

R. 15403

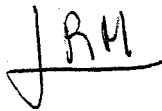
T 1154

GENETICA DE LA DESHIDROGENASA DEL ALCOHOL DE PHYCOMYCES

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

Sevilla, Junio 1983

Director y ponente



Juan Ramón Medina Precioso

19437572

apenas parece un pe-  
queño rústico, y ya tiene 26/10/78  
queins de grandera, o acaso los gobiernos  
no cantan sin esperar, esperar esperar....?

I N D I C E S

## INDICE DE MATERIAS

RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	11
INTERES DEL TRABAJO.....	14
INTRODUCCION.....	16
SISTEMATICA DE <u>PHYCOMYCES</u> .....	17
CICLOS DE VIDA.....	17
Ciclo asexual.....	17
Ciclo sexual.....	19
GENETICA DE <u>PHYCOMYCES</u> .....	20
Generalidades.....	20
Segregación y complementación en heterocariontes.....	20
Mutagénesis en <u>Phycomyces</u> .....	22
Recombinación en <u>Phycomyces</u> .....	22
CAROTENOGENESIS EN <u>PHYCOMYCES</u> .....	23
Generalidades.....	23
Biosíntesis del $\beta$ -caroteno.....	23
Alteraciones genéticas de la carotenogénesis.....	25
Pleiotropía de las mutaciones <u>car</u> .....	26
FOTORRESPUESTAS DE <u>PHYCOMYCES</u> .....	27
Fototropismo y fotomecismo.....	27
Fotoforogénesis.....	28
Fotocarotenogénesis.....	28
Otras fotorrespuestas metabólicas.....	29
El fotosistema <u>mad</u> .....	32
Fotocarotenogénesis en los mutantes <u>mad</u> .....	33
Fotoforogénesis en los mutantes <u>mad</u> y <u>car</u> .....	33
Naturaleza del fotorreceptor <u>mad</u> .....	34
EFECTOS DEL RETINOL SOBRE <u>PHYCOMYCES</u> .....	35
Retinol y carotenogénesis.....	35
Retinol y forogénesis.....	36
LA DESHIDROGENACION DE LOS ALCOHOLES.....	36
Las deshidrogenasas de los alcoholes.....	36
La deshidrogenasa del alcohol de <u>Phycomyces</u> .....	39

GENETICA DE LAS DESHIDROGENASAS DE LOS ALCOHOLES.....	39
Generalidades.....	39
Estudios en la mosca del vinagre.....	41
Estudios en la levadura del pan.....	43
Estudios en el maíz.....	45
Estudios en bacterias.....	45
Resumen.....	46
MATERIALES Y METODOS.....	47
ESTIRPES.....	48
Homocariotes.....	48
Heterocariotes.....	52
METODOS DE CULTIVO.....	56
Medios de cultivo.....	56
Condiciones de cultivo.....	56
MUTAGENESIS.....	57
Inducción de mutaciones.....	57
Aislamiento de mutantes resistentes a alcohol alílico.....	57
LA DESHIDROGENASA DEL ALCOHOL.....	59
Medida espectrofotométrica de la actividad enzimática.....	59
Purificación parcial de la deshidrogenasa del alcohol.....	59
Actividad enzimática en presencia de etanol o dimetilsulfóxido.....	61
Metodos electroforéticos.....	64
Concentración de glucosa en el medio de cultivo.....	64
RESULTADOS Y DISCUSION.....	65
REGULACION POR LUZ DE LA DESHIDROGENASA DEL ALCOHOL.....	66
Generalidades.....	66
Fotorrepresión de la ADH en el tipo silvestre.....	66
Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C149.....	68
Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C68.....	72
Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C109.....	74
Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C21.....	76
Fotorrepresión de la ADH en la estirpe L72.....	78
Fotorrepresión de la ADH en la estirpe L51.....	80
Efecto directo de la luz sobre la ADH.....	82

CAROTENOGENESIS Y ADH.....	83
Actividad ADH de las estirpes C5, C9, C2 y C171.....	83
Actividad ADH de las estirpes S276 y S283.....	89
Difenilamina y actividad ADH.....	92
Retinol y actividad ADH.....	95
Resumen.....	95
ESTUDIOS ELECTROFORETICOS CON LA ADH.....	97
Electromorfos con actividad ADH.....	97
Bandas proteicas con movilidad similar a la ADH.....	101
GENETICA DE LA ADH DE <u>PHYCOMYCES</u> .....	103
Resistencia al alcohol alílico y a la acroleína...	103
Mutantes resistentes al alcohol alílico.....	106
Recesividad de las mutaciones <u>adh</u> .....	115
Complementación entre mutantes <u>adh</u> .....	118
BIBLIOGRAFIA.....	120
AGRADECIMIENTOS.....	132

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclos de vida de <u>Phycomyces blakesleeanus</u> .....	18
Figura 2. Ruta biosintética del $\beta$ -caroteno.....	24
Figura 3. Modelo de regulación de la carotenogénesis.....	30
Figura 4. Metabolismo del piruvato en luz y oscuridad en <u>Phycomyces</u> .....	31
Figura 5. Esquema de la transducción sensorial en <u>Phycomyces</u> ....	37
Figura 6. Esquema del método de aislamiento de mutantes <u>adh</u> .....	58
Figura 7. Actividad ADH antes y después de la purificación parcial con acetona en la estirpe C109.....	62
Figura 8. Actividad ADH antes y después de la purificación parcial con acetona en la estirpe C149.....	63
Figura 9. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe NRRL1555.....	67
Figura 10. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C149.....	71
Figura 11. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C68.....	73
Figura 12. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C109.....	75
Figura 13. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C21.....	77
Figura 14. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe L72.....	79
Figura 15. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe L51.....	81
Figura 16. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe NRRL1555.....	84
Figura 17. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe C5.....	85
Figura 18. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe C9.....	86
Figura 19. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe C2.....	87
Figura 20. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe C171..	88

Figura 21. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe S276..	90
Figura 22. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe S283..	91
Figura 23. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe NRRL1555 en presencia de difenilamina.....	94
Figura 24. Influencia del retinol en la actividad ADH de la estirpe S276.....	96
Figura 25. Distribución de electromorfos en diferentes estirpes del género <u>Phycomyces</u> .....	98
Figura 26. Intensidad de tinción del electromorfo con actividad ADH en la estirpe NRRL1555 bajo diferentes condiciones de cultivo.....	100
Figura 27. Intensidad de tinción del electromorfo con actividad ADH de las estirpes C9, NRRL1555 y C5.....	100
Figura 28. Distribución de bandas proteicas tras la electroforesis de extractos de la estirpe NRRL1555 bajo diferentes condiciones de cultivo.....	102
Figura 29. Distribución de bandas proteicas tras la electroforesis de extractos de las estirpes C9, NRRL1555 y C5.....	102
Figura 30. Supervivencia de las esporas de la estirpe C2 al alcohol alílico.....	104
Figura 31. Supervivencia de las esporas de la estirpe C2 a la acroleína.....	107



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Actividad de la deshidrogenasa del alcohol de <u>P.blakesleeanus</u> frente a diferentes sustratos.....	40
Tabla 2.	Estirpes silvestres de <u>Phycomyces</u> utilizadas en esta tesis.....	48
Tabla 3.	Mutantes de <u>Phycomyces blakesleeanus</u> utilizados en esta tesis aislados por otros autores.....	49
Tabla 4.	Mutantes de <u>Phycomyces blakesleeanus</u> aislados por nosotros.....	50
Tabla 5.	Heterocariontes de <u>Phycomyces</u> utilizados en esta tesis.....	52
Tabla 6.	Actividad ADH tras purificación parcial con acetona.....	60
Tabla 7.	Actividad específica ADH en la estirpe NRRL1555 cultivada con etanol o dimetilsulfóxido.....	61
Tabla 8.	Influencia directa de la luz sobre la actividad ADH.....	82
Tabla 9.	Efecto de la difenilamina o el retinol sobre la actividad ADH.....	93
Tabla 10.	Resistencia de las esporas de la estirpe S343 al alcohol alílico.....	105
Tabla 11.	Resistencia de los micelios de las estirpes C5 y C9 al alcohol alílico.....	106
Tabla 12.	Resistencia de las esporas de la estirpe C2 a la acroleína.....	108
Tabla 13.	Resistencia de los micelios de las estirpes C5 y C9 a la acroleína.....	109
Tabla 14.	Aislamiento de mutantes resistentes a alílico en la estirpe S343.....	110
Tabla 15.	Aislamiento de mutantes resistentes a alílico en la estirpe C2.....	111

Tabla 16.	Aislamiento de mutantes resistentes a alílico en la estirpe NRRL1555.....	111
Tabla 17.	Aislamiento de mutantes resistentes a alílico en la estirpe C9.....	112
Tabla 18.	Resistencia a alcohol alílico de las esporas de las estirpes S295, S296 y S300.....	113
Tabla 19.	Resistencia a alílico de los micelios de las estirpes S313, S317, S318 y S319.....	114
Tabla 20.	Recesividad de varias mutaciones <u>adh</u> .....	117

RESUMEN Y CONCLUSIONES

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. En esta tesis se describe una nueva fotorrespuesta de Phycomyces que, sin prejuzgar el mecanismo molecular subyacente, hemos denominado "fotorrepresión de la ADH": el perfil temporal de actividad ADH de los micelios de Phycomyces es diferente a la luz que a la oscuridad, siendo los valores a la luz sistemáticamente menores que los correspondientes a la oscuridad.
2. Ninguno de los genes mad estudiados está implicado en la nueva fotorrespuesta; puesto que los genes madA y madB están implicados en todas las demás fotorrespuestas conocidas de Phycomyces, la fotorrepresión de la ADH parece depender de un segundo fotosistema de Phycomyces.
3. El perfil temporal de actividades ADH a la luz de los micelios de la estirpe C149 (madD120 (-)) es anormal, presentando un pico de actividad entre el primer y tercer día de cultivo. Además, los valores de la actividad ADH de esta estirpe son mayores, tanto a la luz como a la oscuridad, que los correspondientes valores silvestres.
4. Excepto la mutación carS, las demás mutaciones estudiadas que afectan a la carotenogénesis ejercen un efecto pleiotrópico sobre la actividad ADH de Phycomyces, incrementándola por encima de sus valores normales. Esta relación entre carotenogénesis y actividad ADH también se observa cuando se altera químicamente, con difenilamina u otros agentes, la carotenogénesis del tipo silvestre, aunque el efecto estimulador sobre la ADH de la difenilamina no se debe exclusivamente a su efecto sobre la carotenogénesis.

La fotorrepresión de la ADH, sin embargo, es normal en los mutantes car y en los micelios tratados con difenilamina.

5. Hemos detectado diferencias entre los patrones de electromorfos con actividad ADH de las especies P.nitens y P.blakesleeanus, lo que nos ha permitido asignar a la especie P.nitens dos estirpes de Phycomyces cuya posición taxonómica era incierta. Hemos identificado una banda proteica cuyo comportamiento electroforético corresponde al del electromorfo único con actividad ADH de P.blakesleeanus. Las alteraciones químicas o genéticas que incrementan la actividad ADH no hacen aparecer nuevos electromorfos con dicha actividad sino que aumentan la intensidad de tinción de dicha banda proteica.

6. Hemos demostrado que, aun siendo tóxico el alcohol alílico para las estirpes de P.blakesleeanus dotadas de actividad ADH, la acroleína es unas cien veces más tóxica para dichas estirpes, lo que nos ha permitido aislar numerosos mutantes resistentes a alcohol alílico tratando las esporas con nitrosoguanidina o con ICR-170. Todos los mutantes resistentes a alílico analizados carecen de actividad ADH detectable. Proponemos que los mutantes resistentes a alílico se denominen mutantes adh. Algunas de las mutaciones adh son recesivas; otras, dominantes. No hemos encontrado complementación entre ninguno de los pares de mutaciones adh estudiadas. Proponemos denominar al gen identificado como adhA.

La estirpe silvestre y C5 (carB10 (-)) acumulan pequeñas cantidades de etanol en el medio de cultivo; los mutantes adh , S292 y S371 no acumulan etanol. Una de las funciones de la enzima ADH de P.blakesleeanus parece ser, por tanto, catalizar la conversión de acetaldehído en etanol.

I N T E R E S   D E L   T R A B A J O

## INTERES DEL TRABAJO

La faceta más atractiva de Phycomyces es su capacidad de responder a ciertos estímulos ambientales, como, entre otros, la luz, la gravedad (geotropismo) y la presencia de objetos cercanos (fugotropismo). Phycomyces es un buen sistema para estudiar, con un enfoque reduccionista, los complejos problemas de la fisiología sensorial.

Otra faceta de Phycomyces que está despertando gran interés es la posibilidad de emplearlo para estudiar la base genética y molecular de la diferenciación celular en eucariontes.

Los estudios bioquímicos de la fisiología sensorial y del desarrollo de Phycomyces se encuentran aún muy atrasados. A diferencia de otros eucariontes, como la levadura del pan y la mosca del vinagre, en Phycomyces no se ha trabajado sobre sistemas bioquímicos susceptibles de un análisis genético basado en aislamiento específico de mutantes seleccionables.

En este trabajo hemos estudiado un tal sistema: el de la deshidrogenasa del alcohol (ADH) de Phycomyces. Esperamos contribuir así a desarrollar un enfoque que integre los datos genéticos, bioquímicos, etológicos y de la biología del desarrollo de Phycomyces.

Concretamente, en esta tesis se publican resultados referentes a las siguientes tres líneas fundamentales de trabajo:

- aislamiento y caracterización genética y bioquímica de mutantes de Phycomyces carentes de actividad ADH;
- influencia de la luz sobre la actividad ADH en el tipo silvestre y diversos mutantes de Phycomyces;
- relación entre carotenogénesis y actividad ADH en Phycomyces.

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



## SISTEMATICA DE PHYCOMYCES

En 1823 Kunze estableció la especie Phycomyces nitens, creando con ello el género Phycomyces. En 1925 Burgeff, basándose en diferencias morfológicas y barreras de esterilidad entre distintas estirpes de P.nitens, dividió la especie en dos: Phycomyces nitens y Phycomyces blakesleeanus, que tiene las esporas más pequeñas y las cigosporas más grandes que P.nitens.

Los hongos del género Phycomyces pertenecen a la clase de los Cigomicetos, que se caracterizan por tener esporas vegetativas sin flagelos como adaptación a la vida saprofítica terrestre y micelio carente de tabiques transversales. Este género pertenece al orden Mucorales, ya que sus esporas se forman en el interior de esporangios y no en el extremo de las hifas. Por disponer sus esporangios de columela, está incluido en la familia de las Mucoráceas. El género se caracteriza por tener esporas vegetativas multinucleadas que no se forman a partir de protosporas mononucleadas y por el gran tamaño y vigor de los esporangióforos.

### CICLOS DE VIDA

Phycomyces presenta dos ciclos de vida, uno asexual y otro sexual (figura 1).

#### Ciclo asexual.

El ciclo asexual comienza con la germinación de una espora, que contiene entre uno y seis núcleos, para producir una masa de hifas cilíndricas no tabicadas que, creciendo por su ápice y ramificándose, producen un micelio cenocítico en el que los núcleos se dividen por elongación y constricción sin pérdida de la membrana nuclear (Franke y Reau, 1973).

Sumergido en medio líquido, el micelio adquiere un aspecto algodonoso y no experimenta ulteriores modificaciones morfológicas, multiplicándose por fragmentación.

En medio sólido, el micelio, rastrero y denso, crece radialmente durante dos o tres días para acabar experimentando el siguiente proceso (Gruen, 1959):

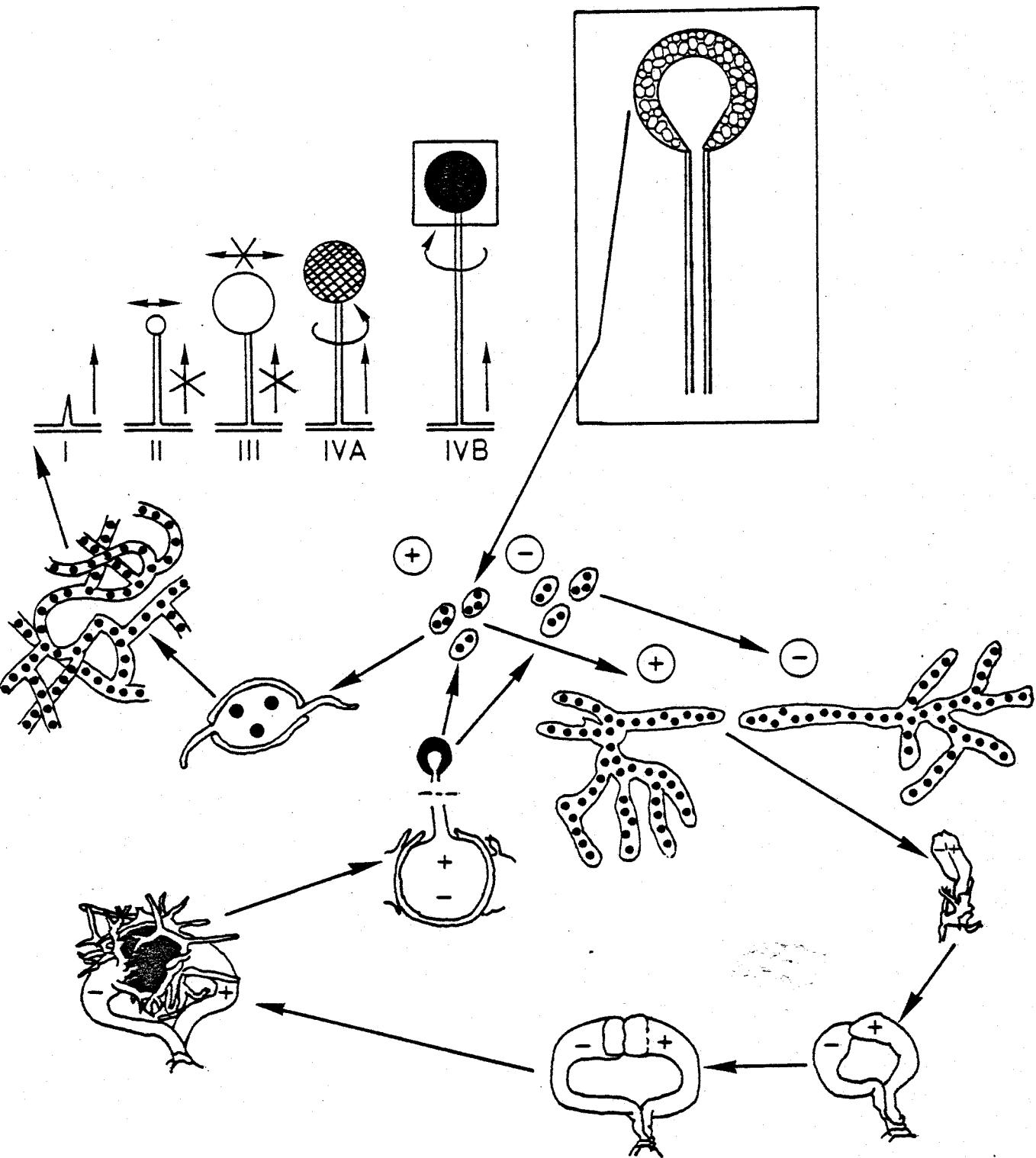


FIGURA 1. Ciclos de vida de *Phycomyces blakesleeanus*.

Véase explicación en el texto. Los signos + y - encerrados en los círculos indican el tipo sexual del micelio correspondiente.

I. Forogénesis. El micelio emite hifas aéreas gigantes no ramificadas llamadas macróforos. Los macróforos crecen verticalmente hasta alcanzar una altura de uno a tres centímetros.

II. Esporangiogénesis. Se detiene transitoriamente la elongación de los macróforos y se forma en el extremo de cada uno de ellos un esporangio esférico que crece radialmente.

III. Esporogénesis. Sigue parada la elongación de los macróforos y se detiene el engrosamiento del esporangio, dentro del cual aparece una pared transversal o columela que separa el citoplasma del macróforo del citoplasma del esporangio; en el citoplasma del esporangio se separan porciones multinucleadas que se rodean de fuertes paredes, originando así las esporas. Cada esporangio contiene unas  $10^5$  esporas.

IV. Crecimiento vertical. El macróforo comienza de nuevo a crecer verticalmente. La zona de crecimiento se localiza inmediatamente debajo del esporangio. Durante algún tiempo, el esporangio y la parte superior del macróforo giran alrededor de su eje con un movimiento de rotación que, visto desde arriba, va en sentido contrario al de las agujas del reloj (etapa IVa); posteriormente, el sentido de rotación pasa a ser coincidente con el de las agujas del reloj (etapa IVb).

En determinadas circunstancias Phycomyces desarrolla unos esporangióforos enanos, llamados micróforos (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1981), que se diferencian de los macróforos en que tienen menos de un milímetro de altura y en otras características morfológicas y de su desarrollo (Thornton, 1972 y 1975).

