

R. 9386



MODIFICACION DE LA BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES
DE GIBBERELLA FUJIKUROI

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

FRANCISCO JAVIER AVALOS CORDERO

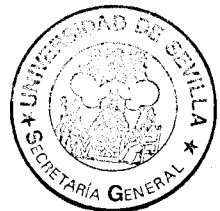
Sevilla, 3 de marzo, 1987

Director y ponente

E. Cerdá Olmedo

Enrique Cerdá Olmedo

Catedrático de Genética de la
Universidad de Sevilla



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 1 número 7 del libro
correspondiente.

Sevilla, 6 MAR. 1987

El Jefe del Negociado de Tesis

Isabel González



TD
204

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para
que mi Tesis Doctoral MODIFICACIÓN DE LA
BIOSINTESIS DE CAROTENOS EN GIBBERELLA
FUSIKUROI

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado:

Sevilla, a 7 de MARZO de 1995

A mi madre

A Jorge

INDICE

RESUMEN Y CONCLUSIONES	6
CAPITULO 1: INTRODUCCION	9
El organismo	9
Genética de <u>Gibberella</u>	10
Giberelinas	12
Carotenoides	16
Mutantes de la carotenogénesis	19
Regulación de la carotenogénesis	20
Inhibidores y activadores de la carotenogénesis	21
Carotenogénesis <u>in vitro</u>	24
Objetivo de la tesis	25
CAPITULO 2: MUTAGENESIS	27
Obtención y caracterización de los microconidios	27
Mutagénesis con nitrosoguanidina	28
Mutagénesis con radiación ultravioleta	31
Mutantes morfológicos y bioquímicos	31
Discusión	33
CAPITULO 3: MUTANTES DE LA CAROTENOGENESIS	35
Carotenoides de las estirpes silvestres	35
Mutantes superproductores	37
Mutantes albinos	40
Mutantes de color alterado	41
Mutantes pálidos en la oscuridad	44
Carotenogénesis y producción de giberelinas ...	44
Discusión	47
Biosíntesis de neurosporaxantina	47
La regulación	49

CAPITULO 4: MODIFICACION QUIMICA DE LA CAROTENOGENESIS	52
Compuestos químicos no activos	52
Inhibidores de la síntesis de neurosporaxantina	54
Activación de la síntesis de carotenoides	56
Discusión	59
 CAPITULO 5: CAROTENOGENESIS <u>IN VITRO</u>	61
Optimización de la incorporación de radiactividad	61
Comportamiento <u>in vitro</u> de algunos mutantes de la carotenogénesis	61
Fraccionamiento del extracto celular de SG22 ..	69
Discusión	70
 CAPITULO 6: DISCUSION GENERAL	72
Mutagénesis	72
Síntesis de carotenoides	73
Carotenogénesis <u>in vitro</u>	75
Regulación de la carotenogénesis	76
 APENDICE 1: MATERIAL Y METODOS	79
Estirpes	79
Métodos de cultivo	81
Medios de crecimiento	81
Inoculación	82
Condiciones de cultivo	82
Obtención de microconidios	83
Tinción de núcleos	83
Tratamientos mutagénicos	83
Mutagénesis con nitrosoguanidina	83
Mutagénesis con sulfonato etilmetílico	84
Mutagenesis con radiación ultravioleta	84
Identificación de auxótrofos	84
Análisis químico de carotenoides	85

Extracción	85
Separación cromatográfica y cuantificación	85
Análisis de giberelinas	86
Ensayos enzimáticos	87
Preparación del extracto celular	87
Precursor radiactivo	88
Condiciones de incubación	88
Extracción de terpenoides radiactivos	88
Separación de las fracciones radiactivas	89
Medición de radiactividad	90
APENDICE 2: BIBLIOGRAFIA	91
AGRADECIMIENTOS	98

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La biosíntesis de carotenoides en el hongo Gibberella fujikuroi puede ser modificada por la presencia de ciertas mutaciones en el genomio o de ciertos productos químicos en el medio. Esta Tesis describe los efectos mutagénicos de la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y la radiación ultravioleta sobre este organismo, los fenotipos in vivo e in vitro de los mutantes con alteraciones en el color, y el efecto de diversos inhibidores y activadores de la carotenogénesis. A la luz de los resultados obtenidos se concluye que:

1. Los microconidios de Gibberella son esporas uninucleadas y muy apropiadas para el aislamiento de mutantes. Se alcanzan frecuencias de mutación superiores a las descritas en otros organismos de interés genético con métodos similares.

2. La germinación produce un espectacular aumento de la sensibilidad de las esporas a la nitrosoguanidina, pero no a la radiación ultravioleta. Ello sugiere que la germinación facilita el acceso de la nitrosoguanidina al material genético.

3. La viabilidad de las esporas expuestas a radiación ultravioleta aumenta drásticamente al iluminarlas. Se demuestra así la presencia en Gibberella de un eficaz mecanismo de fotorreactivación.

4. La neurosporaxantina es el carotenoide predominante en todas las cepas silvestres de Gibberella que se han investigado y su concentración es siempre mayor en los cultivos iluminados que en los mantenidos en la oscuridad (fotoinducción).

5. Los mutantes de la carotenogénesis aislados son muy variados y se pueden clasificar en cuatro grandes grupos fenotípicos: superproductores, albinos, de color alterado y pálidos en la oscuridad.

6. Las cinco deshidrogenaciones de la ruta se atribuyen a una misma enzima, cuya pérdida da lugar a mutantes albinos que acumulan fitoeno. Ciertas alteraciones de la misma enzima dan lugar a mutantes de color amarillo o anaranjado. La acumulación de toruleno ocasiona un color rojo y se debe a la incapacidad para la rotura oxidativa del toruleno a neurosporaxantina. Se desconoce la alteración bioquímica de otros mutantes, pero sus fenotipos son los esperados si la ruta del tipo silvestre está regulada por dos productos génicos, un represor y un correpresor fotosensible.

7. No se observa correlación entre las producciones de carotenoides y giberelinas en los mutantes de la carotenogénesis. Este resultado sugiere la regulación independiente de las rutas metabólicas correspondientes.

8. El bloqueo genético o bioquímico de la carotenogénesis conlleva la acumulación de la misma cantidad de caroteno intermediario que de neurosporaxantina en ausencia de bloqueo. Ello sugiere que Gibberella carece de un mecanismo de regulación por producto final.

9. La difenilamina y la beta-ionona inhiben la deshidrogenasa y la alfa-picolina, la ciclasa. Sin embargo, la mayor parte de los compuestos químicos ensayados, eficaces en otros organismos, no alteran la carotenogénesis de Gibberella.

10. Los extractos del tipo silvestre y de varios mutantes sintetizan terpenoides a partir de mevalonato eficazmente. Se demuestra la producción de varios carotenos, sobre todo fitoeno y toruleno, pero no de neurosporaxantina. Los extractos de la estirpe superproductora SG22 sintetizan más carotenos que los de la estirpe silvestre, probablemente por contener mayor cantidad de enzimas carotenogénicas.

11. La comparación de los resultados de este trabajo con los alcanzados en otros organismos indican una gran semejanza en las rutas biosintéticas de los carotenoides y grandes diferencias en su regulación.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

El organismo

Gibberella fujikuroi (Sawada) Wollenweber, estado perfecto del hongo Fusarium moniliforme Sheldon, es un ascomiceto parásito de numerosas especies de plantas.

Fusarium es un género de hongos imperfectos caracterizado por sus esporas fusiformes, a las que alude el nombre que le dio Link en 1809. Es un género muy cosmopolita, presente en los más variados habitats, desde el permafrost del Artico hasta las arenas del Sahara. La intensa atención que ha recibido se debe a que incluye muchas especies fitopatógenas, algunas muy nocivas. Entre las mas conocidas se encuentran F. oxysporum, F. culmorum, F. graminearum y F. moniliforme.

La ausencia de ciclo sexual y de criterios unificados para definir las especies dentro del género Fusarium ha dado lugar a una sistemática histórica muy confusa. Se han descrito unas mil especies. Muchas de ellas deben la denominación al huésped que parasitan, y representan, en muchos casos, el hallazgo de nuevos huéspedes y no de nuevas especies. Los criterios actuales de clasificación se basan en la morfología de las esporas, la tasa de crecimiento en agar y la pigmentación, y reducen el número de especies a unas 50.

De acuerdo con los criterios aludidos, la especie Fusarium moniliforme se caracteriza por la presencia de microconidios formados en cadenas y la formación en agar de colonias de color blanquecino o de tonos violeta con un diámetro superior a 2.5 cm tras cuatro días de crecimiento (Booth, 1971).

El género Gibberella es la denominación del estado peritecial de alguna de las especies del género Fusarium, la mayoría heterotálicas.

G. fujikuroi comprende estirpes patógenas de muy diversas

plantas, como el pino, la caña de azúcar, el maíz, el sorgo y el arroz. La especie G. fujikuroi se divide en cuatro subespecies, moniliformis, subglutinans, fujikuroi e intermedia (Kuhlman, 1983) atendiendo a criterios reproductivos (las estirpes de distinta subespecie no cruzan entre sí) y morfológicos (formación de macro y microconidios y tamaño de los peritecios).

Esta especie se reproduce asexualmente mediante la producción de conidios. En ciertas condiciones de laboratorio se produce el cruce entre estirpes de sexo contrario. Varios días después de la adición de conidios de una estirpe de sexo (+) sobre el micelio de una estirpe (-) se producen unas estructuras denominadas peritecios, que contienen en su interior los productos meióticos o ascosporas. Las condiciones y frecuencia con que se produce el ciclo sexual en condiciones naturales son desconocidas.

La estirpe IMI58289 de G. fujikuroi empleada preferentemente en este trabajo pertenece a la variedad intermedia y posee la capacidad de producir giberelinas.

Genética de Gibberella

Dentro de la abundante literatura de Gibberella, la genética ha sido poco abordada. Los estudios de mutagénesis, muy escasos (Erokhina, 1969; Erokhina y Efremov, 1970; Sokolova, 1969), describen la inducción de mutantes alterados en la producción de giberelinas por tratamientos con rayos gamma, metanosulfonato de etilo, N-nitrosoetilurea, etilenimina, radiación ultravioleta o N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. El tratamiento más eficaz fué una combinación de etilenimina y radiación ultravioleta (Erokhina, 1969). También se ha estudiado la correlación entre la alteración en la morfología y la producción de giberelinas (Sokolova, 1969). En estos trabajos no se han hecho esfuerzos para optimizar las condiciones de mutagénesis. Entre los mutantes más conocidos, R9

se produjo espontáneamente (Bearder et al., 1973) y Bl-41a por radiación ultravioleta (Bearder et al., 1974).

Tras exposición de microconidios a luz ultravioleta se han aislado mutantes auxótrofos, morfológicos y de color (Puhalla y Spieth, 1983). Uno de los mutantes de color naranja fue nuevamente irradiado y dió lugar a dos nuevos mutantes de color, uno amarillo y otro albino. Mediante cruzamientos entre los mutantes obtenidos se han realizado mapas de ligamiento.

La heterogeneidad de la capacidad de producción de giberelinas ha propiciado estudios de cruzamientos entre estirpes productoras y no productoras. La segregación obtenida ha sido siempre 1:1 (Spector y Phinney, 1966; Phinney y Spector, 1967). Otros cruces genéticos se han realizado usando como marcadores el sexo, el color, la morfología y la velocidad de crecimiento, obteniéndose también segregaciones 1:1 (Sidhu, 1983a).

La heterocariosis ha sido también objeto de atención en Gibberella; se han encontrado heterocariontes en la naturaleza (Sidhu, 1983b; Ming et al., 1966) y se han podido producir artificialmente por anastomosis espontánea de hifas (Puhalla y Spieth, 1983; 1985). Por medio de la heterocariosis se ha determinado la presencia de genes de incompatibilidad en distintas variedades (Puhalla y Spieth, 1985). En distintas etapas de infección por Gibberella en el sorgo se detecta predominancia de distintos heterocariontes (Sidhu, 1983b).

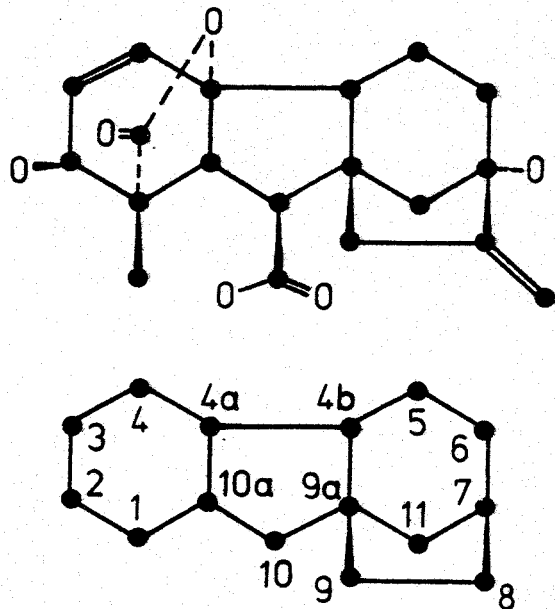
La capacidad de cruzamiento entre estirpes de sexo opuesto es muy variable (Sidhu, 1983c). Dentro de cada subgrupo existen al menos varios genes de incompatibilidad (Puhalla y Spieth, 1985) y algunas estirpes poseen alelos letales para las esporas (Sidhu, 1984).

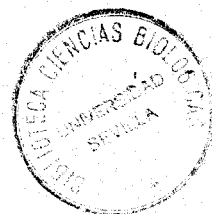
Giberelinas

Las giberelinas son compuestos que presentan un esqueleto ent-giberelano y poseen una actividad biológica consistente en estimular la división y/o la elongación celular. Las giberelinas se han encontrado en gran variedad de organismos del reino de las plantas: angiospermas, gimnospermas, helechos, algas y hongos (Lang, 1970).

La producción de giberelinas ha sido la principal razón de las investigaciones de que ha sido objeto Gibberella. El punto de partida del descubrimiento de las giberelinas fue la descripción por un granjero japonés en 1898 de una enfermedad del arroz en la que las plantas afectadas son mas finas y estiradas. Esta enfermedad, conocida posteriormente como "bakanae" y producida por infección de G. fujikuroi, fue estudiada durante muchos años casi exclusivamente en Japón. En 1926 Kurosawa demostró que el filtrado del medio de cultivo de G. fujikuroi produce sobre plantas de arroz la elongación característica de la enfermedad "bakanae". En

Figura 1. Estructura del ácido giberélico (arriba) y del esqueleto gibano (abajo). En esta figura y en las siguientes se han representado los átomos de carbono con círculos negros y se han suprimido los átomos de hidrógeno.





1935, Yabuta y Hayashi aislaron y llamaron giberelina un metabolito de G. fujikuroi que producía el mismo efecto. En 1938, Yabuta y Sumiki aislaron y cristalizaron una segunda giberelina, menos abundante que la primera. La barrera del idioma retrasó una década el conocimiento en Occidente de los trabajos publicados en Japón. En los años 50 varios grupos de Inglaterra y Estados Unidos se dispusieron a aislar las giberelinas excretadas al medio por G. fujikuroi. De modo independiente Curtis y Cross (1954) y Stodola et al. (1955) purificaron una tercera giberelina que denominaron ácido giberélico y giberelina X respectivamente.

Como consecuencia se investigó el efecto del ácido giberélico en las plantas. Dos grupos descubrieron independientemente que las giberelinas son productos naturales de las plantas (Radley, 1956; West y Phinney, 1956).

En la actualidad se conocen más de sesenta giberelinas de diversos orígenes. La más abundante en G. fujikuroi es GA₃ (ácido giberélico); también están presentes en menor cantidad sus precursores, entre ellos GA₄, GA₇, GA₁₃ y GA₁₄ (Hedden et al. 1978).

Las giberelinas son diterpenos, compuestos de cuatro grupos isoprenoides, aunque esta observación no sea obvia en la figura 1. Otros terpenoides sintetizados por Gibberella son los carotenoides, compuestos en cuya estructura se observa la repetición de grupos isoprenoides, y los esteroides, presentes en todos los seres vivos. Estos y otros compuestos, algunos con funciones metabólicas importantes, como la ubiquinona y los dolicoles, son los productos de una familia arborescente de rutas metabólicas cuyo origen común es el ácido mevalónico (Fig. 2).

Las giberelinas se sintetizan a partir del pirofosfato de geranylgeraniol, un compuesto de veinte átomos de carbono intermediario en la ruta de los terpenoides (Fig. 2), que se convierte en ent-kaureno mediante la formación de cuatro anillos (Fig. 2). La ruta desde mevalonato hasta kaureno fué

demostrada por primera vez por Graebe et al. (1965) y confirmada posteriormente por numerosos experimentos in vitro. Posteriormente el kaureno sufre varios pasos de oxidación en un radical de la molécula para dar ácido kaurenoico. La primera giberelina propiamente dicha, el aldehído de GA₁₂, aparece tras la hidroxilación y contracción de un anillo del ácido kaurenoico (Fig. 3) y contiene la estructura característica de las giberelinas, con dos anillos pentagonales y dos hexagonales. El resto de las giberelinas deriva del aldehído de GA₁₂ por medio de distintas reacciones de oxidación, princi-

=====

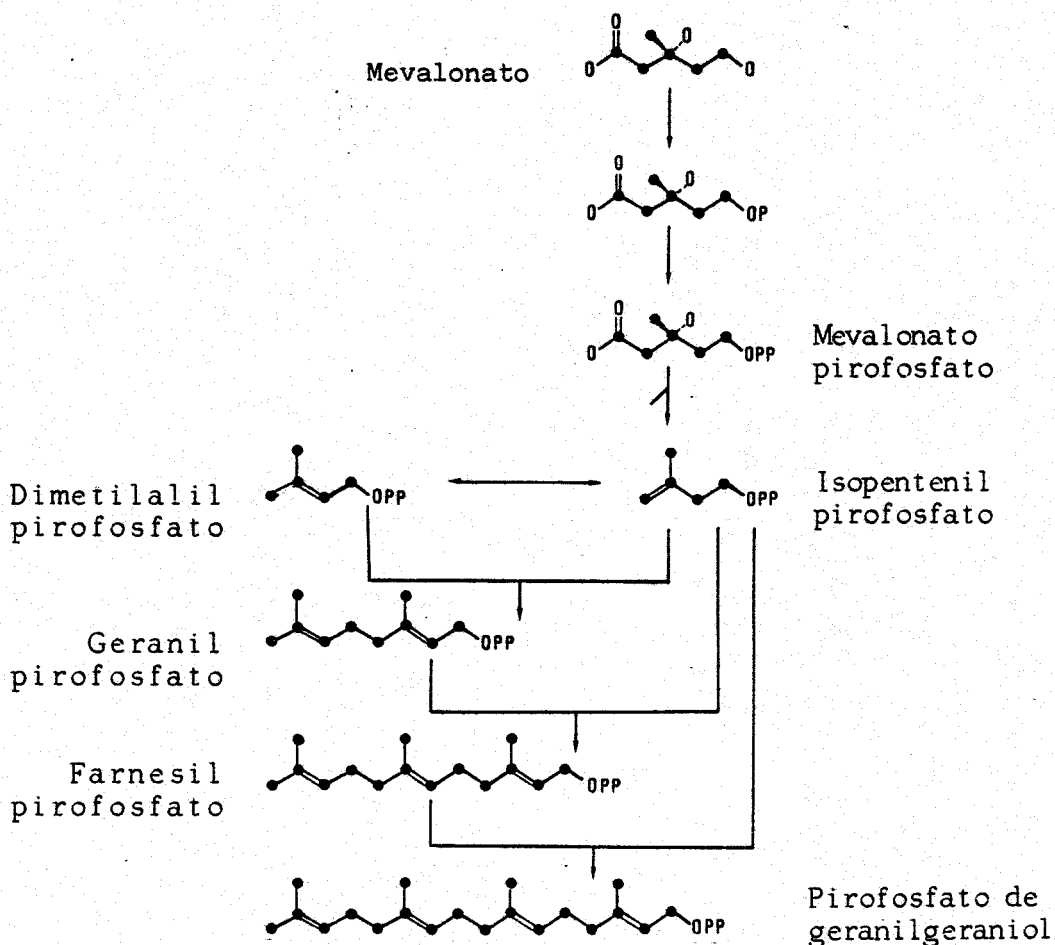


Figura 2. Reacciones desde el mevalonato hasta el pirofosfato de geranilgeraniol.

=====

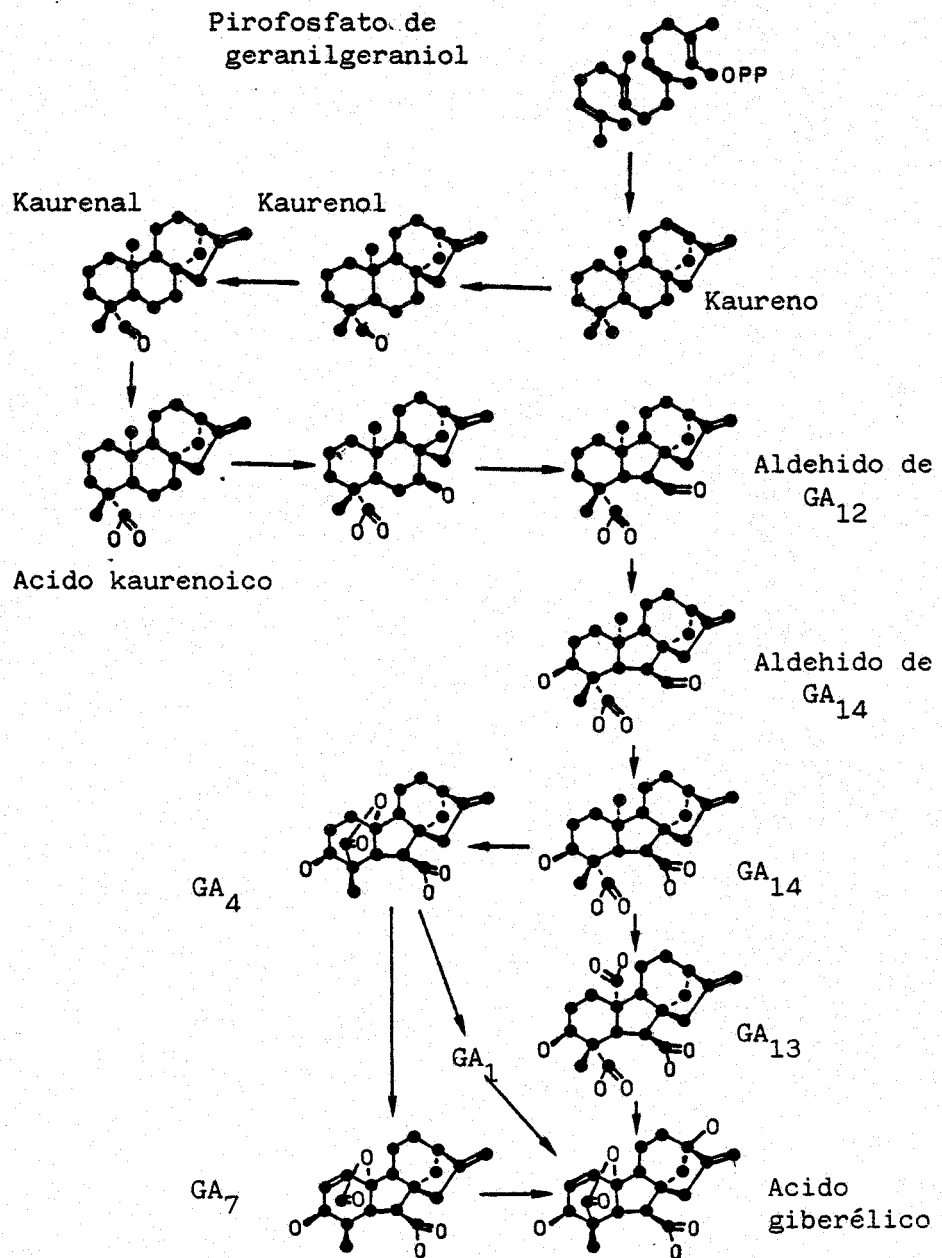


Figura 3. Reacciones desde el pirofosfato de geranylgeraniol hasta el ácido giberélico.

palmente introducción de grupos hidroxilo y formación de dobles enlaces (revisión, Hedden et al., 1978).

