0,5-0,7. Para inducir las proteínas quiméricas se añadieron 10 µL de IPTG (1M) y se mantuvieron las condiciones durante 6 h. Las células se recuperaron por centrifugación a 9000 × g durante 5 min en una Sorvall RCSC (Thermo Electro Corporation, Waltham, MA, EE.UU.) y se almacenaron a -20 °C.

5.9.2 Obtención de lisados crudos

Para obtener los lisados crudos se suspendió la biomasa de 50 mL de cultivo en 1 mL de reactivo de Lew [NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, lisozima 1 g/L (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania), ditiotreititol 1 mM y Triton x-100 1 mL/L, pH 8], se mantuvo en hielo durante 30 min y se lisó con ultrasonidos (tres veces, 30 s, Bradson Sonifier 250, Danbury, CT, EE.UU.). Los restos celulares se separaron por centrifugación a 12000 × g a 4 °C durante 30 min en una Eppendorf 5810 (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania). El sobrenadante se recuperó y se mantuvo en hielo.

5.9.3 Purificación de proteínas quiméricas

Para los ensayos *in vitro*, las proteínas quiméricas se purificaron según Prado-Cabrero *et al.* (2007b) usando tampón con glutatión para eluirlas. Para algunos ensayos la proteína AcaA se liberó de la GST con Factor Xa, una proteasa del plasma bovino (Nagai y Thogersen, 1984) (GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks., UK). La cantidad de proteína se midió según Bradford *et al.* (1976) (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.).

Se fraccionaron las proteínas y se estimó su peso molecular por electroforesis en dodecilsulfato sódico (Laemmli, 1970) y comparación con una mezcla de proteínas de tamaño conocido (PageRuler, Fermentas, Burlington Ontario, Canada).

5.10 Ensayos enzimáticos *in vitro*

5.10.1 Sustratos

Las muestras de isómeros *trans* de β -apo-8'-carotenal (C_{30}), β -apo-10'-carotenal (C_{27}), apo-12'-licopenal (C_{25}), β -apo-14'-carotenal (C_{22}) y β -apo-15'-carotenal (C_{20}), proporcionadas generosamente por BASF (Ludwigshafen, Alemania) y el caroteno β y el licopeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) se purificaron por cromatografía en capa fina en placas de óxido de silicio (20 × 20 cm, Merck, Darmstadt, Alemania) colocadas en cubetas de vidrio (Desaga, Heildelberg, Alemania) con una mezcla de éter de petróleo/dietiléter/acetona (4:4:1 en vol.) como fase móvil. Para otros detalles ver Ruch *et al.* (2005).

La zeaxantina se purificó de *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Scherzinger y Al-Babili, 2008). El caroteno γ se obtuvo de Carotenature (Lupsingen, Switzerland).

El β -apo-12'-carotenal, un C_{25} , se extrajo con acetona/metanol (7:3 en vol.) de células de *E. coli* superproductoras de caroteno β que se transformaron con pThio=CarS y se purificó por cromatografía en capa fina en una mezcla de éter de petróleo/dietiléter/acetona (40:10:7 en vol.).

Los sustratos se cuantificaron a partir de sus coeficientes de extinción (Barua y Olson, 2000; Davies, 1976). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro CPS-240 A (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

5.10.2 Ensayos

Se siguieron técnicas precedentes (Scherzinger y Al-Babili, 2008; Scherzinger *et al.*, 2006) con algunas variaciones: repurificación del licopeno y el apo-12'-licopenal (Prado-Cabrero *et al.*, 2007b); incubación de 50 μ L de sustrato a 28 °C en agitación (200 rpm) y oscuridad durante 4 h en una Thermomixer 21516 (Eppendorf, Hamburg, Alemania), con proteína purificada (\approx 200 mg/L) o lisado crudo (50 μ L) en 200 μ L de mezcla de reacción; extracción con 0,6 mL de benceno/dietiléter (1:4 en vol.) y disolución final en 70 μ L de CH_3Cl .

Los productos se analizaron por cromatografía líquida (Scherzinger y Al-Babili, 2008; Scherzinger *et al.*, 2010) eluyendo con soluciones A (metanol/2-metoxi-2-metilpropano, 1:1 en vol.) y B (metanol/2-metoxi-2-metilpropano/agua, 30:1:10 en vol.).

5.11 Ensayos en células de *E. coli* que contienen carotenoides

Las construcciones pThio y pGEX se transformaron en células TOP10 de *E. coli* que acumulan licopeno y caroteno β , respectivamente, como se describe más arriba (apartado 5.8.1).

Los cultivos se vertieron en 50 mL de medio LB con ampicilina (50 mg/L) o kanamicina (25 mg/L) y se incubaron a 28 °C en agitación (150 rpm) hasta alcanzar la densidad óptica ($D.O._{600\text{ nm}}$) de 0,5-0,7.

La expresión de las proteínas quiméricas se indujo con 10 μL de IPTG 1 mol/L en los transformantes con pGEX y con L-arabinosa (2 g/L) en los transformantes con pThio. Se incubaron a 28 °C en agitación (150 rpm) durante al menos 6 h antes de cosechar las células.

La biomasa resuspendida en 5 mL agua destilada se mezcló y agitó con 7 mL de metanol/triclorometano (1:2 en vol.), se lisó con ultrasonidos y se centrifugó dos veces a 9000 x g durante 5 min en una Sorvall RCSC, descartando el precipitado. Para el licopeno se usó metanol/acetona (10 mL, 3:7 en vol.) en la primera centrifugación y éter de petróleo en la segunda. En ambos casos el sobrenadante se secó por evaporación rotatoria a baja presión y el extracto se disolvió en 1 mL triclorometano; se volvió a centrifugar a 12,000 x g durante 1 min y a secar y el producto se disolvió en 50 μL de CHCl_3 .

Los productos se analizaron por cromatografía líquida seguida de otra cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Scherzinger y Al-Babili, 2008; Scherzinger *et al.*, 2010). Las dos cromatografías difirieron en la columna y en los solventes. En la primera cromatografía los solventes A y B fueron los del apartado 5.9.2, pero con mezcla 10:1:9 en B. En la segunda ambos solventes fueron metanol/2-metoxi-2-metilpropano/agua, con mezcla 10:1:9 en A y 27:70:3 en B.