La forogénesis resulta inhibida cuando los micelios de Phycomyces se cultivan en ambiente cerrado (Galland y Russo, 1979a), inhibición que se debe presumiblemente a la acumulación de  $\text{CO}_2$  (Russo et al. 1981). Se han aislado mutantes supersensibles y superresistentes al efecto de la atmósfera cerrada sobre la forogénesis; en estos mutantes se observan variaciones concordantes del efecto del  $\text{CO}_2$  sobre la forogénesis (Russo et al. 1981).

#### Ciclo sexual

Phycomyces es un género heterotálico; sus estirpes se clasifican en dos tipos sexuales, denominados (+) y (-), morfológicamente indistinguibles y de contribuciones genéticas equivalentes al proceso sexual (Blakeslee, 1904).

El ciclo sexual se inicia cuando dos hifas vegetativas de sexo opuesto crecen muy próximas. Cada parental desarrolla unas hifas cortas y ramificadas llamadas cigóforos, que crecen hacia los del otro sexo, entran en contacto con ellos, se entrelazan, crecen juntos en el aire, y engrosan su tamaño formando los llamados progametangios. A continuación, un septo transversal separa en cada progametangio una célula, el gametangio, del resto del micelio; luego, la pared entre los dos gametangios desaparece y se forma una sola célula, el cigoto, cuyo citoplasma y sus cientos de núcleos provienen de ambos micelios. El cigoto se convierte en cigospora engrosando de tamaño y recubriéndose de una pared rígida de color negro. Después de un periodo de latencia de dos o tres meses, las cigosporas germinan produciendo un germoesporangióforo, en cuyo extremo apical se forma un germosporangio que contiene unas  $10^4$  germosporas.

## GENETICA DE PHYCOMYCES

### Generalidades

El análisis genético clásico se basa en la clasificación por complementación y recombinación de colecciones de alelos obtenidos por mutación. Autores anteriores han desarrollado métodos para realizar en Phycomyces los clásicos estudios de mutación, complementación y recombinación; además en Phycomyces se dispone de un tipo peculiar de análisis genético basado en la segregación de los heterocariontes durante el ciclo asexual (Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968; Medina, 1977).

### Segregación y complementación de heterocariontes

Ni los esporangióforos ni las hifas de Phycomyces se funden espontáneamente al entrar en contacto; no obstante, se dispone de varios métodos para formar micelios heterocariontes:

-el método de Ootaki(1973) consiste en cortar los extremos de dos esporangióforos jóvenes de genotipos distintos y poner en contacto, en atmósfera húmeda, los extremos lesionados. Como resultado de un proceso de regeneración, se forman esporangióforos y esporangios que frecuentemente contienen esporas heterocarióticas;

-el método de Cerdá-Olmedo (Roncero et al., 1983) consiste en inducir mutaciones en micelios jóvenes para formar heterocariontes intrasexuales;

-el método de Gauger y Eslava se basa en recoger cigosporas inmaduras y hacerlas germinar prematuramente, lo que con frecuencia origina heterocariontes intersexuales (Gauger et al., 1980).

La posibilidad de formar artificialmente heterocariontes ha permitido realizar diferentes estudios de complementación en Phycomyces (ver revisiones por Cerdá-Olmedo, 1975 y 1977; Bergman et al., 1969).

Un heterocarionte que contenga dos tipos de núcleos puede formar tres tipos de esporas: heterocarióticas y homocarióticas de uno y otro tipo. En 1968, Heisenberg y Cerdá-Olmedo propusieron el siguiente modelo sobre el comportamiento de los núcleos en el ciclo asexual de Phycomyces:

-la proporción nuclear es la misma en los diferentes sectores y en las diferentes etapas de desarrollo de un micelio heterocarionte;

-los núcleos que entran a formar parte de las esporas constituyen una muestra aleatoria y prácticamente infinita de la población de núcleos de micelio;

-tras el proceso de formación de las esporas los núcleos dejan de dividirse hasta la germinación;

-no hay correlación entre los genotipos de los núcleos que entran a formar parte de cada espora.

Este modelo permite predecir las proporciones de los tres tipos de esporas que producirá un micelio heterocarionte en función de las frecuencias de las esporas con 1,2,...,6 núcleos y de la proporción nuclear en el micelio original. Recíprocamente, medidas las frecuencias de los tres tipos de esporas en la descendencia asexual de un micelio, el modelo permite estimar la proporción nuclear original en dicho micelio.

La validez del modelo ha sido demostrada experimentalmente por sus propios autores y reexaminada por Medina (1977).

El estudio genético basado en la segregación de los heterocariontes durante el ciclo asexual ha sido empleado con éxito en diferentes problemas (véase revisiones por Cerdá-Olmedo, 1975 y 1977).

## Mutagénesis en Phycomyces

El agente mutagénico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (en adelante nitrosoguanidina o NG) se ha utilizado rutinariamente para obtener mutantes auxótrofos de Phycomyces (Brunke et al., 1977; Alvarez et al., 1980) y mutantes alterados en la carotenogénesis (Meissner y Delbrück, 1968; Heisenberg y Cerdá-Olmedo, 1968) o en el comportamiento (Bergman et al., 1973; Cerdá-Olmedo, 1977).

La nitrosoguanidina tiene la ventaja de que induce altas frecuencias de mutación (Adelberg et al., 1965; Cerdá-Olmedo et al., 1968) aunque, precisamente por ello, las estirpes mutantes aisladas llevan frecuentemente varias mutaciones diferentes, lo que representa un grave inconveniente (Guerola et al., 1971; Bergman et al., 1973).

También se han obtenido mutantes de Phycomyces con luz ultravioleta, rayos X, metanosulfonato de etilo (EMS), el producto ICR-170 y, más recientemente, el compuesto 4-nitro-quinolina-1-óxido (Revuelta, 1981).

Dada la naturaleza multinucleada de las esporas de Phycomyces, las esporas supervivientes a la mutagénesis son frecuentemente heterocarióticas, lo que obliga a tratamientos especiales para fijar en homocariosis las mutaciones deseadas. Si se trata de mutaciones recesivas puede ser conveniente enriquecer en esporas funcionalmente uninucleadas o en homocariontes mutantes la población de supervivientes a la mutagénesis (Reau, 1972; Pueyo y Cerdá-Olmedo, 1981; Roncero, 1980; Brunke et al., 1977; Revuelta, 1981).

## Recombinación en Phycomyces

Ya Burgeff en 1928 se ocupó de realizar cruces sexuales en Phycomyces; no obstante, el estudio de la genética sexual de Phycomyces fue prácticamente abandonado debido a las serias dificultades técnicas que presenta. Recientemente, las mejoras técnicas introducidas, en especial el empleo de estirpes isogénicas, ha permitido determinar condiciones experimentales que producen resultados repetitivos y que permiten, por consiguiente, el análisis genético por recombinación en Phycomyces (Cerdá-Olmedo, 1975; Eslava et al., 1975a; Eslava et al., 1975b; Alvarez et al., 1980).

## CAROTENOGENESIS EN PHYCOMYCES

### Generalidades

Los pigmentos carotenoides están muy extendidos en la naturaleza (Goodwin, 1976).

Las plantas y muchos hongos y bacterias pueden sintetizar carotenoides "de novo"; los animales los obtienen de la dieta aunque pueden modificarlos químicamente (Singh y Cama, 1975).

El micelio del tipo silvestre de Phycomyces es de color amarillo por acumular  $\beta$ -caroteno. La cantidad de pigmento acumulado depende de condiciones ambientales, como los nutrientes, la luz, etc. (ver revisión por Cerdá-Olmedo y Torres-Martínez, 1979).

El  $\beta$ -caroteno sirve en Phycomyces como precursor de los ácidos trispóricos, mensajeros químicos en la reacción sexual (Sutter, 1975 y 1977); como precursor de la esporopolenina, un polímero de caroteno que forma parte de la pared celular de la cigospora (Gooday et al., 1973; Furch y Gooday, 1979); el  $\beta$ -caroteno también cumple una función fotoprotectora (Presti y Delbrück, 1978).

### Biosíntesis del $\beta$ -caroteno

La biosíntesis del  $\beta$ -caroteno tiene lugar según la ruta que se expone en la figura 2 (Britton, 1976; Davies, 1979). La síntesis de  $\beta$ -caroteno implica la formación de un precursor de seis carbonos, el mevalonato, y posteriores reacciones de condensación de este precursor para formar el carotenoide incoloro fitoeno; luego, cuatro deshidrogenaciones sucesivas producen el carotenoide rojo licopeno y finalmente dos ciclaciones sucesivas producen el carotenoide amarillo  $\beta$ -caroteno.

La síntesis de  $\beta$ -caroteno está sometida a represión por producto final; así, cuando se inhibe químicamente la síntesis de  $\beta$ -caroteno a nivel de fitoeno por la adición de difenilamina (DFA) (Olson y Knizley, 1962) o a nivel de licopeno mediante la adición de 2-(-4-clorofeniltio)-triethylamina (CFTA) (Coggins et al., 1970), las cantidades de precursor que se acumulan son muy superiores a la cantidad de  $\beta$ -caroteno acumulado en condiciones normales.

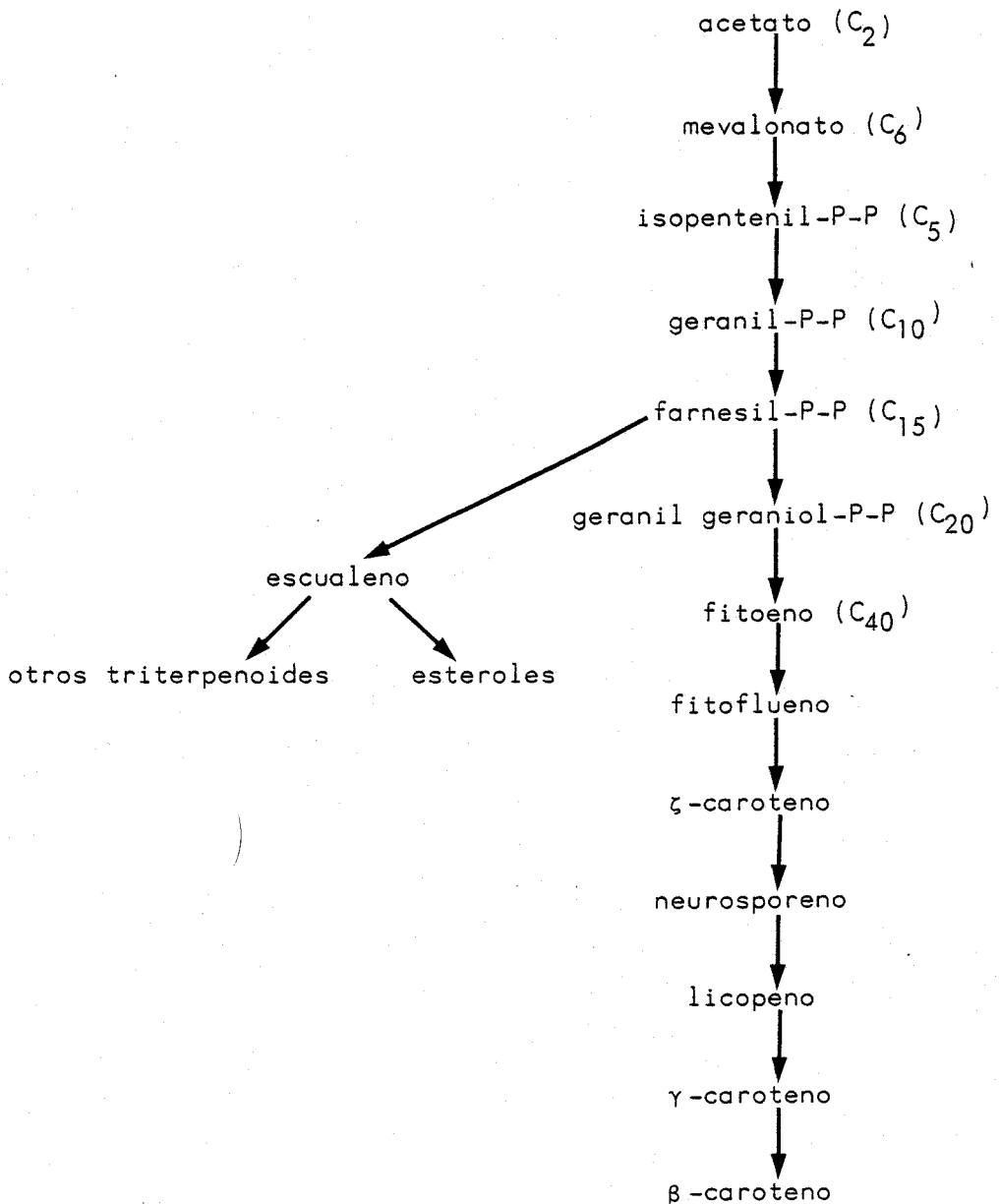


FIGURA 2. Ruta biosintética del β-caroteno.

Esta figura representa la ruta de biosíntesis aceptada para otros organismos; en el caso de *P. blakesleeanus* se supone que es similar, existiendo algunas pruebas de que la conversión de fitoeno en β-caroteno transcurre efectivamente según la figura.



## Alteraciones genéticas de la carotenogénesis

En Phycomyces se han aislado distintos tipos de mutantes afectados en la carotenogénesis. Detectar dichos mutantes es sencillo por el color anormal de sus micelios (Cerdá-Olmedo y Torres-Martínez, 1979).

Atendiendo a su fenotipo, los mutantes afectados en la carotenogénesis aislados hasta el momento se pueden clasificar en siete grupos distintos.

Un primer grupo, de fenotipo S, está formado por mutantes que acumulan mucho más  $\beta$ -caroteno que el tipo silvestre. Estos mutantes no complementan entre ellos, estando mutados en el gen carS. Se ha supuesto que el producto del gen carS está implicado en la retroinhibición de la carotenogénesis (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976).

Un segundo grupo, de fenotipo B, está formado por mutantes de micelio blanco que acumulan grandes cantidades de fitoeno (Meissner y Delbrück, 1968). Estos mutantes no complementan entre ellos, estando afectados en el gen carB (Ootaki et al., 1973), que muy probablemente determina la deshidrogenasa del fitoeno.

Un tercer grupo, de fenotipo R, está formado por mutantes de micelio rojo y que acumulan grandes cantidades de licopeno (Meissner y Delbrück, 1968). Presumiblemente estos mutantes están afectados en el gen que determina la ciclasa del licopeno.

Un cuarto grupo, de fenotipo A, está formado por mutantes de micelio blanco que no acumulan cantidades importantes de ningún carotenoide sino trazas de  $\beta$ -caroteno (Meissner y Delbrück, 1968).

Un quinto grupo, de fenotipo AR, está formado por mutantes de micelio blanco que no acumulan cantidades importantes de ningún carotenoide sino pequeñas cantidades de licopeno.

Los mutantes de fenotipo A y R no complementan con los de su mismo grupo fenotípico y sí complementan a los del otro grupo (Ootaki et al., 1973); los mutantes de fenotipo AR no complementan entre sí, ni a los de los grupos fenotípicos A y R (Ootaki et al., 1973). Se ha propuesto que los mutantes de fenotipo R están alterados en un gen llamado carR, los de fenotipo A en otro gen distinto llamado carA y los de fenotipo AR serían dobles mutantes carA carR (Ootaki et al., 1973); posteriormente, se ha sugerido que los mutantes de los grupos fenotípicos A, R y AR están afectados

todos ellos en un único gen bifuncional denominado gen carRA (Torres-Martínez et al., 1980). El segmento R del gen carRA determinaría la estructura de la ciclasa del licopeno; para el segmento A de dicho gen se han ido proponiendo sucesivas funciones, como que podría estar implicado en la retroinhibición de la ruta de modo que los mutantes en ese segmento requieran un nivel de  $\beta$ -caroteno mucho menor del normal para desencadenar la respuesta de retroinhibición (Murillo, 1980) o que el producto de dicho segmento fuera un transportador de sustratos entre las enzimas carotenogénicas (Murillo et al., 1981). Hasta el momento ninguna de estas hipótesis ha sido verificada o refutada inequívocamente.

Un sexto grupo, de fenotipo C, está formado por mutantes de micelio amarillo pálido que acumulan más  $\beta$ -caroteno que los de fenotipo A pero menos que el tipo silvestre. Estos mutantes no complementan entre sí y complementan a todos los mutantes anteriormente citados, estando afectados en el gen carC (Revuelta, 1981). Se ha propuesto que el producto del gen carC, en micelios iluminados, ejercería un efecto negativo sobre la inhibición de la carotenogénesis causada por el producto del gen carS.

Un séptimo grupo, de fenotipo I, está formado por mutantes que sintetizan cantidades normales de  $\beta$ -caroteno pero son insensibles al efecto estimulador que sobre la carotenogénesis tiene normalmente el retinol (Eslava et al., 1974). Uno de estos mutantes, el car-131, ha sido adscrito mediante técnicas de complementación a un gen diferente de todos los anteriores, denominado carI (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982).

#### Pleiotropía de las mutaciones car

Las mutaciones car son altamente pleiotrópicas, alterando, además de la síntesis de carotenoides, la forogénesis y el ciclo sexual de Phycomyces.

Los mutantes car son hipersensibles al efecto inhibitor del  $\text{CO}_2$  sobre la forogénesis, requiriendo de veinte a treinta veces más aire que el tipo silvestre para que tenga lugar la forogénesis en ambiente cerrado; de hecho, la forogénesis resulta inhibida en los mutantes car por concentraciones de  $\text{CO}_2$  que no afectan al tipo silvestre (Russo et al., 1981).

Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo (comunicación personal) observaron que los mutantes car C2, C5, C9 y C115, al igual que el tipo silvestre, producen en medio normal a la luz una cantidad normal de macróforos y no producen micróforos; en la oscuridad, los

mutantes citados producen menos macróforos que el tipo silvestre y muchos más micróforos que este. La difenilamina incrementó la producción de micróforos por el tipo silvestre en la oscuridad hasta niveles comparables al de los mutantes car citados. Los resultados de Gutiérrez-Corona y Cerdá-Olmedo confirman que existe una relación entre la forogénesis y la carotenogénesis.

Muchos mutantes car son incapaces de dar la reacción sexual completa. En el caso de los mutantes que no fabrican  $\beta$ -caroteno dicho efecto se debe presumiblemente a la carencia de ácidos trispóricos (Sutter, 1975 y 1977) y de las esporopoleninas, pero la carencia de  $\beta$ -caroteno no podría explicar la incapacidad sexual de los mutantes que, estando afectados en la regulación de la carotenogénesis, sintetizan cantidades apreciables o mayores de lo normal de  $\beta$ -caroteno.

## FOTORRESPUESTAS DE PHYCOMYCES

La luz afecta a la conducta, el desarrollo y el metabolismo del hongo Phycomyces (ver revisión, Cerdá-Olmedo, 1977).

### Fototropismo y fotomecismo

Cuando el esporangióforo está iluminado simétricamente los cambios de la intensidad luminosa provocan variaciones de la velocidad de crecimiento (fotomecismo) (Foster, 1972; Foster y Lipson, 1973). El fotomecismo es transitorio aun si el estímulo es permanente; el sistema parece disponer de una variable interna de adaptación,  $A$ , que es comparada continuamente con la intensidad luminosa exterior,  $I$ , de modo que la velocidad de crecimiento depende simultáneamente de  $A$  y de  $I$ . El nivel de adaptación se acerca exponencialmente a la intensidad de la luz externa.

En respuesta a iluminaciones asimétricas se producen variaciones de la dirección de crecimiento del esporangióforo (fototropismo). Puesto que el esporangióforo presenta también geotropismo, cuando un esporangióforo vertical silvestre se ilumina asimétrica y horizontalmente con luz azul de una intensidad superior a  $4 \cdot 10^{-6} \text{ Wm}^{-2}$ , la interacción entre geotropismo y fototropismo conduce finalmente a que el esporangióforo crezca en una dirección que forma un ángulo de  $75^\circ$  con la vertical, denominado ángulo de equilibrio fotogeotrópico (Medina y Cerdá-Olmedo, 1977a). Por debajo de esta intensidad el ángulo de equilibrio fotogeotrópico disminuye y se hace cero para una intensidad umbral de unos  $10^{-9} \text{ Wm}^{-2}$  (Bergman et al., 1973).

Existen numerosas pruebas experimentales de que el fototropismo se debe a una distribución asimétrica de fotomecismos en la sección circular del esporangióforo (Lipson y Block, 1976; Foster y Lipson, 1973; Foster, 1972; Dennison y Bozof, 1973; Medina y Cerdá-Olmedo, 1977b).

#### Fotoforogénesis

La luz influye en la elección entre macro y microforogénesis (Rudolph, 1958):

- la luz de entre 380 y 480 nm de longitud de onda inhibe la microforogénesis y estimula la macroforogénesis (Thornton, 1975);

-el umbral para esta fotorrespuesta es menor de  $10^{-9} \text{ Wm}^{-2}$ , es decir, menor que el umbral para la respuesta fototrópica (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980);

- si el micelio se somete alternativamente a periodos de luz y oscuridad, los esporangióforos aparecen preferentemente en los sitios donde estaba el frente de crecimiento del micelio durante la iluminación (Bergman, 1972);

- si el micelio se mantiene en un recipiente cerrado en la oscuridad, la acumulación de  $\text{CO}_2$  inhibe la forogénesis (Russo, 1977). La luz azul contrarresta dicha inhibición.