De los pocos mutantes de la síntesis de giberelinas conocidos en Gibberella, el mutante R9 no puede hidroxilar la posición 13 y no contiene GA₁ ni GA₃ (Bearder et al., 1973; Spector y Phinney, 1968). El mutante Bl-41a está bloqueado entre kaurenal y ácido kaurenico (Bearder et al., 1974) y carece por tanto de giberelinas. Los cultivos de este mutante en presencia de presuntos intermediarios han servido para confirmar la ruta (Hedden et al., 1974; Bearder et al., 1975).

El ácido giberélico tiene importantes aplicaciones económicas. Su empleo en cultivos de hortalizas y árboles frutales acelera y mejora la producción. En la industria cervecera acorta el tiempo de malteado y mejora la calidad de la malta. El ácido giberélico se produce industrialmente a partir de cultivos de Gibberella fujikuroi (Jefferys, 1973).

Carotenoides

Gibberella y otros hongos contienen un pigmento anaranjado peculiar, la neurosporaxantina, y pequeñas cantidades de otros carotenoides. Los carotenos típicos contienen un armazón característico de cuarenta átomos de carbono y un número variable de átomos de hidrógeno. Los carotenoides engloban, además de los carotenos típicos, moléculas relacionadas que contienen otros átomos (como las xantofilas, que contienen oxígeno). Los carotenoides se encuentran en todos los organismos fotosintéticos y en muchos no fotosintéticos. Son sintetizados por bacterias, hongos y plantas; los animales los obtienen a partir de la dieta. Se han detectado carotenoides en más de 200 especies de hongos, pero se conocen unas cien especies que carecen de ellos. La abundante literatura sobre carotenoides ha sido revisada con frecuencia y muy notablemente por Isler (1971) y Goodwin (1980).

El nombre de carotenoides se extiende a compuestos es-

estructuralmente relacionados con más de 40 átomos de carbono y otros, los denominados apocarotenoides, con menos. La neurosporaxantina (ácido 4'-apo-beta-caroten-4'-oico) es un apocarotenoide de 35 átomos de carbono y un grupo ácido terminal. Los enlaces conjugados son responsables del característico espectro de absorción y el vivo color de muchos carotenoides: el licopeno y el toruleno son rojos; el gamma-caroteno y el beta-caroteno, amarillos; la neurosporaxantina, anaranjada.

La ruta de los carotenoides (Fig. 4) coincide con la de las giberelinas hasta el pirofosfato de geranylgeraniol (Fig. 3). La condensación de dos moléculas de éste da lugar al primer caroteno propiamente dicho, el fitoeno (Fig. 4). La conversión del fitoeno en beta-caroteno en varias plantas y hongos sigue la ruta propuesta por Porter y Lincoln (1950): cuatro pasos de deshidrogenación, con formación de enlaces dobles, convierten el fitoeno en licopeno; dos ciclaciones sucesivas convierten el licopeno en gamma-caroteno y beta-caroteno. Muchas observaciones en distintos organismos apoyan esta ruta, sobre todo los estudios bioquímicos y genéticos en Phycomyces (Cerdá Olmedo, 1986). La síntesis de neurosporaxantina se realiza en Fusarium aquaeductuum, especie emparentada con Gibberella, mediante dos reacciones a partir del gamma-caroteno: en un primer paso de deshidrogenación se sintetiza el toruleno y una segunda reacción de rotura oxidativa produce la neurosporaxantina (Fig. 4) (Bindl et al., 1970)

Otros carotenos serían intermediarios de la ruta si se alterara el orden de las reacciones: la formación de beta-zeacaroteno exige que la primera ciclación preceda a la última deshidrogenación.

Las funciones de los carotenoides no son totalmente conocidas. En muchos organismos protegen contra las altas intensidades luminosas. En algunos tienen funciones especiales, por ejemplo, en los Mucorales sirven de precursores de las hormonas sexuales, ácidos trispóricos (Austin et al., 1970).

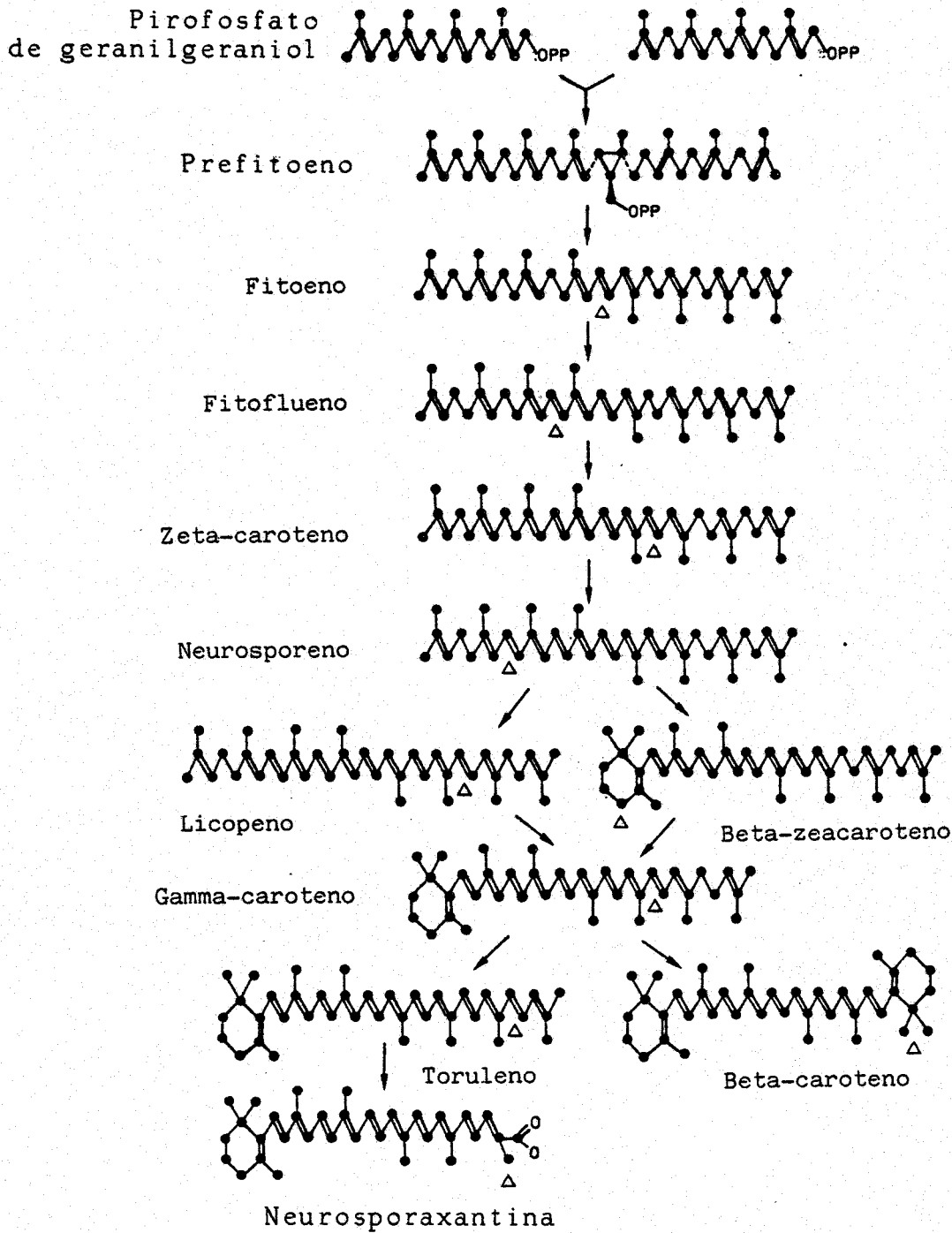


Figura 4. Reacciones desde el pirofosfato de geranilgeraniol hasta la neurosporaxantina. Los triángulos indican el lugar donde se produjo la reacción anterior.

Mutantes de la carotenogénesis

El aislamiento de mutantes ha sido tradicionalmente una de las herramientas más útiles en el estudio de rutas biosintéticas. En varios organismos se han aislado mutantes que han facilitado el estudio de los genes estructurales y regulatorios implicados en la carotenogénesis. En Neurospora crassa (Subden y Goldie, 1973; Goldie y Subden, 1973), Ustilago violacea (Day y Day, 1970; Garber et al., 1975, 1980) y Verticillium albo-atrum (Valadon y Heale, 1965), por ejemplo, se dispone tanto de mutantes albinos como de mutantes de color alterado que acumulan intermediarios en proporciones diferentes a las del silvestre.

La colección más completa de mutantes de la carotenogénesis es la de Phycomyces. Entre los mutantes estructurales se encuentran los blancos que acumulan fitoeno (carB) y los rojos que acumulan licopeno (carR). No se han encontrado mutantes que acumulen mayoritariamente otro caroteno intermedio. Los mutantes carB rezumantes acumulan fitoeno, fitoflueno, zeta-caroteno y neurosporeno en cantidades decrecientes (Eslava y Cerdá Olmedo, 1974). Otro mutante carB (S442) contiene cantidades importantes de zeta-caroteno, además de fitoeno.

Los principales mutantes afectados en funciones regulatorias son los carA, carS y carI. Los mutantes carA son blancos y contienen muy poco caroteno (Murillo et al., 1981). El fenotipo contrario lo presentan los mutantes carS, que tienen disparada la síntesis de beta-caroteno tanto en luz como en oscuridad. Los mutantes carI son insensibles a la inducción química de la carotenogénesis, principalmente por retinol. La síntesis de carotenos tanto en la estirpe silvestre como en la mayoría de los mutantes carA (blancos) es estimulada por la presencia de retinol.

Heterocariontes entre carA y carR en Phycomyces muestran variaciones de color entre el blanco y el naranja. El análi-

sis cuantitativo de licopeno, gamma-caroteno y beta-caroteno en dichos heterocariontes ha permitido relacionar los contenidos relativos de éstos con las proporciones nucleares de cada componente (De la Guardia et al., 1971). De acuerdo con la relación obtenida se ha propuesto la existencia de un agregado enzimático lineal formado por cuatro copias de la deshidrogenasa y dos de la ciclasa (De la Guardia et al., 1971). Nuevas pruebas en apoyo a dicho modelo fueron aportadas por Eslava y Cerdá Olmedo (1974) y Aragón et al. (1976).

Regulación de la carotenogénesis

En todos los organismos estudiados la biosíntesis de carotenoides está regulada por factores ambientales. Suelen tener importancia los nutrientes, la temperatura, el oxígeno, diversos compuestos orgánicos y la luz. Se ha observado fotorregulación de la carotenogénesis en muchos organismos, incluyendo algas, hongos y bacterias. Phycomyces acumula cantidades apreciables de beta-caroteno en la oscuridad (50 ug/g peso seco) y mucho más si se incubaba en la luz (Bergman et al., 1973; López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980). Otros hongos, como F. aquaeductuum, N. crassa y V. agaricinum, sólo contienen cantidades apreciables de carotenoides cuando se incuban en la luz (Rau, 1985).

Las longitudes de onda más eficaces para la fotoinducción de los carotenoides corresponden a la luz azul, absorbida en los seres vivos particularmente por las flavinas y los carotenoides. Rau, (1967a) se inclinó por las flavoproteínas como fotorreceptores en Fusarium aquaeductuum, pero De Fabo et al., (1976) y Whitaker y Shropshire (1981) argumentan en favor del beta-caroteno como fotorreceptor en Neurospora crassa y Phycomyces, respectivamente.

La actividad carotenogénica de Phycomyces está regulada por el producto final, el beta-caroteno. La escasez de beta-caroteno activa la ruta; así, el contenido en fitoeno de los

mutantes carB y el contenido en licopeno de los mutantes carR es muy superior al contenido en beta-caroteno de la estirpe silvestre. La inhibición química de la ruta aumenta enormemente el flujo de sustrato que afluye a ésta. En este mecanismo de regulación están probablemente afectados los mutantes carS, que contienen de cincuenta a cien veces más beta-caroteno que la estirpe silvestre. Los dobles mutantes carB carS acumulan la misma cantidad de fitoeno que los mutantes carS (Murillo y Cerdá Olmedo, 1976).

Inhibidores y activadores de la carotenogénesis

Una segunda herramienta muy útil en el estudio de la biosíntesis de carotenos son los compuestos químicos que afectan a la ruta.

El inhibidor de la carotenogénesis más universalmente empleado es la difenilamina, que bloquea específicamente los pasos de deshidrogenación, produciendo la acumulación de fitoeno. Se han descrito al menos 15 especies de hongos en las que la difenilamina es efectiva (Goodwin, 1980), entre ellas Fusarium aquaeductuum (Bindl et al., 1970). Otros compuestos difenólicos tienen el mismo efecto (Bramley et al., 1984; Herber et al., 1972).

La beta-ionona inhibe también la deshidrogenasa en algunos organismos, por ejemplo Rhodotorula glutinis (Simpson et al., 1964) y Verticillium albo-atrum (Valadon y Mummery, 1966), pero no en otros, como Verticillium agaricinum (Valadon y Mummery, 1973) y Phycomyces blakesleeanus (Lee et al., 1975).

Los compuestos difenólicos parecen inhibir la actividad, pero no la síntesis, de la deshidrogenasa (Valadon y Mummery, 1973; Valadon y Mummery, 1979). El mecanismo de la inhibición no ha sido aún esclarecido, pero se ha atribuido a una semejanza estructural entre una parte de la molécula del fitoeno y otra de los inhibidores bifenólicos (Bramley et al., 1984).

Otros compuestos químicos inhiben la ciclasa del licopeno. Algunos son compuestos N-heterocíclicos, como la piridina, el imidazol y algunos derivados, activos en Blakeslea trispora (Ninet et al., 1969; Feofilora et al., 1970), y la nicotina, activa en Phycomyces blakesleeanus (Davies, 1973) y Verticillium agaricinum (Valadon y Mummery, 1974). Otros compuestos N-heterocíclicos relacionados no son activos y no está clara la relación entre estructura y función.

El 2-(4-clorofeniltio trietilamina HCl (CFTA) inhibe la ciclasa del licopeno en muchas plantas y hongos (Coggins et al., 1970), entre ellos Phycomyces blakesleeanus (Murillo, 1980; Murillo et al., 1981) y Blakeslea trispora (Hsu et al., 1972, 1974). En otros organismos, como Verticillium agaricinum (Valadon y Mummery, 1974), el CFTA carece de efecto significativo.

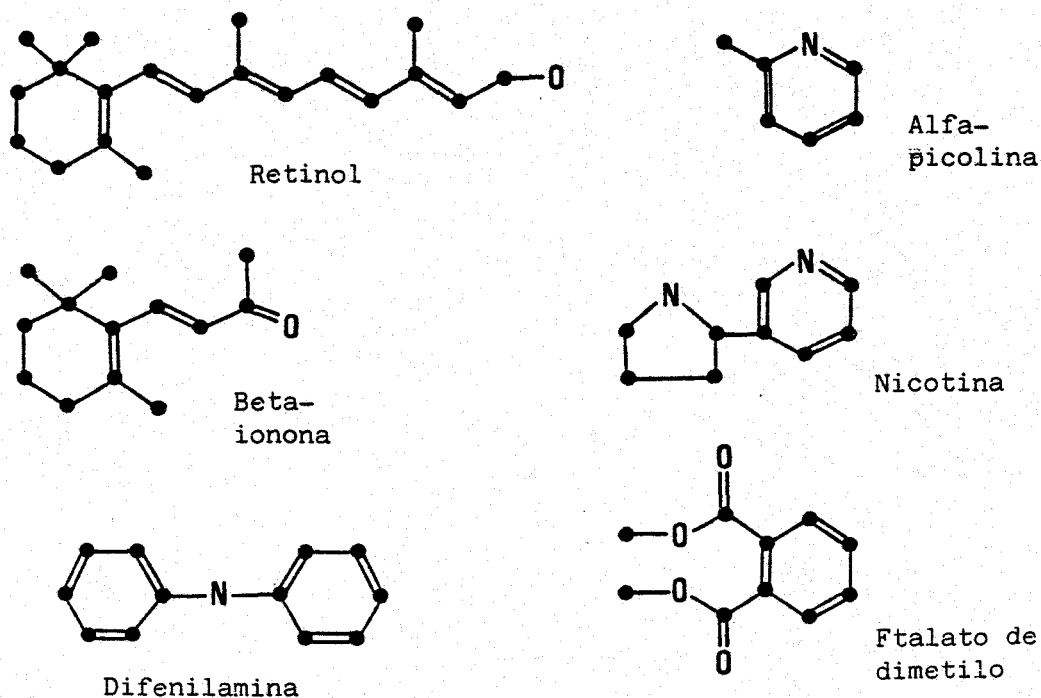


Figura 5. Fórmulas de algunos activadores e inhibidores de la carotenogénesis.

=====

Otros compuestos químicos producen la activación de la síntesis de carotenoides. En los cultivos mixtos de estirpes de sexo opuesto de P. blakesleeanus o B. trispora se observa una fuerte estimulación de la síntesis de carotenos. Este fenómeno ocurre aunque se separe a las dos estirpes por una membrana de celofán y es debido a la acción de los ácidos trispóricos. La adición de éstos a cultivos de Mucor mucedo, M. hiemalis, P. blakesleeanus y Choanephora cucurbitarum estimula la carotenogénesis (Bu'Lock et al., 1976). Este efecto desaparece en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, por lo que se cree que los ácidos trispóricos estimulan la expresión génica (Thomas et al., 1967). En presencia de difenilamina y ácidos trispóricos se observa una gran acumulación de fitoeno, lo que exige la activación de los pasos anteriores. El beta-caroteno es precursor de los ácidos trispóricos, con el retinal y retinol como posibles pasos intermedios (Austin et al., 1970).

El retinol y la beta-ionona son también estimuladores de la síntesis de beta-caroteno en P. blakesleeanus y en B. trispora (Eslava et al., 1974; Lee et al., 1975; Feofilova y Bekhtereva, 1976; Mackinney et al., 1952; Davies, 1973). El mecanismo de acción puede estar relacionado con su parecido con el beta-caroteno, pudiendo ser un efecto de competitividad.

Muchos fenoles son potentes activadores de la síntesis de beta-caroteno en P. blakesleeanus. Entre los más activos se encuentran el veratrol y el ftalato de dimetilo; otros como el alcohol y el aldehído cinámicos inhiben la deshidrogenasa del fitoeno (Cerdá-Olmedo y HÜtermann, 1986). Otros fenoles no tienen efecto significativo. Como en el caso de los compuestos N-heterocíclicos, no se conoce la relación entre estructura y efecto.

En Fusarium aquaeductuum y Cephalosporium diospyros, especies que requieren luz para sintetizar carotenos, el para-hidroxi y para-cloromercuribenzoato inducen la carote-

nogénesis en la oscuridad (Rau, 1967b; Rau et al., 1967; Parn y Seviour, 1974) y más aún en la luz (Theimer y Rau, 1969).

Carotenogénesis in vitro

La mayoría de las investigaciones de la síntesis de carotenoides se han hecho in vivo, pero hay estudios in vitro con extractos celulares de bacterias, algas, hongos y plantas superiores (Para revisión ver Bramley, 1985)

El sustrato más universalmente usado es (^{14}C)-mevalonato pero también se han usado otros sustratos marcados, como el pirofosfato de isopentenilo, el pirofosfato de geranylgeraniol y el fitoeno. Se ha observado la incorporación de radiactividad a numerosos carotenos, como el fitoeno, el licopeno y el beta-caroteno, y xantofilas, como la violaxantina y la zeaxantina.

Las únicas especies de hongos en las que se ha estudiado la carotenogénesis in vitro son Blakeslea trispora (Neujahr y Bjork, 1970), Neurospora crassa (Bobowski et al., 1977; Spurgeon et al., 1979; Mitzka-Schnabel y Rau, 1981), Aspergillus giganteus (Bramley, comunicación personal) y sobre todo Phycomyces blakesleeanus.

La investigación de la carotenogénesis in vitro en Phycomyces se inició con el estudio de la conversión de acetato, hidroximetilglutarato y ácido mevalónico en beta-caroteno (Yokoyama et al., 1962). En este primer trabajo se estudiaron las condiciones más adecuadas de incubación y el requerimiento de cofactores del sistema. Posteriormente se estudió la conversión de fitoeno a licopeno (Davies, 1973), la de ácido mevalónico a licopeno y otros carotenos (Bramley y Davies, 1975) y la de licopeno, gamma-caroteno y neurosporeno a beta-caroteno (Bramley et al., 1977).

En estos trabajos se usó la estirpe C115, superproductora de beta-caroteno. La mayor parte del beta-caroteno en C115 se encuentra en vesículas lipídicas (Riley y Bramley, 1976), en

cuyas membranas es probable que ocurra la síntesis (Riley y Bramley, 1982).

Los extractos de mutantes carB son particularmente incapaces de deshidrogenar el fitoeno, los de mutantes carR, de ciclar el licopeno y los de mutantes carA de hacer cualesquiera carotenos; estos resultados confirman los obtenidos in vivo. En las condiciones de cultivo empleadas, los mutantes carB, carR y carS no muestran niveles de incorporación global muy diferentes a los de la estirpe silvestre (De la Concha et al., 1983).

La vitamina A produce un detectable incremento de la síntesis de beta-caroteno en extractos de la estirpe silvestre (De la Concha et al., 1983). La difenilamina inhibe la síntesis de carotenos insaturados en extractos de mutantes carA, carR y carS, pero esta actividad se recupera al eliminar la difenilamina (Clarke et al., 1983).

El progreso en la bioquímica de la carotenogénesis requiere la purificación de los enzimas. Ello requiere su solubilización con mantenimiento de la actividad, ya que se cree que están asociados a membranas (Riley y Bramley, 1976; Mitzka-Schnabel y Rau, 1981; Kreuz et al., 1982). Las enzimas necesarias para sintetizar fitoeno son liberadas de la membrana por tampón a alta molaridad. La solubilización de las que convierten el fitoeno en beta-caroteno necesitan el empleo de determinados detergentes iónicos (Bramley y Taylor, 1985).

Objetivo de la tesis

La abundante literatura científica sobre Gibberella no dedica ninguna atención a la síntesis de carotenoides, aunque esta ruta tiene el interés de compartir los pasos iniciales con los de la síntesis de giberelinas.

El objetivo de esta tesis es abordar la biosíntesis de los carotenoides en Gibberella en sus aspectos bioquímicos y genéticos. El trabajo ha comprendido cuatro partes: la obten-

ción de mutantes con dos agentes mutagénicos distintos; el análisis de los mutantes afectados en la síntesis de carotenoides; el efecto de diversos compuestos químicos sobre la ruta; y la actividad in vitro de algunos mutantes representativos.

CAPITULO 2

MUTAGENESIS

Este capítulo aspira a mejorar los procedimientos para la obtención de mutantes de G. fujikuroi. A este fin conviene partir de células uninucleadas y por ello se comenzó mejorando las condiciones de esporulación y estudiando los microconidios formados. Se han estudiado con algún detalle los efectos letales y mutagénicos de la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, se han comparado los principales resultados con los de la radiación ultravioleta y se ha usado ocasionalmente el sulfonato etilmetílico.

Obtención y características de los microconidios

En ciertas condiciones de cultivo, la estirpe silvestre de G. fujikuroi IMI58289 produce microconidios, esporas asexuales que aparecen al microscopio como células elipsoidales, no tabicadas, de unos 2-3 μm de ancho y 4-6 μm de largo. La tinción con mitramicina demuestra que los microconidios son uninucleados (Fig. 6). Se usa el nombre de micro-

=====

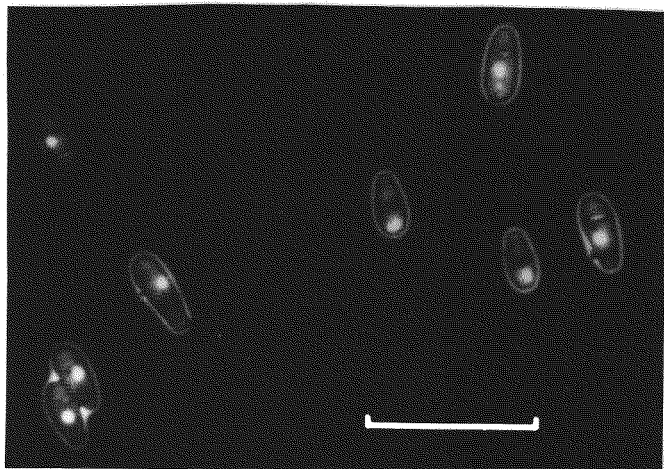


Figura 6. Esporas de G. fujikuroi IMI58289 teñidas con mitramicina y fotografiadas con microscopio de fluorescencia.