Bibliografía

- Aasen, A.J. v Jensen, S.L. (1965) Fungal carotenoids II. The structure of the carotenoid acid neurosporaxanthin. *Acta Chem Scand* 19: 1843-1853.
- Aehle, W., Sobek, H., Amory, A., Vetter, R., Wilke, D. v Schomburg, D. (1993) Rational protein engineering and industrial application: structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved 'washing performance'-the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. *J. Biotechnol* 28: 31-40.
- Agardh, C. A. (1817) Synopsis algarum Scandinaviae, adiecta dispositione universali algarum. *Ex. Officina Berlinqiana*, Lundae, p. 46.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., López, R.C. v Gómez-Gómez, L. (2010) The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *Journal of experimental botany* 61:105-109.
- Alder A., Holdermann, I., Bever, P. v Al-Babili, S. (2008) Carotenoid oxygenases involved in plant branching catalyse a highly specific conserved apocarotenoid cleavage reaction. *Biochem J* 416: 289-296.
- Almeida, E.R.A. v Cerdá-Olmedo, E. (2008) Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Current Genetics* 53:129-137.
- Alvarez, M.I., Ootaki, T. v Eslava, A.P. (1983) Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism induced by ICR-170. *Mol Gen Genet* 191: 507-511.
- Aragón, C.M.G., Murillo, F.J., De la Guardia, M.D. v Cerdá-Olmedo, E. (1976). An enzyme complex for dehydrogenation of phytoene in *Phycomyces*. *Eur J Biochem* 63:71-75.
- Armstrong, G.A. v Hearst, J.E. (1996) Carotenoids 2. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J* 10: 228-237.
- Armstrong, G.A. (1997) Genetics of eubacterial carotenoids biosynthesis: A colorful tale. *Annu Rev Microbiol* 51:629-659.
- Arrach, N., Fernández-Martín, R., Cerdá-Olmedo, E. v Avalos, J. (2001) A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1687-1692.
- Auldridge, M.E., McCarty, D.R., v Klee, H.J. (2006b) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol* 9: 315-321.
- Austin, D.G., Bu'Lock v Winstanley, D.J. (1969) Trisporic acid biosynthesis and carotenogenesis in *Blakesleea trispora*. *Biochem J* 1969 113: 34.
- Austin, D.J., Bu'Lock, J.D. v Drake, D. (1970) The biosynthesis of trisporic acids from β -carotene via retinal and trisporol. *Experientia* 26: 348-349.
- Avalos, J., Bejarano, E.R. v Cerdá-Olmedo, E. (1993) Photoinduction of carotenoid biosynthesis. *Methods Enzymology* 214: 283-294.
- Avalos, J. v Cerdá-Olmedo, E. (2004) Fungal carotenoid production. Arora, D.K. Ed. *In: Handbook of fungal biotechnology* 20: 367-378.
- Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2216-2220.
- Barrero, A.F., Herrador, M.M., Arteaga, P., Gil, J., González, J.A., Alcalde, E. v Cerdá-Olmedo, E. (2011) New apocarotenoids and β -carotene cleavage in *Blakeslea trispora*. *Org Biomol Chem* 9: 7190-7195.
- Barrero, A.F., Oltra, J.E. v Poyatos, J.A. (1996) Acidic metabolites from *Phycomyces blakesleeanus*. *Phytochem* 42: 1427-1433.
- Barua A.B. v Olson J. A. (2000) β -carotene is converted primarily to retinoids in rats *in vivo*. *J Nutr* 130: 1996-2001.
- Bejarano, E. R. v Cerdá-Olmedo, E. (1989) Inhibition of phytoene dehydrogenation and activation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Phytochem* 28: 1623-1626.
- Bejarano, E. R. v Cerdá-Olmedo, E. (1992) Independence of the carotene and sterol pathways of *Phycomyces*. *FEBS Lett* 306: 209-212.
- Bejarano, E.R., Parra, F., Murillo, F.J. v Cerdá-Olmedo, E. (1988) End-product regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Arch Microbiol* 150: 209-214.
- Bergman, K., Burke, P.V., Cerdá-Olmedo, E., David, C.N., Delbrück, M., Foster, K.W., et al. (1969) *Phycomyces*. *Bacteriol Rev* 33: 99-157.

- Bergman, K., Eslava, A.P. y Cerdá-Olmedo, E. (1973). Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Mol Gen Genet* 123: 1-16.
- Blasco, J.L., Roeßink, D., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P. y Galland, P. (2001) Photocarotenogenesis in *Phycomyces*: expresión of the *carB* gene encoding phytoene dehydrogenase. *J Plant Res* 114: 25-31.
- Blakeslee, A.F. (1904) Sexual reproduction in the Mucorineae. *Proc Amer Acad Arts Sci* 40:205-319.
- Blakeslee, A.F. (1906) Zygospore germinations in the Mucorineae. *Ann Mycol* 4: 1-28.
- Blount, J.D., Metcalfe, N.B., Birkhead, T.R. y Surai, P.F. (2003) Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in Zebra Finches. *Science* 300: 125-127.
- Borchert, R. (1963) Über die Azetat-Aktivierung der Sporangiosporen von *Phycomyces blakesleeanus*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 38:31-61.
- Bosser, A. y Belin, J.M. (1994) Synthesis of β -ionone in an aldehyde/xanthine oxidase/ β -carotene system involving free radical formation. *Biotechnol Prog* 10: 129-133.
- Bouvier, F., Dogbo, O. y Camara, B. (2003a) Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science* 300: 2089-2091.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J. y Camara, B. (2003b) Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: Identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD y CsZCD genes involved in *Croccus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15: 47-62.
- Bouvier, F., Isner, J.C., Dogbo, O. y Camara, B. (2005) Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci* 10: 187-194.
- Bradford, M.M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bramley, P.M. (2003) The genetic enhancement of phytochemicals: the case of carotenoids. In: Phytochemical Functional Foods. Pp. 253-279. Johnson, I. and Williamson, G. Eds. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge.
- Brefort, T., Scherzinger, D., Limón, M.C., Estrada, A.F., Trautmann, D., Mengel, C., Avalos, J. y Al-Babili, S. (2011) Cleavage of resveratrol in fungi: Characterization of the enzyme Rco1 from *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* 48:132-143.
- Bu'Lock, J.D., Drake, D. y Winstanley, D.J. (1972) Specificity and transformations of the trisporic acid series of fungal sex hormones. *Phytochem* 11: 2011-2018.
- Bu'Lock, J.D., Jones, B.E. y Winstanley, N. (1976) The apocarotenoid system of sex hormones and prohormones in Mucorales. *Pure & Appl Chem* 47: 191-202.
- Burgeff, H. (1925) Über Arten und Artkreuzung in der Gattung *Phycomyces* Kunze. *Flora*. 118-119, 40-46.
- Burgeff, H. (1912) Über Sexualität, Variabilität und Vererbung bei *Phycomyces nitens*. *Ber Dtsch Bot Ges* 30: 679-685.
- Burgeff, H. (1924) Untersuchungen über Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen. *Bot. Abh* 4: 1-135.
- Burgeff, H. (1928) Variabilität, Vererbung und Mutation bei *Phycomyces blakesleeanus* Bgff. *Z Vererbungslehre* 49: 26-94.
- Burmester, A., Richter, A., Schultze, K., Schachtschabel, D., Boland, W., Wöstermeyer, J. y Schimek, C. (2007) Cleavage of β -carotene as the first step in sexual hormone synthesis in zygomycetes is mediated by a trisporic acid regulated β -carotene oxygenase. *Fungal Genet Biol* 44: 1096-1108.
- Bustin, S.A. (2005) Real-Time PCR. In: M. Podda & J. Fuchs (ed) Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. Marcel Dekker. NY. pp. 1131-1135.
- Caglioti, L., Cainelli, G., Camerino, B., Mondelli, R., Prieto, A., Quilico, A., Salvatori, T. y Selva, A. (1966) The structure of trisporic-C acid. *Tetrahedron Suppl* 22: 175-187.
- Cainelli, G., Grasselli, P. y Selva, A. (1967) Structure of trisporic acid B. *Chim Ind (Milan)*, 49: 628-629.
- Camara, B. y Bouvier, F. (2004) Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 430: 16-21.