#### Fotocarotenogénesis

La fotorrespuesta metabólica más espectacular es la inducción de la carotenogénesis que experimentan los micelios silvestres al ser iluminados. Phycomyces acumula una cantidad apreciable de  $\beta$ -caroteno en la oscuridad ( $60 \mu\text{g/g}$  materia seca (ppm)) pero la iluminación incrementa notablemente la cantidad de pigmento acumulado (Bergman et al., 1973; López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980). La intensidad luminosa umbral para la fotocarotenogénesis es del orden de  $10^{-5} \text{ Wm}^{-2}$  de luz azul, unas  $10^4$  veces mayor que el umbral fototrópico (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980). Esta fotorrespuesta no parece disponer de mecanismo de adaptación, siendo la cantidad de  $\beta$ -caroteno acumulado proporcional a la intensidad luminosa (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980).

En experimentos de exposición de corta duración (hasta 30 minutos), Jayaram et al., (1979) demostraron que la fotocarotenogénesis es bifásica, exhibiendo un componente que se satura a  $20-40 \text{ jm}^{-2}$  y otro que se satura a  $1000-2000 \text{ jm}^{-2}$ . El

primer componente es insensible a cicloheximida y actinomicina D; el segundo es sensible a ambas sustancias; así, para la expresión de la primera fase de la respuesta no sería necesaria la síntesis de proteína ni de ARN, mientras que ambas síntesis serían necesarias para la segunda fase.

La eficacia cuántica relativa a 445, 405 y 365 nm es la misma para el componente de la fotocarotenogénesis que se satura a bajo flujo que para el que se satura a alto flujo luminoso (Whitaker y Shropshire, 1981), lo que sugiere que el mismo fotorreceptor controla ambas fases de la respuesta.

Los mutantes carC tienen una fotocarotenogénesis defectuosa; Revuelta (1981) ha propuesto que la luz ejerce un efecto positivo sobre el gen carC, (Figura 3). Este modelo explica por qué los dobles mutantes carA carS tienen una fotocarotenogénesis defectuosa (López-Díaz, 1979), ya que implica al producto del gen carS en dicha fotorrespuesta. El modelo de Revuelta implica que los mutantes carB y carR tienen una fotocarotenogénesis anormal por tener alterada la retroinhibición de la carotenogénesis. Este modelo también implica que la fotocarotenogénesis es anormal en los mutantes carA. De hecho, Revuelta ha demostrado que la mutación carC complementa las mutaciones carA y carS para la fotocarotenogénesis.

#### Otras fotorrespuestas metabólicas

Se han descrito otras respuestas metabólicas a la luz. De estudios sobre las actividades relativas, en micelios cultivados en luz y en oscuridad, de la asparraginas, la glutamato-oxalacetato transaminasa, la láctico deshidrogenasa y otras enzimas relacionadas con el metabolismo del piruvato, se desprende que en los micelios cultivados a la oscuridad el piruvato es convertido preferentemente en lactato y alanina y el oxalacetato producido preferentemente a partir de asparragina, mientras que a la luz el piruvato se convierte preferentemente en oxalacetato por carboxilación (Sandmann y Hilgenberg, 1979; Hilgenberg y Sandmann, 1977). El consumo de glucosa y de asparragina no varía de la luz a la oscuridad; la concentración de los productos implicados en el ciclo de Krebs tampoco debería variar, pero, como los estudios de los autores citados parecen indicar, el piruvato proveniente de la glicolisis se emplea preferentemente como precursor de metabolitos implicados en el ciclo de Krebs en los micelios iluminados y como sustancia a fermentar en los no iluminados (figura 4).

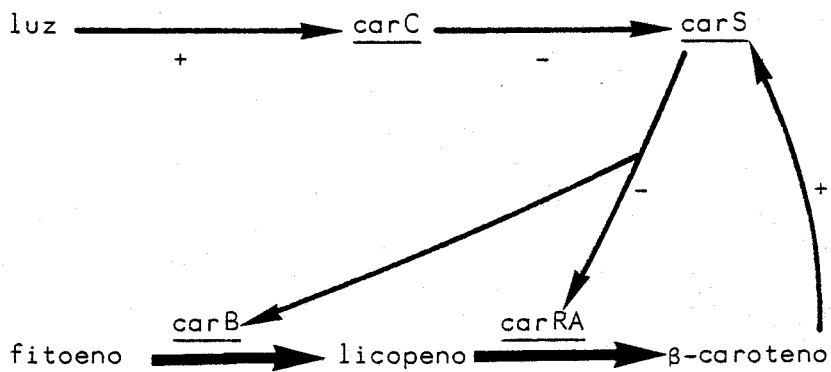


FIGURA 3. Modelo de regulación de la carotenogénesis (según Revuelta, 1981).

Los signos + y - indican respectivamente un efecto positivo o negativo del agente en el que se inicia la flecha respecto de aquellos en los que acaba la flecha. Por ejemplo, la luz ejerce un efecto positivo sobre el gen carC, etc. Las flechas finas indican flujo de información, las flechas gruesas reacción metabólica.

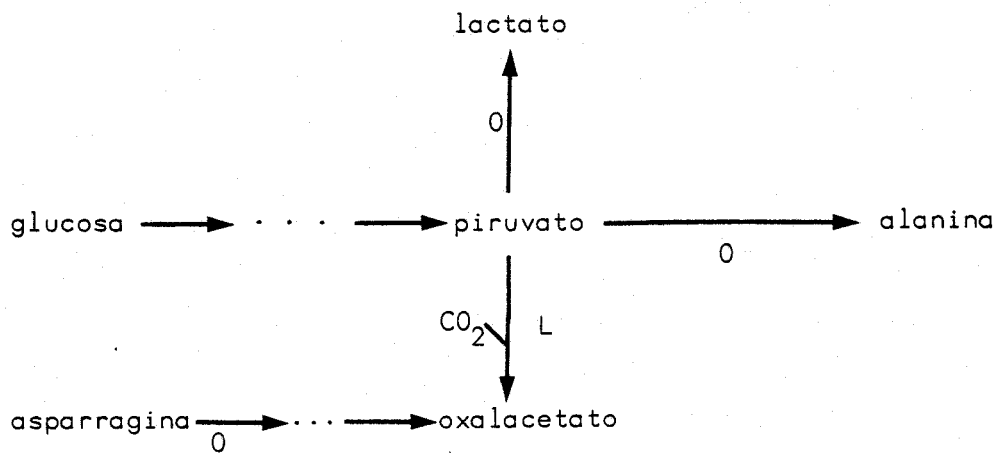


FIGURA 4. Metabolismo del piruvato en luz y oscuridad en Phycomyces.  
 Las reacciones señaladas con O son más activas a la oscuridad que a la luz, la señalada con L más activa a la luz que a la oscuridad.

## El fotosistema mad

En Phycomyces se han aislado y caracterizado mutantes que muestran fotorrespuestas anormales.

Los mutantes que tienen el fotomecismo y el fototropismo alterado se denominan mutantes mad; la mera existencia de estos mutantes constituye una buena prueba de que fototropismo y fotomecismo están íntimamente relacionados.

Un grupo de mutantes mad, que denominamos de clase 1, exhiben geotropismo y fugotropismo normales. Estos mutantes parecen estar afectados en la recepción y etapas iniciales de la transducción del estímulo luminoso.

Los restantes mutantes, mad, clase fenotípica 2, tienen alterados el fugotropismo y el geotropismo. Estos mutantes estarían alterados en el mecanismo efector de mecismos y tropismos.

Los mutantes de la clase fenotípica 1 pueden ser subdivididos en dos grupos según que exhiban una fotocarotenogénesis y fotoforogénesis anormales o ambas respuestas normales.

Los mutantes de la clase 1 se comportan como lo haría el silvestre a una intensidad  $m$  veces superior. El valor de  $m$  depende del mutante de que se trate y suele estar comprendido entre  $10^4$  y  $10^6$ . Nunca se ha aislado un mutante de clase 1 para el que  $m$  sea infinito, es decir, tal que no acabe por dar respuesta fototrópica a intensidades luminosas suficientemente altas.

Los mutantes de clase 2 probablemente son sensibles al mismo rango de intensidades luminosas que el tipo silvestre pero dan respuestas reducidas a todas ellas, dando la apariencia de que no responde a ciertas intensidades luminosas a las que el silvestre puede responder (Medina y Cerdá-Olmedo, 1977a y b).

Ootaki et al. (1974) clasificaron los mutantes mad en cinco grupos de complementación, designados madA a madE. Eslava et al. (1976) confirmaron estos cinco genes, descubrieron uno nuevo, denominado madG, y determinaron por recombinación que ninguna pareja de los seis genes mad exhibe ligamiento. Se ha encontrado otro gen, el madF que complementa con los seis restantes (Fischer, datos no publicados; Ootaki y Presti datos no publicados).



La clasificación fenotípica concuerda con la genética en el sentido de que los mutantes de los genes madA y madB pertenecen a la clase 1 y exhiben fotocarotenogénesis y fotoforogénesis anormales; los mutantes del gen madC pertenecen a la clase 1 y tienen fotocarotenogénesis y fotoforogénesis normales y los mutantes de los demás genes mad pertenecen a la clase 2. Estos resultados se resumen en la figura 5 (página 37).

Se ignora si las fotorrespuestas metabólicas (piruvato, etc.) están mediadas por el sistema mad.

#### Fotocarotenogénesis en los mutantes mad

Jayaram et al. (1979) han estudiado detalladamente la fotocarotenogénesis en mutantes madA y madB, demostrando que ambos tipos de mutantes exhiben una respuesta anormal a flujos bajos de iluminación.

Estudiando la fotocarotenogénesis bajo alto flujo de iluminación en mutantes mad Jayaram et al. (1980) encontraron una respuesta normal en un mutante de cada uno de los genes madC, madE, madF y madG; la estirpe C144 (madB) dio una respuesta muy anormal y la estirpe C21 (madA) ligeramente anormal; un doble mutante madA madB y un triple mutante madA madB madC dieron respuestas comparables y ambas totalmente anormales, confirmando que el gen madC no está implicado en la fotocarotenogénesis y mostrando que los efectos de los genes madA y madB sobre la fotocarotenogénesis se refuerzan recíprocamente.

En dicho estudio también pudo demostrarse que, en claro contraste con lo que sucede en el fototropismo, las intensidades luminosas umbrales para la fotocarotenogénesis son muy similares para el tipo silvestre, para el mutante madA, para el mutante madB y para el doble mutante madA madB; en la fotocarotenogénesis, el rango de intensidades al que dichos mutantes responden es similar al de la estirpe silvestre, pero la respuesta de los mutantes sube más lentamente con la intensidad luminosa y se satura mucho antes que en el tipo silvestre.

#### Fotoforogénesis de los mutantes mad y car

Un corto pulso de luz azul libera la represión por CO<sub>2</sub> de la macroforogénesis.

Galland y Russo (1979a) han estudiado la forogénesis de

mutantes mad y del tipo silvestre en recipientes cerrados: sólo los mutantes madA<sub>3</sub> y madB exhibieron una fotoforogénesis anormal, con umbrales  $10^3$  (madA) a  $10^5$  (madB) veces más alto que el de la estirpe silvestre. Los productos de los genes madA y madB están, por tanto, implicados en todas las fotorrespuestas conocidas hasta el momento, tanto las que tienen lugar en el micelio como en los esporangióforos.

Galland y Russo (1979a) demostraron que la intensidad luminosa mínima que revierte la inhibición de la forogénesis provocada por el cultivo en ambiente cerrado es mucho mayor en los mutantes C2 (carA), C5 (carB), C9 (carR), C6 (carA carR), C171 (carA carR) y C173 (carB carR) que en el tipo silvestre. La estirpe B401, que acumula mucho más  $\beta$ -caroteno que el tipo silvestre, exhibió un umbral normal. Estos resultados podrían interpretarse en el sentido de que el  $\beta$ -caroteno o un derivado suyo es el pigmento receptor en la reversión de la inhibición de la forogénesis causada por la atmósfera cerrada; no obstante, los mismos autores demostraron que en realidad lo que ocurre es que los citados mutantes car son supersensibles a la inhibición por CO<sub>2</sub> de la forogénesis. Se ignora la causa de este fenómeno.

#### Naturaleza del fotorreceptor mad

Se sospecha, aunque no existe una prueba directa de ello, que todas las fotorrespuestas citadas (fototropismo, fotomecismo, fotocarotenogénesis, fotoforogénesis y fotorreversión de la inhibición de la forogénesis por CO<sub>2</sub>) comparten un mismo fotorreceptor, ya que todas esas respuestas están simultáneamente alteradas en los mutantes madA y madB.

Los espectros de acción para el fototropismo y el fotomecismo sugieren que el fotorreceptor es una flavina o un carotenoide. El carotenoide ha sido descartado porque los mutantes carentes de  $\beta$ -caroteno presentan fotomecismo y fototropismo normales (Bergman et al., 1973; Presti et al., 1977).

El coeficiente de extinción molecular del fotorreceptor coincide con el de la riboflavina (Lipson, 1975a y b). La incorporación, en lugar de riboflavina, de roseoflavina hace variar el espectro de acción para el fototropismo, coincidiendo con las longitudes de onda, donde absorbe la roseoflavina y no la riboflavina (Otto et al., 1981).

Todas esas pruebas sugieren fuertemente que el fotorreceptor es una flavoproteína.

Una vez captado el impulso luminoso por el receptor flavoproteico, tendría lugar un proceso de transducción de la señal generada, transducción que en el caso de la fotocarogénesis (Revuelta, 1981) y en el de la fotoforogénesis implicaría al  $\beta$ -caroteno o a un derivado suyo.

## EFFECTOS DEL RETINOL SOBRE PHYCOMYCES

El retinol ejerce notables efectos sobre el metabolismo y el desarrollo de Phycomyces.

### Retinol y carotenogénesis

Eslava et al. (1974) demostraron que el retinol incrementa la cantidad de  $\beta$ -caroteno acumulado por el tipo silvestre desde un nivel basal de aproximadamente 60 ppm en ausencia de retinol hasta unas 2000 ppm en su presencia. El retinol ejerce este efecto sin convertirse directamente en  $\beta$ -caroteno. La estimulación por retinol no tiene lugar en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas.

El retinol estimula la carotenogénesis de los mutantes carA, cuyo nivel de  $\beta$ -caroteno pasa de 1 ppm o menos a entre 62 y 446 ppm (Eslava et al., 1974).

En presencia de retinol los mutantes carB y carR siguen sin acumular  $\beta$ -caroteno, pero las cantidades de precursores que acumulan son mayores que en su ausencia. Así, en medio con retinol los mutantes carB y carR llegan a acumular entre 2400 y 6400 ppm de fitoeno (1700 a 3300 ppm en su ausencia) y entre 3000 y 3500 ppm de licopeno (1500-2500 ppm en su ausencia) respectivamente.

Los mutantes carS, que ya acumulan una cantidad anormalmente alta de  $\beta$ -caroteno (entre 2500 y 4200 ppm) en ausencia de retinol, acumulan aún más  $\beta$ -caroteno (entre 4600 y 6500 ppm) en presencia de retinol (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976).

El efecto del retinol sobre la carotenogénesis de las estirpes carB, carR y carS indica que la estimulación por retinol de la carotenogénesis no actúa a través de la inhibición por producto final de dicha ruta.

Los mutantes carC responden normalmente al retinol (Revuelta, 1981). Murillo y Cerdá-Olmedo (1976) han descrito que la estirpe S106 (car-102 carS42 (-)), que acumula grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno en ausencia de retinol debido a la mutación carS, no

acumula más  $\beta$ -caroteno en presencia de retinol, lo que los autores atribuyeron a que la mutación car-102 haría a esta estirpe insensible al efecto estimulador del retinol.

La estirpe S144 (car1131 (-)) no tiene un nivel basal anormalmente alto de  $\beta$ -caroteno y no responde al efecto estimulador del retinol sobre la carotenogénesis (Roncero y Cerdá-Olmedo, 1982).

### Retinol y forogénesis

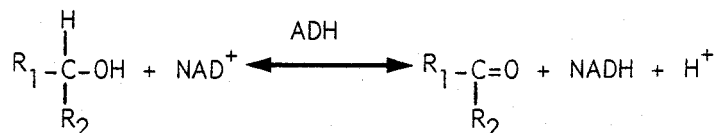
Como dijimos antes, los mutantes car son supersensibles a la inhibición por atmósfera cerrada de la forogénesis. Galland y Russo (1979b) demostraron que la adición de retinol suprime la sensibilidad de los mutantes car a la inhibición de la forogénesis sin afectar a la forogénesis del tipo silvestre. Interpretaron este resultado postulando que el tipo silvestre de Phycomyces sintetiza retinol a partir de  $\beta$ -caroteno y que el retinol sintetizado controla la forogénesis; los mutantes car carecerían de cantidades endógenas suficientes de retinol y de ahí su respuesta al retinol exógeno.

En la figura 5 se representa un esquema formal que resume la transducción de las respuestas de Phycomyces a los agentes físicos y químicos.

### LA DESHIDROGENACION DE LOS ALCOHOLES

#### Las deshidrogenasas de los alcoholes

Las deshidrogenasas de los alcoholes (ADH; alcohol: NAD<sup>+</sup> oxidorreductasa, E.C.1.1.1.1) primero descritas fueron unas enzimas que catalizan la conversión de alcoholes primarios o secundarios respectivamente en aldehídos y cetonas con simultánea formación de NADH a partir de NAD<sup>+</sup> y la liberación de un protón al medio. El esquema de la reacción es:



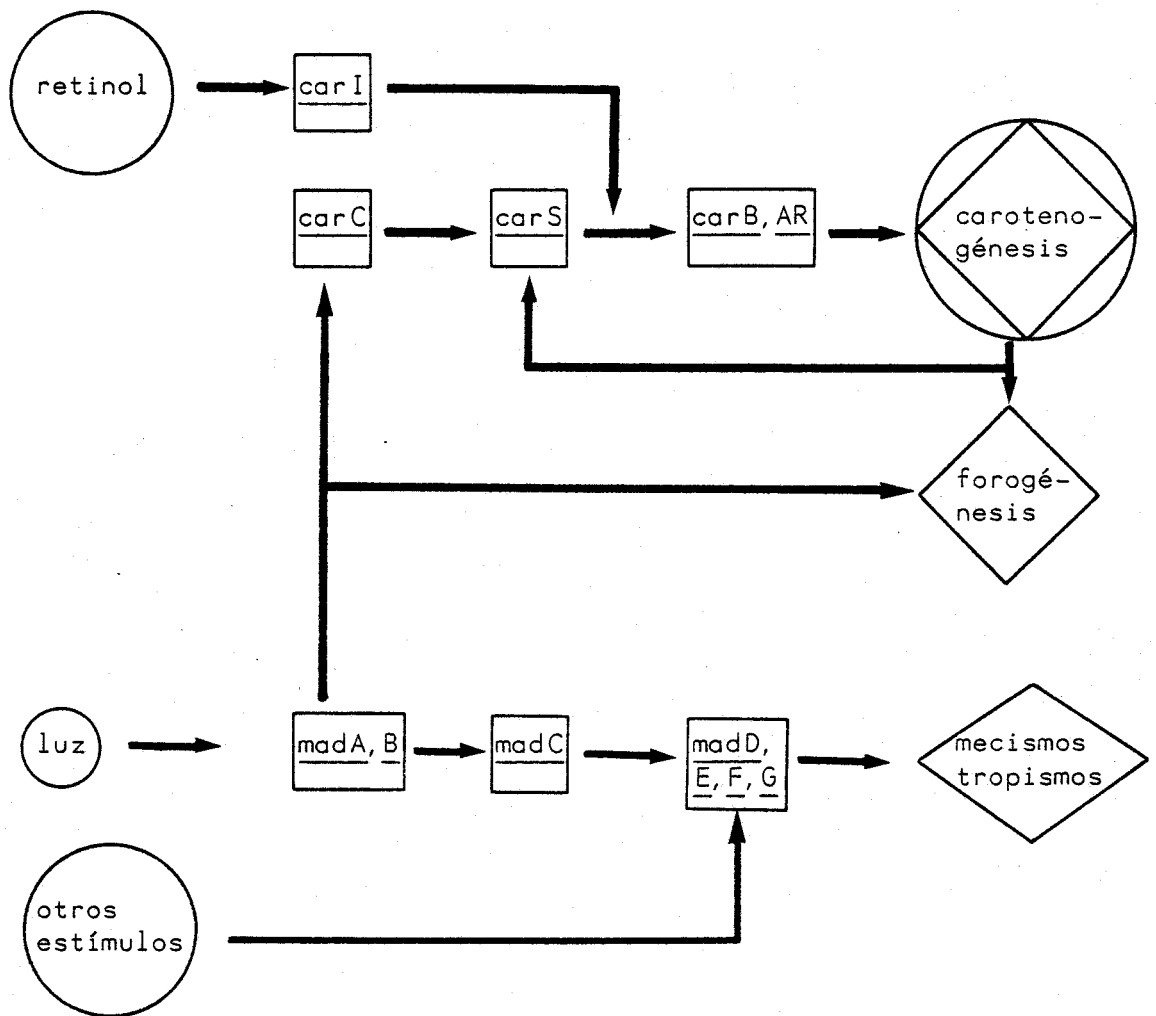
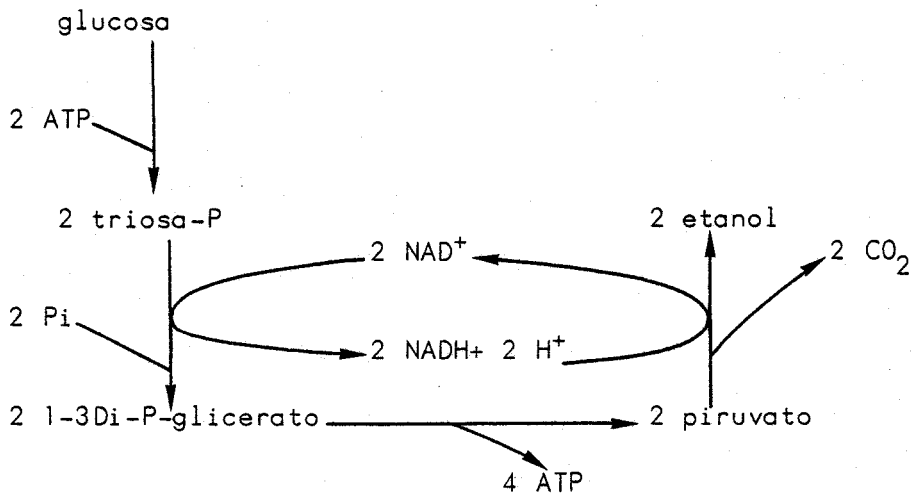


FIGURA 5. Esquema de la transducción sensorial en *Phycomyces*.