Barra: 10 μm .

=====

conidios en contraposición con los macroconidios, esporas multicelulares y de mayor tamaño producidas por otras estirpes.

Una serie de investigaciones preliminares consiguió mejorar notablemente la esporulación de IMI58289. La pobreza del medio y la iluminación estimulan la producción de microconidios por el micelio. Tras cinco días de cultivo a la luz a 23°C se detectaron 5.1×10^6 microconidios por caja en medio de esporulación, 2.4×10^4 en medio mínimo y menos de 100 en medio nutritivo. Los cultivos en la oscuridad suelen tener menos de 100 microconidios por caja, pero se observa una esporulación errática considerable en algunos casos.

Mutagénesis con nitrosoguanidina

Los microconidios son muy sensibles a los efectos letales de la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (en adelante, nitrosoguanidina). Tanto la supervivencia como la mutagenicidad dependen del producto de la concentración de mutágeno por el tiempo de exposición (Fig. 7), producto que llamamos dosis y medimos en M s (concentración molar por tiempo en segundos). Para cada dosis la letalidad es mayor si se preincuban los microconidios en medio nutritivo, es decir, si se les permite iniciar la germinación. La mayor sensibilidad comienza a las dos horas de germinación, cuando aun no se detectan grandes cambios morfológicos en las esporas, se mantiene durante la formación de los tubos de germinación y disminuye más tarde (Fig. 8). A las 6 horas de preincubación un 80% de los microconidios presentan tubo de germinación; a las 12 horas el porcentaje es un 99%.

La mutagenicidad, medida como porcentaje de auxótrofos entre supervivientes, aumenta linealmente con la dosis (Fig. 9). El número total de auxótrofos respecto al número inicial de esporas alcanza un máximo alrededor de una dosis de 0.1 M s. Para una misma dosis, la frecuencia de mutantes es mayor

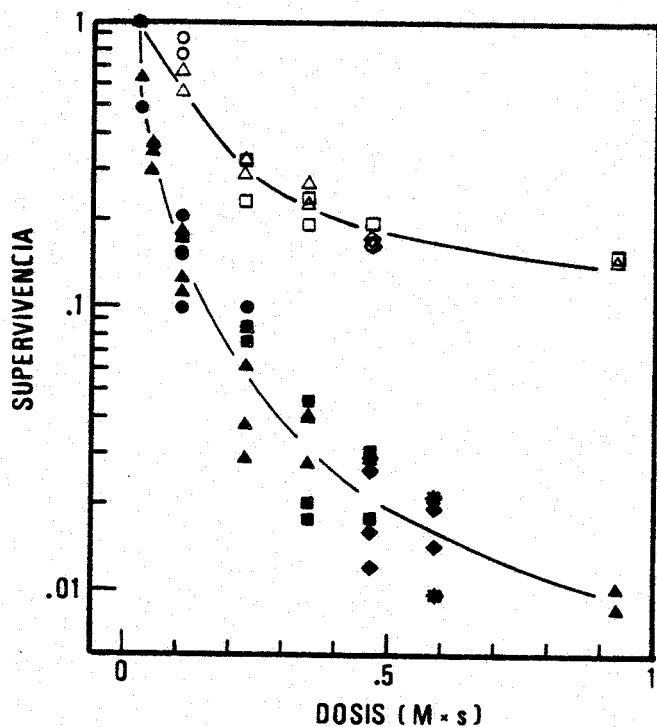
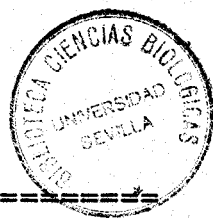


Figura 7. Supervivencia a la nitrosoguanidina de esporas latentes (suspendidas en agua, símbolos blancos) o incubadas 2 horas en medio nutritivo (símbolos negros). Las dosis indicadas en abscisas se obtuvieron con exposiciones de

15 (triángulos),
30 (cuadrados),
45 (círculos),
60 (rombos)
o 75 (estrellas)
minutos a las concentraciones apropiadas de nitrosoguanidina.

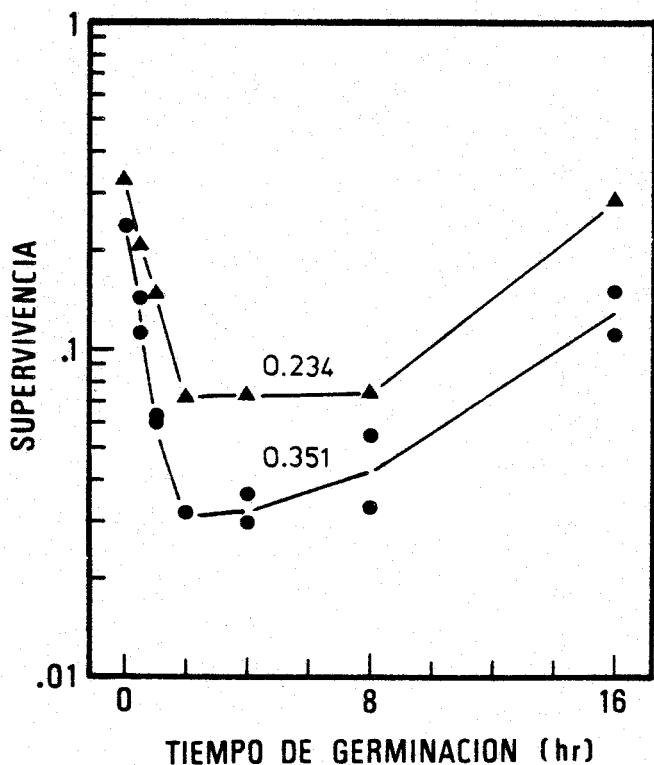


Figura 8. Efecto de la germinación sobre la supervivencia de esporas tratadas con nitrosoguanidina. Se suspendieron las esporas en medio nutritivo, se incubaron a temperatura ambiente durante el tiempo indicado y se expusieron a las dosis indicadas de nitrosoguanidina.

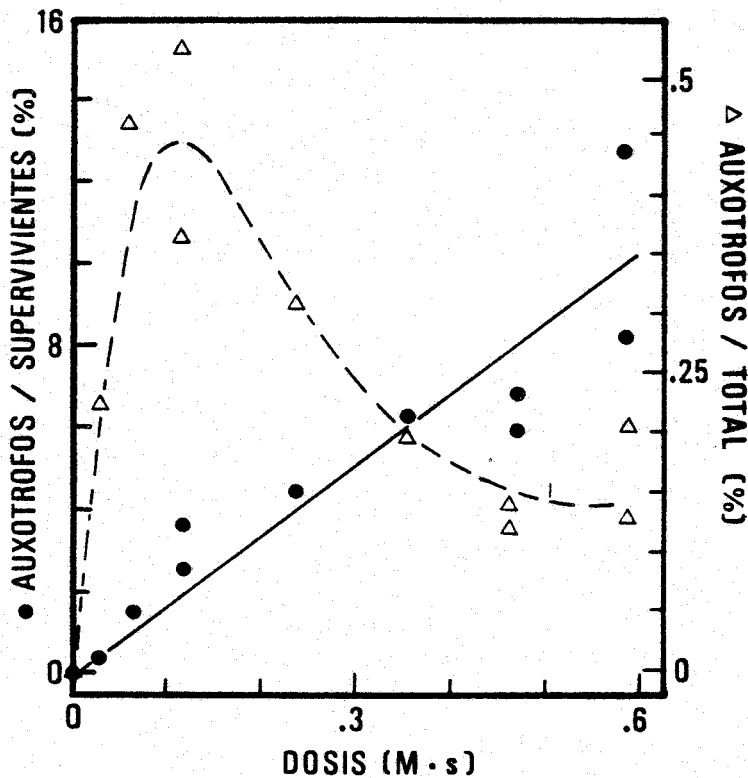


Figura 9. Frecuencia de mutantes auxótrofos entre las colonias producidas por esporas incubadas dos horas en medio nutritivo, expuestas a nitrosoguanidina y sembradas en agar nutritivo.

Tabla 1. Supervivencia (% de las células iniciales) y frecuencia de mutantes auxótrofos (% de los supervivientes) de esporas latentes o preincubadas 2 horas en medio nutritivo y expuestas a nitrosoguanidina o a radiación ultravioleta.

Agente	Dosis	Esporas	Supervivencia	Auxótrofos
nitrosoguanidina	0.5 M s	latentes	15	2.5
	0.1 M s	preinc.	14	3.1
	0.05 M s	preinc.	33	1.4
radiación UV	0.7 J m ⁻²	latentes	20	0.8

Se ensayó la auxotrofia de 1040 colonias obtenidas en las condiciones descritas en cada línea. Las frecuencias de auxótrofos inducidas por radiación ultravioleta son significativamente menores que las inducidas por nitrosoguanidina, según el estadístico t obtenido tras una transformación arco seno de las frecuencias (Sokal y Rohlf, 1969).

si se preincubaban las esporas en medio nutritivo. Sin embargo, si las esporas preincubadas y no preincubadas se tratan con distintas dosis de mutágeno hasta una misma frecuencia de supervivientes, se obtienen las mismas frecuencias de mutantes (Tabla 1).

Mutagenesis con radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta de 254 nm es letal para los microconidios (Fig. 10). La exposición inmediata a la luz visible de los microconidios irradiados revierte este efecto letal (fotorreactivación). En ambos casos la letalidad sigue aproximadamente una cinética de primer orden con un pequeño hombro inicial. A diferencia de la nitrosoguanidina, la incubación previa de los microconidios no afecta a la letalidad por radiación ultravioleta. Como en el caso de la nitrosoguanidina, la letalidad disminuye cuando avanza la germinación (Fig. 11). La mutagenicidad de la radiación ultravioleta es significativamente menor que la de la nitrosoguanidina a un mismo nivel de supervivencia (Tabla 1).

Mutantes morfológicos y bioquímicos

Entre los supervivientes de los tratamientos mutágenicos aparecen con cierta frecuencia variantes que se diferencian de la estirpe silvestre por sus requerimientos nutritivos o por el tamaño, la morfología, el color o la textura de las colonias.

Entre los mutantes inducidos por nitrosoguanidina que crecen en medio nutritivo pero no en medio mínimo identificamos requerimientos de arginina (siete mutantes), metionina (cinco), leucina (cuatro), lisina (tres), biotina (dos), ácido nicotínico (dos), adenina (uno), triptófano (uno) y fenilalanina (uno).

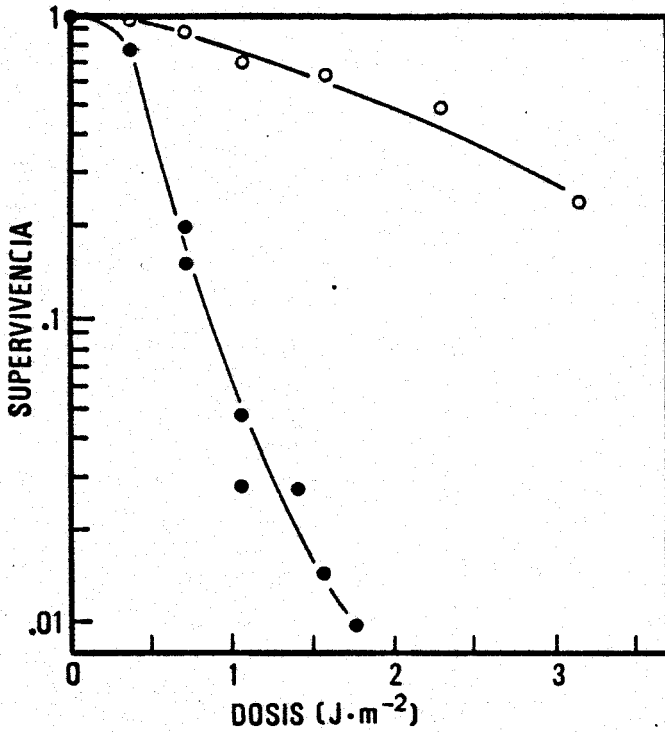


Figura 10. Supervivencia de las esporas a la radiación ultravioleta y fotorreactivación por la luz visible. Tras la exposición a la dosis indicada en abscisas, las esporas se expusieron (O) o no (●) a la luz visible, y se incubaron en la oscuridad.

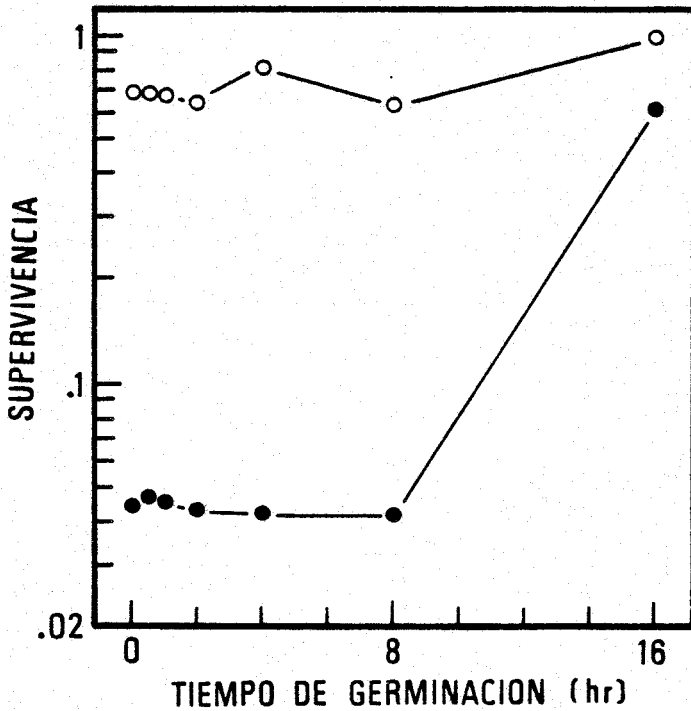


Figura 11. Efecto de la germinación sobre la supervivencia de esporas expuestas a radiación ultravioleta. Las esporas se incubaron en medio nutritivo durante los tiempos indicados en abscisas, se expusieron a 1 J m⁻² de radiación ultravioleta, se expusieron (O) o no (●) a la luz visible, y se incubaron en la oscuridad.

También se obtuvieron mutantes auxótrofos inducidos por otros agentes, como la radiación ultravioleta y el sulfonato etilmetílico. Los tres auxótrofos de adenina estudiados adquieren una coloración rosa cuando se cultivan en concentraciones limitantes de adenina: el micelio es rosa oscuro con 20 mg L^{-1} , rosa pálido con 200 mg L^{-1} y blanco con 2 g L^{-1} . La síntesis de pigmento responsable de la coloración es por lo tanto reprimida por la adenina. Estas características concuerdan con las de algunos auxótrofos de adenina de otras especies, como los afectados en los genes ad1 y ad2 en Sacharomyces cerevisiae (Silver y Eaton, 1969) y adel y ade2 en Candida albicans (Poulter y Rikkerink, 1983).

Otros mutantes presentan un intenso color morado tanto en la luz como en la oscuridad. El tipo silvestre adquiere una coloración similar, pero menos intensa, en ciertas condiciones de cultivo. La naturaleza del pigmento responsable de este color es desconocida. El contenido en carotenos de estos mutantes es el mismo de la estirpe silvestre.

El resto de los mutantes afectados en la coloración difieren del silvestre cuantitativa o cualitativamente en el contenido de carotenos. A ellos y a la biosíntesis de carotenos está dedicado el resto de esta tesis.

DISCUSION

G. fujikuroi es un organismo muy apropiado para la inducción y aislamiento de mutantes. Las esporas uninucleadas facilitan la expresión de mutaciones recesivas y el aislamiento de las células que las contienen. Las frecuencias de mutación obtenidas son muy altas y permiten obtener fácilmente gran variedad de mutantes. Otras estirpes de G. fujikuroi forman macroconidios multicelulares y no presentarían, por lo tanto, dichas ventajas.

La germinación produce un espectacular aumento de la sensibilidad de las esporas a la nitrosoguanidina, pero no a la

radiación ultravioleta. De modo similar, la nitrosoguanidina mata más eficazmente las bacterias y levaduras en crecimiento que las estacionarias y las esporas de Phycomyces en germinación que las durmientes (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968; Calderón y Cerdá-Olmedo, 1983; Roncero et al., 1984).

Los efectos letales de la nitrosoguanidina y de la radiación ultravioleta se vuelven menos acusados cuando las esporas han tenido oportunidad de germinar durante 16 horas, consecuencia, presumiblemente, del aumento del número de núcleos.

Las mutaciones inducidas por la nitrosoguanidina en Gibberella serán fundamentalmente cambios de base, si se pueden aplicar los resultados con otros organismos. Los cambios más frecuentes son las transiciones GC \rightarrow AT (Prakash y Sherman, 1973; Coulondre y Miller, 1977), pero también aparecen las transiciones inversas, AT \rightarrow GC, transversiones e incluso desfases (Yournó et al., 1969). Los efectos de la nitrosoguanidina han sido revisados por Neale (1976), Cerdá-Olmedo y Ruiz-Vázquez (1979) y Gichner y Veleminsky (1982).

La dosis a emplear en la práctica depende de la naturaleza de los mutantes que se desee aislar. El número total de mutantes obtenidos a partir de un número dado de esporas alcanza un máximo para una dosis aproximada de 0.1 M s. La frecuencia de mutantes entre los supervivientes aumenta monótonamente con la dosis. Si se desea aislar mutantes raros no seleccionables, la dosis ha de ser alta a fin de tener posibilidades de encontrarlos, aún a riesgo de acumular numerosas mutaciones en un mismo genoma. Si los mutantes se pueden seleccionar conviene utilizar dosis bajas, para evitar en lo posible las mutaciones múltiples. Las mutaciones múltiples en genes distintos son particularmente peligrosas cuando se estudia la relación entre los genes y sus funciones.

La radiación ultravioleta induce menores frecuencias de mutantes que la nitrosoguanidina, pero conviene usarla para ampliar, al menos potencialmente, los cambios moleculares representados en la colección de mutantes.

CAPITULO 3

MUTANTES DE LA CAROTENOGENESIS

En este capítulo se investiga la síntesis de carotenoides por las estirpes silvestres de G. fujikuroi y F. moniliforme y por varios tipos de mutantes de G. fujikuroi cuyo aislamiento describe el capítulo anterior. El análisis de las giberelinas de los mutantes permite estudiar la relación entre dos grandes ramas de los terpenoides.

Carotenoides de las estirpes silvestres

En todas las estirpes silvestres de G. fujikuroi y F. aquaeductuum ensayadas el pigmento mayoritario es la neurosporaxantina y el contenido en carotenoides es mayor a la luz que en la oscuridad (Tabla 2).

En todas ellas el contenido en fitoeno a la luz es de unos 10 ug por g de peso seco (ppm) o menos, excepto en F. aquaeductuum que contiene 44 ppm. En todas las estirpes incubadas en la oscuridad el contenido de fitoeno se reduce a trazas difícilmente cuantificables. Todas las estirpes contienen cantidades apreciables de carotenos neutros coloreados, agrupados en la Tabla 2 bajo el nombre de "carotenos intermediarios".

En el resto de las investigaciones se usó la estirpe IMI58289, productora de giberelinas, que crece bien a 23°C y a 30°C, pero escasamente a 36°C, cerca de la temperatura límite de crecimiento (Fig. 12).

La escasez de carotenoides de la estirpe IMI58289 cultivado a 23°C en oscuridad la hace particularmente apropiada para estudios de fotoinducción. Los cultivos de cuatro días a 30°C o 36°C en la oscuridad contienen 15 ppm de carotenoides, con predominio de la neurosporaxantina. El contenido en carotenoides a la luz permanece más o menos constante con el

=====
 Tabla 2. Contenido en carotenoides de varias estirpes silvestres de G. fujikuroi y F. aquaeductuum incubadas 9 días a 23°C. Los valores son µg por g de peso seco (ppm). El total es al suma de la neurosporaxantina, los carotenos intermediarios, y el fitoeno.
 =====

Estirpe	Cultivado en la luz			Cultivado en la oscuridad		
	Carotenos intermed.	Neurospoxantina	Total	Carotenos intermed.	Neurospoxantina	Total
IMI58289	37	112	159	< 1	< 1	1
ATCC38932	38	114	162	3	7	10
ATCC38933	19	125	144	3	19	22
M845	13	175	188	3	34	37
M848	23	223	256	15	71	91
ATCC42178	8	137	145	4	6	10
ATCC12776	16	96	117	< 1	2	2
SG87	14	94	113	1	< 1	1
<u>F. aquae-</u> <u>ductuum</u>	26	87	157	3	3	6

=====

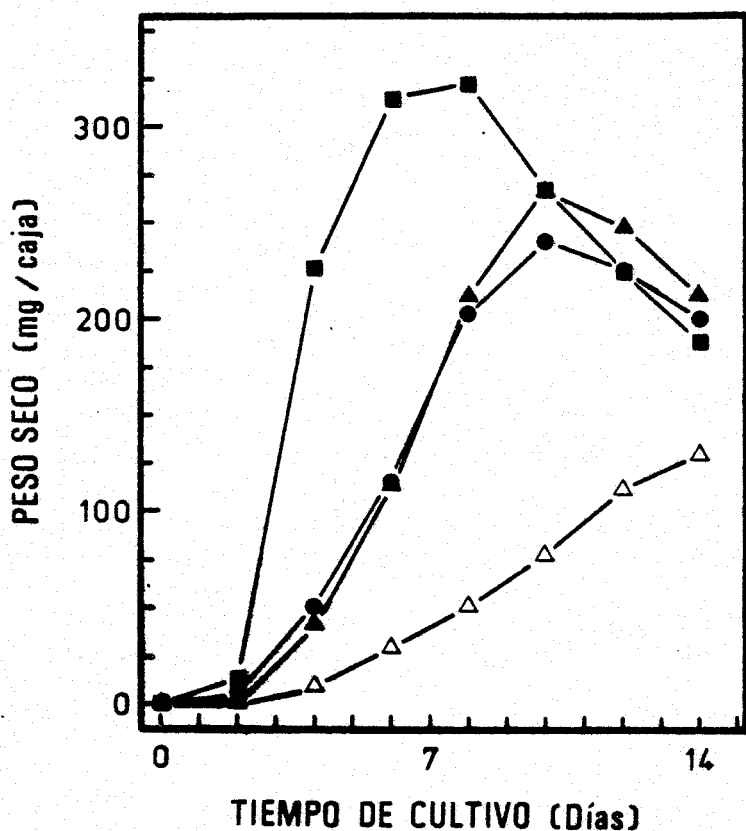


Figura 12. Crecimiento micelial de las estirpes silvestres de *G. fujikuroi* (símbolos negros) y *F. aquaeductuum* (círculos blancos) en función del tiempo de incubación. Los cultivos se iniciaron con siete fragmentos de micelio distribuidos simétricamente sobre el agar de una caja de Petri (cuadrados negros) o con un solo fragmento situado en el centro de la caja (los demás símbolos) y se incubaron en la oscuridad a 30°C (triángulos negros) o a 23°C (los demás símbolos).

tiempo (Fig. 13). Predomina la neurosporaxantina, con unas 100 ppm. El más abundante de los carotenos intermediarios es el toruleno (26 ppm), acompañado de beta-caroteno y gamma-caroteno (5 ppm de cada uno) y trazas de licopeno y neurosporeno.