- Campuzano, V., Díaz-Mínguez, J.M., Eslava, A.P. y Alvarez, M.I. (1990) A new gene (*mad1*) involved in the phototropic response of *Phycomyces*. *Mol Gen Genet* 223: 148-151.
- Campuzano, V., Galland, P., Eslava, A.P. y Alvarez, M.I. (1995) Genetic characterization of two phototropism mutants of *Phycomyces* with defects in the genes *mad1* and *madJ*. *Curr Genet* 27: 524-527.
- Candau, R., Bejarano, E.R. y Cerdá-Olmedo, E. (1991) *In vivo* channeling of substrates in an enzyme aggregate for beta-carotene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 88: 4936-4940.
- Carail, M. y Caris-Veyrat, C. (2006) Carotenoid oxidation products: From villain to saviour?. *Pure appl Chem* 78: 1493-1503.
- Carnoy, J.B. (1870) Recherches anatomiques et physiologiques sur les champignons. *Bull Soc R Bot Belg* 9: 157-321.
- Cerdá-Olmedo, E. (1975) The genetics of *Phycomyces blakesleeanus*. *Genet Res* 25: 285-296.
- Cerdá-Olmedo, E. (2001) *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol Rev* 25: 503-512.
- Cerdá-Olmedo, E. y Corrochano, L.M. (2001) Genetics of *Phycomyces* and its responses to light. In: Photomovement (Häder, D.P. and Lebert, M., Eds.), pp. 589-620. Elsevier Science.
- Cerdá-Olmedo, E. y Hüttermann, A. (1986). Förderung und Hemmung der Carotinsynthese bei *Phycomyces* durch Aromaten. *Anzrew Botanik* 60: 59-70.
- Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E.D. (1987) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Cerdá-Olmedo, E. y Reau, P. (1970) Genetic classification of the lethal effects of various agents on heterokaryotic spores of *Phycomyces*. *Mutat Res* 9:369-384.
- Conn, P.F., Schalch, W. y Truscott, T.G. (1991) The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J Photochem Photobiol B* 11: 41-47.
- Corrochano, L.M. y Cerdá-Olmedo, E. (1992) Sex, light and carotenes: the development of *Phycomyces*. *Trends Genet* 8: 268-274.
- Cunningham, F.X. Jr., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K.A., DellaPenna, D. y Gantt, E. (1996) Functional analysis of the [beta] and [epsilon] lycopene cyclase enzymes of arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *The Plant Cell* 8: 1613-1626.
- Davies, B.H. (1976) Carotenoids. In: Goodwin TW (ed) Chemistry and biochemistry of plant pigments, Academic Press, London, 2: 38-165.
- De la Concha, A. y Murillo, F.J. (1984) Accumulation of a complex form of beta-carotene by *Phycomyces blakesleeanus* cytoplasmic mutants. *Planta* 161:233-239.
- De la Guardia, M.D., Aragón, C.M.G., Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1971) A carotenogenic enzyme aggregate in *Phycomyces*: evidence from quantitative complementation. *Proc Natl Acad Sci* 68:2012-2015.
- Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J. y Hartman, P.E. (1966) A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* 54: 61-76.
- Di Mascio, P., Kaiser, S. y Sies, H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 274: 532-538.
- Drinkard, L.C., Nelson, G.E. y Sutter, R.P. (1982) Growth arrest: a prerequisite for sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Exp Mycol* 6: 52-59.
- Edge, R., McGarvey, D.J. y Truscott, T.G. (1997) The carotenoids as antioxidants -a review. *J Photochem Photobiol B* 41: 189-200.
- Ehrenshaft, W. y Daub, M.E. (1994) Isolation, sequence, and characterization of the *Cercospora nicotianae* phytoene dehydrogenase gene. *Appl Environ Microbiol* 60: 2766-2771.
- Eibel, P., Schimek, C., Fries, V., Grolig, F., Schapat, T., Schmidt, W., Schneckenburger, H., Ootaki, T. y Galland, P. (2000) Statoliths in *Phycomyces*: Characterization of octahedral protein crystals. *Fungal Genet Biol* 29: 211-220.

- Eisenreich, W., Rohdich, F. v Bacher, A. (2001) Deoxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* 6: 78-84.
- Elfving, F. (1881) En obeaktad Känslighet hos *Phycomyces*. *Bot Not* 4: 105-107.
- El-Jack, M., Mackenzie, A. v Bramley, P. (1988) The photoregulation of carotenoid biosynthesis in *Aspergillus giganteus* mut. alba. *Planta* 174: 59-66.
- Ershov, I.V., Dmitrovskii, A.A. v Bykhovskii, V. (1993) Properties of beta-carotene-15,15'-dioxygenase, stabilized during purification with lutein and dithiothreitol. *Biokhimiia* 58: 416-423.
- Eslava, A.P. v Cerdá-Olmedo, E. (1974) Genetic control of phytoene dehydrogenation in *Phycomyces*. *Plant Sci Lett* 2: 9-14.
- Eslava, A.P., Alvarez, M.I. v Cerdá-Olmedo, E. (1974) Regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* by vitamin A and β -ionone. *Eur J Biochem* 48: 617-623.
- Estrada, A.F., Brefort, T., Mengel, C., Díaz-Sánchez, V., Alder, A., Al-Babili, S., Avalos, J. (2009) *Ustilago maydis* accumulates β -carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Fungal Genet Biol* 46: 803-813.
- Estrada, A.F., Maier, D., Scherzinger, D., Avalos, J. v Al-Babili, S. (2008) Novel apocarotenoid intermediates in *Neurospora crassa* mutants imply a new biosynthetic reaction sequence leading to neurosporaxanthin formation. *Fungal Genet Biol* 45: 1497-1505.
- Eugster, C.H. v Märki-Fischer, E. (1991) The chemistry of rose pigments. *Angew Chem Int Edit* 30: 654-672.
- Faivre, B., Gregoire, A., Preault, M., Cezilly, F. v Sorci, G. (2003) Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science* 300:103.
- Fester, T., Hause, B., Schmidt, D., Halfmann, K., Schmidt, J., Wray, V., Hanse, G. v Strack, D. (2002) Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol* 43: 256-265.
- Fraser, P.D., Ruiz-Hidalgo, M.J., Lopes-Matas, M.A., Alvarez, M.I., Eslava, A.P. v Bramley, P.M. (1996) Carotenoid biosynthesis in wild type and mutant strains of *Mucor circinelloides*. *Biochim Biophys Acta* 1289: 203-208.
- Frengova, G.I. v Beshkova, D.M. (2009) Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 163-180.
- Galland, P. (2001) Phototropism in *Phycomyces*. In: Photomovement (Häder, D.P. and Lebert, M., Eds.), Elsevier Science, 621-657.
- Gann, P.H., Ma, J., Giovannucci, E., Willett, W., Sacks, F.M., Hennekens, C.H. v Stampfer, M.J. (1999) Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: Results of a prospective analysis. *Cancer Res* 59: 1225-1230.
- Garcés, R., Tortolero, M. v Medina, J.R. (1985) Alcohol dehydrogenase activity and carotenogenesis in *Phycomyces*. *Exp Micol* 9: 356-358.
- Gessler, N.N., Sokolov, A.V., Bykhovskii, V. v Belozerskaia, T.A. (2002) Superoxide dismutase and catalase activities in carotenoid-synthesizing fungi *Blakeslea trispora* and *Neurospora crassa* under the oxidative stress. *Appl Biochem Microbiol* 38: 205-209.
- Giglio, S., Monis, P.T. v Saint, C.P. (2003). Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucl. Acids Res.* 31:136.
- Giovannucci, E. (1999) Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* 91: 317-331.
- Giuliano, G., Al-Babili, S. v von Lintig, J. (2003) Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci* 8: 145-149.
- Goodwin, T.W. (1952) Studies in carotenogenesis: 3. Identification of the minor polyene components of the fungus *Phycomyces blakesleeanus* and a study of their synthesis under various cultural conditions. *Biochem J* 50:550-558.