Los círculos representan entrada de estímulos, los rectángulos, genes implicados en la transducción de la información, los rombos, respuesta a los estímulos y las flechas, flujo de información.

No se sabe si las transferencias del electrón y del átomo de hidrógeno al  $\text{NAD}^+$  se realizan simultáneamente o no.

La reacción descrita es reversible; de hecho, en muchos organismos la función fisiológica de la enzima ADH es catalizar la síntesis de etanol a partir de acetaldehído, con el consiguiente consumo de  $\text{NADH}$ . Esta reacción es de gran importancia fisiológica para muchos organismos puesto que les permite sintetizar ATP a partir de glucosa sin consumo neto de  $\text{NAD}^+$  en condiciones anaeróbicas. En muchos organismos la fosforilación a nivel de sustrato es el único modo de producir ATP en ausencia de oxígeno. El esquema de las reacciones es el siguiente:



Como se ve en el esquema, la conversión de piruvato en  $\text{CO}_2$  y etanol permite regenerar el  $\text{NAD}^+$  consumido en la formación del 1-3-Di-P-glicerato.

Las deshidrogenasas del alcohol son enzimas presentes en una amplia variedad de organismos, que incluyen todos los reinos biológicos. Dependiendo de su origen biológico tienen diferentes especificidades de sustratos alcohólicos; así algunas atacan preferentemente a alcoholes de cadena corta y otras de cadena larga, unas alcoholes primarios y otras secundarios, finalmente, algunas deshidrogenasas atacan alcoholes con un núcleo bencénico.

No todas las deshidrogenasas del alcohol utilizan  $\text{NAD}^+$  como cofactor. De hecho existen tres clases de deshidrogenasas del alcohol: las que utilizan  $\text{NAD}^+$  (E.C.1.1.1.1); las que utilizan  $\text{NADP}^+$  (E.C.1.1.1.2) y las que utilizan tanto  $\text{NAD}^+$  como  $\text{NADP}^+$  (E.C.1.1.1.71).

Se ignora si las deshidrogenasas que utilizan  $\text{NAD}^+$  cumplen una función fisiológica diferente de las que utilizan  $\text{NADP}^+$ . Desde luego las proporciones intracelulares  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  y  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  pueden diferir mucho y los sistemas que controlan dichas proporciones son independientes. Suele afirmarse que el  $\text{NADP}^+$  interviene preferentemente en reacciones anabólicas y el  $\text{NAD}^+$  en reacciones catabólicas.

### La deshidrogenasa del alcohol de Phycomyces

Gleason (1971) publicó un estudio sistemático de las deshidrogenasas del alcohol de quince especies de Mucorales; en todos los casos se trataba de enzimas dependientes de  $\text{NAD}^+$ . Hartz et al. (1978) describieron la existencia de una actividad deshidrogenasa del alcohol dependiente de  $\text{NADP}^+$  en Phycomyces blakesleeanus. Aunque este tipo de enzima se había detectado anteriormente en hongos Ascomicetos (Forrester y Gaucher, 1972; Gross y Zenk, 1969) su presencia no se había demostrado en Zigomicetos hasta el trabajo pionero de Hartz y colaboradores. En dicho trabajo se describe como los extractos de micelios de Phycomyces blakesleeanus exhiben un solo electromorfo con actividad ADH y como el substrato óptimo es el etanol (Tabla 1), que es el alcohol frente al cual la enzima muestra una mayor velocidad máxima y actividad relativa.

Al germinar, las esporas de Phycomyces liberan al medio piruvato, acetaldehído y etanol (Rudolph, 1960 y 1961); en este trabajo presentamos pruebas a favor de que una de las funciones fisiológicas de la ADH dependiente de  $\text{NADP}^+$  descrita por Hartz et al. (1978) es llevar a cabo la fermentación etanólica responsable de dicha excreción de etanol.

## GENETICA DE LAS DESHIDROGENASAS DE LOS ALCOHOLES

### Generalidades

En 1967, Megnet describió un método para aislar selectivamente mutantes alterados en la síntesis del ADH en la levadura Schizosaccharomyces pombe. Dicha técnica se basa en el hecho de que la ADH cataliza la conversión del producto inofensivo 2-propen-1-ol (alcohol alílico) en la sustancia altamente tóxica 2-propen-1-al (acroleína). Los individuos silvestres se suicidan en presencia de alílico intoxicándose con la acroleína que ellos mismos sintetizan; los mutantes carentes de actividad ADH, o con un nivel de dicha actividad mucho más bajo de lo normal, pueden vivir en presencia de alcohol alílico por no sintetizar acroleína y, en

TABLA 1. Actividad de la deshidrogenasa del alcohol de P.blakesleeanus frente a diferentes sustratos.

Alcohol	Actividad relativa	Km aparente	Velocidad máxima
Metanol	0		
Etanol	100	$1.98 \times 10^{-5}$	164
1-Propanol	53	$5.22 \times 10^{-6}$	86.8
1-Butanol	48	$3.30 \times 10^{-6}$	81.9
1-Pentenol	41	$2.73 \times 10^{-6}$	65.5
1-Hexanol	33	$2.51 \times 10^{-6}$	40.9
1-Heptanol	10	$2.46 \times 10^{-6}$	16.3
2-Propen-1-ol	66	-	-

Esta tabla está tomada de Hartz et al., 1978. En la primera columna se indica el sustrato; en la segunda, la actividad relativa frente a ese sustrato; en la tercera, la concentración molar de sustrato equivalente a la Km aparente de la enzima y en la cuarta, la velocidad máxima frente al sustrato en nmoles de NADP<sup>+</sup> reducido por minuto.



consecuencia, pueden ser fácilmente aislados como mutantes resistentes a concentraciones de alcohol alílico que para el tipo silvestre son letales.

En general, las sustancias en las que un grupo  $R_2-\overset{R_1}{C}=O$  está conjugado con un doble o triple enlace son potentes agentes alquilantes de proteínas. Cuando los correspondientes alcoholes se incuban en presencia de la deshidrogenasa del alcohol se convierten en los aldehídos alquilantes pertinentes (Rando, 1972 y 1974). Aunque la propia deshidrogenasa del alcohol acaba por ser inactivada por alquilación de su sitio activo, la mayor parte de moléculas de aldehído escapan de su sitio de formación y alquilan las moléculas proteicas cercanas (Alston et al., 1979; Rando, 1972), lo que puede provocar la muerte celular. Así, alcoholes como el 1-penteno-3-ol y el 2-propenol ( $CH_2=CH-CH_2OH$ ) son sustratos que inducen el suicidio mediado por la ADH.

La posibilidad de aislar específicamente mutantes alterados en la estructura o la síntesis de una enzima constituye un desideratum en los estudios sobre la base genética del metabolismo y el desarrollo de organismos eucariontes. No es pues de extrañar que la técnica de Megnet haya sido aplicada a dos de los sistemas eucariontes más activamente estudiados: la levadura del pan y la mosca del vinagre.

#### Estudios en la mosca del vinagre

Grell et al. (1968) estudiaron el patrón electroforético de bandas con actividad ADH (E.C.1.1.1.1) en razas consanguíneas de Drosophila melanogaster. Detectaron dos tipos de homocigotos; ambos exhibían tres electromorfos distintos con actividad ADH, pero diferían en la velocidad de migración de las tres bandas. Llamaron F1, F2 y F3 a las isoenzimas del homocigoto rápido (homocigoto FF) y S1, S2 y S3 a las del lento (homocigoto SS). Los homocigotos FF y SS portan alelos diferentes de un mismo gen, el locus Adh, que se sitúa en la posición 50.1 del cromosoma II, entre los genes el (alas "elbow") y el gen rd (quetas reducidas).

Grell y colaboradores, cuyo trabajo es anterior al de Megnet, aislaron un mutante carente de actividad ADH irradiando con rayos X machos homocigotos para el alelo  $ADH^S$  y cruzándolos con hembras homocigotas el rd; entre varios miles de descendientes analizados dos exhibieron alas anormales; analizados detalladamente dichos individuos resultaron ser heterocigotos con un cromosoma II normal y el otro, proveniente de su padre, portador de una delección que incluía al gen el y al gen Adh pero no al gen rd.

El equipo de Grell aisló más mutantes carentes de actividad ADH inyectando metanosulfonato de etilo (EMS) a machos y cruzándolos con moscas portadoras de la delección citada para a continuación estudiar, en cada descendiente de este cruce, la presencia o ausencia de actividad ADH. Se trata de un método extremadamente laborioso puesto que es preciso analizar bioquímicamente miles de individuos para detectar cada mutante ADH<sup>-</sup>.

Grell y colaboradores demostraron que los mutantes carentes de actividad ADH son más sensibles al etanol que las moscas silvestres, lo que les permitió mejorar su sistema de aislar mutantes ADH<sup>-</sup>: toda la descendencia de los machos tratados con el agente mutagénico es puesta en presencia de etanol al 15% y si mueren algunas moscas normalmente es porque el macho progenitor lleva la mutación deseada.

Aunque ya a partir de los trabajos de Grell y colaboradores se dispuso de mutantes carentes de actividad ADH en Drosophila melanogaster, el estudio de la base genética de la síntesis de dicha enzima mejoró notablemente con la aplicación por Sofer y Hatkoff (1972) de la técnica de Megnet a Drosophila melanogaster. Sofer y Hatkoff demostraron que concentraciones de 1-penteno-3-ol que matan a las moscas silvestres no afectan a los mutantes ADH<sup>-</sup> de Grell y colaboradores; luego, aislaron doce mutantes carentes de actividad ADH entre catorce supervivientes al tratamiento con 1-penteno-3-ol de 10<sup>5</sup> moscas descendientes de otras mutagenizadas con EMS.

Los trabajos citados hubieran fracasado si las moscas carentes de actividad ADH no hubieran resultado ser viables y fértiles. La mera existencia de los mutantes carentes de actividad ADH descritos demuestra que dicha actividad enzimática, al menos en determinadas circunstancias ambientales, no es indispensable para la vida. Ya hemos señalado que las moscas carentes de actividad ADH son hipersensibles al efecto tóxico del etanol; Vigue y Sofer (1976) aprovecharon ese hecho para aislar revertientes dotados de actividad ADH criando, en presencia de etanol, los descendientes del cruce entre homocigotos ADH<sup>-</sup> portadores de diferentes alelos del gen Adh; Vigue y Sofer concluyeron que la selección con etanol debe servir tanto para estudiar la recombinación intragénica en el locus Adh como para aislar revertientes producidos por mutación en dicho locus.

El disponer de métodos de selección positiva y negativa para el sistema de la ADH ha permitido analizar en profundidad tanto la estructura del gen Adh como la regulación de su expresión.

durante el desarrollo de la mosca varía la expresión del gen Adh (Ursprung et al., 1970): la actividad ADH se detecta en el primer estadio larval, sube durante el desarrollo de la larva, decrece en la pupa y vuelve a subir tras la eclosión, alcanzando el máximo de actividad entre los cinco y diez días tras la eclosión. Aunque es una proteína abundante, constituyendo el 1% del total de las proteínas del adulto, no se encuentra en todos los tejidos del individuo, faltando por ejemplo en los ovarios, testículos y glándulas salivares. Los métodos genéticos de selección de mutantes han permitido identificar tanto el gen estructural como ciertos elementos genéticos reguladores de dicho gen, de los que algunos actúan sólo en "cis" y otros tanto en "cis" como en "trans" (Thompson et al., 1977; McDonald y Ayala, 1978). La secuencia completa de aminoácidos del polipéptido que dimeriza para formar la ADH fue publicada por Thatcher (1980). En ese año Goldberg aisló el gen estructural de la ADH de Drosophila melanogaster mediante el siguiente protocolo: aisló la población de moléculas de ARN del tipo silvestre, preparó ADNc marcado radiactivamente a partir de dicha población con ayuda de la polimerasa de ADN dependiente de ARN, y reanilló la población de ADNc así lograda con fragmentos de ADN de Drosophila melanogaster portados por el fago  $\lambda$ . El ADNc proveniente de estirpes de Drosophila melanogaster portadoras en homocigosis de la delección que incluye el gen Adh no reanilló con los clones del fago portadores del gen de la ADH de la mosca, lo que permitió aislar dichos clones. Goldberg obtuvo además una parte de la secuencia del gen Adh describiendo la presencia de dos intrones en dicho gen. Finalmente, Benyajati et al. (1981) publicaron la secuencia completa de nucleótidos del gen Adh.

#### Estudios en la levadura del pan

La levadura del pan, Saccharomyces cerevisiae, posee tres isoenzimas con actividad ADH; una de ellas, aunque codificada por un gen nuclear, se encuentra en las mitocondrias; las otras, en el citoplasma, siendo una constitutiva y la otra reprimible por glucosa. La enzima citoplásmica constitutiva interviene en la fermentación etanólica, permitiendo regenerar el  $\text{NAD}^+$  consumido en la glicolisis. La enzima citoplásmica reprimible por glucosa interviene en el catabolismo respiratorio del etanol.

En 1968 Lutstorf y Megnet, mediante la técnica del alcohol alílico, aislaron mutantes de levadura carentes de alguna de las dos isoenzimas citoplásmicas y demostraron que dichas isoenzimas están determinadas por genes distintos. En 1972 Cummings demostró que dichos genes no están ligados. Ciriacy (1975a) aisló mutantes de levadura carentes de actividad ADH constitutiva cultivando las

células en presencia de glucosa y de alílico (1 mM) y demostró, por recombinación y complementación, que todos ellos están afectados en el mismo gen, al que denominó adc. A partir de los mutantes adc, aisló mutantes carentes de actividad ADH reprimible por glucosa como supervivientes a alcohol alílico 10 mM cuando las células se cultivan en glicerol como fuente de carbono; dichos mutantes fueron denominados adr. A partir de los dobles mutantes adc adr, Ciriacy aisló mutantes carentes de actividad ADH mitocondrial como resistentes a alcohol alílico 50 mM.

El mismo Ciriacy (1975b) demostró que el gen adr2 determina la estructura de la ADH reprimible por glucosa mientras que el gen adr1 regula la síntesis de dicha isoenzima y que ambos genes no están ligados.

Las estirpes adc-adm-adr1-ADR2 crecen mal en condiciones aeróbicas con glucosa como fuente de carbono y no crecen en anaerobiosis. Ciriacy (1976) aprovechó este fenómeno para aislar mutantes con una regulación alterada de la enzima reprimible por glucosa como estirpes, con el genotipo indicado, que crezcan bien en aerobiosis, con glucosa como única fuente de carbono. Aisló así mutantes en un tercer gen, el adr3, cuyo alelo mutante determina síntesis constitutiva de la isoenzima normalmente reprimible por glucosa, tanto sobre un fondo adr1 como ADR1. El gen ADR3 actúa únicamente en "cis" respecto del ADR2, al cual está estrechamente ligado. Como resumen de todos estos trabajos, Ciriacy concluyó que el gen ADR1 determina la síntesis de un factor necesario para la expresión del gen ADR2 y que el gen ADR3 sería el promotor del gen ADR2. Ciriacy (1979) confirmó dicha hipótesis aislando mutantes del gen ADR1 que expresan constitutivamente el gen ADR2.

No todos los trabajos sobre las isoenzimas ADH de Saccharomyces cerevisiae han sido realizados por Ciriacy. En 1975, Wills y Phelps aislaron mutantes de Saccharomyces cerevisiae con la isoenzima constitutiva alterada. Partiendo de estirpes "petites" que carecen de ADH mitocondrial y buscando mutantes resistentes a alcohol alílico, dichos autores aislaron estirpes con la isoenzima constitutiva capaz de catalizar la conversión de acetaldehído en etanol, pero que no ataca al alcohol alílico. Wills (1976a y 1976b) aisló un nuevo tipo de mutantes de levadura resistentes a alcohol alílico: estirpes que no están alteradas aparentemente en ninguno de los genes que controlan la isoenzima ADH pero que por tener alterada la proporción  $NAD^+/NADH$  resisten la acción tóxica de dicho alcohol.

Las secuencias de aminoácidos de las isoenzimas citoplásmicas con actividad ADH fueron publicadas en 1979 por Wills y Jörnvall; las secuencias difieren en quince posiciones de doscientas ochenta y cuatro, mostrando, por tanto, una clara homología.

Utilizando el plásmido YRp7, que lleva el alelo funcional del gen TRP1 y es capaz de replicarse autónomamente en la levadura, Williamson et al. (1980) construyeron una genoteca de Saccharomyces portada por dicho plásmido. Utilizando como aceptor una estirpe de levadura auxótrofa para triptófano y carente de la isoenzima ADH constitutiva, aislaron plásmidos portadores del gen ADC, cuya secuencia parcial de nucleótidos ha sido publicada por dichos autores.

#### Estudios en el maíz

El tercer organismo al que se ha aplicado con éxito la técnica del alcohol alílico es el maíz, Zea mays. En el maíz hay dos genes no ligados que determinan sendas isoenzimas con actividad ADH (Freeling y Schwartz, 1973). En la raíz primaria, la actividad de ambas isoenzimas se ve notablemente incrementada por la ausencia de oxígeno (Freeling, 1974); en cambio, el polen maduro y el escutelo del embrión durmiente sólo expresan una de las dos isoenzimas, la llamada ADH1. Freeling (1976) diseñó un procedimiento de tinción "in vivo" de la actividad deshidrogenasa del alcohol en granos de polen de maíz.

El alcohol alílico mata selectivamente los gametofitos dotados de actividad ADH, no anulando la viabilidad y fertilidad de los eventuales granos de polen ADH<sup>-</sup> presentes en la muestra (Schwartz y Osterman, 1976; Cheng y Freeling, 1976). Se han aislado mutantes carentes o subproductores de ADH1 mutagenizando con rayos X, en la planta, células maduras de polen, sometiendo el polen recolectado a vapores de alcohol alílico y utilizando la muestra así tratada para fertilizar (Freeling y Cheng, 1978). Por este método se han aislado mutantes portadores de pequeñas deleciones que incluyen el gen estructural de la enzima ADH1 y mutantes reguladores que controlan la expresión de dicho gen; no se han aislado aún mutantes alterados en la secuencia de nucleótidos del gen estructural.