Mutantes superproductores

Los mutantes superproductores son de color naranja intenso, con los mismos carotenoides que la estirpe silvestre y en las mismas proporciones, pero en mucha mayor cantidad e independientemente de la iluminación (Tabla 3). La cantidad total de carotenoides aumenta durante las dos primeras semanas de cultivo (Fig 13).

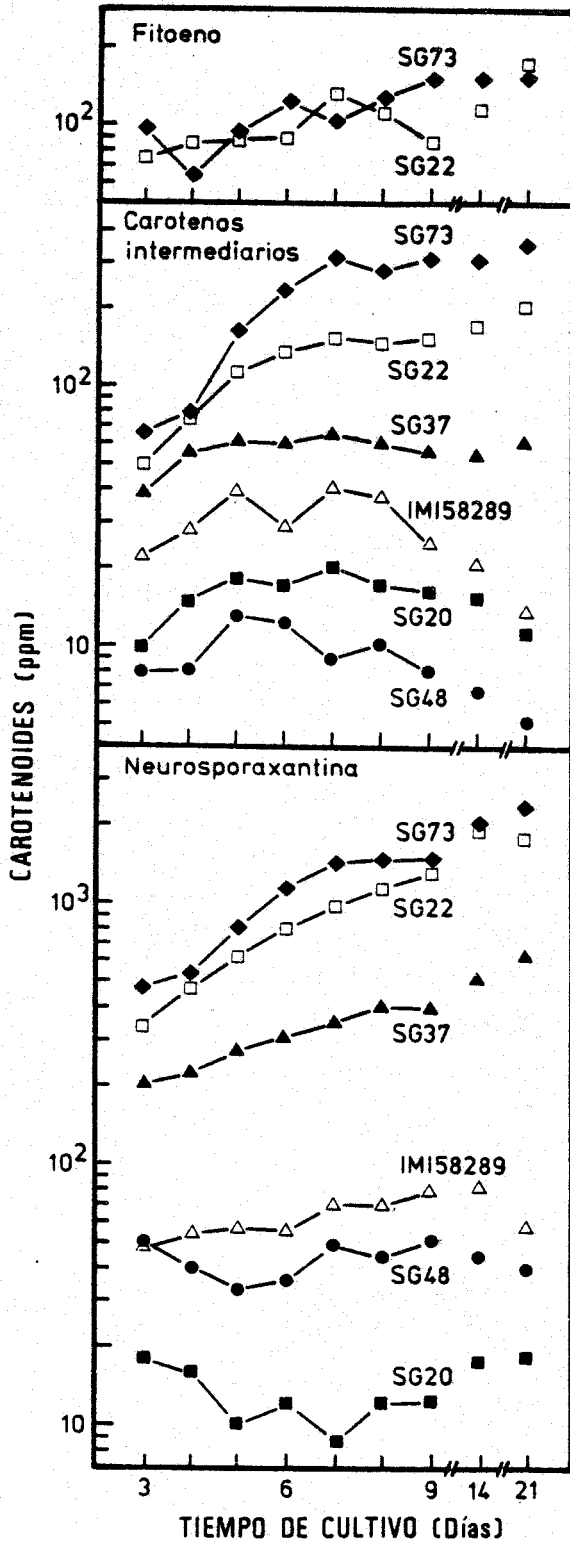


Figura 13. Contenido en carotenoides de la estirpe silvestre, tres mutantes superproductores (SG22, SG37 y SG73) y dos mutantes pálidos en la oscuridad (SG20 y SG48) crecidos a 23°C, en función de la edad del cultivo. Los mutantes se incubaron en la oscuridad y la estirpe silvestre a la luz, ya que produce muy pocos carotenoides a 23°C en la oscuridad. SG22 y SG73 son las únicas estirpes que contienen cantidades apreciables de fitoeno.

=====
 Tabla 3. Contenido de carotenoides en los mutantes superproductores crecidos a 23°C durante cuatro o nueve días a la luz o en la oscuridad. Los valores son ppm.
 =====

Estirpe	Incubación	Fitoeno	Carotenos intermed.	Neurospoxantina	Total
IMI58289	4 luz	Trazas	27	56	83
	4 osc.	Trazas	1	1	Trazas
	9 luz	Trazas	27	115	142
	9 osc.	Trazas	2	1	3
SG1	4 luz	71	43	515	629
	4 osc.	50	69	572	691
	9 luz	86	108	1256	1450
	9 osc.	82	121	1082	1285
SG19	4 luz	70	50	444	564
	4 osc.	60	72	553	685
	9 luz	81	112	1092	1285
	9 osc.	62	113	1336	1511
SG22	4 luz	67	54	485	606
	4 osc.	63	86	643	792
	9 luz	91	119	1330	1540
	9 osc.	108	143	1667	1918
SG36	4 luz	72	61	596	729
	4 osc.	52	103	700	855
	9 luz	115	127	1398	1640
	9 osc.	76	143	1547	1766
SG37	4 luz	39	55	313	407
	4 osc.	12	64	230	306
	9 luz	44	67	547	658
	9 osc.	33	67	456	556
SG39	4 luz	72	61	521	654
	4 osc.	42	96	502	640
	9 luz	92	96	901	1089
	9 osc.	54	116	1238	1408

=====

El fenotipo superproductor se debe presumiblemente a una mutación reguladora. La estirpe SG37 comparte las características de los mutantes superproductores pero con sensiblemente menos carotenoides; esta estirpe puede tener una mutación rezumante en el mismo mecanismo regulador.

La estirpe superproductora SG22, elegida para estudios más detallados, contiene una concentración similar de carotenoides a 23°C y 30°C. A 36°C la concentración es un 30% mayor, pero el crecimiento es mucho más lento.

Mutantes albinos

Los mutantes albinos nunca tienen carotenoides coloreados, mientras que la estirpe silvestre sólo carece de ellos en la oscuridad. Se han analizado seis mutantes albinos obtenidos a partir de la estirpe silvestre IMI58289 (Tabla 4). La concentración de fitoeno en la estirpe SG43 es similar a la concentración total de carotenoides en la estirpe silvestre; esta estirpe sufre por lo tanto un bloqueo específico en la deshidrogenación del fitoeno. No se detectaron carotenoides en las estirpes SG4, SG52, SG53 y SG54 bajo ninguna condición de cultivo ensayada; este fenotipo no es achacable a un bloqueo específico de las reacciones desde fitoeno a neurospora-xantina. Una versión rezumante del mismo fenotipo aparece en la estirpe SG2, que contiene 8 ppm de neurospora-xantina y 7 ppm de carotenos intermediarios en la luz.

A partir de la estirpe superproductora SG22 se han aislado seis mutantes albinos. Cuatro de ellos (SG74, SG77, SG78 y SG79) contienen altas cantidades de fitoeno (Tabla 4), y ningún carotenoide coloreado. Al igual que la estirpe SG43, están presumiblemente afectados en la deshidrogenasa del fitoeno. Otros dos mutantes, SG75 y SG76, no presentan carotenoides bajo ninguna condición de cultivo ensayada.

=====

Tabla 4. Contenido de carotenoides en la estirpe silvestre, el mutante SG22 y en los mutantes blancos con fitoeno derivados de ellos. Los cultivos se incubaron en la luz o en la oscuridad durante nueve días a 23°C. Los valores son ppm.

Estirpe	Carotenoide	En la luz	En la oscuridad
IMI58289	Fitoeno	10	Traces
	Carotenos intermed.	37	<1
	Neurosporaxantina	112	<1
	Total	159	Trazas
SG43	Fitoeno	140	Trazas
SG22	Fitoeno	144	87
	Carotenos intermed.	100	113
	Neurosporaxantina	933	1172
	Total	1177	1372
SG74	Fitoeno	873	928
SG77	Fitoeno	904	852
SG78	Fitoeno	1403	1202
SG79	Fitoeno	1086	1039

=====

Mutantes de color alterado

Los mutantes con modificaciones más sutiles de la coloración derivan de la estirpe superproductora SG22. Probablemente no se encontraron al mutagenizar la estirpe silvestre porque en un fondo levemente pigmentado no se notan tanto las diferencias de color. Todos estos mutantes conservan dos características de la estirpe parental: la continua acumulación de carotenoides con el tiempo y la ausencia de fotoinducción.



En algunos mutantes la diferencia de color se debe a cambios cuantitativos y no cualitativos en el contenido de carotenoides. Las diferencias de color observadas entre la estirpe parental y dos mutantes (SG71 y SG72) se explican por una disminución en la concentración de carotenoides. Otro de los mutantes (SG73) tiene más carotenoides que la estirpe parental, pero el incremento relativo es pequeño (menos del doble).

Muchos mutantes presentan cambios cualitativos importantes en su composición de carotenoides. La parte inferior de la figura 14 representa los análisis detallados y la superior izquierda indica la suma total de carotenoides.

Los cambios cualitativos se reflejan claramente en la representación en coordenadas homogéneas (arriba a la derecha). Las estirpes que tienen las mismas proporciones de carotenoides que la parental aparecen agrupadas en esta representación, aunque los totales sean diferentes. Así, aparecen juntos dos mutantes rojos (SG68 y SG82) que contienen toruleno como carotenoide mayoritario. El defecto genético de estos mutantes es la incapacidad de llevar a cabo la rotura oxidativa del toruleno para dar neurosporaxantina; los pequeños incrementos de otros carotenos intermediarios son probablemente un efecto secundario del bloqueo principal.

Tres de los mutantes (SG42, SG45 y SG70) se encuentran parcialmente afectados en las deshidrogenaciones. Los niveles relativamente altos de beta-caroteno y los cocientes beta-zeacaroteno / neurosporeno y neurosporaxantina / toruleno demuestran que estas estirpes realizan las demás reacciones de la carotenogénesis sin dificultad. La pérdida total de la capacidad de deshidrogenar da lugar a los mutantes blancos anteriormente descritos que contienen sólo fitoeno. La estirpe de color amarillo pálido SG42 está afectada en todas las deshidrogenaciones, pero más particularmente en la primera, tercera y cuarta. Su fenotipo es similar al de un mutante de Phycomyces de color verdoso con una deshidrogenasa poco activa (Bejarano, comunicación personal). Los mutantes de color

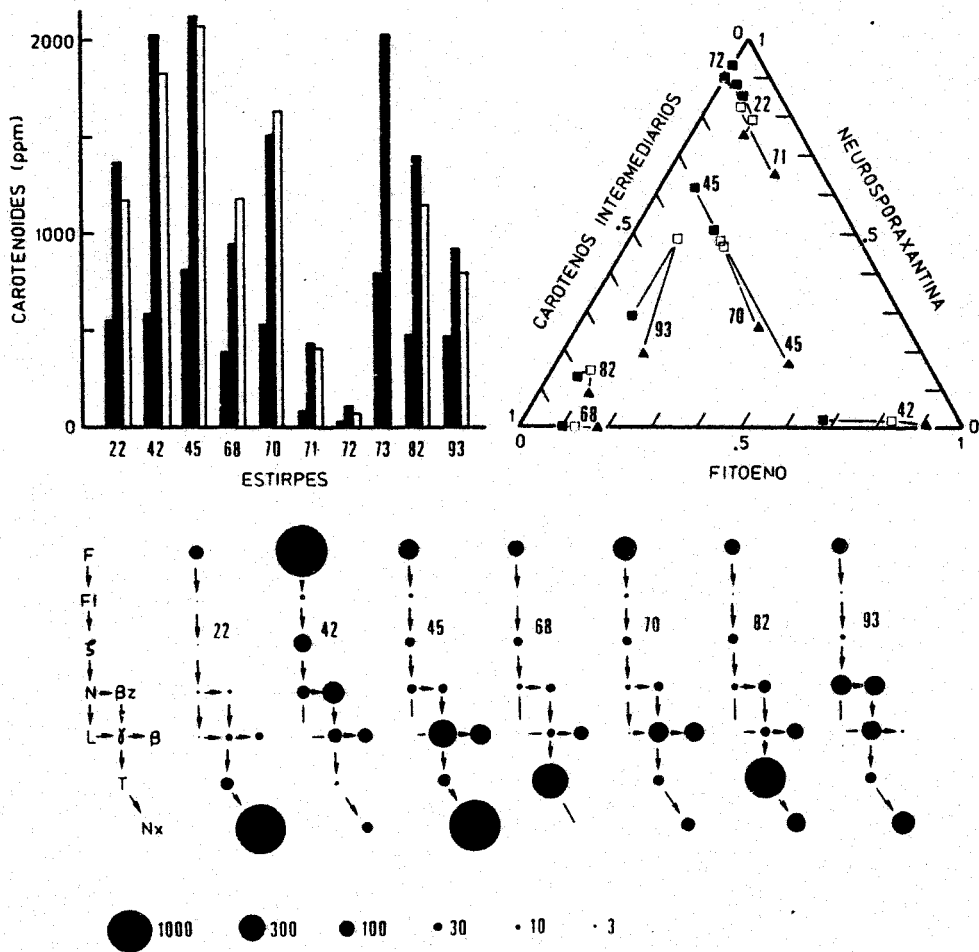


Figura 14. Carotenoides en los mutantes de color alterado.

Arriba a la izquierda: Contenido total de carotenoides en micelios incubados cuatro días en la oscuridad (barra izquierda), nueve días en la oscuridad (barra central), o nueve días a la luz (barra derecha) de los mutantes SG cuyos números se indican.

Arriba a la derecha: Representación en coordenadas homogéneas de las proporciones de neurosporaxantina, fitoeno, y carotenos intermediarios en las estirpes SG que se indican (cuatro días en la oscuridad (▲), nueve días en la oscuridad (■), nueve días en la luz (□)). Cada proporción está representada por la distancia del símbolo a cada uno de los lados del triángulo; la suma de las distancias a los tres lados es uno (el lado del triángulo).

Abajo: Contenido de fitoeno (F), fitoflueno (Ff), zeta-caroteno (S), neurosporeno (N), licopeno (L), beta-zeacaroteno (βz), gamma-caroteno (γ), beta-caroteno (β), toruleno (T), y neurosporaxantina (Nx) en las estirpes SG cuyos números se indican. La superficie de los círculos es proporcional a la concentración en ppm (escala inferior). Las flechas indican las supuestas reacciones químicas: hacia abajo, las deshidrogenaciones; a la derecha, las ciclaciones; y oblicua, la rotura oxidativa.

amarillento SG45 y SG70 parecen estar afectados específicamente en la quinta deshidrogenación. Otro mutante naranja amarillento (SG93) parece defectuoso en todas las reacciones a partir de neurosporeno.

La inhibición química de la ciclasa en la estirpe SG22 no produce un cambio apreciable de color, como se describe en el capítulo 3. Es de suponer que los mutantes de la ciclasa no sufran alteraciones de color y por eso no han sido aislados.

Mutantes pálidos en la oscuridad

Estos mutantes derivan de la estirpe silvestre y se parecen mucho a ella cuando se incuban a la luz, pero contienen cantidades significativas de neurosporaxantina en la oscuridad. Las proporciones relativas de los diferentes carotenos son similares a los de la estirpe silvestre; el componente mayoritario es la neurosporaxantina y de fitoeno solo hay trazas.

El contenido total de carotenoides en la oscuridad varía considerablemente de una estirpe a otra (Tabla 5). Como en la estirpe silvestre, el contenido en carotenoides de los dos mutantes analizados varía poco con el tiempo (Fig. 13).

Carotenogénesis y producción de giberelinas

Se determinó la presencia de giberelinas en el medio de cultivo de representantes de todos los tipos de mutantes aislados (Fig. 15). Todos los mutantes ensayados excretan giberelinas al medio, incluso el mutante superproductor de neurosporaxantina SG1, cuya producción de giberelinas es baja pero detectable.

Todas las estirpes superproductoras de carotenoides ensayadas producen cantidades menores de giberelinas que la estirpe silvestre; de ellas, la que produce mayor cantidad es SG22, estirpe empleada para el aislamiento de los mutantes

con el color alterado. Los cinco mutantes derivados de SG22 analizados muestran niveles de producción de giberelinas semejantes o menores a los de la estirpe parental.

=====
 Tabla 5. Contenido de carotenoides en los mutantes pálidos en la oscuridad aislados a partir de la estirpe silvestre. Los cultivos se incubaron nueve días a 23°C o 30°C en la luz o en la oscuridad. Los valores son ppm.

Estirpe	Incubación	Carotenos intermed.	Neurospoxantina	Total
IMI58289	23°C luz	27	115	142
	23°C oscuridad	2	1	3
	30°C oscuridad	8	21	29
SG20	23°C luz	21	125	146
	23°C oscuridad	13	32	45
	30°C oscuridad	39	84	123
SG40	23°C luz	44	136	180
	23°C oscuridad	21	26	47
	30°C oscuridad	42	98	140
SG41	23°C luz	16	79	95
	23°C oscuridad	5	8	13
	30°C oscuridad	12	89	101
SG48	23°C luz	14	132	146
	23°C oscuridad	9	71	80
	30°C oscuridad	16	136	152
SG49	23°C luz	29	121	150
	23°C oscuridad	9	13	22
	30°C oscuridad	27	66	93
SG60	23°C luz	25	113	138
	23°C oscuridad	7	18	25
	30°C oscuridad	38	65	110
SG69	23°C luz	46	201	247
	23°C oscuridad	6	8	14
	30°C oscuridad	18	38	62

=====

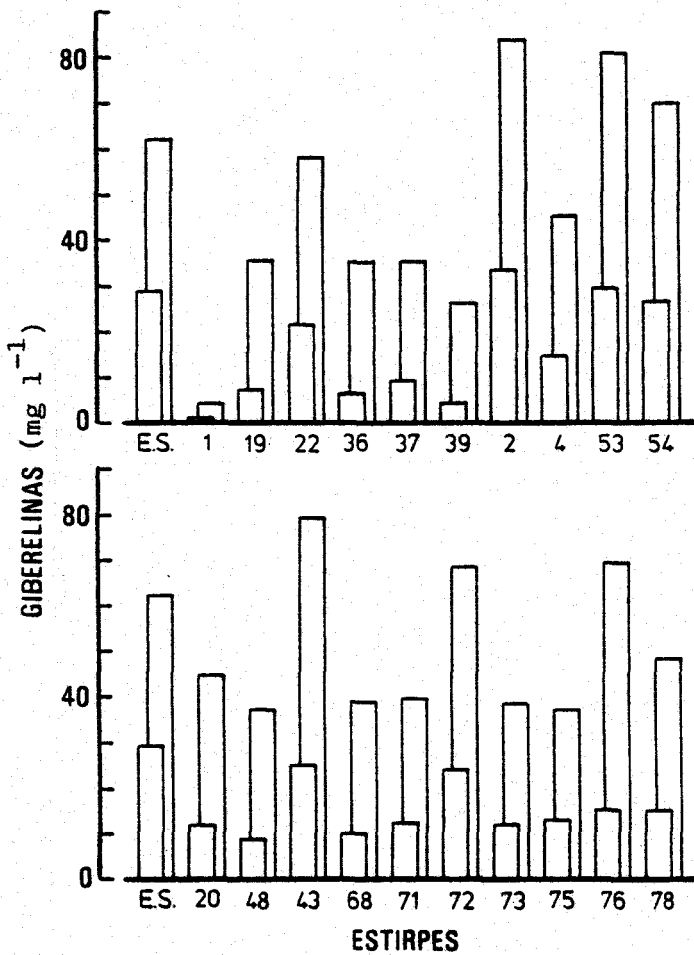


Figura 15. Concentración de giberelinas en el medio de cultivo tras incubar la estirpe silvestre (E.S.) y los mutantes SG que se indican durante seis (barra anterior) y doce días (barra posterior).

El mutante albino SG4 y los dos mutantes pálidos en la oscuridad ensayados, SG20 y SG48, muestran también un apreciable descenso en la producción de giberelinas. En los demás mutantes aislados a partir de la estirpe silvestre no se encuentran cambios en la producción de giberelinas.

Las condiciones empleadas no son óptimas para la producción de giberelinas, pero aseguran que queda glucosa al acabar la incubación (Fig. 16). Las diferencias encontradas entre los distintos mutantes no se pueden achacar por lo tanto a diferencias causadas por agotamiento de la fuente de carbono.

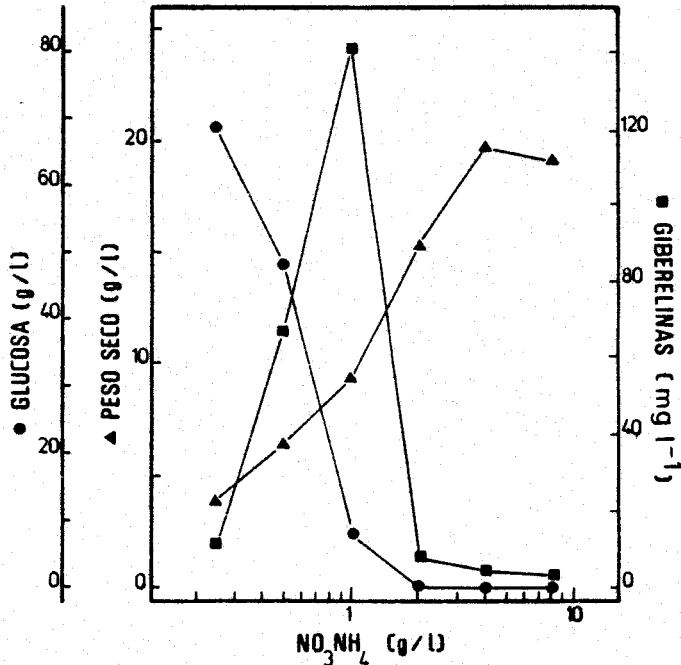


Figura 16. Crecimiento de la estirpe silvestre y concentración de giberelinas y glucosa en el medio a los quince días de incubación en caldo 10% ICI en función de la concentración inicial de NH_4NO_3 .

DISCUSION

Biosíntesis de neurosporaxantina

La presencia de neurosporaxantina como carotenoide mayoritario y la inducción de la síntesis por la luz son características comunes a todas las estirpes ensayadas de G. fujikuroi. El contenido en caroteno en la oscuridad depende de la estirpe, siendo particularmente bajo en IMI58289 y SG87, precisamente las dos únicas estirpes productoras de giberelinas entre las investigadas.

El estudio de los mutantes de color sugiere que la ruta propuesta para F. aquaeductuum (Bindl et al, 1970) es válida también para Gibberella. El fitoeno, el gamma-caroteno y el

toruleno son intermediarios críticos en esta ruta. La abundancia de fitoeno en muchos mutantes albinos, de toruleno en los mutantes SG68 y SG82 y de gamma-caroteno en los mutantes SG45 y SG70 sugiere que estos compuestos son intermediarios en la ruta. Al menos el toruleno ha de ser el sustrato de una enzima específica defectuosa, aunque en distinto grado, en los mutantes SG68 y SG82.

Las cinco deshidrogenaciones son probablemente llevadas a cabo por una misma enzima, como las cuatro deshidrogenaciones en Phycomyces (Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974; Aragón et al., 1976). En apoyo de esta hipótesis, cinco de los mutantes presentan fitoeno como producto final, pero no se ha encontrado ningún mutante que acumule como producto final alguno de los cinco intermediarios parcialmente deshidrogenados. Los mutantes SG45 y SG70, que contienen considerables cantidades de gamma-caroteno, pueden presentar una deshidrogenasa rezumante con un cambio en la preferencia de sustrato, más que una pérdida de una deshidrogenasa específica para gamma-caroteno.

El precursor inmediato del gamma-caroteno podría ser el licopeno o el beta-zeacaroteno, según el orden en que se realicen la cuarta deshidrogenación y la ciclación. La inhibición específica de la ciclasa produce la acumulación de licopeno (ver capítulo 3º de esta tesis). La combinación de ineficiencia en las deshidrogenaciones y eficiencia en las ciclaciones en el mutante SG42 produce la acumulación de cantidades considerables de beta-zeacaroteno (Fig. 14). Ambos intermediarios están presumiblemente presentes en la estirpe SG22 (Fig. 14), pero los contenidos respectivos son demasiado bajos para poder asegurarlo con los métodos empleados. Ninguna de estas observaciones permite asegurar el orden de dichas reacciones en el tipo silvestre y condiciones naturales. La inhibición parcial de la deshidrogenasa explica la presencia de fitoeno, fitoflueno, zeta-caroteno, gamma-caroteno y otros intermediarios en micelio de SG22 crecido en presencia de difenilamina 20 uM (ver capítulo 3º).