- Goodwin, T.W. v Lijinski, W. (1951). Studies in carotenogenesis: 2. Carotene production by *Phycomyces blakesleeanus*; the effect of different amino-acids when used in media containing low concentrations of glucose. *Biochem J* 50: 268-273.
- Govind, N.S. v Cerdá-Olmedo, E. (1986) Sexual activation of carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *J Gen Microbiol* 132: 2775-2780.
- Graham, J.E. v Bryant, D.A. (2008) The Biosynthetic Pathway for Synechoxanthin, an Aromatic carotenoid Synthesized by the Euryhaline, Unicellular Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7002 *J Bacteriol* 190: 7966-7974.
- Guntelberg, A.V. v Ottesen, M. (1954) Purification of the proteolytic enzyme from *Bacillus subtilis*. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* 29: 36.
- Gutiérrez-Corona, F. v Cerdá-Olmedo, E. (1988) Genetic determination of sporangiophore development in *Phycomyces*. *Dev Genet* 9:733-741.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Heber, D. v Lu, Q.Y. (2002) Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp Biol Med* 227: 920-923.
- Heisenberg, M. v Cerdá-Olmedo, E. (1968). Segregation of heterocaryons in asexual cycle of *Phycomyces*. *Mol Gen Genet* 102: 187-195.
- Hocking, D. (1965) Demonstration of β -carotene in gametangia of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. *Nature* 206: 846.
- Huang, F.C., Horvath, G., Molnar, P., Turcsi, E., Deli, J., Schrader, J., Sandmann, G., Schmidt, H. v Schwab, W. (2009) Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from *Rosa damascena*. *Phytochemistry* 70: 457-464.
- Hundle, B., Alberti, M., Nievelstein, V., Beyer, P., Kleinig, H., Armstrong, G.A., Burke, D.H. v Hearst, J.E. (1994) Functional assignment of *Erwinia herbicola* Eho10 carotenoid genes expressed in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 245: 406-416.
- Idnurm, A., Walton, F.J., Floyd, A. v Heitman, J. (2008) Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature* 451: 193-196.
- Inomata, M., Hirai, N., Yoshida, R. v Ohigashi, H. (2004) The biosynthetic pathway to abscisic acid via ionylideneethane in the fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 65: 2667-2678.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okama, H. (1990) High efficiency transformation of with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. v Shinozaki, K. (2000) A stress-inducible gene for 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. *Plant Physiol* 123: 553-562.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Rahut, A., Reeb, V., Arnold, A.E., *et al.* (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Jayaram, M., Presti, D. v Delbrück, M. (1979) Light induced carotene synthesis in *Phycomyces*. *Exp Mycol* 3: 42-52.
- Jyocouchi, H., Hill, R.J., Tomita, Y. v Good, R.A. (1991) Studies of immunomodulating actions of carotenoids. I. Effects of beta-carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression *in vitro* culture system. *Nutr Cancer* 16: 93-105.
- Kaelin, W.G., Krek, W., Sellers, W.R., DeCaprio, J.A., Aichenbaum, F., Fuchs, C.S., *et al* (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* 70: 351-364.
- Kamoda, S., Terada, T. v Saburi, Y. (2003) A common structure of substrate shared by lignostilbenedioxygenase isozymes from *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1394-1396.
- Kibbe, W.A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35: 43-46.

- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J.M., Vogt K., Lederer, M.O., Breithaupt, D.E. v von Lintig, J. (2001) Identification and Characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of Provitamin A. *J Biol. Chem* 276: 14110-14116.
- Kiser, P.D., Golczak, M., Lodowski, D.T., Chance, M.R. v Palczewski, K. (2009) Crystal structure of native RPE65, the retinoid isomerase of the visual cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 17325-17330.
- Klingner, A., Bothe, H., Wray, V. v Marner, F.J. (1995) Identification of a yellow pigment formed in maize roots upon mycorrhizal colonization. *Phytochemistry* 38:53-55.
- Kloer, D. v Schulz, G. (2006) Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol Life Sci* 63: 2291-2303.
- Kloer, D.P., Ruch, S., Al-Babili, S., Beyer, P. v Schulz, G.E. (2005) The structure of a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Science* 308: 267-269.
- Kohler, B.E. (1995) Carotenoids. Vol 1 B: *Spectroscopy*, Birkhäuser Verlag, Basel.
- Krubasik, P., Kobayashi, M. v Sandmann, G. (2001) Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the mechanisms for C50 carotenoid formation. *Eur J Biochem* 268: 3702-3708.
- Kunze, G. (1823) *Phycomyces*, Vol. 2, p. 113-116. En G. Kunze y J.C. Schmidt (eds), *Mycologische Hefte*. Leipzig.
- Kuzina, V. v Cerdá-Olmedo, E. (2006) Modification of sexual development and carotene production by acetate and other small carboxylic acids in *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleeanus*. *Appl Environm Microbiol* 72: 4917-4922.
- Kuzina, V. v Cerdá-Olmedo, E. (2007) Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 991-999.
- Kuzina, V., Domenech, C. v Cerdá-Olmedo, E. (2006) Relationships among the biosyntheses of ubiquinone, carotene, sterols, and triacylglycerols in Zygomycetes. *Arch Microbiol* 186: 485-493.
- Kuzina, V., Ramírez-Medina, H., Visser, H., van Ooyen, A.J.J., Cerdá-Olmedo, E. v van den Berg J.A. (2008) Genes involved in carotene synthesis and mating in *Blakeslea trispora*. *Curr Genet* 54: 143-152.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Landrum, J.T. v Bone, A.R. (2001) Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys* 385: 28-40.
- Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W. v Croteau, R. (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci* 97: 13172-13177.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. v McCoy, J.M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnol* 11: 187-193.
- Leuenberger, M.G., Engeloch-Jarret, C. v Woggon, W.D. (2001) The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of beta-carotene to retinal. *Angew Chem Int Ed Engl* 40: 2613-2617.
- Ligusa, H., Yoshida, Y. v Hasunuma, K. (2005) Oxygen and hydrogen peroxide enhance light-induced carotenoid synthesis in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett* 18: 4012-4016.
- Lindqvist, A. v Anderson, S. (2002) Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *J Biol Chem* 277: 23942-23948.
- Livak, K.J. v Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Lipson, E.D. v Horwitz, B.A. (1991) Photosensory reception and transduction. In: *Sensory Receptors and Signal Transduction* (Spudich, J.L. and Satir, B.H., Eds.), pp. 1-64. Wiley-Liss, New York.
- López-Díaz, I. v Cerdá-Olmedo, E. (1980). Relationship of photocarotenogenesis to other behavioural and regulatory responses in *Phycomyces*. *Planta* 150:134-139.