#### Estudios en bacterias

Bajo condiciones anaeróbicas, la bacteria Escherichia coli lleva a cabo la fermentación etanólica (Dawes y Foster, 1956),

convirtiendo el acetyl-CoA en etanol. En el tipo silvestre, las dos enzimas implicadas se sintetizan únicamente en anaerobiosis; se han aislado mutantes desreprimidos (adhC) en los cuales ambas enzimas se producen durante el crecimiento aerobio (Clark y Cronan, 1980a y b). El tipo silvestre puede crecer en presencia de alcohol alílico siempre que haya oxígeno suficiente, pero es sensible a dicho alcohol en ausencia de oxígeno. Los mutantes adhC son sensibles al alcohol alílico tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Lorowitz y Clark (1982) obtuvieron mutantes espontáneos resistentes a alcohol alílico a partir de una estirpe adhC. Estos mutantes carecen tanto de actividad deshidrogenasa del alcohol como de deshidrogenasa del acetaldehído. Los mismos autores aislaron mutantes con resistencia termosensible al alcohol alílico mutagenizando con EMS una estirpe silvestre. La actividad deshidrogenasa del alcohol de estos mutantes resultó ser termosensible, así como, en algunos de ellos, la actividad deshidrogenasa del acetaldehído. Tanto los mutantes no termosensibles como los termosensibles resistentes a alílico mapean en el mismo sitio, definiendo el gen adhE, muy próximo al gen adhC. En resumen, que el locus adh de E.coli contiene un sitio de control "cis" dominante responsable de la represión aeróbica de las dos enzimas citadas, el llamado locus adhC, y el gen estructural de la deshidrogenasa del alcohol, que de alguna manera también interviene en la determinación de la actividad deshidrogenasa del acetaldehído.

#### Resumen

De todo lo dicho sobre la deshidrogenasa del alcohol se puede concluir que:

- se pueden aislar mutantes afectados específicamente en la síntesis o regulación de la deshidrogenasa del alcohol utilizando alcohol alílico;
- el empleo de dicha técnica ha sido muy eficaz en los cuatro sistemas a los que se ha aplicado hasta ahora;
- puesto que Phycomyces posee actividad ADH, el método del alcohol alílico debería también ser eficaz aplicado a este organismo.

MATERIALES Y METODOS

## ESTIRPES

### Homocariontes

Las estirpes silvestres del género Phycomyces utilizadas en esta tesis están en la tabla 2; las estirpes mutantes de Phycomyces blakesleeanus que no han sido aisladas por nosotros en la tabla 3; las obtenidas por nosotros en la tabla 4.

En todos los casos se ha empleado la nomenclatura genética propuesta por Demerec et al. (1966). Las estirpes se designan con una letra mayúscula que indica el laboratorio donde fueron obtenidas, seguida de un número de aislamiento. Estas letras son A, Departamento de Genética, Universidad de Salamanca; B, Max Planck Institute für Molekulare Genetik, Berlin; C, California Institute of Technology, California; H, University of California, Santa Cruz (California); L, Department of Physics, Syracuse University, Syracuse (New York); S, Departamento de Genética, Universidad de Sevilla.

Los genotipos se indican mediante tres letras minúsculas que hacen referencia al tipo de mutación, seguidas de una letra mayúscula que indica el gen y de un número que indica el alelo. Las mutaciones car afectan a la síntesis de carotenoides; mad, al fototropismo; nic, a la síntesis de nicotinamida; lys, a la síntesis de lisina; dar, a la resistencia a 5-deazariboflavina; adh, a la resistencia a alcohol alílico. El tipo sexual se indica con el signo (+) o (-).

El origen de cada estirpe se indica dando la estirpe original y el mutágeno utilizado para obtenerla ("NG"= N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina; "UV"= luz ultravioleta; "Esp"= espontáneo) o bien las estirpes parentales separadas por el signo "x" para indicar cruzamiento sexual.

TABLA 2. Estirpes silvestres de Phycomyces utilizadas en esta tesis.

Estirpe	Especie	Sexo	Aislada por
CBS149.24	<u>nitens</u>	(+)	
CBS188.27	<u>blakesleeanus</u>	(+)	Blakeslee
NRRL1555	<u>blakesleeanus</u>	(-)	
Indoh1522	?		H. Indoh
S271	?		Bandoni



TABLA 3. Mutantes de Phycomyces blakesleeanus utilizados en esta tesis aislados por otros autores.

Estirpe	Genotipo	Origen
A87	<u>lysA401</u> (-)	NRRL1555, UV
B36	<u>nicA101</u> (+)	C269xS102
C2	<u>carA5</u> (-)	NRRL1555, NG
C5	<u>carB10</u> <u>geo-10</u> (-)	NRRL1555, NG
C9	<u>carR21</u> (-)	NRRL1555, NG
C21	<u>madA7</u> (-)	NRRL1555, NG
C68	<u>madD59</u> (-)	NRRL1555, NG
C109	<u>madB101</u> (-)	NRRL1555, NG
C149	<u>madD120</u> (-)	NRRL1555, NG
C171	<u>carA30</u> <u>carR21</u> (-)	C9, NG
L51	<u>madA7</u> <u>madB103</u> (-)	C303xC21
L72	<u>madA7</u> <u>madB103</u> <u>madC119</u> (-)	L2xL51
S276	<u>carS42</u> (+)	C242x(C115*S102)
S283	<u>carA5</u> <u>carS42</u> <u>nicA101</u> (-)	C242x(C115*S102)
S343	<u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)	S265, Esp

TABLA 4. Mutantes de Phycomyces blakesleeianus aislados por nosotros.

Estirpe	Genotipo	Origen
S291	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-)	A87, ICR-170
S292	<u>adh-2</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)	S343, NG
S293	<u>adh-3</u> <u>lysA401</u> (-)	A87, NG
S294	<u>adh-4</u> <u>lys401</u> (-)	A87, NG
S295	<u>adh-5</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)	S343, NG
S296	<u>adh-6</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)	S343, NG
S297	<u>adh-7</u> <u>nicA101</u> (+)	B36, ICR-170
S298	<u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+)	B36, NG
S299	<u>adh-9</u> <u>nicA101</u> (+)	B36, NG
S300	<u>adh-10</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)	S343, NG
S313	<u>adh-11</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)	S343, NG
S314	<u>adh-12</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)	S343, NG
S315	<u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-)	A87, NG
S316	<u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+)	B36, ICR-170
S317	<u>adh-15</u> <u>carR21</u> (-)	C9, NG

cont. TABLA 4.

---

Estirpe	Genotipo	Origen
S318	<u>adh-16</u> <u>carR21</u> (-)	C9, NG
S319	<u>adh-17</u> <u>carR21</u> (-)	C9, NG
S371	<u>adh-33</u> (-)	NRRL1555, NG
S381	<u>adh-21</u> <u>lysA401</u> (-)	A87, ICR-170
S382	<u>adh-22</u> <u>lysA401</u> (-)	A87, ICR-170
S383	<u>adh-23</u> <u>lysA401</u> (-)	A87, ICR-170
S384	<u>adh-24</u> <u>lysA401</u> (-)	A87, ICR-170
S385	<u>adh-25</u> <u>lysA401</u> (-)	A87, NG
S386	<u>adh-26</u> <u>lysA401</u> (-)	A87, NG
S387	<u>adh-27</u> <u>nicA101</u> (+)	B36, ICR-170
S388	<u>adh-28</u> <u>nicA101</u> (+)	B36, ICR-170
S389	<u>adh-29</u> <u>nicA101</u> (+)	B36, ICR-170
S390	<u>adh-30</u> <u>nicA101</u> (+)	B36, NG
S391	<u>adh-31</u> <u>nicA101</u> (+)	B36, NG
S392	<u>adh-32</u> <u>nicA101</u> (+)	B36, NG

---

## Heterocariontes

Los heterocariontes intrasexuales se obtuvieron por el método microquirúrgico de Ootaki (1973). Los heterocariontes intersexuales se obtuvieron mediante una modificación del método de Gauger et al. (1980), consistente en cultivar juntos dos micelios de distinto sexo portadores de auxotrofías complementarias y transplantar la cigosporas jóvenes a medio mínimo; los micelios que logran crecer en medio mínimo son obviamente heterocariontes protótrofos.

En este trabajo sólo se han utilizado heterocariontes obtenidos por nosotros; dichos heterocariontes figuran en la tabla 5, en la que los genotipos de las estirpes en heterocariosis están separados por un asterisco.

---

TABLA 5. Heterocariontes de Phycomyces blakesleeanus utilizados en esta tesis.

---

Heterocarionte	Genotipo
A87*B36	<u>lysA401</u> (-) * <u>nicA101</u> (+)
A87*S297	<u>lysA401</u> (-) * <u>adh-7</u> <u>nicA101</u> (+)
A87*S298	<u>lysA401</u> (-) * <u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+)
A87*S299	<u>lysA401</u> (-) * <u>adh-9</u> <u>nicA101</u> (+)
A87*S316	<u>lysA401</u> (-) * <u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+)
A87*S387	<u>lysA401</u> (-) * <u>adh-27</u> <u>nicA101</u> (+)
A87*S388	<u>lysA401</u> (-) * <u>adh-28</u> <u>nicA101</u> (+)
A87*S389	<u>lysA401</u> (-) * <u>adh-29</u> <u>nicA101</u> (+)
A87*S390	<u>lysA401</u> (-) * <u>adh-30</u> <u>nicA101</u> (+)

---

Heterocarionte Genotipo

A87*S391	<u>lysA401</u> (-) * <u>adh-31</u> <u>nicA101</u> (+)
A87*S392	<u>lysA401</u> (-) * <u>adh-32</u> <u>nicA101</u> (+)
B36*S291	<u>nicA101</u> (+) * <u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-)
B36*S293	<u>nicA101</u> (+) * <u>adh-3</u> <u>lysA401</u> (-)
B36*S294	<u>nicA101</u> (+) * <u>adh-4</u> <u>lysA401</u> (-)
B36*S315	<u>nicA101</u> (+) * <u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-)
B36*S381	<u>nicA101</u> (+) * <u>adh-21</u> <u>lysA401</u> (-)
B36*S382	<u>nicA101</u> (+) * <u>adh-22</u> <u>lysA401</u> (-)
B36*S383	<u>nicA101</u> (+) * <u>adh-23</u> <u>lysA401</u> (-)
B36*S384	<u>nicA101</u> (+) * <u>adh-24</u> <u>lysA401</u> (-)
B36*S385	<u>nicA101</u> (+) * <u>adh-25</u> <u>lysA401</u> (-)
B36*S386	<u>nicA101</u> (+) * <u>adh-26</u> <u>lysA401</u> (-)
C9*S292	<u>carR21</u> (-) * <u>adh-2</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)
C9*S295	<u>carR21</u> (-) * <u>adh-5</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)
C9*S296	<u>carR21</u> (-) * <u>adh-6</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)
C9*S300	<u>carR21</u> (-) * <u>adh-10</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)
C9*S313	<u>carR21</u> (-) * <u>adh-11</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)
C9*S314	<u>carR21</u> (-) * <u>adh-12</u> <u>carB10</u> <u>dar-54</u> <u>dar-55</u> <u>geo-10</u> (-)

cont. TABLA 5.

---

Heterocarionte	Genotipo
S291*S297	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-7</u> <u>nicA101</u> (+)
S291*S298	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+)
S291*S299	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-9</u> <u>nicA101</u> (+)
S291*S316	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+)
S291*S387	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-27</u> <u>nicA101</u> (+)
S291*S388	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-28</u> <u>nicA101</u> (+)
S291*S389	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-29</u> <u>nicA101</u> (+)
S291*S390	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-30</u> <u>nicA101</u> (+)
S291*S391	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-31</u> <u>nicA101</u> (+)
S291*S392	<u>adh-1</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-32</u> <u>nicA101</u> (+)
S293*S298	<u>adh-3</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+)
S293*S316	<u>adh-3</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+)
S294*S298	<u>adh-4</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+)
S294*S316	<u>adh-4</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+)
S297*S315	<u>adh-7</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-)
S298*S315	<u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-)
S298*S381	<u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-21</u> <u>lysA401</u> (-)
S298*S382	<u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-22</u> <u>lysA401</u> (-)

cont. TABLA 5.

---

Heterocarionte	Genotipo
S298*S383	<u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-23</u> <u>lysA401</u> (-)
S298*S384	<u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-24</u> <u>lysA401</u> (-)
S298*S385	<u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-25</u> <u>lysA401</u> (-)
S298*S386	<u>adh-8</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-26</u> <u>lysA401</u> (-)
S299*S315	<u>adh-9</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-)
S315*S316	<u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+)
S315*S387	<u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-27</u> <u>nicA101</u> (+)
S315*S388	<u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-28</u> <u>nicA101</u> (+)
S315*S389	<u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-29</u> <u>nicA101</u> (+)
S315*S390	<u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-30</u> <u>nicA101</u> (+)
S315*S391	<u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-31</u> <u>nicA101</u> (+)
S315*S392	<u>adh-13</u> <u>lysA401</u> (-) * <u>adh-32</u> <u>nicA101</u> (+)
S316*S381	<u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-21</u> <u>lysA401</u> (-)
S316*S382	<u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-22</u> <u>lysA401</u> (-)
S316*S383	<u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-23</u> <u>lysA401</u> (-)
S316*S384	<u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-24</u> <u>lysA401</u> (-)
S316*S385	<u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-25</u> <u>lysA401</u> (-)
S316*S386	<u>adh-14</u> <u>nicA101</u> (+) * <u>adh-26</u> <u>lysA401</u> (-)

---

## METODOS DE CULTIVO

### Medios de cultivo

Normalmente se utilizó el medio mínimo Sutter IV (SIV) (Sutter, 1975) que contiene glucosa, sales minerales y asparragina en lugar de glutamina.

El medio SIV se suplementó, en algunos casos, con algunas de las siguientes sustancias: extracto de levadura (0.1%); nicotinamida (1 mg/l); lisina (200 mg/l); acetato de retinol emulsificado con dimetilsulfóxido (0.2%) y etanol (0.2%) a una concentración final de 200 mg/l o difenilamina disuelta en etanol (0.1%) a una concentración final de 75  $\mu$ M. El extracto de levadura se añadió antes de autoclavar el medio; los demás productos se añadieron después de autoclavar el medio, siendo la lisina y la nicotinamida esterilizadas por filtración.

Para el aislamiento de mutantes adh, el medio SIV se suplementó con alcohol alílico (2-propen-1-ol) a una concentración final de 50 mM. En algunos experimentos se empleó medio SIV suplementado con acroleína (2-propen-1-al) a una concentración final comprendida entre 1-100  $\mu$ M.

Para lograr crecimiento colonial se acidificó el medio a pH=3.3 mediante una solución al 20% de ClH en agua.

Los medios descritos son líquidos; cuando fue necesario se empleó medio sólido añadiendo agar (1.5%).

### Condiciones de cultivo

El medio sólido se echó en cajas de plástico transparente de 8.5 cm de diámetro a razón de 25 ml de medio por caja. Las cajas se mantuvieron bajo iluminación continua en una cámara a 22°C.

El medio líquido se distribuyó en matraces de Erlenmeyer de vidrio transparente de 250 ml tapados con algodón, a razón de 100 ml de medio por matraz. Los matraces se sometieron a una agitación continua de 30 rpm en un agitador orbital inclinado, bajo iluminación constante de 0.15  $Wm^{-2}$  de luz blanca (equivalente a 0.05  $Wm^{-2}$  de luz azul, medida con un filtro 5-61, Corning Glassworks, Corning, N.Y.) o en la oscuridad, en ambos casos en una cámara a 22°C.



Los cultivos en medio líquido se iniciaron inoculando 50.000 esporas viables por mililitro, activadas por calor durante 15 minutos a 48°C (Rudolph, 1960).

Los cultivos en medio sólido se iniciaron bien inoculando un número adecuado de esporas viables previamente activadas como en el caso anterior, bien trasplantando con unas pinzas estériles un trozo de un micelio preexistente.

## MUTAGENESIS

### Inducción de mutaciones

Las mutaciones se indujeron tratando con NG o ICR-170 esporas activadas por calor.

En el primer caso, se añadió 0.1 ml de una solución conteniendo 1 mg/ml de NG a una suspensión de  $10^7$  esporas activadas por calor en 1 ml de tampón citrato-fosfato a pH=7.5 (Gomori, 1955). Las esporas se mantuvieron en contacto con el mutágeno durante 15 minutos, en oscuridad y agitación continua. A continuación el mutágeno se eliminó lavando y resuspendiendo varias veces las esporas con agua estéril.

Para la mutagénesis con ICR-170 se siguió un protocolo semejante excepto que la concentración final de mutágeno en la suspensión de esporas fue de 20 µg/ml, que se empleó tampón fosfato pH=7.5 0.1 M y que el contacto entre las esporas y el mutágeno duró cuatro horas.

### Aislamiento de mutantes resistentes a alcohol alílico

Las esporas tratadas con uno u otro mutágeno se sembraron en medio sólido sin alílico a razón de  $10^5$  esporas por caja y se hicieron diluciones oportunas para determinar la supervivencia al tratamiento mutagénico. Las esporas provenientes de los micelios originados al germinar las esporas mutagenizadas se recolectaron en agua estéril, se lavaron varias veces y se sembraron en medio con alcohol alílico a razón de  $10^5$  esporas por caja. Los micelios que crecieron en el medio selectivo se transplantaron a medio de nuevo selectivo para comprobar el fenotipo; las esporas provenientes de los micelios resistentes se sembraron en medio selectivo y un micelio proveniente de cada una de las cajas iniciales sembradas con esporas mutagenizadas se aisló para experimentos posteriores (Figura 6).

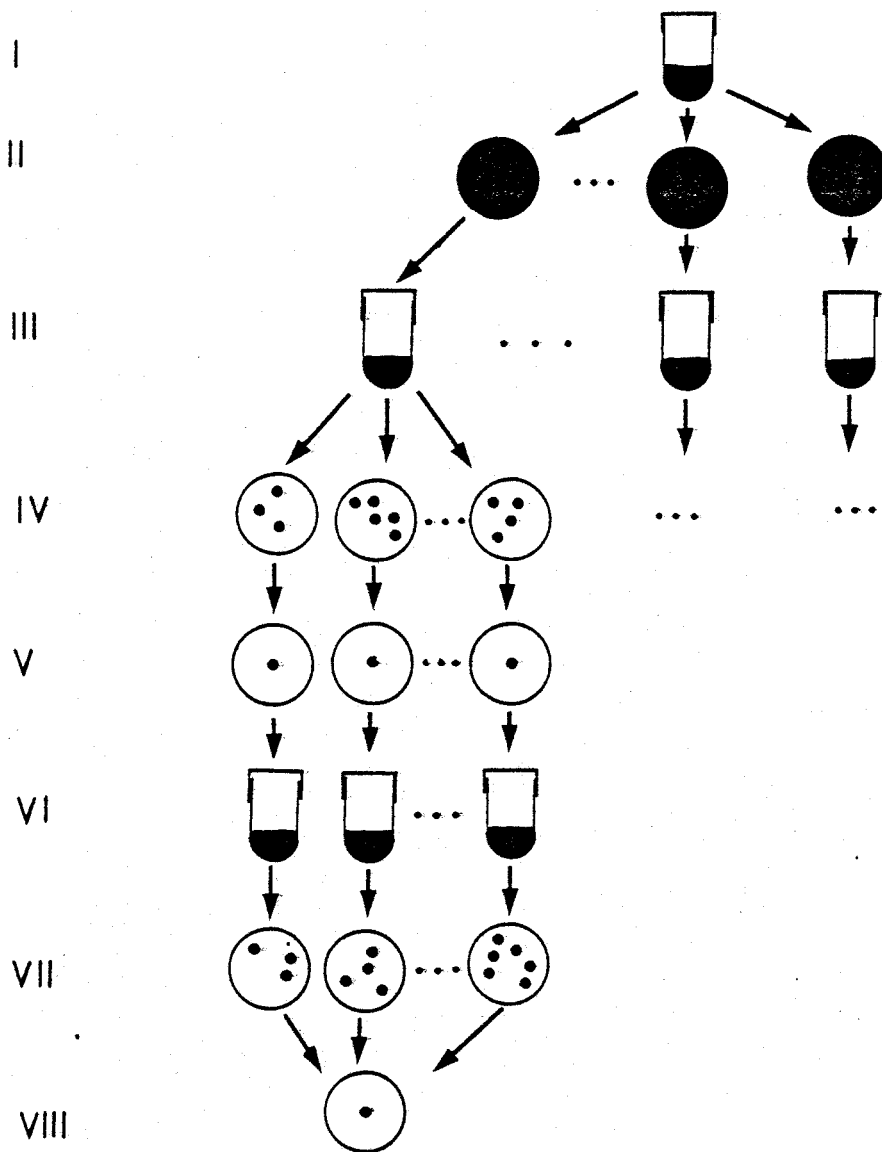


FIGURA 6. Esquema del método de aislamiento de mutantes *adh*.

El método consta de las siguientes etapas: I, mutagénesis de las esporas iniciales; II, siembra de las esporas mutagenizadas en medio no selectivo (cajas de reciclado); III, recolección de las esporas de las cajas de reciclado, las esporas de diferentes cajas de reciclado no se mezclan; IV, inoculación de las esporas recicladas en medio selectivo; V, trasplante de un micelio de cada una de las cajas de la colección proveniente de una caja de reciclado determinada a una caja con medio selectivo; VI, recolección de esporas provenientes de los micelios individuales del paso anterior; VII, inoculación en medio selectivo de las esporas aisladas en el paso anterior; VIII, trasplante de un único micelio por caja de reciclado a medio selectivo, este micelio se conserva para estudios posteriores.