Los mutantes blancos que carecen de fitoeno pueden estar bloqueados en pasos anteriores al fitoeno, o bien ser incapaces de fotoinducir la carotenogénesis, o bien pueden estar afectados en otras funciones regulatorias.

El esclarecimiento del número de enzimas y genes de la ruta espera el desarrollo de análisis genético en las estirpes empleadas en este trabajo.

La regulación

El contenido en fitoeno de los mutantes de Gibberella carentes de actividad deshidrogenasa es muy similar al contenido de neurosporaxantina en la estirpe silvestre. Este y otros resultados (capítulo 3) sugieren que Gibberella carece de un mecanismo de regulación por producto final. Ni la escasez, ni aún la carencia, de producto final activan las partes todavía funcionales de la ruta, donde darían lugar a fitoeno o a otros productos intermedios.

El contenido en carotenoides de la estirpe silvestre permanece aproximadamente estable a lo largo del tiempo. Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo de regulación del contenido en carotenoides, o bien un equilibrio entre la síntesis y la destrucción. La fotólisis de la neurosporaxantina no juega un papel importante en esta ecuación: las intensidades luminosas a las que se induce la síntesis son demasiado bajas para destruir masivamente el producto y hay dos mutantes con cantidades de carotenoides en la oscuridad similares al de la estirpe silvestre.

El contenido en carotenoides en las estirpes superproductoras de Gibberella aumenta constantemente con el tiempo como si careciera del mecanismo, regulador o destructivo, que mantiene el nivel en la estirpe silvestre.

Los resultados obtenidos con los mutantes de color sugieren un sencillo mecanismo regulatorio mediado por dos productos génicos que denominaremos L y R. La carotenogénesis es

inhibida por el producto R; su pérdida mutacional trae consigo la superproducción de neurosporaxantina (mutantes superproductores). El producto L, modificado directa o indirectamente por la luz, inhibe a R y, por lo tanto, estimula la carotenogénesis. Los mutantes superproductores son insensibles a la luz, puesto que no tienen producto R susceptible de ser inhibido por L. La pérdida mutacional de L produciría mutantes carentes de carotenoides. Puesto que R es un eficaz represor, no hay síntesis de carotenoides en oscuridad. Los mutantes pálidos en la oscuridad pueden tener un producto R modificado; como sería de esperar, la síntesis residual en oscuridad varía de un mutante a otro. Estos mutantes no estarían afectados en el producto L, puesto que responden a la luz.

El esquema predice que algunos de los mutantes albinos (pérdida de L o un R modificado) se pueden aislar a partir de la estirpe silvestre pero no a partir de estirpes superproductoras. Por lo tanto, es interesante resaltar que de seis mutantes albinos aislados a partir de la estirpe silvestre, solo uno acumula fitoeno, mientras que entre seis albinos aislados a partir de la estirpe superproductora SG22, cuatro acumulan fitoeno. En términos genéticos, la pérdida de R es epistática sobre las mutaciones en L. Esta epistasia es el motivo para la interacción propuesta entre los productos R y L.

Este sencillo mecanismo regulatorio sirve también para explicar las observaciones sobre síntesis de carotenoides in vitro (Capítulo 4 de esta tesis).

Los análisis de las giberelinas en los mutantes de la carotenogénesis no detectan regulaciones comunes a ambas rutas: la superproducción de neurosporaxantina no se ve acompañada por una superproducción de giberelinas y los mutantes incapaces de sintetizar carotenoides mantienen la capacidad de producir giberelinas.

La posibilidad de una relación indirecta entre ambas rutas no debe ser descartada. La producción de carotenoides es escasa en comparación con la de giberelinas, incluso en las estirpes superproductoras de aquellos. Así por ejemplo, un matraz de 250 ml de la estirpe SG22 contiene unos 3,5 mg de carotenoides y unos 15 mg de giberelinas, a los 15 días de cultivo en las condiciones de la figura 15. Las variaciones de flujo en la ruta de los carotenoides no pueden afectar por sí mismas de manera muy notable a la otra ruta. De todas maneras es digno de señalar que casi todos los mutantes superproductores de carotenoides producen menos giberelinas que la estirpe silvestre (Fig. 15); la cuantía de estas disminuciones no está lejos de la exigida si el aporte de sustrato a una ruta se hace a expensas de la otra.

La desviación de sustratos no es suficiente para explicar la baja producción de giberelinas de la estirpe SG1. Por tanto, entre todos los mutantes analizados SG1 es el único presuntamente afectado en una función directamente relacionada con la síntesis de giberelinas.

CAPITULO 4

MODIFICACION QUIMICA DE LA CAROTENOGENESIS

En este capítulo se describe el efecto sobre la síntesis de carotenoides en G. fujikuroi de distintos compuestos químicos ya conocidos por activar o inhibir la carotenogénesis en otros organismos.

Compuestos químicos no activos

Las bajas cantidades de carotenos acumulados por la estirpe silvestre, particularmente en oscuridad, la hacen idónea para analizar la activación de la síntesis por productos químicos. Por otro lado, las estirpes superproductoras se prestan mejor para detectar inhibición de la síntesis. En consecuencia hemos ensayado los compuestos químicos en la estirpe silvestre y en el mutante superproductor SG22, incubados tanto a la luz como en oscuridad.

Ninguno de los compuestos químicos ensayados produjo una inducción importante de la síntesis en la estirpe silvestre en oscuridad, es decir, ninguno de ellos reemplaza a la luz en la inducción de la carotenogénesis. Los resultados correspondientes han sido omitidos en casi todas las figuras y tablas siguientes.

Muchos de los compuestos químicos activos en otros organismos carecen de efecto significativo en Gibberella. Entre ellos hay inhibidores, como la CFTA, la nicotina, el imidazol y el alcohol cinámico, y activadores como el retinol, el veratrol y el ftalato de dimetilo (tabla 6). Estos compuestos químicos fueron usados hasta concentraciones que inhiben considerablemente el crecimiento, por lo que la ausencia de efecto en la carotenogénesis no puede ser achacada a una falta de acceso a la célula.

Tabla 6. Ausencia de efecto de varios compuestos químicos sobre el contenido de carotenoides en la estirpe silvestre y el mutante superproductor SG22. Los cultivos se incubaron a 23°C durante cuatro días a la luz o en la oscuridad. Los valores son ppm.

Adiciones (mg l ⁻¹)	Fitoeno	Carotenos intermed.	Neurospoxantina	Total
SG22 incubado en la luz				
Ninguno	61	61	556	678
CFTA (200)	105	109	474	688
CFTA (600)	102	151	418	671
Nicotina (649)	107	78	273	458
Nicotina (1622)	130	94	293	517
Imidazol (300)	75	57	365	497
Imidazol (1000)	60	112	347	519
Retinol (400)	105	74	599	778
SG22 incubado en la oscuridad				
Ninguno	71	87	583	742
CFTA (200)	123	99	508	730
CFTA (600)	125	114	525	764
Nicotina (649)	102	69	432	603
Nicotina (1622)	178	107	465	750
Imidazol (300)	80	53	398	531
Imidazol (1000)	64	160	754	978
Retinol (400)	136	107	543	786
Veratrol (691)	311	338	725	1374
Ftalato de dimetilo (388)	277	222	1166	1665
Alcohol cinámico (27)	179	173	1075	1427
Estirpe silvestre incubada en la luz				
Ninguno	Trazas	36	60	95
CFTA (200)	Trazas	17	29	46
CFTA (600)	Trazas	11	13	24
Nicotina (649)	Trazas	36	23	59
Nicotina (1622)	Trazas	20	33	53
Imidazol (300)	Trazas	29	62	91
Imidazol (1000)	Trazas	32	81	113
Retinol (400)	Trazas	64	64	128
Veratrol (691)	37	53	47	137
Ftalato de dimetilo (388)	28	58	63	149
Alcohol cinámico (27)	19	49	67	135

Inhibidores de la síntesis de neurosporaxantina

La difenilamina inhibe la síntesis de neurosporaxantina, con acumulación de fitoeno (Fig. 17), e inhibe el crecimiento (Fig. 20). La cantidad de carotenoides se mantiene a niveles aproximadamente constantes. Así, en presencia de difenilamina 70 μM , el contenido en fitoeno de SG22 a la luz o en la oscuridad es similar al contenido en neurosporaxantina de SG22 en ausencia de inhibidor y 6-7 veces superior al de la estirpe silvestre en la luz. La inhibición química de la deshidrogenasa produce el mismo efecto que el bloqueo genético de la misma enzima: el contenido en fitoeno de algunos de los mutantes albinos aislados es equivalente al de neurosporaxantina en las estirpes parentales (ver capítulo 2, Tabla 4).

La beta-ionona produce el mismo efecto que la difenilamina, pero sin llegar a producir una inhibición total (Fig. 18 y tabla 7). Al aumentar la concentración aumenta el contenido en fitoeno y disminuye el de neurosporaxantina, pero mantiene siempre un cierto contenido basal de ésta, incluso a muy altas concentraciones; paralelamente el contenido en carotenos intermediarios se mantiene prácticamente constante.

La difenilamina y la beta-ionona inhiben, por tanto, la deshidrogenasa del fitoeno.

La alfa-picolina ejerce un efecto muy diferente al de los demás compuestos químicos, claramente manifiesto sólo a muy altas concentraciones (Fig. 20): inhibe la síntesis de neurosporaxantina con alguna acumulación de fitoeno y una fuerte acumulación de carotenos intermediarios (Fig. 19 y tabla 7). En presencia de 2 g l^{-1} de alfa-picolina, el licopeno constituye un 70-80% de los carotenos intermediarios. La alfa-picolina inhibe, por tanto, la ciclase.

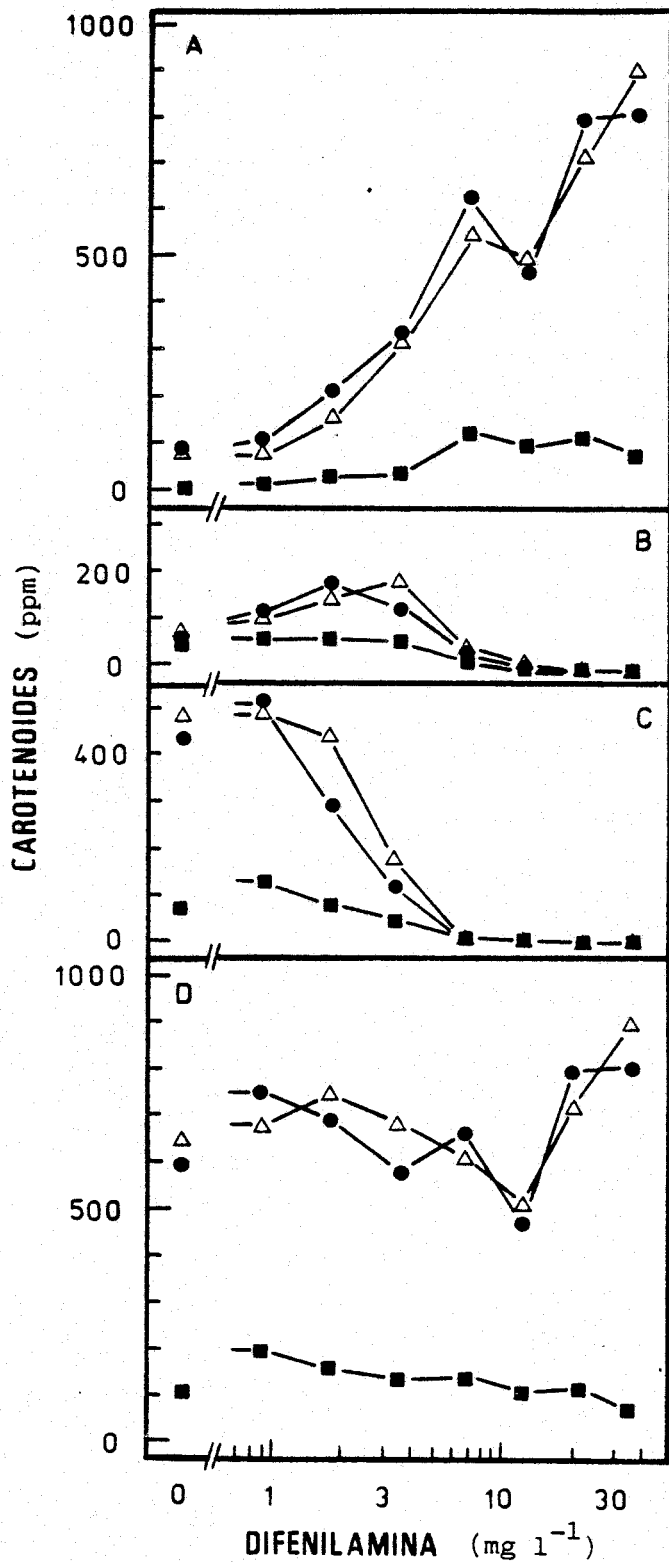


Figura 17. Efecto de la difenilamina sobre el contenido en fitoeno (A), carotenos intermediarios (B), neurosporaxantina (C) y total de carotenoides (D) de la estirpe silvestre incubada a la luz (■), y el mutante SG22 incubado a la luz (Δ) o en la oscuridad (●).

=====
 Tabla 7. Efecto de la alfa-picolina y la beta-ionona sobre el contenido de carotenoides en la estirpe silvestre y el mutante superproductor SG22. Los cultivos se incubaron a 23°C durante cuatro días en la luz o en la oscuridad. Los valores son ppm.

Adiciones (mg l ⁻¹)	Fitoeno	Carotenos intermed.	Neurospora xantina	Total
SG22 incubado en la luz				
Ninguno	70	71	604	745
Alfa-picolina (500)	89	84	527	700
Alfa-picolina (2000)	51	248	269	568
Beta-ionona (400)	504	96	34	634
SG22 incubado en la oscuridad				
Ninguno	84	86	563	733
Alfa-picolina (500)	107	89	459	655
Alfa-picolina (2000)	53	334	290	677
Beta-ionona (400)	916	125	62	1103
Estirpe silvestre incubada en la luz				
Ninguno	Trazas	41	60	101
Alfa-picolina (500)	Trazas	41	54	95
Alfa-picolina (2000)	Trazas	48	36	84
Beta-ionona (400)	61	5	1	66

=====
Activación de la síntesis de carotenoides

Ninguno de los compuestos ensayados produjo una fuerte activación de la síntesis de carotenos en la estirpe silvestre. El parahidroximercuribenzoato (PHMB), ensayado según nuestro protocolo o según el de Rau et al. (1967), carece de efecto en *Gibberella*.

Una ligera activación fue detectada en la estirpe silvestre en oscuridad en presencia de 2 g l⁻¹ de alfa-picolina, ya

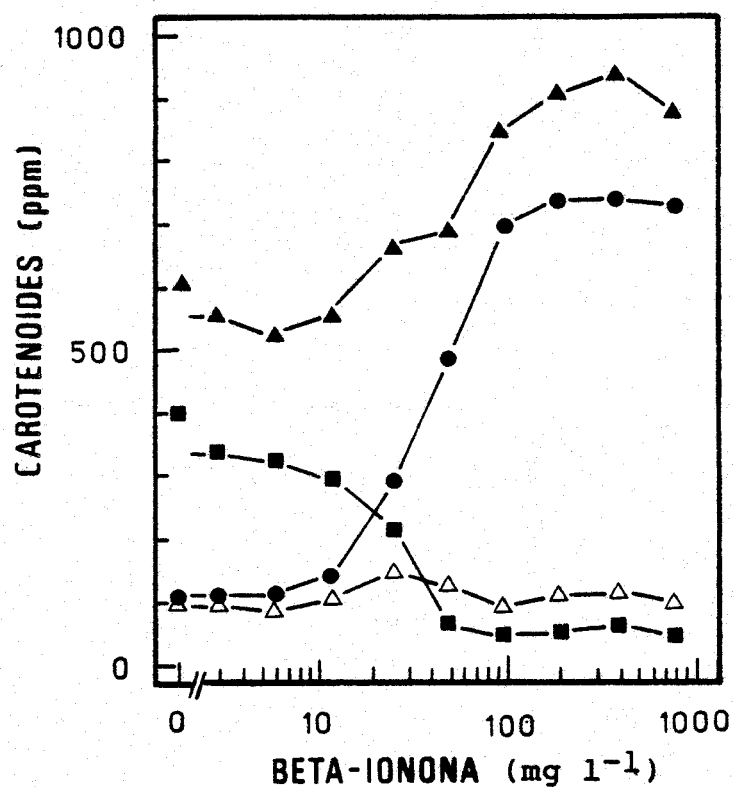


Figura 18. Efecto de la beta-ionona sobre el contenido en fitoeno (●), carotenos intermediarios (Δ), neurosporaxantina (■) y total de carotenos (▲) de la estirpe SG22 incubada en la oscuridad.

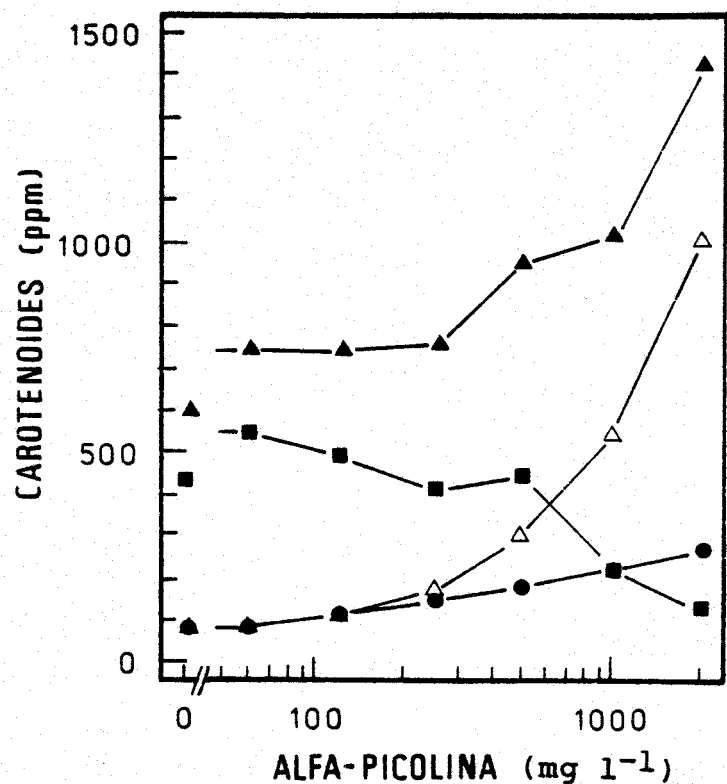


Figura 19. Efecto de la alfa-picolina sobre el contenido en fitoeno (●), carotenos intermediarios (Δ), neurosporaxantina (■) y total de carotenos (▲) de la estirpe SG22 incubada en la oscuridad.

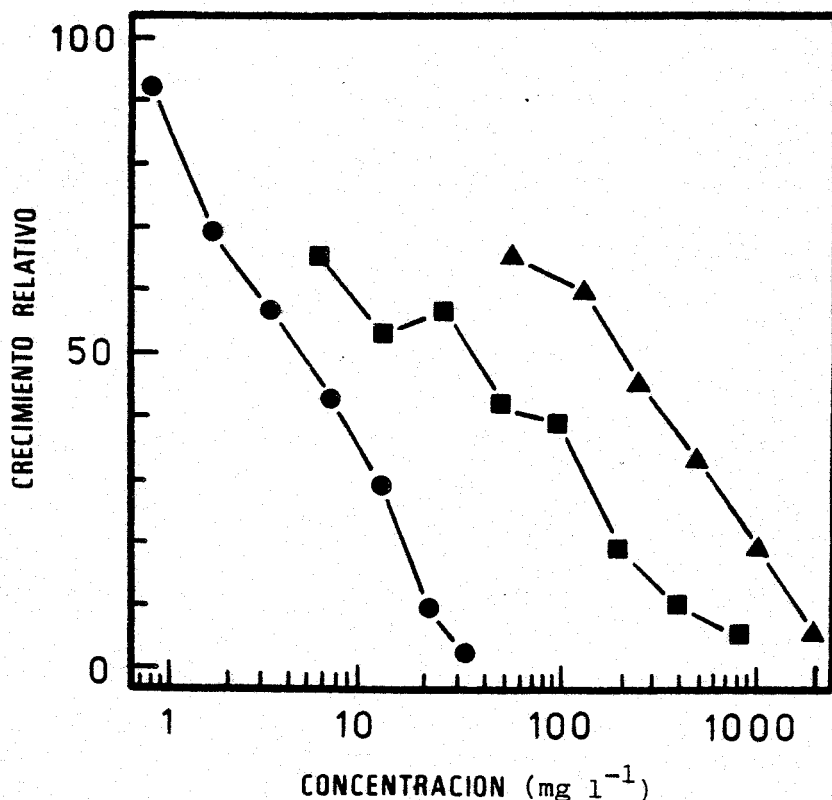


Figura 20. Efecto de la difenilamina (●), la beta-ionona (■) y la alfa-picolina (▲) sobre el crecimiento del mutante SG22. En cada experimento el peso seco de las colonias incubadas en ausencia de estos compuestos se tomó como 100.

que el micelio alcanza una concentración 12 ppm de carotenos.

Algunos de los compuestos químicos ensayados hubieron de disolverse en etanol o en Tween 80 y se observó que la presencia de etanol induce una pequeña activación de la carotenogénesis en la estirpe silvestre incubada en oscuridad. En consecuencia se investigó el efecto de tres alcoholes y dos detergentes sobre la carotenogénesis. El etanol, el propanol y el dimetilsulfóxido activan ligeramente la carotenogénesis e inhiben el crecimiento mientras que el metanol y Tween 80 carecen de efecto.

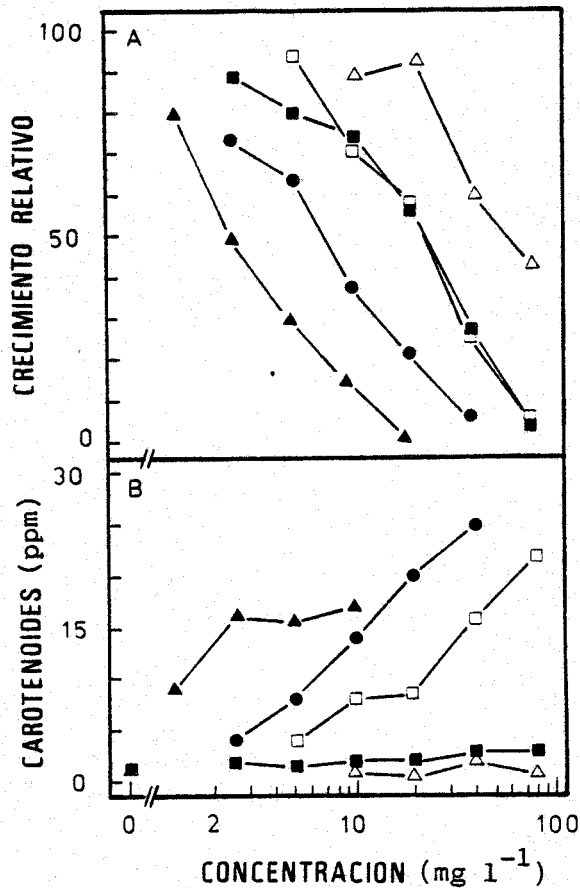


Figura 21. Efecto del metanol (■), etanol (●), propanol (▲), dimetilsulfóxido (□) y Tween 80 (Δ) sobre el crecimiento (A) y contenido en carotenoides (B) de la estirpe silvestre incubada en la oscuridad. El peso seco de las colonias incubadas en ausencia de los compuestos químicos se tomó como 100.