- Ma, L.J., *et al.* (2009) Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genet* 5: e1000549.
- Mackinney, G., Nakayama, T. y Chichester, C.O. (1956) On the biosynthesis of carotenoids. *J Biol Chem* 220:759.
- Mackinney, G., Nakayama, T., Buss, C.D. y Chichester, C.O. (1952) Carotenoid production in *Phycomyces*. *J Am Chem Soc* 74: 3456.
- Maicas, S. y Mateo, J.J. (2005) Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 322-335.
- Marasco, E.K., Vay, K. y Schmidt-Dannert, C. (2006) Identification of carotenoid cleavage dioxygenases from *Nostoc* sp. PCC7120 with different cleavage activities. *J Biol Chem* 281: 31583-31593.
- Martín-Rojas, V., Gómez-Puerto, A. y Cerdá-Olmedo, E. (1996) Lack of protection by carotenes against gamma-radiation damage in *Phycomyces*. *Radiat Environ Biophys* 3: 193-197.
- Massart, J. (1888) Recherches sur les organismes inférieurs 1. La loi de Weber vérifiée pour l'héliotropisme du champignon. *Bull Acad R Sci Belg* 3:590-601.
- Mata, N.L., Moghrabi, W.N., Lee, J.S., Bui, T.V., Radu, R.A., *et al.* (2004) Rpe65 is a retinyl ester binding protein that presents insoluble substrate to the isomerase in retinal pigment epithelial cells. *F Biol Chem* 279: 635-643.
- McGarvey, D.J. y Croteau, R. (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1015-1026.
- Mehta, B.J., Obratsova, I.N. y Cerdá-Olmedo, E. (2003) Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene. *Appl Environm Microbiol* 69:4043-4048.
- Mehta, B.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1995) Mutants of carotene production in *Blakeslea trispora*. *Appl Microbiol Biotechnol* 42: 836-838.
- Mehta, B.J. y Cerdá-Olmedo, E. (2001) Intersexual partial diploids of *Phycomyces*. *Genetics* 158, 635-641.
- Mehta, B.J., Salgado, L.M., Bejarano, E.R. y Cerdá-Olmedo, E. (1997) New mutants of *Phycomyces blakesleeanus* for β -carotene production. *Appl Environm Microbiol* 63:3657-3661.
- Meissner, G. y Delbrück, M. (1968) Carotenes and retinal in *Phycomyces* mutants. *Plant Physiol* 43:1279-1283.
- Mendes-Pinto, M.M. (2009) Carotenoid breakdown products: the “norisoprenoids” in wine aroma. *Arch Biochem Biophys* 483: 236-245.
- Messing, S.A.J., Gabelli, S.B., Echeverria, I., Vogel, J.T., Guan, J.C., Tan, B.C., Klee, H.J., McCarty, D.R. y Amzel, L.M. (2010) Structural insights into maize viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *Plant Cell* 22: 2970-2980.
- Michan, S., Lledias, F. y Hansber, W. (2003) Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-null mutant strains. *Eukaryot Cell* 2: 798-808.
- Miller, M.L. y Sutter, R.P. (1984) Methyl trisporate E. A sex pheromone in *Phycomyces blakesleeanus*. *J Biol Chem* 259: 6420-6422.
- Moeller, S.M., Jacques, P.F. y Blumberg, J.B. (2000) The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *J Am Coll Nutr* 19: 522S-527S.
- Moraga, A.R., Rambla, J.L., Ahrazem, O., Granell, A. y Gomez-Gomez, L. (2009) Metabolite and target transcript analyses during *Crocus sativus* stigma development. *Phytochemistry* 70: 1009-1016.
- Murillo, F.J., Calderon, I.L., Lopez-Diaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. (1978) Carotene-superproducing strains of *Phycomyces*. *Appl Environ Microbiol* 36: 639-642.
- Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1976) Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*. *Mol Gen Genet* 148: 19-24.
- Murillo, F.J., Torres-Martínez, S., Aragón, C.M y Cerdá-Olmedo, E. (1981) Substrate transfer in carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Eur J Biochem* 119: 511-516.

- Nagai, K. y Thogersen, H.C. (1984) Generation of β -globin by sequence-specific proteolysis of a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Nature* 309: 810-812.
- Nagao, A., During, A., Hoshina, C., Terao, J. y Olson, J.A. (1997). Stoichiometric conversion of all *trans*- β -carotene to retinal by pig intestinal extract. *Arch Biochem Biophys* 328: 57-68.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Ann Rev Plant* 56: 165-185.
- Namitha, K.K. y Negi, P.S. (2010) Chemistry and Biotechnology of Carotenoids. *Crit Rev Food Sci Nut* 50: 728-760.
- Nieuwenhuis, M. y Van den Ende, H. (1975) Sex specificity of hormone synthesis in *Mucor mucedo*. *Arch Microbiol* 102: 167-169.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. y Yura, T. (1998) Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 64: 1694-1699.
- Norman, S. (1991) Beta-carotene from the abscisic acid producing strain of *Cercospora rosicola*. *Plant Growth Reg* 10: 103-108.
- North, H.M., De Almeida, A., Boutin, J.P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B. y Marion-Poll, A. (2007) The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* 50: 810-824.
- Obraztsova, I.N., Prados, N., Holzmann, K., Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (2004) Genetic damage following introduction of DNA in *Phycomyces*. *Fungal Genet Biol* 41: 168-180.
- Ohmiya, A. (2009) Carotenoid cleavage dioxygenases and their apocarotenoid products in plants. *Plant Biotechnol* 26: 351-358.
- Olson, J.A y Hayaishi, O. (1965) The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc Natl Acad Sci* 54: 1364-1370.
- Ootaki, T., Lighty, A.C. y Delbrück, M. (1973). Complementation between mutants of *Phycomyces* deficient with respect to carotenogenesis. *Molec Gen Genet* 121:57-70.
- Orejas, M., Peláez, M.I., Alvarez, M.I., Eslava, A.P. (1987) A genetic map of *Phycomyces blakesleeanus*. *Mol Gen Genet* 210:69-76.
- Pelz, A., Wieland, K.P., Putzbach, K., Hentschel, P., Albert, K. y Gotz, F. (2005) Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 280: 32493-32498.
- Pfaffl, M.W. (2004) Quantification strategies in Real-Time PCR. In: Bustin SA (ed) *A-Z of Quantitative PCR*, Biotechnology Series, International University Line, La Jolla, CA. pp. 87-120.
- Plempel, M. (1957) Die Sexualstoffe der Mucoraceae. Ihre Abtrennung und die Erklärung ihrer Funktion. *Arch Mikrobiol* 26: 151-174.
- Plempel, M. (1963) Die chemischen Grundlagen der Sexualreaktion bei Zygomyceten. *Planta* 59: 492-508.
- Polaino, S., Gonzalez-Delgado, J.A., Arteaga, P., Herrador, M.M., Barrero, A.F. y Cerdá-Olmedo, E. (2012) Apocarotenoids in the sexual interaction of *Phycomyces blakesleeanus*. *Org Biomol Chem* 10: 3002-3009.
- Polaino, S. e Idnurm, A. (2012) Sexual pheromones in the fungi. In *Biocommunication of Fungi*. G. Witzany (Ed.). Springer, Netherlands. pp. 171-188.
- Polaino, S., Herrador, M.M., Cerdá-Olmedo, E. y Barrero, A. (2010) Splitting of β -carotene in the sexual interaction of *Phycomyces*. *Org Biomol Chem* 8: 4229-4231.
- Poliakov, E., Gentleman, S., Cunningham, F. X. Jr., Miller-Ihli, N.J. y Redmond, T.M. (2005) Key role of conserved histidines in recombinant mouse beta-carotene 15' 15-monooxygenase-1 activity. *J Biol Chem* 280: 29217-29223.
- Porter, J.W. y Lincoln, R.E. (1950) I. Lycopersicon selections containing a high content of carotenes and colorless polyenes. II. The mechanism of carotene biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 27:390-403.