## LA DESHIDROGENASA DEL ALCOHOL

### Medida espectrofotométrica de la actividad enzimática

Los micelios cultivados en medio líquido durante de 1 a 4 días, en oscuridad o luz, se recogen sobre papel de filtro y se lavan bien con agua destilada; a continuación se trituran por maceración a 4°C en un mortero con arena de mar lavada con ácido y calcinada; la pasta resultante se suspende en tampón fosfato 0.1 M, pH=7.5, al cual se ha añadido 2-mercaptoetanol a una concentración final de 1 mM. La suspensión se centrifuga a 30000 g durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se pasa a través de un papel de filtro, recogándose así el llamado "extracto crudo". Dicho extracto crudo se emplea para medir la actividad enzimática del modo que a continuación describimos.

La actividad enzimática se midió a 25°C, en un espectrofotómetro tipo Spectronic 2000, por el incremento de absorbencia a 340 nm debida a la formación de NADPH en la mezcla de reacción. La cubeta de control lleva 0.9 ml de tampón glicina-pirofosfato 0.1 M, pH=8.3, 50 µl de una solución de NADP<sup>+</sup> en agua destilada para lograr una concentración final en la cubeta de 2 mM, 50 µl de agua y 50 µl de extracto crudo en su propio tampón. La cubeta de reacción lleva lo mismo que la de control, excepto que no lleva los 50 µl de agua y lleva 50 µl de etanol para lograr una concentración final de 0.8 M. En caso de que la actividad enzimática presente en el extracto crudo sea tan alta que dificulte la medida, se realizan las diluciones pertinentes de dicho extracto en tampón fosfato pH=7.5 0.1 M. La actividad total máxima admisible en el ensayo fue de 100 nmoles de NADP<sup>+</sup> reducido por minuto (1 nmol de NADP<sup>+</sup> reducido por minuto es una miliunidad de enzima).

La concentración de proteína se midió por el método de Lowry et al. (1951). La actividad específica se da como el número de miliunidades de enzima (miliU.E.) por miligramo de proteína presente en el extracto crudo.

### Purificación parcial de la deshidrogenasa del alcohol

Los extractos crudos descritos en el parágrafo anterior constituyen una mezcla compleja de biomoléculas y, por tanto, las medidas de actividad enzimática en dichos extractos crudos pueden sufrir una gran variabilidad incontrolable. Para mejorar la regularidad de las medidas y para aumentar la actividad específica de las muestras, hemos puesto a punto un método de purificación

parcial de la deshidrogenasa del alcohol.

Un volumen de extracto crudo preparado como se describió anteriormente se mezcla con entre 0.8 y 1.2 volúmenes de acetona y la mezcla se mantiene a 0°C durante treinta minutos para a continuación centrifugarla a 5000 rpm durante veinte minutos. El sobrenadante se descarta y el precipitado se resuspende en medio volumen de tampón fosfato 0.1 M pH=7.5 y se centrifuga a 5000 rpm durante veinte minutos. Se recoge el sobrenadante y se utiliza para medir la actividad enzimática según el protocolo descrito en el apartado anterior.

La tabla 6 da los resultados de mezclar un extracto crudo inicial proveniente de la estirpe C5, que exhibió una actividad de 215 miliU.E. y una concentración de proteína de 2.12 mg/ml, lo que da una actividad específica de 101 miliU.E. por miligramo de proteína, de mezclar, decimos, dicho extracto con los volúmenes de acetona que se indican.

TABLA 6. Actividad ADH tras purificación parcial con acetona.

Acetona	Actividad enzimática		Concentración de proteína		Actividad específica	
	%		%		%	
0.8	15	7	0.09	4.2	167	165
0.9	125	58	0.12	5.7	1042	1032
1.0	145	67	0.17	8.0	853	845
1.1	148	69	0.20	9.4	740	733
1.2	152	71	0.22	10.4	691	684

En la primera columna se da la proporción de volúmenes de acetona respecto a volumen de extracto empleado en la purificación; en la segunda la actividad enzimática en miliU.E. y el % que dicha actividad representa frente a la del extracto crudo; en la tercera columna se da la concentración de proteína en mg/ml y el % que representa respecto a la inicial; en la cuarta columna se da la actividad enzimática específica en miliU.E. por miligramo de proteína y su % respecto a la actividad específica del extracto crudo.

Como puede observarse, el incremento de actividad específica es máximo cuando se emplea 0.9 volúmenes de acetona por cada volumen de extracto crudo; no obstante, puesto que el rendimiento de la purificación decrece rápidamente si se emplean volúmenes inferiores de acetona, hemos preferido utilizar el mismo volumen de acetona que de extracto crudo como método normal de trabajo. Con dicho método se logra aumentar al menos ocho veces la actividad específica de la muestra de ensayo y se hacen más repetibles las determinaciones de actividad.

Las actividades específicas en el extracto crudo y en el precipitado con acetona son proporcionales, como puede observarse en las figuras 7 y 8, donde representamos las actividades específicas de cultivos en luz y oscuridad de las estirpes C109 y C149 antes y después de la purificación parcial con acetona.

#### Actividad enzimática en presencia de etanol o dimetilsulfóxido

En algunos experimentos se añadió al medio de cultivo etanol (para solubilizar difenilamina) o etanol y DMSO (para solubilizar acetato de retinol); en consecuencia hemos creído necesario comprobar que dichos solventes no ejercen por sí mismos efectos importantes sobre la actividad específica de la ADH.

En la tabla 7 se da la actividad específica de la ADH en medios sin etanol ni DMSO, con uno u otro de dichos productos o con ambos, a una concentración del 0.2% de cada producto en todos los casos. Como puede apreciarse en dicha tabla, el etanol y el DMSO producen un ligero incremento de la actividad específica de la ADH. No obstante, dicho incremento es despreciable frente a las variaciones de actividad ADH que describiremos en Resultados.

---

TABLA 7. Actividad específica ADH en la estirpe NRRL1555 cultivada con etanol o DMSO.

---

Actividad ADH			
Control	DMSO	Etanol	Etanol+DMSO
30	35		80
60		90	110

---

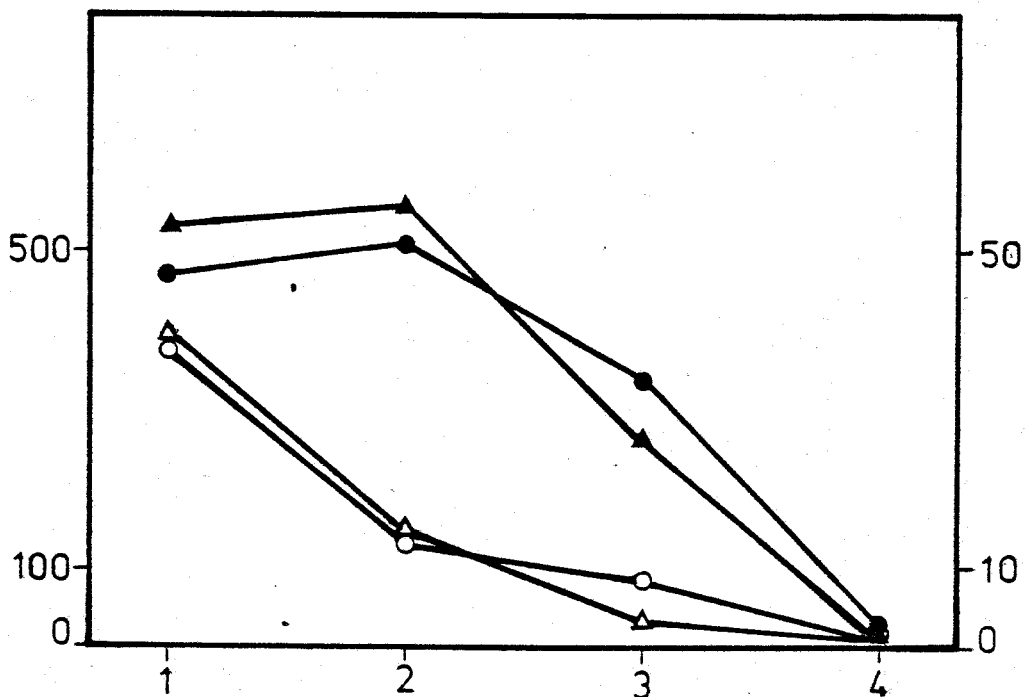


FIGURA 7. Actividad ADH antes y después de la purificación parcial con acetona en la estirpe C109.

En el eje vertical se da la actividad ADH en miliU.E. por mg de proteína; a la izquierda la del extracto purificado con acetona y a la derecha la del extracto crudo. En el eje horizontal el tiempo en días. Los símbolos llenos indican cultivos en oscuridad; los vacíos, en luz. Los círculos se refieren a los extractos purificados con acetona; los triángulos, a los extractos crudos.

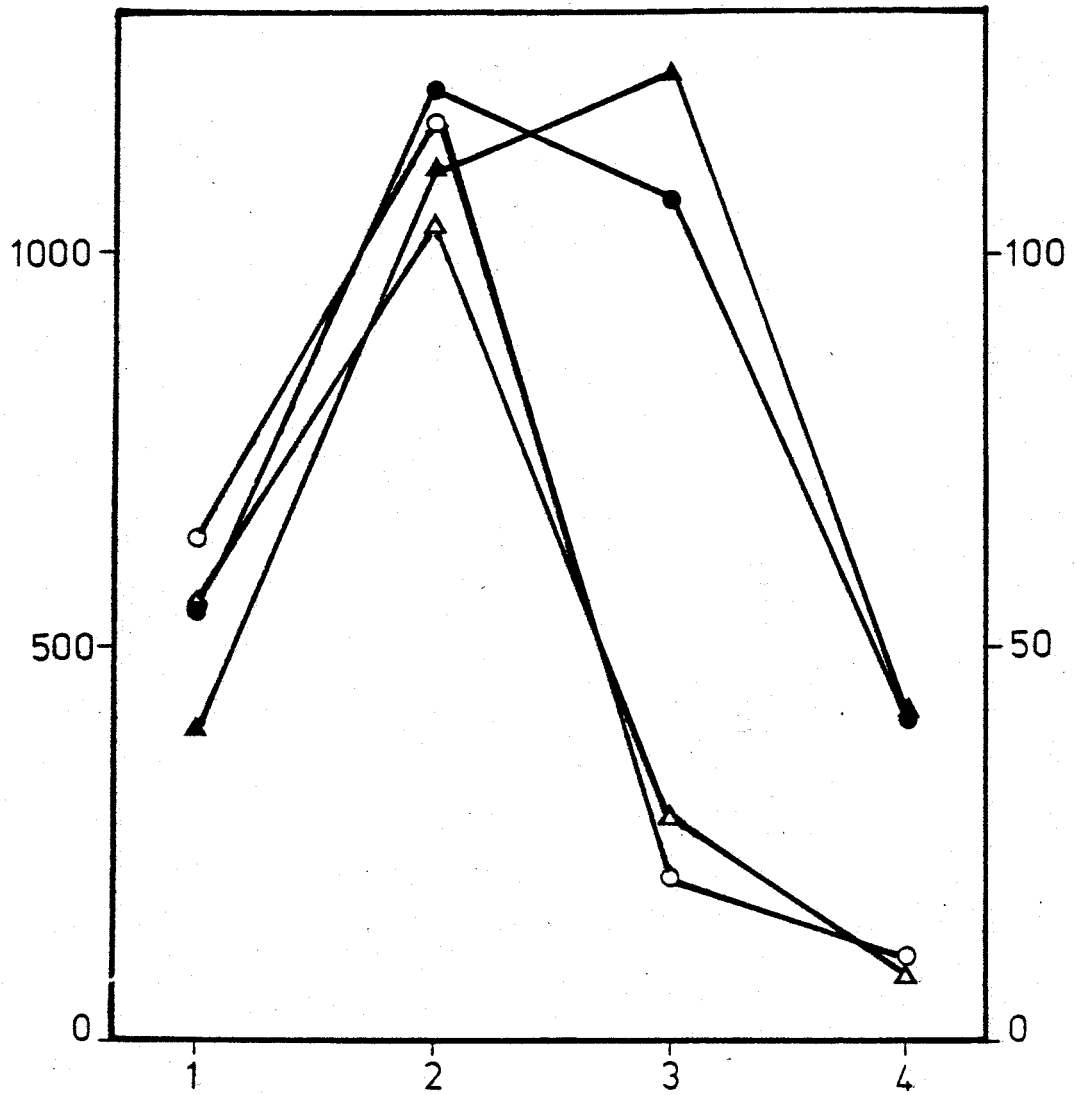


FIGURA 8. Actividad ADH antes y después de la purificación parcial con acetona en la estirpe C149.

Esta figura se interpreta como la figura 7.

## Métodos electroforéticos

Para identificar los electromorfos con actividad ADH se partió de micelios cultivados durante 62 horas, de los cuales se obtuvieron extractos purificados parcialmente con acetona, puesto que en ensayos previos con extractos crudos se detectaron variaciones incontrolables de la movilidad electroforética de la ADH, debidas probablemente a la presencia de fragmentos de membranas o moléculas lipídicas en el extracto; en los heterocariontes estudiados para detectar complementación y durante la comprobación del fenotipo ADH<sup>-</sup> se emplearon extractos crudos.

La electroforesis se realizó, según modificación del método de Hartz et al. (1978), en placa vertical conteniendo un gradiente del 6 al 16% de poliacrilamida, precedido de un gel espaciador al 4%. El gel se preparó mezclando ClH-histidina, 0.029 M, concentración final; TEMED 0.03% (v/v) concentración final y glicerol 20% (v/v) concentración final y ajustando la mezcla a pH=9 con NaOH 1 M. Se utilizó persulfato amónico para acelerar la polimerización de la acrilamida. El tampón del electrodo contiene ácido bórico a una concentración final de 0.03 M ajustado a pH=9 con 1 M de NaOH. Las dimensiones del gel son 0.15 cm de grosor, 13.5 cm desde el borde izquierdo al derecho y 10.5 cm desde el extremo de origen al extremo final del gel. La intensidad de corriente en la placa fue de 20 mA. Se utilizó azul de bromofenol para reconocer el frente de migración. Los posibles electromorfos con actividad ADH se tiñeron por inmersión del gel en una solución con 50 ml de tampón glicina-pirofosfato 0.1 M pH=8.3, y, disueltos en agua, los siguientes productos; 2 ml de nitrobluetetrazolium (NBT) a 54 mg/ml, 0.5 ml de metasulfato de fenazina (PMS) a 3 mg/ml, 0.6 ml de Tween-80 al 10% (Worsfold et al., 1977), NADP<sup>+</sup> a una concentración final de 1 mM y 2 ml de etanol.

La tinción de proteínas se llevó a cabo por inmersión del gel en una solución de ácido perclórico en agua a una concentración de 35 g/l a la que se le añade azul de Coomassie G250 hasta una concentración final de 0.2 g/l; esta solución se mantiene en agitación durante una hora y se pasa primero a través de un papel de filtro y después a través de un filtro Millipore número de catálogo HAWP29325, según una modificación del método de Reisner et al. (1975).

## Concentración de glucosa en el medio de cultivo

La glucosa remanente en el medio de cultivo, después de crecer en él durante 1, 2, 3 ó 4 días la estirpe correspondiente, se midió enzimáticamente con un analizador de glucosa marca Yellow Springs Instrument, modelo 27.



RESULTADOS Y DISCUSION

## REGULACION POR LUZ DE LA DESHIDROGENASA DEL ALCOHOL

### Generalidades

Como ya señalamos en la introducción, autores precedentes han demostrado que el metabolismo de Phycomyces varía de la luz a la oscuridad. Concretamente, el metabolismo del piruvato hacia lactato es más intenso en micelios cultivados en oscuridad que en luz. Puesto que la ADH puede intervenir en la conversión de piruvato en etanol, nosotros hemos investigado si también esta ruta metabólica depende de las condiciones de iluminación. Para ello hemos medido la actividad específica de la ADH en micelios cultivados en la oscuridad o bajo iluminación constante de  $0.15 \text{ Wm}^{-2}$  de luz blanca durante 1, 2, 3 ó 4 días.

En estos experimentos se estudió simultáneamente la cinética de consumo de glucosa en la luz y en la oscuridad.

### Fotorrepresión de la ADH en el tipo silvestre

Los resultados referentes a la estirpe NRRL1555 están en la figura 9. Los valores del nivel de ADH de los micelios cultivados a la oscuridad son claramente mayores que los correspondientes valores de los micelios cultivados a la luz. Nosotros hemos denominado a esta nueva fotorrespuesta de Phycomyces como "fotorrepresión de la ADH", sin que esta denominación prejuzgue el mecanismo molecular por el que llega a establecerse la diferencia entre los valores a la luz y a la oscuridad.

En la figura 9 también se observa que, tanto a la luz como a la oscuridad, la actividad específica ADH decrece desde el segundo al cuarto día; otros datos no presentados aquí demuestran que la actividad ADH se anula, tanto a la luz como a la oscuridad, a partir del quinto día de cultivo.

La dependencia del nivel de ADH con el tiempo de cultivo es diferente en la luz que en la oscuridad: los micelios cultivados sin luz presentan un máximo de la actividad específica entre el primer y tercer día, máximo ausente en los cultivos iluminados. Puesto que en las esporas sólo se detectan trazas de actividad ADH (datos no publicados), sospechamos que en los micelios iluminados se alcanza un máximo de actividad entre las cero y veinticuatro horas de cultivo. Es posible que el retraso en alcanzar el máximo de los cultivos en la oscuridad respecto a los de la luz esté relacionado con el hecho de que en la oscuridad hay mucha más actividad ADH que en la luz.

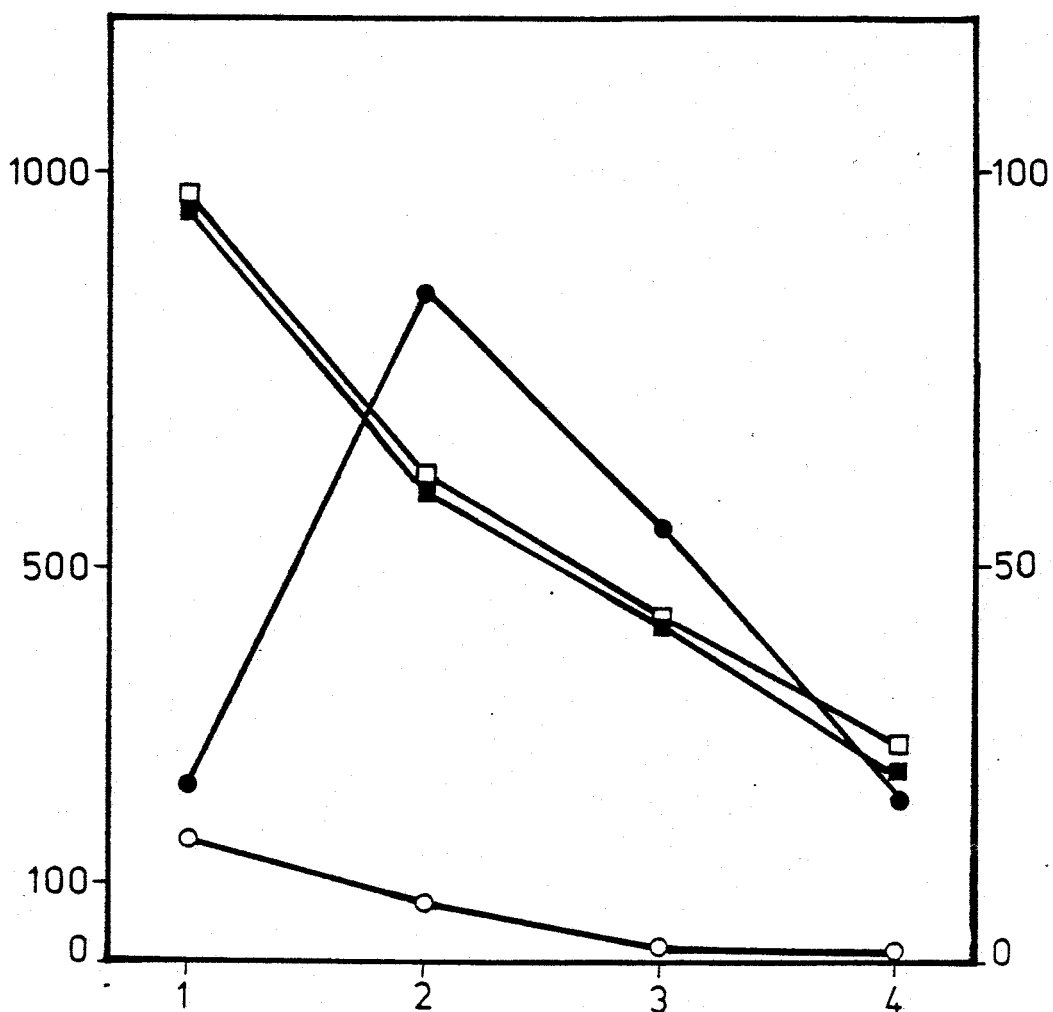


FIGURA 9. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe NRRL1555.