DISCUSION

La mayor parte de los compuestos químicos ensayados no afectan de modo sensible la carotenogénesis de Gibberella. La difenilamina y la beta-ionona inhiben la deshidrogenasa del fitoeno a concentraciones similares a las que son efectivos en otros organismos (ver capítulo 5). La alfa-ionona, un isómero de la beta-ionona, carece prácticamente de efecto. Este resultado sugiere que la parte del anillo de la molécula es la responsable del efecto inhibitorio.

La alfa-picolina es el único compuesto conocido que induce la acumulación de licopeno en Gibberella. La concentración necesaria para producir la inhibición es muy alta y está muy cerca del límite de inhibición del crecimiento. Los inhibidores de la ciclasa en otros organismos carecen de efecto en Gibberella.

Ningún compuesto ensayado hace variar el contenido total de carotenos pero el total de caroteno en SG22 sufre un moderado incremento (aproximadamente al doble) en presencia de concentraciones muy tóxicas de algunos compuestos químicos. Más que una verdadera desregulación de la carotenogénesis, este resultado puede reflejar un desacoplamiento entre el crecimiento micelial, inhibido, y la síntesis de carotenos, aún activa.

La ligera inducción de la síntesis en la estirpe silvestre por metanol, etanol y propanol correlaciona con sus respectivos tamaños, que determinan su volatilidad y su coeficiente de partición. En los experimentos no se tomaron precauciones especiales para evitar la evaporación de estos compuestos; en experimentos similares realizados por A. Aguilera en este laboratorio, tras siete días de incubación aún permanecía en las cajas un 50% del etanol inicial. La interacción con las membranas parece ser la explicación más plausible de la ligera activación por etanol, propanol y dimetilsulfóxido (Arnold y Johnson, 1982; Patterson et al., 1972).

CAPITULO 5

CAROTENOGENESIS IN VITRO

Este capítulo describe los primeros estudios in vitro de la carotenogénesis de Gibberella, inspirados en los anteriores de Phycomyces. El método consiste en la incorporación de radiactividad de (^{14}C)-mevalonato a carotenos en extractos celulares y se ha aplicado a varios de los mutantes de la carotenogénesis descritos en el capítulo 2.

Optimización de la incorporación de radiactividad

La incorporación de radiactividad a carotenos a partir de (^{14}C)-mevalonato implica la realización de dieciseis reacciones (Figuras 2 y 4, capítulo 1) llevadas a cabo, según los conocimientos actuales, por al menos diez enzimas diferentes. La obtención de niveles de incorporación eficaces presenta numerosos problemas. Tanto las enzimas como los sustratos están expuestos a sufrir alteraciones; por ejemplo, la desfosforilación de los primeros intermediarios por fosfatasas del extracto celular produce alcoholes que no pueden sufrir las reacciones siguientes. Se hicieron ensayos preliminares en tampones Tris y fosfato, con o sin fluoruro potásico (10 mM), un conocido inhibidor de las fosfatasas; la mayor incorporación de radiactividad en carotenoides se obtuvo en tampón Tris con fluoruro, que se usó en adelante. A fin de proteger los grupos SH de las enzimas, las incubaciones se hicieron en presencia de ditiotreitól.

Comportamiento in vitro de algunos mutantes de la carotenogénesis

En las condiciones de incubación normalizadas, del 40 al 80% de la radiactividad del (^{14}C)-mevalonato se encuentra en

compuestos lipídicos, extraíbles en éter etílico. Gran parte de la radiactividad incorporada (entre un 30 y un 90%) se encuentra en compuestos lipídicos polares, tales como los precursores de las giberelinas y los alcoholes originados por la desfosforilación de los intermediarios pirofosfato, y permanece en el origen de la primera separación cromatográfica (ver material y métodos). La radiactividad de las fracciones ácido kaurenico/geranilgeraniol y kaurenol/farnesol es muy alta en todas las estirpes (800-3000 y 300-1000 Bq respectivamente), excepto en la estirpe SG76 que en ningún caso sobrepasaron los 150 Bq. El resto de la radiactividad se reparte esencialmente entre el kaureno, el escualeno y los carotenos.

La radiactividad de los carotenos es diferente de una estirpe a otra y razonablemente repetible para cada una (tabla 8)

Tabla 8. Media y desviación típica de la radiactividad en los carotenos tras ocho incubaciones con cuatro extractos de la estirpe superproductora SG22 cultivada a la luz.

Fracción	Radiactividad (Bq)	
Extracto en éter etílico	5161.3 ±	623.3
Fitoeno	81.2 ±	37.7
Fitoflueno	3.9 ±	3.3
Beta-caroteno/zeta-caroteno/beta-zeacaroteno	13.8 ±	4.3
Gamma-caroteno/neurosporeno	36.6 ±	11.7
Toruleno/licopeno	323.4 ±	29.2
Kaureno	623.2 ±	884.4
Escualeno	5.3 ±	6.4
Proteína (mg/incubación)	14.2 ±	2.3

La incorporación en carotenos es unas 50-100 veces mayor en extractos del mutante superproductor SG22 que en los del mutante rojo SG68 y la estirpe silvestre (Tabla 9). La mayor parte de la radiactividad en carotenos aparece en las fracciones fitoeno y licopeno/toruleno. A fin de averiguar la distribución de radiactividad entre el licopeno y el toruleno, se recromatografió la fracción licopeno/toruleno del extracto del mutante SG22 incubado en la oscuridad; aproximadamente un 80% de la incorporación se encuentra en el toruleno.

Entre los extractos de los mutantes albinos, se encuentra mucha radiactividad en fitoeno en los de la estirpe SG78 y muy baja en los de las estirpes SG4, SG43, SG75 y SG76 (tabla 10); este resultado confirma el comportamiento in vivo de dichas estirpes (ver capítulo 2). La radiactividad del kaureneno en los mismos extractos es muy variable y la del escualeno fué baja en todos excepto en SG76, en el que el escualeno contiene el 80% de la radiactividad total de los lípidos.

La primera separación de los compuestos lipídicos en cromatografía en columna de óxido de aluminio permite obtener una primera fracción que contiene la neurosporaxantina (ver material y métodos). Los intentos de purificar la neurosporaxantina en cromatografía de capa fina fracasaron. La fracción de la neurosporaxantina contiene en todos los casos unos 50-100 Bq, excepto en el de la estirpe SG76 que es diez veces menor. La presencia del mismo nivel de radiactividad en estirpes capaces e incapaces de sintetizar neurosporaxantina sugiere que la radiactividad detectada no es debida a dicho carotenoide.

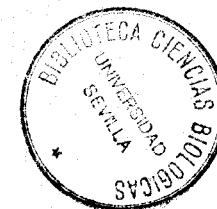
La alta incorporación de radiactividad obtenida en extractos celulares del mutante superproductor SG22 lo hacen idóneo para un estudio más detallado de algunos aspectos de la actividad carotenogénica in vitro.

La concentración de proteína en el extracto afecta drásticamente la actividad (Fig. 22): la incorporación de radiactividad desaparece casi totalmente al diluir el extracto cuatro veces.

=====
 Tabla 9. Radiactividad (Bq) incorporada a escualeno, kaureno y carotenos por extractos de la estirpe silvestre y los mutantes SG22 y SG68 incubados a la luz y en la oscuridad.

Fracción	Estirpe silvestre		SG22		SG68	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
Extracto en éter etílico	5682.8	4816.5	5792.5	5520.1	5376.0	5235.3
Fitoeno	5.1	1.1	70.4	149.2	4.8	2.4
Fitoflueno	0.5	0.4	3.1	4.5	0.5	0.1
Beta-caroteno	0.8	0.6	18.6	18.7	0.7	0.7
Gamma-caroteno	1.1	0.5	53.9	66.2	1.5	1.1
Lycopeno/toruleno		2.0	0.7	317.8	585.3	5.2
4.3						
Total carotenos	9.5	3.3	463.8	823.9	12.7	8.6
Kaureno	350.6	0.8	14.5	38.9	11.6	7.2
Escualeno	2.8	7.0	5.0	4.8	5.3	4.1
mg proteína/inc.	10.0	12.3	11.3	13.2	9.3	9.4

=====
 La fracción del beta caroteno incluye el zeta-caroteno y el beta-zeacaroteno. La fracción del gamma-caroteno incluye el neurosporeno.
 =====



=====
 Tabla 10. Radiactividad incorporada en fitoeno, kaureno y escualeno por extractos celulares de los mutantes albinos SG78 y SG43 incubados en luz y oscuridad y SG4, SG75 y SG76 incubados en oscuridad.

		Radiactividad (Bq)				
Estirpe	Extracto en éter etílico	Fitoeno	Kaureno	Escualeno	mg de proteína/ incubación	
SG78	Luz	5506.5	562.8	1424.9	6.2	15.0
	Osc.	5585.2	1623.1	458.4	9.8	13.2
SG43	Luz	5537.8	4.6	25.8	2.8	12.4
	Osc.	4083.4	2.4	2.0	10.0	10.3
SG4	Osc.	6023.8	1.6	145.2	28.4	15.0
SG75	Osc.	5823.8	3.4	421.2	7.8	13.2
SG76	Osc.	3651.6	0.2	0.8	2971.9	12.4

=====
 La radiactividad de los carotenos y otros lípidos es significativa a partir de los 20 minutos de incubación (Fig. 23). La del fitoeno pasa por un máximo a la hora de incubación. La de las fracciones gamma-caroteno/neurosporeno y beta-caroteno/zeta-caroteno/beta-zeacaroteno aumentan al principio y se estabilizan tras una hora de incubación. La radiactividad en la fracción licopeno/toruleno, sin embargo, aumenta a lo largo de las tres horas de incubación.

La producción de escualeno in vitro es una exclusiva de extractos de los micelios muy jóvenes, que se encuentran en crecimiento activo (Fig. 24). Los mismos extractos sobresalen en la producción de carotenos coloreados. Los extractos de micelios maduros presentan las más altas cantidades de ra-

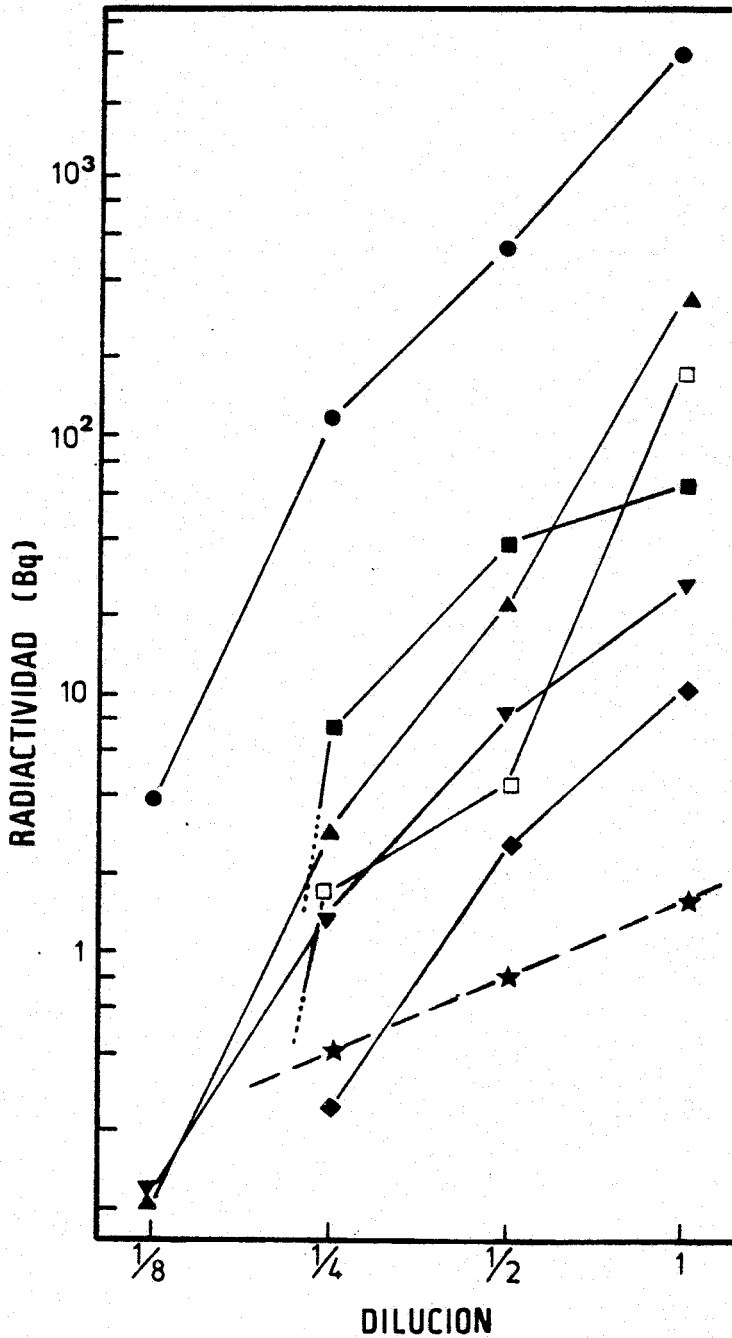


Figura 22. Efecto de la dilución de un extracto celular del mutante superproductor SG22 sobre la incorporación de radiactividad al extracto en éter etílico (●), al kaureno (□) y a los carotenos (fitoeno (■), beta-caroteno/beta-zeacaroteno/zeta-caroteno (◆), gamma-caroteno/neurosporeno (▼) y toruleno/licopeno (▲)). El extracto (1) se diluyó dos (1/2), cuatro (1/4) u ocho veces (1/8). La línea discontinua (★) representa la disminución esperada.

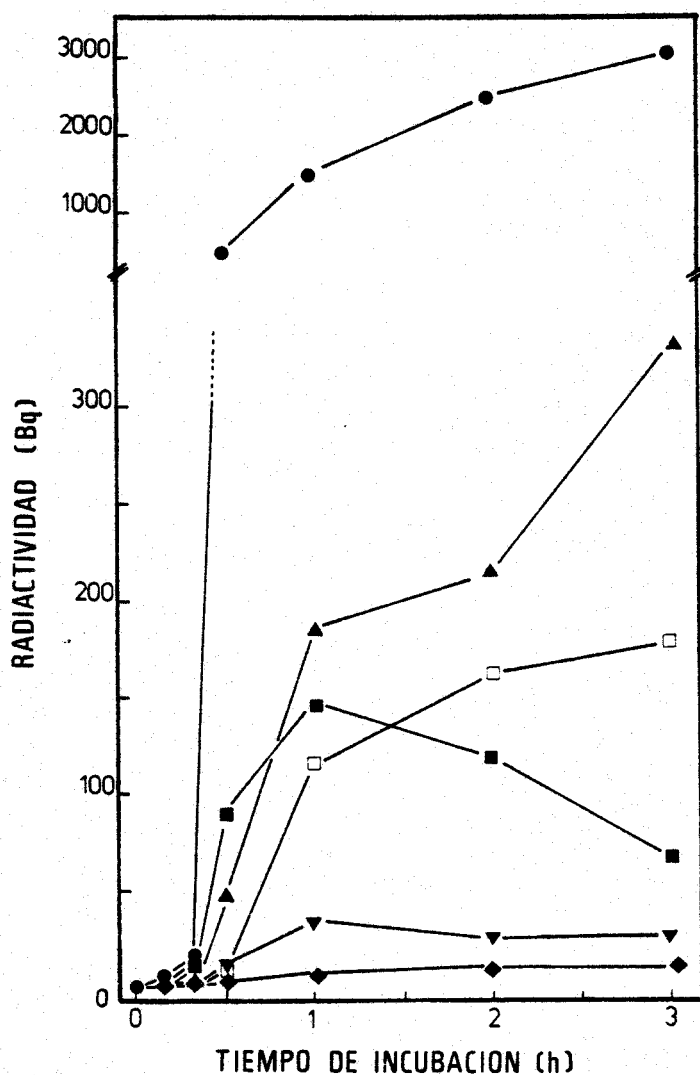


Figura 23. Cinética de la incorporación de radiactividad al extracto en éter etílico (●), al kaureno (□) y a los carotenos (fitoeno (■), beta-caroteno/beta-zeacaroteno/zeta-caroteno (◆), gamma-caroteno/neurosporeno (▼) y toruleno/licopeno (▲)) durante la incubación de un extracto de la estirpe superproductora SG22 con (C^{14})-mevalonato.

diactividad en las fracciones que contienen los precursores de las giberelinas. Estas observaciones con extractos se corresponden, grosso modo, con las actividades metabólicas in vivo.

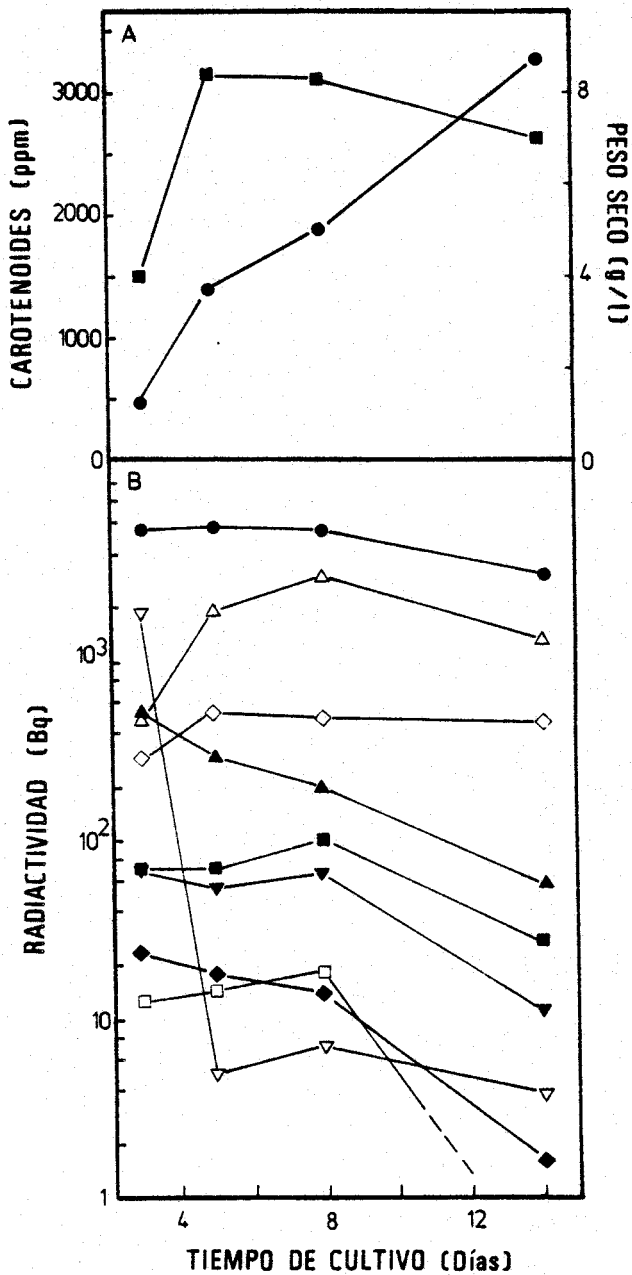


Figura 24.

A: Crecimiento (■) y contenido en carotenoides (●) de la estirpe SG22 en función de la edad.

B: Síntesis de terpenoides (extracto en éter etílico (●), kaureno (□), kaurenol/farnesol (◇), ácido kaurenico/geranilgeraniol (△), escualeno (▽), fitoeno (■), beta-caroteno/beta-zeacaroteno/zeta-caroteno (◆), gamma-caroteno/neurosporeno (▼) y toruleno/licopeno (▲)) en extractos celulares del mutante superproductor SG22 en función de la edad.

Fraccionamiento del extracto celular de SG22

Cuando el extracto celular de la estirpe SG22 (llamado S10 por ser el sobrenadante de una centrifugación a 10.000 g) se centrifuga a 105.000 g se obtienen dos fracciones: el sobrenadante o fracción citosólica (S105) y el precipitado o fracción de membranas (P105). El extracto S105 produce el 45% del fitoeno producido por el S10, pero solo el 6% del licopeno/toruleno. El extracto P105 prácticamente no incorpora ningún mevalonato a terpenoides. Al unir las fracciones S105 y P105 se recupera prácticamente la actividad presente en el S10 (Tabla 11).

Tabla 11. Síntesis de terpenoides en el extracto celular (S10) del mutante superproductor SG22, en las fracciones citosólica (S105) y de membranas (P105), y en la mezcla de éstas.

Fracción	Radiactividad (Bq)			
	S10	S105	P105	S105 +P105
Extracto en éter etílico	5792.5	3800.9	7.4	5637.1
Fitoeno	70.4	31.2	0.1	100.6
Fitoflueno	3.1	0.7	0.1	2.6
Beta-caroteno/zeta-caroteno /beta-zeacaroteno	18.6	2.0	0	13.6
Gamma-caroteno/neurosporeno	53.9	7.9	0.2	61.7
Toruleno/licopeno	297.7	17.2	0.2	269.0
Kaureno	14.5	4.2	0.4	2.1
kaurenol/farnesol	526.7	99.0	3.8	836.0
Acido kaurenoico/ geranilgeraniol	1935.8	2722.8	13.2	2521.3
Escualeno	298	68	15	391
Proteína (mg/incubación)	11,3	9,2	2,4	10,9

DISCUSION

Los resultados demuestran la producción de carotenos in vitro por extractos de G. fujikuroi a partir de mevalonato. Las condiciones no difieren mucho de las empleadas con P. blakesleeanus (Bramley y Davies, 1975) y permiten la síntesis de distintos terpenoides, como el kaureno y el escualeno, además de carotenos. La variabilidad obtenida en la radiactividad de las distintas fracciones, especialmente en la del kaureno, y el limitado número de repeticiones de los experimentos invitan a la prudencia en las conclusiones.

La capacidad de sintetizar lípidos a partir de mevalonato disminuye bruscamente al diluir los extractos celulares. La disminución observada es mucho mayor que la esperada por la dilución proporcional del contenido de enzimas. La causa puede ser una más lenta transferencia de sustrato entre las enzimas al alejarse físicamente unas de otras en un medio acuoso. Este efecto se nota claramente en la síntesis de licopeno y toruleno (cuyos precursores inmediatos son hidrocarburos hidrófobos) mientras la síntesis de fitoeno (cuyos precursores son casi todos hidrosolubles) es proporcional a la concentración de los extractos.

El fraccionamiento celular confirma la ubicación en membranas de las enzimas que sintetizan los carotenos coloreados. La disminución de la incorporación a fitoeno en la misma fracción sugiere una unión débil de la sintetasa del fitoeno a la membrana.

Los mutantes investigados difieren mucho en su actividad in vitro. La actividad carotenogénica de extractos de la estirpe superproductora SG22 es muy superior a la de extractos de la estirpe silvestre. De la misma manera, los extractos de SG78, (un mutante carB con fondo superproductor) produce mucho más fitoeno que los de SG43 (un mutante carB con fondo silvestre). Los extractos de mutantes superproductores tienen, probablemente, más enzimas carotenogénicas que los

extractos silvestres. La síntesis de carotenos coloreados en extractos de la estirpe silvestre es aproximadamente la de los extractos de SG22 diluidos cuatro veces; un contenido de enzimas carotenogénicas cuatro veces menor en los micelios silvestres explicaría la diferencia encontrada in vitro.

Ningún extracto sintetiza cantidades importantes de neurosporaxantina, aunque sí de toruleno. Este hecho es muy llamativo si se tiene en cuenta que la neurosporaxantina es el producto final de la carotenogénesis in vivo. La conversión del toruleno en neurosporaxantina puede necesitar condiciones o cofactores especiales. Ello no ha de extrañar si se tiene en cuenta que la rotura oxidativa del toruleno es muy diferente a las reacciones anteriores de la ruta.

En las condiciones empleadas se obtiene un rendimiento muy aceptable: la incorporación total a lípidos oscila entre un 40-80% de la radiactividad suministrada, no muy lejos del máximo teórico. La radiactividad de los carotenos se estabiliza en las primeras dos horas de incubación, excepto la de la fracción licopeno/toruleno, que sigue aumentando linealmente a las tres horas. Al no haberse ensayado incubaciones más largas se desconoce cuando y a que nivel de radiactividad se satura la síntesis de licopeno y toruleno. La elección de tres horas como tiempo de incubación para todos los mutantes tiene carácter arbitrario.