- Prado-Cabrero, A., Estrada, A.F., Al-Babili, S. y Avalos, J. (2007a) Identification and biochemical characterization of a novel carotenoid oxygenase: Elucidation of the cleavage step in the *Fusarium* carotenoid pathway. *Mol Microbiol* 64: 448-460.
- Prado-Cabrero, A., Scherzinger, D., Avalos, J. y Al-Babili, S. (2007b) Retinal biosynthesis in Fungi: Characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryotic Cell* 6: 650-657.
- Prisbylla, M.P., Tabake, K. y White, J.D. (1979) Stereospecific synthesis of (\pm)-trisporel B, a prohormone of *Blakeslea trispora*, and a facile synthesis of (\pm)-trisporeic acids. *J Am Chem Soc* 101: 762-763.
- Pueyo, C. y Cerdá-Olmedo, E. (1981) Causes of cell death following exposure to different fungicides and heat. *Exp Mycol* 5:112-119.
- Rao, A.V. (2002) Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. *Exp Biol Med* 227: 908-913.
- Redmond, T.M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., et al. (2001) Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *F Biol Chem* 276: 6560-6565.
- Redmond, T.M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., et al. (1998) Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet* 20: 344-351.
- Redmond, T. M., Poliakov, E., Yu, S., Tsai, J. Y., Lu, Z. y Gentleman, S. (2005) Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 13658-13663.
- Reuelta, J.L. y Eslava, A.P. (1983). A new gene (*carC*) involved in the regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Mol Gen Genet* 192: 225-229.
- Reyes, P., Chichester, C.O., y Nakayama, T.O.M. (1964) The mechanism of β -ionone stimulation of carotenoid and ergosterol biosynthesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochim Biophys Acta* 90: 578.
- Rivero, F. y Cerdá-Olmedo, E. (1994) Spore dormancy mutants of *Phycomyces*. *Exp Mycol* 18:221-229.
- Robbins, W. J., V. W. Kavanagh y F. Kavanagh (1942) Growth substances and dormancy of spores of *Phycomyces*. *Bot Gaz* 104:224-242.
- Rodrigo, M.J., Alquezar, B. y Zacarias, L. (2006) Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis*, L. Osbeck). *J Exp Bot* 57: 633-643.
- Rodríguez-Concepción, M. y Boronat, A. (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plants. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 3:1079-1089.
- Rodríguez-Romero, J. y Corrochano, L.M. (2004) The gene for the heat-shock protein HSP100 is induced by blue light and heat-shock in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Curr Genet* 46: 295-303.
- Rohmer, M. (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* 16:565-574.
- Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B. y Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* 295:517-524.
- Roncero, M.I.G., Zabala, C, Cerdá-Olmedo, E (1984) Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine on *Phycomyces* spores. *Mutat Res* 125: 195-204.
- Roncero, M.I.G. y Cerdá-Olmedo, E. (1982) Genetics of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr Genet* 5: 5-8.
- Rubio, A., Rambla, J.L., Santaella, M., Gomez, M.D. Orzaez, D., Granell, A. y Gomez-Gomez, L. (2008) Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in beta-ionone release. *J Biol Chem* 283: 24816-24825.

- Ruch, S., Beyer, P., Ernst, H. y Al-Babili, S. (2005) Retinal biosynthesis in Eubacteria: *in vitro* characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 55: 1015-1024.
- Ruiz-Albert, J., Cerdá-Olmedo, E. y Corrochano, L.M. (2002) Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. *Molec Genet Genom* 266:768-777.
- Ruiz-Hidalgo, M.J., Benito, E.P., Sandmann G., y Eslava, A.P. (1997) The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol Gen Genet* 253:734-744.
- Saelices, L., Youssar, L., Holdermann, I., Al-Babili, S. y Avalos J. (2007) Identification of the gene responsible for torulene cleavage in the *Neurospora* carotenoid pathway. *Mol Genet Genomics* 278: 527-537.
- Salgado, L. M., Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1989). Carotene superproducing mutants of *Phycomyces blakesleeana*. *Exp Mycol* 13: 332-336.
- Salgado, L.M. y Cerdá-Olmedo, E. (1992) Genetic interactions in the regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Curr Genet* 21: 67-71.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sandmann, G. (2009) Evolution of carotene desaturation: the complication of a simple pathway. *Arch Biochem Biophys* 483: 169-174.
- Sanz, C., Alvarez, M.I., Orejas, M., Velayos, A., Eslava, A.P. y Benito, E.P. (2002) Interallelic complementation provides genetic evidence for the multimeric organization of the *Phycomyces blakesleeana* phytoene dehydrogenase. *Eur J Biochem* 269:902-908.
- Sanz, C., Velayos, A., Álvarez, M.I., Benito, E.P. y Eslava, A.P. (2011) Functional analysis of the *Phycomyces carRA* gene encoding the enzymes phytoene synthase and lycopene cyclase. *PLoS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0023102.
- Schachtschabel, D. y Boland, W. (2007) Efficient Generation of a Trisporoid Library by Combination of Synthesis and Biotransformation. *J Org Chem* 72: 1366-1372.
- Schachtschabel, D. y Boland, W. (2009). Strigolactones: the first members of a new family of “shoot branching hormones” in plants?. *Chem Biochem* 10: 221-223.
- Schachtschabel, D., Schimek, C., Wöstemeyer, J. y Boland, W. (2005) Biological activity of trisporoids and trisporoids analogues in *Mucor mucedo* (-). *Phytochemistry* 66: 1358-1365.
- Scherzinger, D. y Al-Babili, S. (2008) *In vitro* characterization of an ancient carotenoid cleavage dioxygenase from *Nostoc* sp. PCC7120 reveals a novel cleavage pattern, cytosolic localization and induction by stress conditions. *Mol Microbiol* 69: 231-244.
- Scherzinger, D., Ruch, S., Kloer, D.P., Wilde, A. y Al-Babili, S. (2006) Retinal is formed from apo-carotenoids in *Nostoc* sp. PCC 7120: *in vitro* characterization of an apo-carotenoid oxygenase. *Biochem J* 398: 361-369.
- Scherzinger, D., Scheffer, E., Bär, C., Ernst, H. y Al-Babili, S. (2010) The *Mycobacterium tuberculosis* ORF Rv0650 encodes a carotenoid oxygenase mediating central and excentric cleavage of conventional and aromatic carotenoids. *FEBS Journal* 277: 4662-4673.
- Schimek, C. y Wöstemeyer, J. (2009) Carotene derivatives in sexual communication of zygomycete fungi. *Phytochem* 70:1867-1875.
- Schmidt, H., Kurtzer, R., Eisenreich, W. y Schwab, W. (2006) The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. *F Biol Chem* 281: 9845-9851.
- Schmidt-Darnert, C., Umeno, D. y Arnold, F.H. (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat Biotechnol* 18: 750-753.
- Schopfer, W.H. (1934) Les vitamines cristallisées B1 comme hormones de croissance chez un microorganisme (*Phycomyces*). *Arch Mikrobiol* 5: 511-549.
- Schopfer, W.H. y Grob, E.C. (1952) The biosynthesis of beta carotene by *Phycomyces* raised in a medium containing sodium acetate as the sole source of carbon. *Experientia* 8:140.