En el eje vertical izquierdo, la actividad ADH en miliU.E. por mg de proteína. En el eje vertical derecho el % de la concentración de glucosa inicial que queda en el medio de cultivo. En el eje horizontal el tiempo en días. Los símbolos llenos se refieren a los cultivos en la oscuridad; los vacíos, a los cultivos iluminados. Los cuadrados se refieren a la concentración de glucosa en el medio; los círculos a la actividad ADH.

No concedemos gran importancia a la forma exacta del perfil temporal de la actividad ADH en luz y en oscuridad; la determinación de la forma exacta del perfil temporal de la actividad ADH exigiría medir dicha actividad a intervalos temporales mucho más cortos a los empleados en este trabajo (cada dos horas por ejemplo).

La cinética de consumo de glucosa es la misma a la luz que a la oscuridad.

#### Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C149

La estirpe C149 (madD120) exhibe un fenotipo anormal para varias fotorrespuestas diferentes. Fue aislada por Bergman et al. (1973) sembrando esporas activadas por calor en medio normal y añadiendo, tras 48 horas de crecimiento NG a la caja de cultivo; las esporas provenientes de los micelios que crecieron en la caja se trataron con una dosis de rayos X que permitió una supervivencia de alrededor del 10%. Se trató, por tanto, de un fuerte procedimiento mutagénico y no sería sorprendente que C149 fuera portador de varias mutaciones diferentes.

En pruebas fototrópicas la estirpe C149 fue la única entre las 25 estirpes mutantes analizadas por Bergman et al. (1973) que no respondió en absoluto a la luz en todo el rango de intensidades luminosas probados; en consecuencia, carece de sentido hablar para el fototropismo de esta estirpe de intensidad luminosa umbral.

Sin embargo la estirpe C149 no es completamente insensible a la luz, puesto que exhibe una fotocarotenogénesis y una fotoforogénesis que Bergman y colaboradores juzgaron normales.

Como la estirpe C149 exhibe un geotropismo y un fugotropismo mucho más lentos que los del tipo silvestre, fue incluida por Bergman y colaboradores en la clase fenotípica 2, con otros mutantes presumiblemente afectados en el mecanismo efector de los tropismos.

Según Ootaki et al. (1974), la estirpe C149 está mutada en el gen madD; todos los mutantes hasta ahora analizados en ese gen están incluidos en la clase fenotípica 2.

Jayaram et al. (1980) observaron que la fotocarotenogénesis de la estirpe C149, en condiciones de alto flujo luminoso, (200-3000  $\text{jm}^{-2}$ ) es anormal, ya que, aunque el flujo al que se satura la respuesta es el mismo para la estirpe silvestre que para la estirpe

C149, la respuesta máxima de la estirpe C149, alcanzada a dicho flujo saturante, es sólo el 75% de la respuesta máxima del tipo silvestre. Los datos iniciales de Bergman et al. (1973) fueron que la concentración de  $\beta$ -caroteno del tipo silvestre pasó de 48 ppm en la oscuridad a 571 ppm en la luz, incrementándose en 523 ppm y que, por su parte, la concentración de  $\beta$ -caroteno de la estirpe C149 pasó de 70 ppm en la oscuridad a 461 ppm en la luz, incrementándose en 391 ppm, lo que representa un 75% del incremento de la estirpe silvestre; en este sentido los resultados de Bergman y colaboradores y de Jayaram y colaboradores no son contradictorios.

En los resultados de Bergman et al. se indica únicamente si la estirpe bajo estudio exhibió o no control por luz de la forogénesis, (de ahí que consideraran normal a la estirpe C149). Cuando López-Díaz y Cerdá-Olmedo (1981) analizaron detalladamente la inhibición por luz de la microforogénesis, encontraron que la estirpe C149 produce en la oscuridad un 15% del número de micróforos producidos por la estirpe silvestre y que C149 no produce micróforos a ninguna de las intensidades luminosas estudiadas; así, por ejemplo, a una intensidad  $10^{-10} \text{ Wm}^{-2}$ , inferior al umbral fototrópico silvestre, la estirpe silvestre produjo un 40% del número de micróforos producidos a la oscuridad, mientras que la estirpe C149 no produjo ningún micróforo. De estos resultados puede concluirse que la microforogénesis de la estirpe C149 es totalmente anormal. Desgraciadamente, no se publicaron datos sobre la macroforogénesis de esta estirpe.

Galland y Russo (1979a) estudiaron la fotoforogénesis en mutantes alterados para el fototropismo y descubrieron que en la estirpe silvestre el número de macróforos producidos por el micelio aumenta monótonamente con la intensidad luminosa en el rango de 0 a  $6 \text{ Wm}^{-2}$  (1 minuto de irradiación con luz azul) mientras que en la estirpe C149 el número de macróforos aumenta con la intensidad luminosa en el rango de 0 a  $6 \times 10^{-2} \text{ Wm}^{-2}$  y disminuye al aumentar la intensidad luminosa por encima de dicha intensidad crítica. En resumen que la estirpe C149 exhibe una fotoforogénesis, una fotocarotenogénesis y un fototropismo anormales.

Cohen (1974) publicó que tras la captación de un estímulo luminoso tiene lugar un decrecimiento transitorio del nivel de AMPc en los esporangióforos del tipo silvestre; la concentración baja hasta el 40% de su valor inicial, recuperando dicho valor inicial a los dos minutos tras la estimulación.

Cohen y Atkinson (1978) publicaron que la fosfodiesterasa del AMPc (E.C.3.1.4.17) de Phycomyces se activa con la luz azul, especialmente en presencia de GTP, postulando que dicha enzima interviene en la transducción de la señal luminosa. Según Cohen (1978) la estirpe C149 es anormal en dos sentidos:

- no presenta decrecimiento transitorio de AMPc tras recibir una estimulación por luz y;
- posee una fosfodiesterasa anormal, cuya actividad depende del pH de una forma distinta que la del tipo silvestre, permaneciendo activa a valores de pH superiores a 7.8, a los que la actividad de la del tipo silvestre decrece notablemente.

Los resultados de Cohen han sido criticados desde dos puntos de vista. Leutwiler y Brandt (1982) han comunicado que no observaron variaciones en las concentraciones de AMPc en los esporangióforos de Phycomyces tras la iluminación. Nótese que la fosfodiesterasa de la estirpe C149 puede ser anormal sin que ello implique que la variación de AMPc tras el estímulo luminoso descrita por Cohen sea real. Reddy (1980) realizó un estudio sistemático de la fosfodiesterasa de AMPc en el tipo silvestre y una colección de mutantes mad de Phycomyces, observando que la actividad de dicha enzima es anormalmente baja en la estirpe C21 (madA7); posteriormente Galland y Reddy (1982) demostraron por experimentos de recombinación que la mutación que confiere la actividad fosfodiesterasa anormal a la estirpe C21 va en un gen distinto, el pde, del gen madA; también encontraron que la mutación pde por sí sola no altera el fototropismo, aunque no probaron si altera o no otras fotorrespuestas.

Estos resultados sugieren que también en el caso de la estirpe C149 hay dos mutaciones distintas, una en el gen madD y otra en otro gen, quizás el pde, responsable de la fosfodiesterasa.

Los resultados referentes a la actividad específica ADH en la estirpe C149 están en la figura 10.

La cinética de consumo de glucosa es la misma en la luz que en la oscuridad y similar a la del tipo silvestre.

La actividad ADH de los micelios iluminados es, durante el primer y segundo día de cultivo mucho mayor que los correspondientes valores de la estirpe silvestre. Además, el perfil temporal de la actividad ADH de la estirpe C149 en la luz es claramente diferente al de la estirpe silvestre; mientras que en la

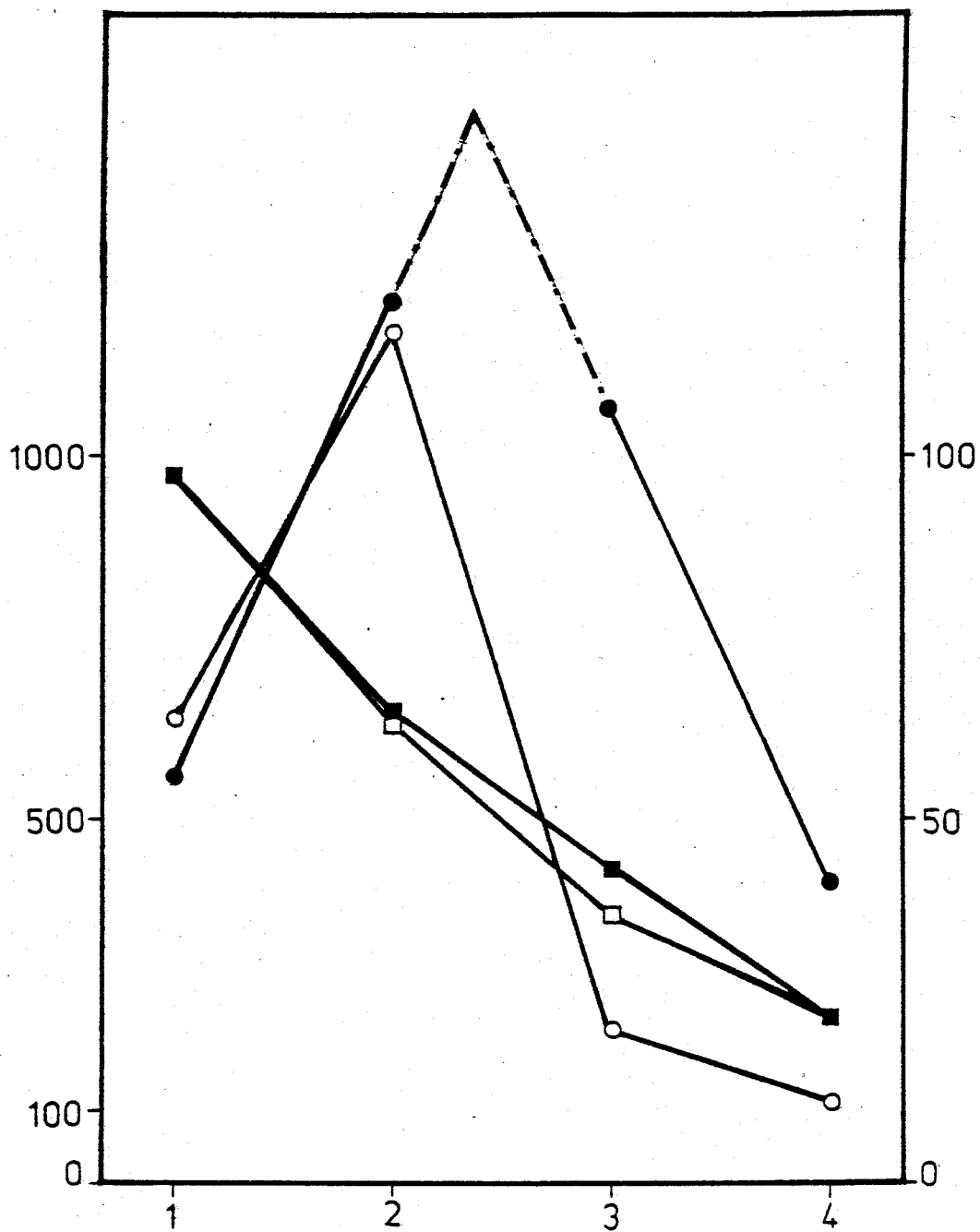


FIGURA 10. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C149.  
 La interpretación es idéntica a la de la figura 9.

estirpe C149 el máximo de actividad se alcanza al segundo día de cultivo en la estirpe silvestre suponemos que se alcanza antes del primer día de cultivo.

Esta diferencia entre el comportamiento a la luz de la estirpe C149 y de la estirpe silvestre puede tener cualquiera de los dos siguientes orígenes:

- que la estirpe C149 tenga una fotorrepresión de la actividad ADH anormal, de modo que se comporte a la luz como el silvestre a la oscuridad;

- que la actividad ADH de la estirpe C149 sea mucho más alta que la del tipo silvestre; en este caso el retraso en alcanzar el máximo a la luz se debería, al igual que hemos postulado para la estirpe silvestre, al propio hecho de que la actividad es mucho más alta.

La actividad ADH de la estirpe C149 a la oscuridad sugiere que la segunda alternativa es la correcta. En efecto, por una parte, en la oscuridad, los valores de la estirpe C149 son mayores que los correspondientes de la estirpe silvestre y, por otra parte, al tercer día de cultivo el valor de la actividad ADH de la estirpe C149 en la oscuridad es mucho mayor que en la luz; este segundo hecho sería inexplicable si la estirpe C149 no respondiera a la luz.

En resumen, postulamos que la estirpe C149 tiene tanto a la luz como a la oscuridad una actividad ADH superior a la del tipo silvestre en esas condiciones, y que la mutación madD no influye en la fotorrepresión de la ADH; para confirmarlo hemos estudiado la actividad ADH en otra estirpe madD constando los resultados en el párrafo siguiente.

Ignoramos si esta alteración de la actividad ADH en la estirpe C149 está relacionada o no con la alteración de su actividad fosfodiesterasa.

#### Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C68

Los resultados referentes a la fotorrepresión de la actividad ADH en la estirpe C68 están en la figura 11. Se observa que la cinética de consumo de glucosa es igual a la luz que a la oscuridad y similar a la del tipo silvestre.

Los valores de la actividad ADH de los micelios cultivados a la oscuridad son, en todos los casos, mayores que los pertinentes valores a la luz, por lo que concluimos que la fotorrepresión de la



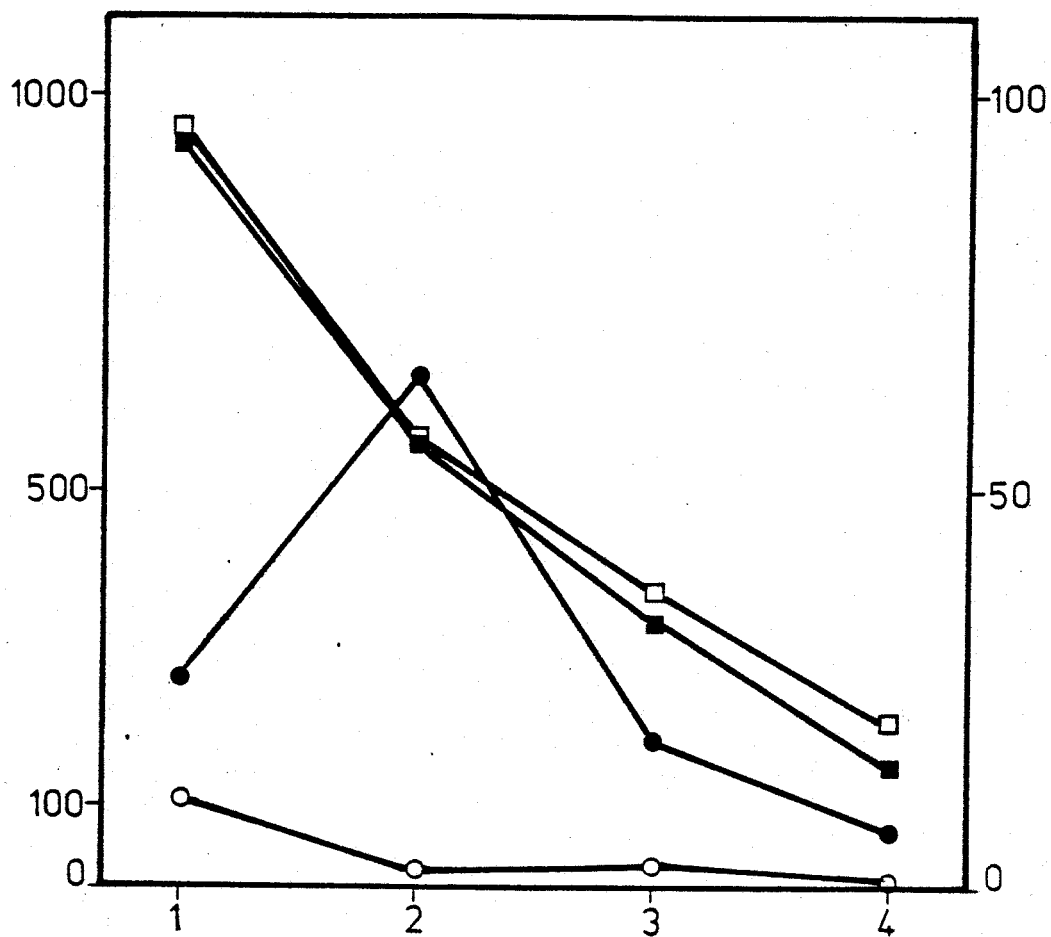


FIGURA 11. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C68.  
 La interpretación es idéntica a la de la figura 9.

actividad ADH es normal en la estirpe C68. En consecuencia parece lógico descartar que la anomalía observada en la estirpe C149 se deba a la mutación madD.

Se ignora si las alteraciones de la fotoforogénesis y fotocarotenogénesis de la estirpe C149 están causadas por su mutación madD; si no fuera así podrían mantenerse los esquemas habituales sobre la transducción sensorial en Phycomyces, en los cuales la salida hacia fotocarotenogénesis y fotoforogénesis es previa a la intervención del producto del gen madD. En este caso, la hipótesis más sencilla sería suponer que la estirpe C149 lleva una segunda mutación que altera simultáneamente varias respuestas distintas del fototropismo, alterado por la mutación madD. Se ignora si esta hipotética segunda mutación es la misma o no que la que origina la alteración de la fosfodiesterasa de C149.

#### Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C109

Según Bergman et al. (1973) la estirpe C109 pertenece a la clase fenotípica 1, presentando fotocarogénesis y fotoforogénesis anormales y un umbral fototrópico mucho mayor que el del tipo silvestre, aunque inferior a la intensidad luminosa empleada en este trabajo.

A la intensidad empleada por nosotros, la estirpe C109 presenta una fotocarotenogénesis reducida (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980) y no se cura de la inhibición de la fotoforogénesis producida por el cultivo en atmósfera cerrada (Galland y Russo, 1979a).

Los resultados referentes a la fotorrepresión de la actividad ADH en la estirpe C109 están en la figura 12.

La cinética de consumo de glucosa es la misma en luz que en oscuridad y similar a la del tipo silvestre.

Los valores de la actividad ADH de los micelios cultivados a la luz son menores que los correspondientes a la oscuridad, lo que sugiere que el gen madB no está implicado en esta fotorrespuesta.

No obstante, no cabe descartar taxativamente que el gen madB no esté implicado en la fotorrepresión de la actividad ADH puesto que pudiera ocurrir que estemos trabajando a una intensidad luminosa mucho mayor que el umbral de esta fotorrespuesta.

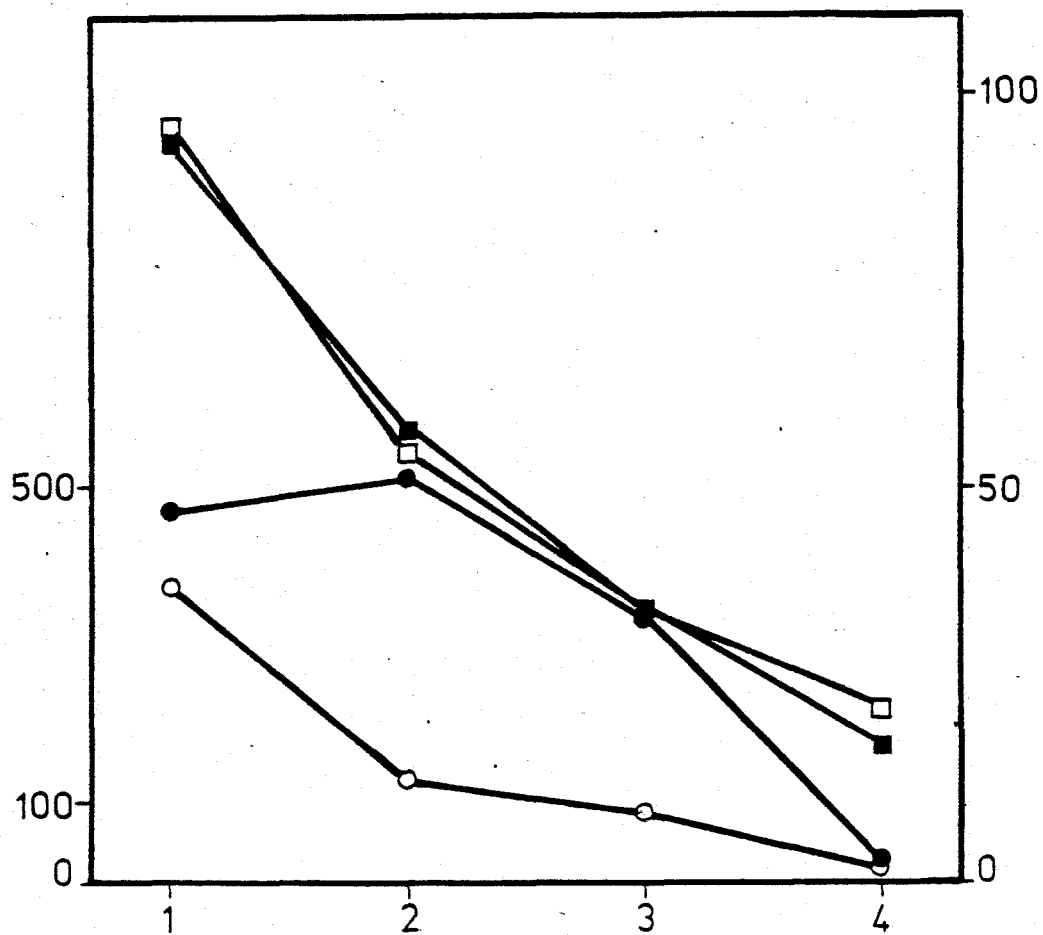


FIGURA 12. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C109.  
 La interpretación es idéntica a la de la figura 9.