La actividad sintética in vitro de los extractos de micelio de distinta edad reflejan diferencias metabólicas in vivo. La síntesis de escualeno en extractos de micelios jóvenes se corresponde con la síntesis de membranas. Las gibberelinas son metabolitos secundarios que se sintetizan en la fase estacionaria de crecimiento; sus precursores son abundantemente producidos por los extractos de micelios maduros.

CAPITULO 6

DISCUSION GENERAL

En este capítulo se comparan los resultados obtenidos con Gibberella en esta tesis con los de otros organismos.

Mutagénesis

Las esporas uninucleadas y haploides de Gibberella le confieren una ventaja para el aislamiento de mutaciones recesivas. No todos los organismos usados en los laboratorios tienen esa ventaja; entre los hongos filamentosos, las esporas multinucleadas de Phycomyces dificultan considerablemente el aislamiento de mutantes recesivos (Roncero et al., 1984). Muchas estirpes de Gibberella forman macroconidios multicelulares y presentarían, por lo tanto, dificultades similares.

Las frecuencias de mutación que se describen en esta tesis están entre las más altas conocidas. Aunque las frecuencias de auxótrofos dependen en algún grado de criterios subjetivos, según se incluyan o no los mutantes rezumantes, las frecuencias de auxótrofos de cerca del 10% encontradas en esporas de Gibberella expuestas a nitrosoguanidina superan ampliamente las obtenidas en condiciones comparables con Phycomyces (menos del 0.1%, según experiencia de este laboratorio) o Saccharomyces (alrededor del 1%, Calderón y Cerdá-Olmedo, 1983).

Las esporas de Gibberella son más resistentes a los efectos letales de la nitrosoguanidina que las células de Saccharomyces (Calderón y Cerdá-Olmedo, 1983) y aproximadamente igual de resistentes que las esporas de Phycomyces (Roncero et al., 1984). Como estas últimas son uninucleadas, los núcleos de Gibberella deben ser más resistentes que los núcleos de Phycomyces.

La germinación hace más sensibles a las esporas de Gibbe-

rella a los efectos letales de la nitrosoguanidina. Lo mismo ocurre con las bacterias (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968) y levaduras (Calderón y Cerdá-Olmedo, 1983) en crecimiento activo y con las esporas de Phycomyces en germinación (Roncero et al., 1984).

La frecuencia de mutantes entre los supervivientes de Gibberella aumenta linealmente con la dosis, como en Phycomyces (Roncero et al., 1984). En Saccharomyces se alcanza un máximo cuando la supervivencia es del 20% (Calderón y Cerdá-Olmedo, 1983), debido a la coexistencia, junto a una mayoría de células sensibles, de una población relativamente resistente a los efectos letal y mutagénico del agente. En Escherichia, a los pocos minutos de tratamiento se alcanza una elevada frecuencia de mutantes que se mantiene aunque continúe la exposición (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968; Kasahara et al., 1971). Estas diferencias pueden reflejar mecanismos de mutación diferentes.

La nitrosoguanidina muta preferentemente los genes que se están replicando en el momento del tratamiento (Cerdá-Olmedo et al., 1968; Dawes y Carter, 1974; Calderón y Cerdá-Olmedo, 1982). En las bacterias esta preferencia conduce a la frecuente mutación simultánea de genes vecinos en los cromosomas (comutación, Guerola et al., 1971). En las levaduras no se observa esta comutación de genes próximos, pero sí una acción simultánea del mutágeno sobre puntos de distintos cromosomas que se replican a la vez (Burke y Fangman, 1975; Carter y Dawes, 1978; Calderón y Cerdá-Olmedo, 1982). No se ha investigado este punto en Gibberella, pero cabe suponer que las mutaciones dobles en genes vecinos sean infrecuentes, como lo son en los otros eucariontes inferiores.

Síntesis de carotenoides

Algunos mutantes de la carotenogénesis de Gibberella descritos en esta tesis son homólogos a mutantes aislados en

otros organismos, pero la relación no está clara en otros casos.

Los mutantes blancos que acumulan fitoeno son homólogos de los carB de Phycomyces (Meissner y Delbrück, 1968; Eslava y Cerdá-Olmedo, 1974; Aragón et al., 1976) y al-1 de Neurospora (Subden y Goldie, 1973), aunque el contenido de fitoeno en cada caso está determinado por el mecanismo de regulación que posean. En todos ellos se debe admitir la existencia de una deshidrogenasa responsable de las varias reacciones de desaturación del fitoeno. La inhibición de la deshidrogenasa por difenilamina en estos y otros organismos (Bindl et al., 1970; Clarke et al., 1983; Lee et al., 1975; Valadon y Mummery, 1966) sugiere un mecanismo enzimático común a todos ellos. Las mismas concentraciones de difenilamina tienen parejos efectos en todos estos organismos.

La beta-ionona inhibe la deshidrogenasa de algunos organismos, como Verticillium albo-atrum (Valadon y Mummery, 1966), pero no de otros, como Verticillium agaricinum (Valadon y Mummery, 1973) o Phycomyces blakesleeanus (Lee et al., 1975). Estas diferencias sugieren la existencia de variantes funcionales de la deshidrogenasa.

La alfa-picolina inhibe la ciclase de Gibberella de modo similar y a las mismas altas concentraciones necesarias para inhibir la de Phycomyces (Bejarano, comunicación personal). La inhibición da lugar a la acumulación de licopeno, pero no a un cambio notable de color del micelio. En Gibberella no se han encontrado mutantes afectados en la ciclase, como los carR de Phycomyces (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968), posiblemente porque no se distinguen visualmente del silvestre.

La inhibición de la carotenogénesis de Gibberella por alfa-picolina contrasta con la ausencia de efecto de la nicotina y el CFTA, inhibidores de la ciclase muy activos en Phycomyces. Ello sugiere diferencias entre las ciclasas de ambos organismos y mecanismos de acción diferentes de la alfa-picolina y los otros compuestos.

Los mutantes blancos de Gibberella carentes de fitoeno pueden ser homólogos a los mutantes al-2 y al-3 de Neurospora crassa, que carecen de carotenos y están presuntamente afectados en pasos anteriores al fitoeno (Kushawa et al., 1978), pero no se puede descartar que estén afectados en funciones reguladoras.

Los mutantes carT descritos en esta tesis solo pueden ser aislados en organismos que tengan al toruleno por sustrato intermedio de la carotenogénesis, como Fusarium, Neurospora o Verticillium, que sintetizan neurosporaxantina. En uno de ellos, Verticillium albo-atrum, se ha descrito un mutante con un alto contenido en toruleno (Valadon y Heale, 1965), presuntamente homólogo a los carT de Gibberella. Estos mutantes son una fuente de toruleno y constituyen el punto de partida para buscar mutantes que acumulen licopeno.

Carotenogénesis in vitro

Solo se ha investigado la carotenogénesis in vitro de cuatro hongos, además de Gibberella. Ninguno de ellos produce giberelinas y solo uno de ellos, Neurospora crassa, sintetiza neurosporaxantina. Los extractos de Gibberella sintetizan lípidos tan activamente como los de Phycomyces (De la Concha et al., 1983) y más que los de Neurospora (Mitzka-Schnabel y Rau, 1981).

La síntesis de carotenos es más activa en extractos de Neurospora y Phycomyces que en los de la estirpe silvestre de Gibberella y comparable a los de la estirpe superproductora SG22. Los extractos de Neurospora y Phycomyces sintetizan sobre todo fitoeno. Los de la estirpe superproductora SG22 de Gibberella sintetizan sobre todo toruleno y poca o ninguna neurosporaxantina, que es el producto final in vivo. La sustancial acumulación del intermediario anterior, el toruleno, demuestra la realización eficiente de dieciseis reacciones consecutivas (Figuras 2 y 4, capítulo 1), entre ellas deshi-

drogenaciones y ciclaciones poco activas en los extractos de Phycomyces y Neurospora. La biosíntesis adicional de gibberelinas en Gibberella da mayor relevancia a la activa síntesis de carotenos in vitro: el kaureno y otros compuestos de la ruta de las gibberelinas detraen gran parte del sustrato radiactivo.

Los extractos de las estirpes superproductoras de Phycomyces (Bramley y Davies, 1975) y Gibberella sintetizan más carotenos cuando se preparan con micelios jóvenes, en vez de maduros. Este hecho sería de esperar en Phycomyces, que mantiene relativamente constante su contenido de carotenos con el tiempo, pero no en Gibberella, que acumula continuamente carotenoides. La competencia entre las rutas de las gibberelinas y los carotenoides por los cofactores existentes en los extractos podría explicar la disminución observada de la carotenogénesis in vitro.

Los extractos de Gibberella son más estables que los de Phycomyces ya que aquellos continúan sintetizando toruleno a las tres horas, mientras éstos dejan de sintetizar carotenos a las dos horas (Bramley y Davies, 1975).

Regulación de la carotenogénesis

La carotenogénesis de Phycomyces está regulada por el producto final, el beta-caroteno (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976; Cerdá-Olmedo, 1985), como se pone de manifiesto al bloquear genética o químicamente la ruta. La escasez de producto final activa la ruta y da lugar a una enorme acumulación de caroteno intermediario. La carotenogénesis de Gibberella no está regulada por el producto final porque los mismos bloqueos inducen la acumulación de cantidades de carotenos intermediarios similares a las de neurosporaxantina en condiciones normales.

Los mutantes superproductores de neurosporaxantina de Gibberella no son idénticos a los mutantes carS de Phycomy-

ces, afectados en la regulación por producto final. La mutación en el gen carS produce un incremento de hasta cien veces en el contenido de beta-caroteno, pero aún persiste una forma de regulación, reflejada en la constancia aproximada del contenido en caroteno a lo largo del tiempo. Tal situación no ocurre en Gibberella: el contenido en carotenoides en las estirpes superproductoras aumenta constantemente en las primeras dos semanas de incubación.

La biosíntesis de carotenos en extractos de la estirpe superproductora de Gibberella es mucho mayor que la de extractos de la estirpe silvestre. Por el contrario, con Phycomyces, en las mismas condiciones, no se obtienen diferencias importantes de actividad entre extractos de la estirpe silvestre y mutantes carS (De la Concha et al., 1983). Todos estos resultados sugieren de nuevo la ausencia en Gibberella de un mecanismo de regulación similar al de Phycomyces.

Los mutantes blancos de Gibberella carentes de fitoeno no tienen homólogo en Phycomyces. Los más similares son los mutantes carA, que parecen estar afectados en una función implicada en la transferencia de sustrato (Torres-Martínez et al., 1980). Estos mutantes se diferencian de los de Gibberella en que siempre acumulan pequeñas cantidades de caroteno y, en presencia de retinol, cantidades muy importantes.

Los mutantes pálidos en la oscuridad de Gibberella parecen estar afectados en funciones regulatorias relacionadas con la fotoinducción. En otros organismos se han aislado mutantes con fenotipo similar, entre ellos Fusarium (Rau, comunicación personal) y Phycomyces (Bejarano, comunicación personal), pero ninguno de ellos se ha estudiado en detalle.

Ni el retinol ni otros fenoles que activan la carotenogénesis en Phycomyces y otros organismos afectan de modo sensible a Gibberella. Ello hace imposible el aislamiento de mutantes como los carI de Phycomyces, insensibles a la acción de dichos productos químicos

El para-hidroximercuribenzoato, que induce la síntesis de

neurosporaxantina en F. aquaeductuum (Rau, 1967b; Rau et al., 1967), carece de efecto en Gibberella, aunque ambos organismos son muy parecidos y tienen rutas biosintéticas de carotenoides equivalentes.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren profundas diferencias en la regulación de la carotenogénesis entre Gibberella y otros organismos.

APENDICE 1

MATERIAL Y METODOS

ESTIRPES

Las estirpes utilizadas en esta tesis se indican en la tabla 12. La estirpe silvestre de Fusarium aquaeductuum fué proporcionada por el Dr. W. Rau (Botanisches Institut der Universitat, Munich, República Federal de Alemania). Todas las demás estirpes son de Gibberella fujikuroi. La estirpe silvestre IMI58289 fué obtenida del Imperial Mycological Institute (Kew, Surrey, Inglaterra). La estirpe silvestre SG87 fué obtenida del Botanisches Institut der Universitat, Gottingen (República Federal de Alemania). Todas las restantes estirpes SG fueron obtenidas a partir de la estirpe IMI58289 por tratamientos con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, sulfonato etílmético o radiación ultravioleta. En la tabla 12 se menciona el tratamiento usado en el aislamiento de cada estirpe.

=====

Tabla 12. Mutantes empleados en esta tesis.

Estirpe	Genotipo	Fenotipo	Origen
SG1	<u>car-1</u>	naranja intenso	IMI58289 NG
SG2	<u>car-2</u>	blanco	IMI58289 NG
SG4	<u>car-3</u>	blanco	IMI58289 NG
SG19	<u>car-4</u>	naranja intenso	IMI58289 NG
SG20	<u>car-5</u>	naranja pálido	IMI58289 NG
SG22	<u>car-6</u>	naranja intenso	IMI58289 NG
SG36	<u>car-7</u>	naranja intenso	IMI58289 NG

SG37	<u>car-8</u>	naranja	IMI58289 NG
SG39	<u>car-9</u>	naranja intenso	IMI58289 NG
SG40	<u>car-10</u>	naranja pálido	IMI58289 NG
SG41	<u>car-11</u>	naranja pálido	IMI58289 NG
SG42	<u>carS6 car-12</u>	amarillo pálido	SG22 NG
SG43	<u>car-13</u>	blanco (F)	IMI58289 NG
SG45	<u>carS6 car-14</u>	naranja amarillento	SG22 NG
SG48	<u>car-15</u>	naranja pálido	IMI58289 EMS
SG49	<u>car-16</u>	naranja pálido	IMI58289 EMS
SG52	<u>car-17</u>	blanco	IMI58289 UV
SG53	<u>car-18</u>	blanco	IMI58289 UV
SG54	<u>car-19</u>	blanco	IMI58289 UV
SG60	<u>car-20</u>	naranja pálido	IMI58289 NG
SG68	<u>carS6 carT21</u>	rojo	SG22 NG
SG69	<u>car-22</u>	naranja pálido	IMI58289 NG
SG70	<u>carS6 car-23</u>	naranja amarillento	SG22 NG
SG71	<u>carS6 car-24</u>	naranja	SG22 NG
SG72	<u>carS6 car-25</u>	naranja pálido	SG22 NG
SG73	<u>carS6 car-26</u>	naranja intenso	SG22 NG
SG74	<u>carS6 car-27</u>	blanco (F)	SG22 NG
SG75	<u>carS6 car-28</u>	blanco	SG22 NG
SG76	<u>carS6 car-29</u>	blanco	SG22 NG
SG77	<u>carS6 car-30</u>	blanco (F)	SG22 NG
SG78	<u>carS6 carB31</u>	blanco (F)	SG22 NG
SG79	<u>carS6 car-32</u>	blanco (F)	SG22 NG
SG82	<u>carS6 car-33</u>	rojo	SG22 NG
SG93	<u>carS6 car-34</u>	naranja amarillento	SG22 NG

Los mutágenos estan abreviados: EMS, sulfonato etilmetílico; NG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina; UV, radiación ultravioleta. Los genotipos y los fenotipos están descritos en el capítulo 2. Los mutantes blancos que acumulan fitoeno están indicados con (F). Los mutantes pálidos en la oscuridad aparecen como naranja pálido.

=====



MÉTODOS DE CULTIVO

Medios de crecimiento

El medio mínimo contiene por litro: glucosa, 30 g; NO_3Na , 3 g; PO_4KH_2 , 1 g; $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; ClK , 0.5 g; BO_4H , 10 μg ; SO_4Cu , 100 μg ; Cl_3Fe , 200 μg ; Cl_2Mn , 20 μg ; MoO_4Na , 20 μg ; y SO_4Zn , 2 mg.

El medio nutritivo contiene por litro: glucosa, 30 g; peptona, 8 g; extracto de levadura, 4 g; NO_3Na , 3 g; PO_4KH_2 , 1 g; $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g y ClK , 0.5 g.

En algunos casos se usó una variante de este medio llamada "medio de germinación", que contiene 1 g de extracto de levadura y no contiene peptona.

Para la obtención de conidios se diseñó un medio de esporulación que contiene por litro: glucosa, 1 g; extracto de levadura, 1 g; NO_3NH_4 , 1 g; PO_4KH_2 , 1 g; y $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g.

Para producción de giberelinas se empleó el medio 10%ICI (Geissman et al., 1966).

Para solidificar los medios se empleó 16 g l^{-1} de agar Analema (Vorquímica, Vigo).

En los casos de adición de compuestos químicos, estos fueron añadidos al medio inmediatamente antes de vertirlo en cajas de Petri. El retinol, la alfa-ionona y la beta-ionona se disolvieron en etanol y emulsionaron con monooleato de polioxietilensorbitano ("Tween 80"), que se encontraban en el medio a unas concentraciones finales de 8 ml l^{-1} de etanol y 4 ml l^{-1} de Tween 80. La difenilamina, el veratrol, el ftalato de dimetilo y el alcohol cinámico se disolvieron en etanol, que alcanzaba en el medio una concentración final de 20 ml l^{-1} . Los demás compuestos químicos se añadieron al medio disueltos en agua.

Inoculación

Se han utilizado cuatro formas diferentes de inoculación. Para las mediciones de carotenos y pesos secos se sembraron en cada caja, en distribución hexagonal, siete fragmentos de micelio obtenido al incubar conidios durante dos días en cajas con medio de germinación.

Para contar colonias se inocularon las cajas con suspensiones de conidios recién cosechados.

Para buscar auxótrofos se sembraron las cajas mediante réplica por palillo. Este método, similar al empleado con levaduras y bacterias, consiste en pinchar micelio con un palillo estéril y pinchar después en las cajas a sembrar.

Los matraces para análisis de producción de giberelinas y obtención de micelio para extractos celulares se inocularon con 1 ml de una suspensión de fragmentos de micelio esporulado. Para obtener las suspensiones se inocularon frascos de unos 8 ml de volumen con 3 ml de agar de esporulación inclinado con fragmentos de micelio y se incubaron a 30°C a la luz; a los cinco días se les añadió 3 ml de agua estéril y se agitaron violentamente.

Condiciones de cultivo

Los cultivos en agar se incubaron a 23°C o a 30°C. Como fuente de iluminación se usó una batería de cinco fluorescentes que daban una intensidad luminosa de unos 0.5 W m⁻². Los cultivos destinados a recoger microconidios se incubaron a 30°C a la luz.

Los cultivos para obtener micelio para la preparación de extractos celulares se incubaron en matraces Erlenmayer de dos litros, con 500 ml de medio mínimo líquido, en un agitador orbital a 25°C.

Los cultivos para análisis de giberelinas se incubaron en matraces Erlenmayer de 500 ml, con 250 ml de medio 10%ICI, en un agitador orbital en oscuridad a 30°C.

Obtención de microconidios

Se lavó la superficie de cultivos en medio de esporulación, incubados una semana a 23°C a la luz, con 10-15 ml de agua estéril. Los microconidios se limpiaron de fragmentos del micelio por filtración y se lavaron dos veces por centrifugación en agua estéril. Las suspensiones obtenidas se usaron inmediatamente o se resuspendieron en una solución acuosa de glicerol al 10% (V/V) y se guardaron a -20°C.

TINCION DE NUCLEOS

Los microconidios se suspendieron en una solución de mitramicina (Pfizer) a una concentración de 10 µg ml⁻¹ en dimetilsulfóxido (Sigma) al 50% y se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Biophot V. En dichas condiciones la mitramicina entra en la célula y tinte los núcleos, que emiten luz amarilla por fluorescencia.

TRATAMIENTOS MUTAGENICOS

Mutagénesis con nitrosoguanidina

Se usaron soluciones congeladas de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Sigma) de 1 mg ml⁻¹. Las soluciones restantes no se volvieron a congelar. Las soluciones del mutágeno se conservan en la oscuridad y se evita la luz intensa en su manipulación.

Se incubaron en caldo nutritivo a 30°C durante dos horas (si no se dice otra cosa) suspensiones de unos 10⁶ conidios recién recogidos por ml, se lavaron y se expusieron en tampón citrato-fosfato pH 7.5 (Gomori, 1955) a distintas dosis de nitrosoguanidina. Definimos la dosis como el producto de la concentración molar del mutágeno por el tiempo de exposición en segundos, de tal modo que cualquier dosis puede obtenerse

con distintas combinaciones de concentración y tiempo. En los tratamientos sin incubación previa en caldo nutritivo la exposición al mutágeno se hizo en solución acuosa no tamponada, a fin de evitar el efecto germinador del tampón.

Los tratamientos se hicieron a temperatura ambiente, se detuvieron por dilución y los conidios se lavaron dos veces con agua destilada.

Mutagénesis con sulfonato etilmetílico

En una adaptación del procedimiento de Prakash y Sherman (1973), los microconidios se suspendieron en una solución al 3% (V/V) de sulfonato etilmetílico en tampón fosfato durante 0.5 a 2 horas a temperatura ambiente. Los tratamientos se interrumpieron por dilución y lavado con agua destilada.

Tanto en los tratamientos con sulfonato etilmetílico como en los de nitrosoguanidina se adoptaron las medidas de seguridad propuestas por Ehremberg y Wachtmeister (1977).

Mutagénesis con radiación ultravioleta

Se inocularon cajas de agar nutritivo con microconidios recién recogidos y se expusieron destapadas a 0.35 W m^{-2} de radiación ultravioleta a 49 cm de una lámpara Sylvania G15T8 y se incubaron en oscuridad a 30°C . Para inducir la fotorreactivación los conidios recién irradiados se incubaron cinco horas a 30°C a la luz (unos 1.25 W m^{-2}) y luego se incubaron en la oscuridad.

Identificación de auxótrofos

Se consideraron auxótrofos los clones que, tras tres subcultivos sucesivos, dan colonias en medio mínimo cuyo diámetro es menor de 1/4 del de las colonias en medio nutritivo. Se identificaron los requerimientos nutritivos de los auxótrofos por el método de Holliday (1956).

ANALISIS QUIMICO DE CAROTENOIDES

Extracción

Los micelios se separaron del medio de cultivo, se congelaron a -20°C y se liofilizaron. Se trituraron muestras de unos 0.1 g en frío en un mortero con arena lavada al ácido. El polvo resultante se extrajo con acetona varias veces hasta que la acetona y los restos celulares perdieron totalmente el color. La acetona recogida se centrifugó a 2.000 g y el sobrenadante se evaporó en un rotoevaporador (Buchler) conectado a una bomba de vacío (Millipore). Las muestras evaporadas se guardaron a -20°C en atmósfera de nitrógeno.

Separación cromatográfica y cuantificación

Los análisis rutinarios se hicieron en columnas de cromatografía de 2 cm de diámetro interior con una capa de 1 cm (3 g aprox.) de óxido de aluminio (Merck, grado II-III) desactivada al 3%. Las muestras se resuspendieron en un pequeño volumen de éter de petróleo (punto de ebullición $40-60^{\circ}\text{C}$) y se añadieron a las columnas. La adición de 12 ml de éter de petróleo eluyó el fitoeno. La adición posterior de 10 ml de acetona eluyó los carotenos intermediarios y esteroides. La adición final de 16 ml de una solución etanólica de sosa (50 g de NaOH y 50 ml de agua en el volumen de etanol 96% (V/V) necesario para completar un litro) eluyó la neurosporaxantina. A esta última fracción se le añadió 5 ml de éter de petróleo y, lentamente, 8 ml de $\text{ClH } 2\text{N}$ y se lavó con éter de petróleo hasta que desapareció el color.

Las concentraciones de carotenos intermediarios se determinaron tras su separación cromatográfica o se estimaron a partir del espectro de absorción de su mezcla. En el primer caso se utilizaron columnas de 10 cm de óxido de aluminio, eluidas con concentraciones crecientes de éter etílico en

éter de petróleo (punto de ebullición, 50-70°C).