- Schroeder, W.A. y Johnson, E.A. (1995) Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J Ind Microbiol* 14: 502-507.
- Schwartz, S.H., Qin, X. y Zeevaart, J.A. (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J Biol Chem* 276: 25208-25211.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., McCarty, D.R., Welch, W. y Zeevaart, J.A. (2003) Substrate specificity and kinetics for VP 14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthesis pathway. *Biochimica Biophysica Acta* 1619: 9-14.
- Schwartz, S.H., Qin, X. y Loewen, M.C. (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem* 279: 46940-46945.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D. y McCarty, D.R. (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874.
- Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269: 32678-32684.
- Sies, H. y Stahl, W. (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62: 1315S-1321S.
- Sies, H. y Stahl, W. (2003) Non-nutritive bioactive constituents of plants: lycopene, lutein and zeaxanthin. *Int J Vit Nutr Res* 73: 95-100.
- Simkin, A.J., Underwood, B.A., Auldridge, M., Loucas, H.M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D.G. y Klee, H.J. (2004a) Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol* 136: 3504-3514.
- Snodderly, D.M. (1995) Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidants vitamins. *Am J Clin Nutr* 62: 1448S-1461S.
- Stahl, W. y Sies, H. (2002) Carotenoids and protection against solar UV radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 15: 291-296.
- Steiger, S., Astier, C. y Sandmann, G. (2000) Substrate specificity of the expressed carotenoid 3,4-desaturase from *Rubrivivax gelatinosus* reveals the detailed reaction sequence to spheroidene and spirilloxanthin. *Biochem J* 349: 635-640.
- Strack, D. y Fester, T. (2006) Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytol* 172: 22-34.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. y Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth Enzymol* 185: 60-89.
- Sutter, R.P. (1970). Effect of light on β -carotene accumulation in *Blakeslea trispora*. *J Gen Microbiol* 64:215-221.
- Sutter, R.P. (1975) Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 127-130.
- Sutter, R.P., (1986) Apotrisporin E: A new sesquiterpenoid isolated from *Phycomyces blakesleeanus* and *Blakeslea trispora*. *Exp Mycol* 10: 256-258.
- Sutter, R.P. (1987) Sexual development, p. 317-336. In E. Cerdá-Olmedo, and E. D. Lipson (ed.), *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sutter, R.P., Capage, D.A. y Harrison, T.L. (1971) Aspects of trisporic acid synthesis in *Blakeslea trispora*. *First international micological Congress* 4.
- Sutter, R.P., Capage, D.A., Harrison, T.L. y Keen, W.A. (1973) Trisporic acid biosynthesis in separate plus and minus cultures of *Blakeslea trispora*: Identification by *Mucor* assay of two mating-type-specific components. *J Bacteriol* 114: 1074-1082.
- Sutter, R.P., Dadok, J., Bothner-by, A.A., Smith, R.R. y Mishra, P.K. (1989) Cultures of separated mating types of *Blakeslea trispora* make D and E forms of trisporic acids. *Biochem* 28: 4060-4066.
- Sutter, R.P., Grandin, A.B., Dye, B.D. y Moore, W.R. (1996) (–) mating type-specific mutants of *Phycomyces* defective in sex pheromone biosynthesis. *Fungal Genet Biol* 20: 268-279.
- Sutter, R.P., Harrison, T.L. y Galazko, G. (1974) Trisporic acid biosynthesis in *Blakeslea trispora* via mating type-specific precursors. *J Biol Chem* 249: 2282-2284.

- Sutter, R.P. y Whitaker, J.P. (1981a) Zygophore-stimulating Precursors (Pheromones) of Trisporic acid Active in (–)-*Phycomyces blakesleeanus*. *J Biol Chem* 5: 2334-2341.
- Sutter, R.P. y Whitaker, J.P. (1981b) Sex pheromone metabolism in *Blakeslea trispora*. *Naturwiss* 68: 147-148.
- Sutter, R.P. y Zawodny, P.D. (1984) Apotrisporin: A major metabolite of *Blakeslea trispora*. *Exp Myco* 8: 89-92.
- Tagua, V. G., Medina, H.R., Martín-Domínguez, R., Eslava, A.P., Corrochano, L.M., Cerdá-Olmedo, E. y Idnurm A. (2012) A gene for carotene cleavage required for pheromone biosynthesis and carotene regulation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genet Biol* 49:398-404.
- Takahashi, Y., Moiseyev, G., Chen, Y. y Ma, J.X. (2005) Identification of conserved histidines and glutamic acid as key residues for isomerohydrolase activity of RPE65, an enzyme of the visual cycle in the retinal pigment epithelium. *FEBS Lett* 579: 5414-5418.
- Taylor, I.B., Burbidge, A. y Thompson, A.J. (2000) Control of Abscisic acid synthesis. *J Exp Bot* 51: 1563-1574.
- Than, A., Bramley, P.M., Davies, B.H. y Rees, A.F. (1972) Stereochemistry of phytoene. *Phytochemistry* 11:3187-3192.
- Torres-Martínez, S., Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1980) Genetics of lycopene cyclization and substrate transfer in β -carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Genet Res* 36:299-309.
- Umeno, D., Tobias, A.V. y Arnold, F.H. (2005) Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:51-78.
- van den Ende, H (1968) Relationship between sexuality and carotene synthesis in *Blakeslea trispora*. *J Bacteriol* 96: 1298-1303.
- van den Ende, H. (1979) Sexual morphogenesis in the *Phycomycetes*. In *The Filamentous Fungi. Developmental Mycology*. J.E. Smith, and D.R. Berry (Eds). Department of Applied Microbiology, University of Strathclyde, Glasgow. A Halsted Press Book. Wiley, New York. 3: 256-274.
- van Laere, A.J., Furch, B. y Van Assche, J.A. (1987) The sporangiospore: dormancy and germination, p. 247-279. In E. Cerdá-Olmedo and E. D. Lipson (eds) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- van Mulders, R. M., Van Laere, A. J. y Verbeke, M. N. (1986) Effects pH and cations on the germination induction of *Phycomyces* spores with carboxylic acids. *Biochem Physiol Pflanzen* 181:103-115.
- Voigt, K. y Wöstemeyer, J. (2001) Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analyses of actin and translation elongation factor EF-1 α genes. *Gene* 270: 113-120.
- Volgelstein, B. y Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 615-619.
- von Arx (1982) On Mucoraceae s. str. and other families of the Mucorales. *Sydowia Ann Mycol* 35: 10-26.
- von Lintig, J. y Vogt, K. (2000) Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *F Biol Chem* 275: 11915-11920.
- von Lintig, J. y Wyss, A. (2001) Molecular analysis of vitamin A formation: cloning and characterization of beta-carotene 15-15'-dioxygenases. *Arch Biochem Biophys* 385: 47-52.
- von Lintig, J. (2010) Colors with Functions: Elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Annu Rev Nut* 30: 35-36.
- Walter, M.H., Floss, D.S., Hans, J., Fester, T. y Strack, D. (2007) Apocarotenoid bioynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* 68: 130-138.