El "análisis de multicomponentes" (Jochum y Schrott, 1984) es una estimación matemática de la proporción de varios compuestos en una mezcla, dados los espectros de absorción de los compuestos puros y de la mezcla. En nuestro caso se supuso la presencia de zeta-caroteno, neurosporeno, beta-zeacaroteno, licopeno, gamma-caroteno, cis-toruleno y trans-toruleno. Los espectros se extienden de 390 a 540 nm. El procedimiento de ajuste estima la suma de los errores, que osciló entre un 3 y un 7%. El método no permite asegurar la presencia real de componentes muy minoritarios.

Para identificar los carotenos se compararon sus espectros de absorción y su comportamiento cromatográfico con los ya publicados (Davies, 1976). La neurosporaxantina y el toruleno se compararon además con muestras purificadas proporcionadas por Hoffman-La Roche.

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro Bausch & Lomb, modelo Spectronic 2000. Las concentraciones se determinaron por su coeficiente de extinción en hexano, $E = 91.5$ (1 mg l^{-1} , 1 cm) para el fitoeno a 284 nm y $E = 171.5$ para la neurosporaxantina a 475 nm. Para estimar la concentración global de carotenos intermediarios se les atribuyó un coeficiente de extinción máximo de $E = 250$.

ANALISIS DE GIBERELINAS

Los medios de cultivo se separaron del micelio por filtración o centrifugación. A 0.2 ml del filtrado o sobrenadante de cada cultivo se le añadió 0.2 ml de etanol 96% y 2 ml de una mezcla fría de etanol 96% y ácido sulfúrico 1:1. Las mezclas se agitaron concienzudamente y se incubaron 30 minutos a 48°C. En las condiciones descritas las giberelinas reaccionan con el ácido sulfúrico y producen un derivado fluorescente.

Las concentraciones de giberelinas se calcularon por com-

paración con la fluorescencia mostrada en las mismas condiciones por medio fresco con concentraciones conocidas de ácido giberélico (Sigma) disuelto en los 0.2 ml de etanol 96% que se añaden a la mezcla. Se midió la emisión a 464 nm de muestras excitadas a 406 nm en un fluorímetro Perkin-Elmer, modelo LS-5.

Las concentraciones de glucosa en el filtrado se determinaron con un analizador de glucosa YSI modelo 27.

ENSAYOS ENZIMATICOS

Preparación del extracto celular

Los micelios se separaron del medio de cultivo por filtración, se lavaron con agua destilada, se congelaron a -20°C , se liofilizaron y se guardaron a -80°C herméticamente cerrados hasta el momento de su uso.

Los micelios liofilizados se pasaron por un cedazo de latón (Endecotts Ltd., tipo BS140, 355 μm de poro). Se suspendieron lo mejor posible 0.5 g de muestra pulverizada en 4 ml de una solución de ditiotreitól 5 mM en tampón Tris-ClH (N-tris hidroximetil-amino-metano) 0.4 M pH 8 (Gomori, 1955), y se centrifugaron a 10.000 g durante 25 minutos a 4°C . Los sobrenadantes (llamados S10) se utilizaron inmediatamente para las incubaciones a fin de evitar pérdidas de actividad. En algún caso, el sobrenadante S10 se volvió a centrifugar a 105.000 g durante 90 minutos; mientras que el nuevo sobrenadante (S105) se usó directamente, al precipitado (P105) se le añadió la mitad del volumen inicial de tampón y se removió en frío con una varilla hasta desaparecer los grumos; en paralelo se centrifugó otro S10, pero el sobrenadante y el precipitado no se separaron, sino que se homogeneizaron de la misma manera.

El contenido de proteína de los extractos se calculó por el método de Lowry et al. (1951), usando albúmina de suero bovino como patrón.

Precursor radiactivo

La lactona del ácido L(2-C¹⁴)-mevalónico (1.85 MBq ml⁻¹; 1.90 GBq mmol⁻¹), obtenida de Amersham International plc. (Amersham, Inglaterra), se desecó bajo corriente de nitrógeno y se resuspendió en una solución NaOH 25 mM, para dar lugar a la correspondiente sal sódica.

Condiciones de incubación

Las incubaciones se hicieron en mezclas de 0.5 ml con los siguientes componentes: 0.05 ml de la solución sódica del ácido ¹⁴C-mevalónico, (que contiene 4868.4 picomoles, 9250 Bq); 0.24 ml de una solución que contiene ATP (5 nanomoles), NAD (0.5 nanomoles), NADP (0.5 nanomoles), FAD (0.5 nanomoles) y FK (5 micromoles); 0.01 ml de una solución que contiene Cl₂Mg·6H₂O (100 micromoles) y Cl₂Mn·4H₂O (150 micromoles) y 0.2 ml de extracto celular.

Los cofactores se disuelven en el mismo tampón con que se prepara el extracto.

Las incubaciones se llevaron a cabo en la oscuridad en un baño a 35°C con agitación aproximada de un vaivén por segundo. Las reacciones se detuvieron por adición de 2 ml de metanol.

Extracción de terpenoides radiactivos

A las mezclas incubadas se añadió 1 ml de una solución de "acarreadores", osea, terpenos no radiactivos (fitoeno, fitoflueno, beta-caroteno, gamma-caroteno, licopeno, toruleno, escualeno y, en menor cantidad, neurosporeno y zeta-caroteno), a una concentración aproximada de 100 µg ml⁻¹ cada uno excepto el neurosporeno y el zeta-caroteno. El escualeno se obtuvo de Sigma, el toruleno de la estirpe SG68 de G. fujikuroi, descrita en esta tesis, y los demás carotenos de distin-



tas cepas de P. blakesleeanus.

Las soluciones resultantes se añadieron a 50 ml de agua saturada con ClNa y se extrajeron tres veces con éter etílico. Las fracciones de éter se deshidrataron con un exceso de SO_4Na_2 anhidro durante una hora, se decantaron y se desecaron en un evaporador rotatorio. Para determinar la radiactividad total las fracciones se resuspendieron en cinco ml de éter etílico y se tomaron alícuotas de 0.1 ml. El resto se usó para separar las fracciones de los carotenos, el escualeno y los precursores de las giberelinas.

Separación de las fracciones radiactivas

Las muestras se cromatografiaron en columnas de 0.8 cm de diámetro interior con 0.5 cm de óxido de aluminio grado I (Woelm Pharma) desactivada al 3%. Un primer lavado con acetona eluyó los carotenos neutros, el escualeno, los alcoholes y los precursores de las giberelinas. Un segundo lavado con 3 ml de una solución etanólica de sosa (descrita anteriormente) eluyó la fracción de la neurosporaxantina; a ésta se le añadió 1.5 ml de ClH 0.2 N y se extrajo tres veces con 2 ml de éter de petróleo 40-60°.

La fracción de carotenos neutros se cromatografió en capa fina de gel de sílice (Merck) en éter de petróleo 60-80°. Se separaron tres fracciones: el kaureno (R_f aproximado: 0.75, detectado en cámara de centelleo), el escualeno (R_f aproximado: 0.6, detectado con vapores de yodo) y los carotenos neutros, que forman una ancha banda (R_f desde 0.50 hasta 0.15 aproximadamente). Los precursores de giberelinas y los alcoholes permanecieron en el origen. Estas dos últimas fracciones se separaron de la capa fina y se resuspendieron en éter etílico.

Los carotenos neutros se cromatografiaron en capa fina de óxido de aluminio (Merck) en 3% de tolueno en éter de petróleo 60-80°. En dichas condiciones se separaron el fitoeno (R_f

0.65-0.75, detectado bajo luz ultravioleta), el fitoflueno (Rf 0.52-0.60, detectado bajo luz negra), el beta-caroteno y el beta-zeacaroteno (Rf 0.30-0.50), el gamma-caroteno y el neurosporeno (Rf 0.18-0.26) y el toruleno y el licopeno (Rf 0.03-0.18). Las fracciones de los carotenos se identificaron por el color y por el comportamiento de muestras conocidas sometidas a las mismas manipulaciones. En algunos casos el fitoeno se separó y recromatografió en capa fina de gel de sílice en éter de petróleo 60-80°.

Las fracciones de los precursores de giberelinas y los alcoholes se cromatografiaron en capa fina de gel de sílice en 10% de acetato de etilo en tolueno. La observaciones en cámara de centelleo permitieron observar casi siempre cuatro bandas radiactivas: tres con Rf 0.43-0.52, 0.32-0.42, 0.20-0.27 y una cuarta en el origen. La primera banda contiene kaurenal, copalol y otros dos compuestos no identificados, la segunda kaurenol y farnesol, la tercera ácido kaurenico y geranilgeraniol, y la del origen, geraniol (Bramley, comunicación personal).

Medición de radiactividad

Las fracciones desecadas se disolvieron en 10 ml de tolueno con 5 g l⁻¹ de 2-5-difeniloxazol (PSPARK Scientific limited, scintillation grade) y se midió su radiactividad en un contador de centelleo Beckman LS7500. La radiactividad de fondo fué aproximadamente 1 Bq.

APENDICE 2

BIBLIOGRAFIA

- Aragón, C.M.G., Murillo, F.J., De la Guardia, M.D. y Cerdá-Olmedo, E. (1976) *Eur. J. Biochem.* 63:71-75.
- Arnold, W.N. y Johnson, B.P. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* 43:311-318.
- Austin, D.J., Bu'Lock, J.D. y Drake, D. (1970) *Experientia* 26:348-349.
- Bearder, J.R., MacMillan, J. y Phinney, B.O. (1973) *Phytochemistry* 12:2655-2659.
- Bearder, J.R., MacMillan, J. y Phinney, B.O. (1975) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 721-726.
- Bearder, J.R., MacMillan, J., Wells, C.M., Chaffey M.B. y Phinney B.O. (1974) *Phytochemistry* 13:911-917.
- Bergman, K., Eslava, A.P. y Cerdá-Olmedo, E. (1973) *Mol. Gen. Genet.* 123:1-16.
- Bindl, E., Lang, W. y Rau, W. (1970) *Planta* 94:156-174.
- Bobowsky, G. C., Barker, W.G. y Subden, R. E. (1977) *Can. J. Bot.* 55:2137-2141.
- Booth, C., "The Genus *Fusarium*" (1971) Publications of the Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, Eastern Press Limited, England.
- Bramley, P.M. (1985) *Adv. Lipid Res.* 21:243-279.
- Bramley, P.M., Clarke, I.E., Sandmann, G. y Boger, P. (1984) *Z. Naturforsch.* 39c:460-463.
- Bramley, P.M. y Davies, B.H. (1975) *Phytochemistry* 14:463-469.
- Bramley, P.M. y Taylor, R.F. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 839:155-160.
- Bramley, P.M., Than, A. y Davies, B.H. (1977) *Phytochemistry* 16:235-238.
- Bu'Lock, J.D., Jones, B.E. y Winskill, N. (1976) *Pure Appl. Chem.* 47:191-202.
- Burke, W., y Fangman, W.L. (1975) *Cell* 5:263-269.

- Calderón, I.L. y Cerdá-Olmedo, E. (1982) *Curr. Genet.* 6: 237-243.
- Calderón, I.L. y Cerdá-Olmedo, E. (1983) *Mutat. Res.* 108: 133-146.
- Carter, B.L.A. y Dawes, I.W. (1978) *Mutat. Res.* 51:289-292.
- Cerdá-Olmedo, E. (1985) *Methods in Enzymol.* 110:221-243.
- Cerdá-Olmedo, E. (1986) en "Bioquímica y Biología Molecular", dir. Ochoa, S. y otros, Salvat Editores, Barcelona, p. 259-263.
- Cerdá-Olmedo, E. y Hanawalt, P.C. (1968) *Mol. Gen. Genet.* 101:191-202.
- Cerdá-Olmedo, E., Hanawalt, P.C. y Guerola, N. (1968) *J. Mol. Biol.* 33:705-719.
- Cerdá-Olmedo, E. y Hüttermann, A. (1986) *Angew. Bot.* 60:59-70.
- Cerdá-Olmedo, E. y Ruiz-Vázquez, R. (1979) En "Genetics of Industrial Microorganisms", O.K. Sebek y A.I. Laskin, Eds., Amer. Soc. Microbiol, Washington, p. 15-20.
- Clarke, I.E., De la Concha, A., Murillo, F.J., Sandmann, G., Skone, E.J. y Bramley, P.M. (1983) *Phytochemistry* 22:435-439.
- Coggins, C.W., Henning, G.L. y Yoyoyama, H. (1970) *Science* 168:1589-1590.
- Coulondre, C. y Miller, S.H. (1977) *J.Mol. Biol.* 117:577-606.
- Curtis, P.J. y Cross, B.E. (1954) *Chem. & Ind.* p.1066.
- Davies, B.H. (1973) *Pure Appl. Chem.* 35:1-28.
- Davies, B.H. (1976) en "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments"; Goodwin, T.W. ed. Academic Press. London. p. 38-165.
- Dawes, I.W. y Carter, L.A. (1974) *Nature (London)* 250:709-712.
- Day, A.W. y Day, L.L. (1970) *Can. J. Genet. Cytol.* 12:891-904.
- DeFabo, E.C., Harding, R.W. y Shropshire, W. (1976) *Plant. Physiol.* 57:440-445.
- De la Concha, A., Murillo, F.J., Skone, E.J. y Bramley, P.M. (1983) *Phytochemistry* 22:441-445.

- De la Guardia, M.D., Aragón, C.M.G., Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68:2012-2015.
- Ehremberg, L. y Wachtmeister, C.A. (1977) "Handbook of mutagenicity test procedures", Kilbey, B.J., Legator, M.S., Nichols, W. y Ramel, C. (ed.), Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, p401-410.
- Erokhina, L.I. (1969) *Genetika* 5:143-147.
- Erokhina, L.I. y Efremov, B.D. (1970) *Genetika* 6:170-172.
- Eslava, A.P., Alvarez, M.I. y Cerdá-Olmedo, E. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48:617-623.
- Eslava, A.P. y Cerdá-Olmedo, E. (1974) *Plant. Sci. lett.* 2: 9-14.
- Feofilova, E.P. y Bekhtereva, M.N. (1976) *Microbiologiya* 45: 557-558.
- Feofilova, E.P., Bekhtereva, M.N. y Kozlova, Y.I. (1970) *Microbiologiya* 39:389-395.
- Garber, E.D., Baird, M.L. y Chapman, D.J. (1975) *Bot. Gaz. Chicago* 136:341-346.
- Garber, E.D., Ruddat, M. y Merza, A.P. (1980) *Bot. Gaz. Chicago* 141:210-212.
- Geissman, T.A., Verbiscar, A.J., Phinney, B.O. y Cragg, G. (1966) *Phytochemistry* 5:933-947.
- Gichner, T. y Veleminsky, J. (1982) *Mutat. Res.* 99:129-242.
- Goldie, A.H. y Subden, R.E. (1973) *Biochem. Genet.* 10:275-284.
- Gomori, G. (1955) *Methods enzymol.* 1:138-146.
- Goodwin, T.W. (1980) "The Biochemistry of the carotenoids" *Plants, Vol 1*, Chapman and Hall, London.
- Graebe, J.E., Dennis, D.T., Upper, C.D. y West, C.A. (1965) *J. Biol. Chem.* 240:1847-1854.
- Guerola, N., Ingraham, J.L. y Cerdá-Olmedo, E. (1971) *Nature (London) New Biol.* 230:122-125.
- Hedden, P., MacMillan, J. y Phinney, B.O. (1974) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 587-592.
- Hedden, P., MacMillan, J. y Phinney, B.O. (1978) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29:149-192.

- Heisenberg, M. y Cerdá-Olmedo, E. (1968) *Mol. Gen. Genet.* 102:187-195.
- Herber, R., Maudinas, B. y Villovtreix, J. (1972) *Phytochemistry* 11:3461-3464.
- Holliday, R. (1956) *Nature (London)* 178:987.
- Hsu, W.J., Poling, S.M. y Yokoyama, H. (1974) *Phytochemistry* 13:415-419.
- Hsu, W.J., Yokoyama, H. y Coggins, C.W. (1972) *Phytochemistry* 11:2985-2990.
- Isler, O. (1971) "Carotenoids", Birkhauser, Basel.
- Jefferys, E.G. (1973) *Adv. Appl. Microbiol.* 13:283-315.
- Jochum, P. y Schrott, E.L. (1984) *Anal. Chim. Acta* 157:211-226.
- Kasahara, H., Udaka, S. e Ikeda, Y. (1971) *Agr. Biol. Chem.* 35:226-232.
- Kreuz, K., Beyer, P. y Kleinig, H. (1982) *Planta* 154:66-69.
- Kuhlman, E.G. (1983) *Mycologia* 74:759-768.
- Kurosawa, E. (1926) *Trans. Natl. Hist. Soc. Formosa* 16:213-227.
- Kushawa, S.C., Kates, M., Renaud, R.L. y Subden, R.E. (1978) *Lipids* 13:352-355.
- Lang, A. (1970) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21:537-570.
- Lee, T.C., Rodríguez, D.B., Karasawa, I., Lee, T.H., Simpson, K.L. y Chichester, C.O. (1975) *Appl. Microbiol.* 30:988-993.
- López-Díaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. (1980) *Planta* 150:134-139.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.A., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Mackinney, G., Nakayama, T., Buss, C.D. y Chichester, C.O. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* 74:3456-3457.
- Meissner, G. y Delbrück, M. (1968) *Plant. Physiol.* 43:1279-1283.
- Ming, Y.N., Lin, P.C. y Yu, T.F. (1966) *Scientia Sinica* 15:371-378.

- Mitzka-Schnabel, U. y Rau, W. (1981) *Phytochemistry* 20:63-69.
- Murillo, F.J. (1980) *Plant. Sci. lett.* 17:201-205.
- Murillo, F.J. y Cerdá-Olmedo, E. (1976) *Mol. Gen. Genet.* 148:19-24.
- Murillo, F.J., Torres-Martínez, S., Aragón, C.M.G. y Cerdá-Olmedo, E. (1981) *Eur. J. Biochem.* 119:511-516.
- Neale, S. (1976) *Mutat. Res.* 32:229-260.
- Neujahr, H.Y. y Bjork, L. (1970) *Acta Chem. Scand.* 24:2361-2365.
- Ninet, L., Renaut, J. y Tissier, R. (1969) *Biotechnol. Bioeng.* 11:1195-1210.
- Parn, P. y Seviour, R.J. (1974) *J. Gen. Microbiol.* 85:228-236.
- Patterson, S.J., Butler, K.W., Huang, P., Labelle, J., Smith, I.C.P. y Schneider, H. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 266:597-602.
- Phinney, B.O. y Spector, C. (1967) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 144:204-210.
- Porter, J.W. y Lincoln, R.E. (1950) *Arch. Biochem. Biophys.* 27:390-403.
- Poulter, R.T.M. y Rikkerink, E.H.A. (1983) *J. Bacteriol.* 156:1066-1077.
- Prakash, L. y Sherman, F. (1973) *J. Mol. Biol.* 79:65-82.
- Puhalla, J. E. y Spieth, P.T. (1983) *Exp. Mycol.* 7:328-335.
- Puhalla, J. E. y Spieth, P.T. (1985) *Exp. Mycol.* 9:39-47.
- Radley, M. (1956) *Nature (London)* 178:1070-1071.
- Rau, W. (1967a) *Planta* 72:14-28.
- Rau, W. (1967b) *Planta* 74:263-277.
- Rau, W. (1985) *Pure Appl. Chem.* 57:777-784.
- Rau, W., Feuser, B. y Rau-Hund, A. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 136:589-590.
- Riley, G.J.P. y Bramley, P.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 450:429-440.

- Riley, G.J.P. y Bramley, P.M. (1982) *Cytobios* 34:97-104.
- Roncero, M.I.G., Zabala, C. y Cerdá-Olmedo, E. (1984) *Mutation Res.* 125:195-204.
- Sidhu, G.S. (1983a) *Can. J. Genet. Cytol.* 25:93-96.
- Sidhu, G.S. (1983b) *Can. J. Bot.* 61:3314-3319.
- Sidhu, G.S. (1983c) *Can. J. Genet. Cytol.* 25:605-608.
- Sidhu, G.S. (1984) *J. Hered.* 75:237-238.
- Silver, J.M. y Eaton, N.R. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34:301-305.
- Simpson, K.L., Nakayama, T.O.M. y Chichester, C.O. (1964) *J. Bacteriol.* 88:1688-1694.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1969) "Biometry", Freeman, W.H. Publications, San Francisco.
- Sokolova, E.V. (1969) *Genetika* 5:100-108.
- Spector, C. y Phinney, B.O. (1966) *Science* 153:1397-1398.
- Spector, C. y Phinney, B.O. (1968) *Physiol. Plant.* 21:127-136.
- Spurgeon, S. L., Turner, R. V. y Harding, R. W. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 195:23-29.
- Stodola, F.H., Raper, K.B., Fennell, D.I., Conway, H.F., Sohns, V.E., Langford, C.T. y Jackson, R.W. (1955) *Arch. Biochem. Biophys.* 54:240-245.
- Subden, R.E. y Goldie, A.H. (1973) *Genetica* 44:615-620.
- Theimer, R.R. y Rau, W. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 177:180-181.
- Thomas, S.A., Harris, R.C., Kirk, J.T.O. y Goodwin, T.W. (1967) *Phytochemistry* 6:361-366.
- Torres-Martínez, S., Murillo, F.J., y Cerdá-Olmedo, E. (1980) *Genet. Res.* 36:299-309.
- Valadon, L.R.G. y Heale, J.B. (1965) *J. Gen. Microbiol.* 41:341-348.
- Valadon, L.R.G. y Mummery, R.S. (1966) *J. Gen. Microbiol.* 45:531-540.

- Valadon, L.R.G. y Mummery, R.S. (1973) *Microbios* 7:173-180.
- Valadon, L.R.G. y Mummery, R.S. (1974) *Microbios* 10A:97-104.
- Valadon, L.R.G. y Mummery, R.S. (1979) *Microbios lett.* 6:129-135.
- West, C.A. y Phinney, B.O. (1956) *Plant Physiol.* 31(Suppl.) XX.
- Whitaker, B.D. y Shropshire, W. (1981) *Exp. Mycol.* 5:243-252.
- Yabuta, T. y Hayashi, T. (1939) *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 15: 257-266.
- Yabuta, T. y Sumiki, Y. (1938) *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 14: 1526.
- Yokoyama, H., Nakayama, T.O.M. y Chichester, C.O. (1962) *J. Biol. Chem.* 237:681-686.
- Yourno, J., Barr, D. y Tanemura, S. (1969) *J. Bacteriol.* 100: 453-459.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que, directa o indirectamente, contribuyeron a que esta tesis saliera adelante. A todos ellos expreso desde aquí mi más sincero agradecimiento:

A Enrique Cerdá Olmedo, por la confianza que ha depositado en mi durante la tesis, por las innumerables horas dedicadas, por sus correcciones inmisericordes.

A Fernando Parra, que entre muchas otras cosas me enseñó a machacar micelio en un mortero. Su carácter feliz y entusiasta alegró los primeros meses de esta tesis; su filosofía aún impregna las paredes de la 115.

A Dudu, Curro, Jose y Miguel; por volver a estar con ellos empezaría de nuevo.

A Aurora, por su paciencia.

A los demás hifólogos de la 115, Amador, Govind, y Reyes. A los compañeros: Juan, Andrés, Paco C., Paco L., Paco R., Edu, Choni, Felix, Norman, Danko, Bea, Corro, Cayo, Enca y Rafi. A Asun, Pepe C., Maribel, Loli, Yebra. A los altos cargos, J. Ramón, Tahía, María, Isa, y Pepep, que dirigió los experimentos con nitrosguanidina.

A D. Nelki y J. Digby, que hicieron posible los experimentos in vitro. A P. Bramley y al Prof. W. Rau, que me aceptaron como visitantes en sus laboratorios, y al Dr. Schrott, que me introdujo al análisis de multicomponentes y me facilitó los espectros de referencia.

También expreso mi agradecimiento a Pfizer Co., por la muestra de mitramicina, a Hoffman-La Roche por las muestras purificadas de carotenos, y al departamento de bioquímica de la Facultad de Biología de Sevilla, por la paciencia y por el fluorímetro, que hizo posible los análisis de giberelinas.

A todos, gracias.