- Walter, M.H. v Strack, D. (2011) Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. *Nat Prod Rep* 28: 663-692.
- Walter, M.H., Floss, D.S. v Strack, D. (2010) Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta* 232: 1-17.
- Werkman, B.A. (1976) Localization and partial characterization of a sex-specific enzyme in homothallic and heterothallic Mucorales. *Arch Microbiol* 109: 209-213.
- Werkman, B.A. v Van den Ende, H. (1973) Trisporic acid synthesis in *Blakeslea trispora*. *Arch Mikrobiol* 90: 365-374.
- Werkman, B.A. v Van den Ende, H. (1974) Trisporic acid synthesis in homothallic and heterothallic Mucorales. *J Gen Microbiol* 82: 273-278.
- Wetzel, J., Burmester, A., Kolbe, M. v Wöstemeyer, J. (2012) The mating-related loci *sexM* and *sexP* of the zygomycetous fungus *Mucor mucedo* and their transcriptional regulation by trisporoid pheromones. *Microbiology* 150: 1016-1023.
- Willcox, J.K., Catignani, G.L. v Lazarus, S. (2003) Tomatoes and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43: 1-18.
- Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., v Williams, P.M. (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Anal Biochem* 270: 41-49.
- Wyss, A., Wirtz, G., Woggon, W., Brugger, R., Wyss, M., *et al.* (2000) Cloning and expression of beta,beta-carotene 15-15'-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 334-336.
- Yamuna, S. v Boland, W. (2012) How sex influences carotene metabolism in Zygomycetes fungi?. 11TH European Conference on Fungal Genetics. Marburg, Germany.
- Yan, W., Jang, G.F., Haeseleer, F., Esumi, N., Chang, J., Kerrigan, M., Campochiaro, M., Campochiaro, P., Palczewski, K. v Zack, D.J. (2001) Cloning and characterization of a human β,β -carotene-15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium. *Genomics* 72: 193-202.
- Yeum, K.J., Lee-Kim, Y.C., Yoon, S., Lee, K.Y., Park, I.S., Lee, K.S., *et al.* (1995) Similar metabolites formed from beta-carotene by human gastric mucosal homogenates, lipoxygenase, or linoleic acid hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys* 321: 167-174.
- Yoshida, Y. v Hasunuma, K. (2004) Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 279: 6986-6993.
- Yokoyama, H.; Chichester, C.O. y Mackinney, G. (1960). Formation of carotene *in vitro*. *Nature* 185: 687-688.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M. v Berger, R.G. (2003a) Cleavage of beta,beta-carotene to flavor compounds by fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 331-336.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M. v Berger, R.G. (2003b) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β,β -carotene to flavor compounds. *Biol Chem* 384: 1049-1056.
- Zycha, H., Siepmann, R. y Linnemann, G. (1969) Mucorales. Cramer, Lehre, Germany.

Conclusiones

CONCLUSIONES

Sobre las dos primeras reacciones para la producción de apocarotenoides

1. El genoma de *Phycomyces* tiene dos genes, *carS* y *acaA*, responsables de oxigenasas de carotenoides.
2. Los transcritos de *carS* y *acaA* son más abundantes durante la interacción sexual, y su variación temporal es similar a la de los transcritos de los genes estructurales de la carotenogénesis.
3. Las proteínas CarS y AcaA son oxigenasas que cortan en dos pasos sucesivos la cadena del caroteno β . CarS produce un fragmento de 25 carbonos y otro de 15. AcaA corta el fragmento C₂₅ en uno de 18 carbonos y otro de 7. Los tres fragmentos resultantes son los precursores de las tres familias de apocarotenoides de *Phycomyces*: los trisporoides, los ciclofarnesoides y los metilhexanoides.
4. *In vivo*, las oxigenasas CarS y AcaA cortan la cadena lineal del licopeno e *in vitro*, AcaA corta varios apolicopenoides.
5. La proteína CarS es la única oxigenasa conocida que corta el caroteno β a fragmentos de 25 y 15 carbonos. La proteína AcaA es la única oxigenasa conocida que produce fragmentos de 18 y 7 carbonos.
6. Las oxigenasas CarS y AcaA y sus homólogas en otros Mucorales no tienen secuencias muy parecidas, pero forman una rama propia en el cladograma de las oxigenasas de carotenoides.
7. Se rechazan decisivamente la hipótesis del retinal como intermediario en la biosíntesis de ácidos trispóricos y la hipótesis alternativa de dos cortes simétricos en el caroteno β .
8. La proteína CarS tiene una función esencial en la regulación de la carotenogénesis por realimentación dependiente de su actividad enzimática, probablemente a través de su producto, el β -apo-12'-carotenal.

Sobre los apocarotenoides en estirpes silvestres y mutantes de Phycomyces

9. El espectro de absorción ultravioleta del medio de cultivo es un buen indicador de su contenido global en apocarotenoides.
10. Los medios de cultivos mixtos de estirpes de ambos sexos contienen más de 50 apocarotenoides distintos. Se presentan estimaciones cuantitativas de 32 apocarotenoides. En los cultivos de sexos separados los apocarotenoides son menos variados y menos abundantes. Los ácidos trispóricos y sus ésteres solo se encuentran en cultivos mixtos.
11. Las mutaciones *carB*, *carR* y *carS* bloquean la producción de apocarotenoides. Las mutaciones *carB10* y *carS153* son nulimorfos. Otras mutaciones estudiadas son rezumantes. Los aminoácidos E150 y S433 son esenciales para la actividad de CarS.
12. Las mutantes *car* producen enzimas capaces de metabolizar apocarotenoides procedentes de estirpes de sexo opuesto con los que se cocultiven.
13. Las contribuciones de las estirpes de distinto sexo no son simétricas. La estirpe NRRL1555, de sexo (–), aporta más carbonos a los apocarotenoides que las estirpes (+).
14. El trisporol B se encuentra en pequeñas cantidades en cultivos separados de la estirpe silvestre de sexo (–) y puede ser una feromona.
15. El metiltrisporato C no se encuentra en los cultivos separados y no debe considerarse una señal sexual.
16. Se proponen rutas metabólicas para la producción de los apocarotenoides de *Phycomyces*.