Puede observarse que los perfiles temporales de la actividad ADH en los micelios cultivados a la luz y a la oscuridad no son idénticos a los del tipo silvestre; así, la caída de actividad entre el primer y segundo día a la luz es más pronunciada que la del tipo silvestre y el pico de actividad entre el primer y tercer día de cultivo a la oscuridad menos pronunciado que el del tipo silvestre. Creemos, por las razones expuestas en párrafos anteriores, que las diferencias de los detalles de los perfiles temporales de las diversas estirpes mutantes y del tipo silvestre no indican que las mutaciones bajo estudio intervenga en la fotorrepresión de la ADH.

#### Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C21

La estirpe C21 presenta fugotropismo normal pero fototropismo y fotoforogénesis anormales, siendo su umbral fototrópico menor que la intensidad de luz utilizada en este trabajo (Bergman et al., 1973; Ootaki et al., 1974). A  $0.05 \text{ Wm}^{-2}$  de luz azul la estirpe C21 presenta una fotocarotenogénesis (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980; Jayaram et al., 1980), una fotomacroforogénesis y una reversión por luz de la inhibición de la macroforogénesis por atmósfera cerrada reducidas (Galland y Russo, 1979a) pero un fototropismo (Lipson y Terasaka, 1981) y una inhibición por luz de la macroforogénesis normales (López-Díaz y Cerdá-Olmedo, 1980).

Los resultados referentes a la fotorrepresión de la ADH de la estirpe C21 están en la figura 13. La cinética de consumo de glucosa es la misma en luz que en oscuridad y similar a la del tipo silvestre.

Los valores de la actividad ADH de los micelios cultivados a la oscuridad son mayores que los correspondientes valores a la luz.

Estos resultados permiten afirmar que o bien el gen *madA* no está implicado en la fotorrepresión de la ADH, o bien  $0.05 \text{ Wm}^{-2}$  es una intensidad de luz azul muy superior a la intensidad umbral de dicha fotorrespuesta y ya saturante. Puesto que para el fototropismo y la fotomicroforogénesis la segunda alternativa es la correcta, los resultados expuestos en este párrafo no permiten resolver el dilema.

Respecto a la ausencia de un pico prominente de actividad entre el primer y tercer día de cultivo a la oscuridad, valen los comentarios hechos para la estirpe C109.

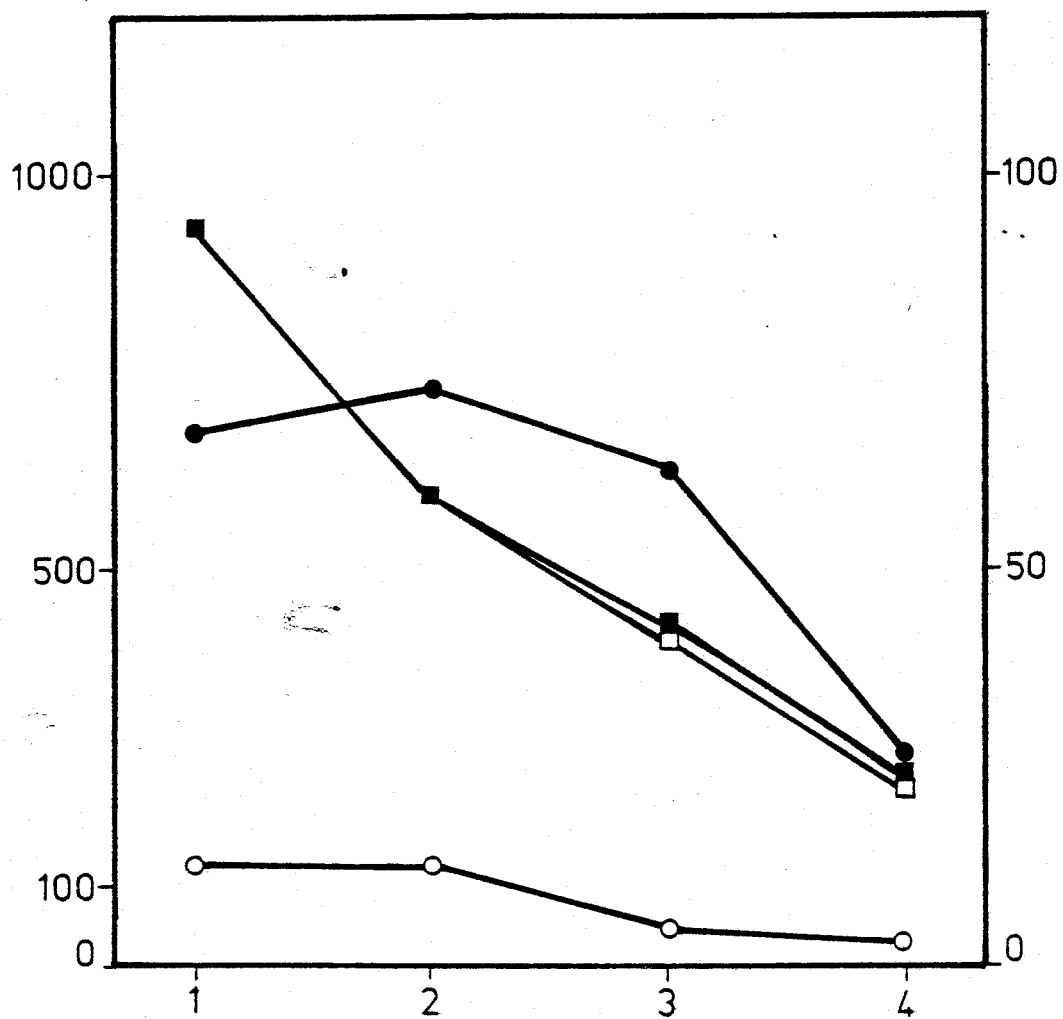


FIGURA 13. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe C21.  
 La interpretación es idéntica a la de la figura 9.

Como ya dijimos, la estirpe C21 lleva la mutación pde-1 que determina una actividad fosfodiesterasa anormalmente baja; dicha mutación no parece ejercer alteraciones importantes en la fotorrepresión de la ADH.

#### Fotorrepresión de la ADH en la estirpe L72

Los genes madA y madB intervienen en todas las fotorrespuestas de Phycomyces conocidas hasta este trabajo.

Lipson et al. (1980) construyeron las 21 combinaciones posibles de dobles mutantes madX madY, (donde X e Y designan dos letras distintas desde la A a la G), y el triple mutante madA madB madC, estirpe L72.

Lipson y Terasaka (1981) estudiaron el fototropismo en los dobles mutantes madX madY y en L72, observando que esta estirpe no da respuesta fototrópica alguna a intensidades de luz azul comprendidas entre 0.001 y 1.6  $Wm^{-2}$ .

Jayaram et al. (1980) estudiaron la fotocarotenogénesis de la estirpe L72, observando una respuesta mucho menor que la del tipo silvestre a una intensidad de luz azul de 0.06  $Wm^{-2}$ .

Los resultados referentes a la fotorrepresión de la actividad ADH en la estirpe L72 sometida a una intensidad de 0.15  $Wm^{-2}$  de luz blanca (equivalente a 0.05  $Wm^{-2}$  de luz azul) están en la figura 14.

Los valores de la actividad ADH de los micelios cultivados a la luz son claramente menores que los correspondientes valores de los micelios cultivados a la oscuridad.

Puesto que estamos trabajando a una intensidad luminosa a la que la estirpe L72 no presenta fototropismo y presenta una fotocarotenogénesis extremadamente reducida, interpretamos nuestros resultados en el sentido de que el sistema mad no está implicado en la fotorrepresión de la ADH.

De confirmarse lo anterior, la fotorrepresión de la ADH sería la primera fotorrespuesta conocida de Phycomyces en la que no intervendría el sistema mad.

La cinética de consumo de glucosa en la estirpe L72 es la misma a la luz que a la oscuridad. La forma de la dependencia del consumo de glucosa con el tiempo de cultivo es similar a la de la

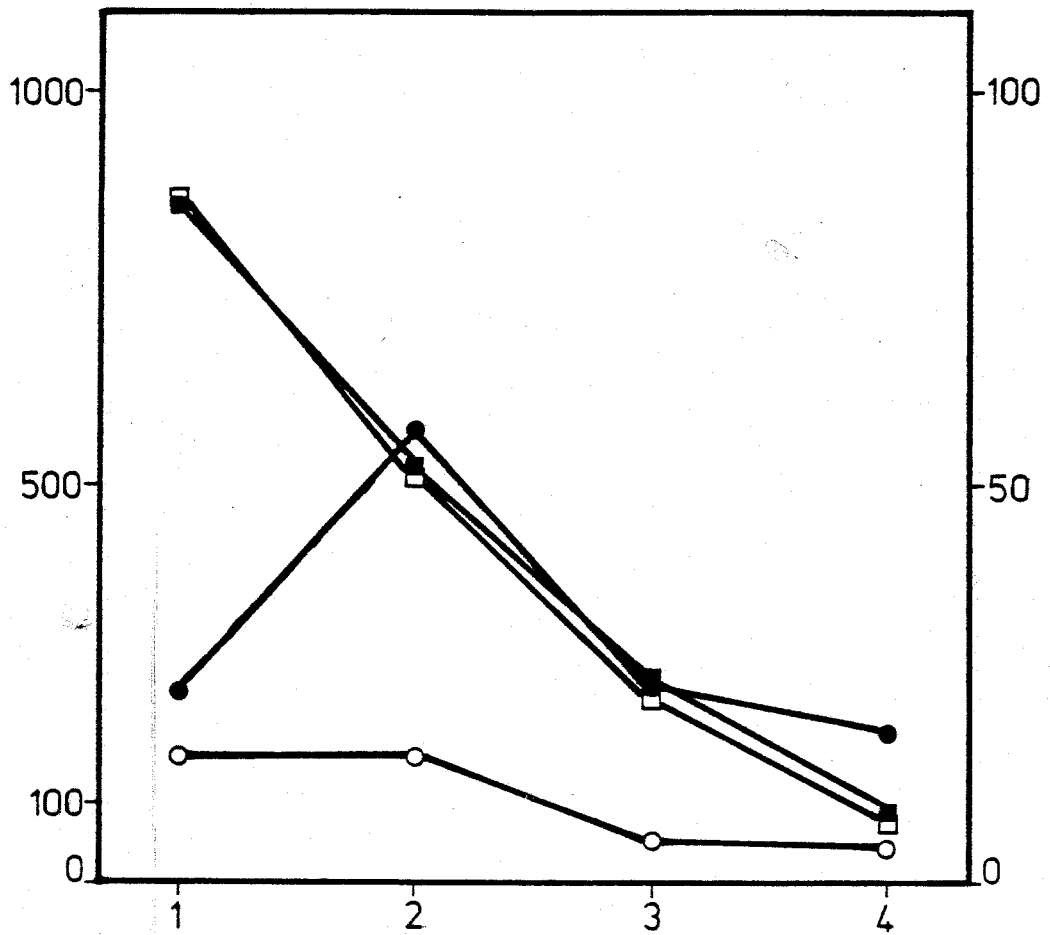


Figura 14. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe L72.  
 La interpretación es idéntica a la de la figura 9.

estirpe silvestre; sin embargo, la estirpe L72 consume la glucosa más rápidamente de lo normal; así mientras que la estirpe silvestre había consumido al segundo día de cultivo el 40% y al tercer día de cultivo el 57% de la glucosa inicial, la estirpe L72 consumió durante los dos primeros días el 50% y durante los tres primeros días el 77% de la glucosa inicial. Ignoramos el posible significado fisiológico de esta aceleración metabólica de la estirpe L72; en cualquier caso, cuando se comparan los resultados referentes al consumo de glucosa con los referentes a la actividad específica ADH, se ve que ambos parámetros fisiológicos no están correlacionados.

#### Fotorrepresión de la ADH en la estirpe L51

La estirpe L51, portadora de las mutaciones madA7 y madB103, (Lipson et al., 1980) exhibe una fotocarotenogénesis y un fototropismo extremadamente reducidos a altas intensidades luminosas (Jayaram et al., 1980; Lipson y Terasaka, 1981).

Los resultados referentes a la fotorrepresión de la ADH para esta estirpe están en la figura 15.

La cinética de consumo de glucosa es la misma en luz que en oscuridad y similar a la del tipo silvestre.

Los valores de la actividad ADH de los micelios cultivados a la luz son menores que los correspondientes a la oscuridad.

Este resultado confirma que los genes madA y madB no están implicados en la fotorrepresión de la ADH.

Puesto que el comportamiento global de la estirpe L51 es muy similar al de la estirpe L72, confirma también que el gen madC no juega ningún papel en la fotorrepresión de la ADH.

La estirpe L51 proviene del cruzamiento de la estirpe C303 con la C21 cuya mutación madA7 conserva; la estirpe L72 proviene del cruzamiento de la L51 con la L2 y también lleva la mutación madA7; tanto en C21 y L51 como en L72, la actividad ADH al segundo día de cultivo en la luz es ligeramente superior que al primer día de cultivo; ignoramos el alcance de esta observación.

Nuestros resultados sobre la influencia de la luz en la actividad ADH concuerdan con los obtenidos por Sandmann y Hilgenberg (1979) y Hilgenberg y Sandmann (1977) sobre variaciones del metabolismo del piruvato con las condiciones de iluminación. Dichos



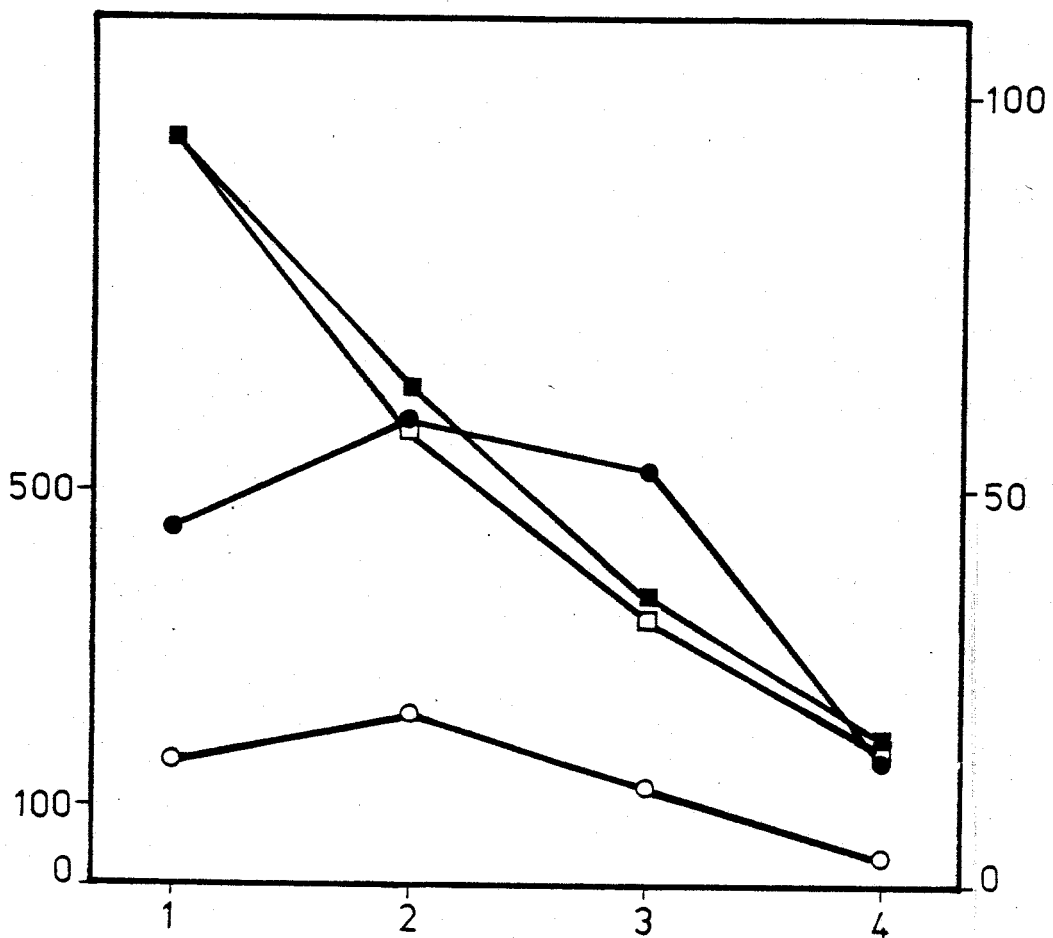


Figura 15. Fotorrepresión de la ADH en la estirpe L51.  
 La interpretación es idéntica a la de la figura 9.

autores han mostrado que en la oscuridad las reacciones que convierten piruvato en lactato y alanina son más activas que en la luz; nuestros resultados indican que en la oscuridad la conversión de piruvato en etanol es asimismo más activa que en la luz.

#### Efecto directo de la luz sobre la ADH

Para comprobar si hay o no una inactivación directa de la ADH por la luz hemos estudiado la actividad total de la ADH en extractos crudos y parcialmente purificados con acetona de micelios de la estirpe L72 tras dos días de cultivo en la oscuridad. Dos extractos de cada tipo se mantuvieron a la oscuridad y otros dos se iluminaron con luz blanca de una intensidad de  $0.6 \text{ Wm}^{-2}$ , determinándose la actividad total ADH a diferentes tiempos tras la obtención del extracto. Los resultados, obtenidos con una intensidad luminosa cuatro veces mayor que la empleada en los experimentos "in vivo", figuran en la tabla 8. Los resultados indican que no hay una inactivación directa de la ADH por la luz, al menos durante las primeras horas de tratamiento. Estos resultados no permiten descartar que, en periodos más largos, la luz no inactive directamente la ADH; en cualquier caso, el perfil temporal de la ADH en la oscuridad es, obviamente, independiente de cualquier posible efecto directo de la luz sobre la enzima, luego la caída que se observa a partir del segundo día de cultivo es fisiológica.

TABLA 8. Influencia directa de la luz sobre la actividad ADH

tiempo	Actividad ADH	
	A	B
0	1	1
0.5	1	
1		1
1.5	1.07	
2.5	1	0.97
3.5	1.09	
4.5		0.98
5.5	0.97	
6.5		0.97

En la primera columna se da el tiempo de exposición del extracto a la luz en horas. En la columna A se da el cociente entre la actividad total ADH al tiempo correspondiente y al tiempo 0 para los extractos crudos y en la columna B lo mismo para los extractos purificados parcialmente con acetona.

## CAROTENOGENESIS Y ADH

Como dijimos en la introducción, algunas mutaciones car ejercen un efecto pleiotrópico sobre diversas fotorrespuestas de Phycomyces, como la fotocarotenogénesis (Revuelta, 1981) y la fotoforogénesis en ambientes cerrados (Galland y Russo, 1979a).

Nosotros hemos investigado si la fotorregulación de la actividad ADH es o no normal en los mutantes car.

### Actividad ADH de las estirpes C5, C9, C2 y C171

Los resultados referentes a las estirpes C5, C9, C2 y C171 se dan en las figuras 17, 18, 19 y 20 respectivamente. Para facilitar la comparación, en la figura 16 está la actividad ADH de la estirpe silvestre representada a la misma escala que la de las figuras 17 a 22.

En todos los casos la cinética de consumo de glucosa es normal en la luz y en la oscuridad.

Los valores de la actividad ADH de los micelios cultivados en la oscuridad son mucho mayores que los correspondientes valores de los micelios iluminados de la misma estirpe.

Concluimos que las mutaciones carB, carR y carA no alteran la fotorrepresión de la ADH.

En los cuatro casos, tanto a la luz como a la oscuridad, los valores de la actividad ADH de las estirpes mutantes son mayores que los correspondientes valores de la estirpe silvestre.

Concluimos que las mutaciones carB, carR y carA ejercen un efecto pleiotrópico sobre la actividad ADH, consistente en incrementar dicha actividad por encima de los valores normales.

La magnitud del incremento de la actividad ADH es menor en la estirpe C9 que en las otras tres. El incremento en el doble mutante carA carR es similar al de la estirpe carA, como si la mutación carR no ejerciera un efecto estimulador adicional sobre la actividad ADH en presencia de la mutación carA.

En los cuatro casos, el perfil temporal de la actividad ADH de los micelios iluminados exhibe un máximo entre el segundo y tercer día. Este hecho concuerda perfectamente con la hipótesis de que el momento en que se alcanza el máximo de actividad depende del

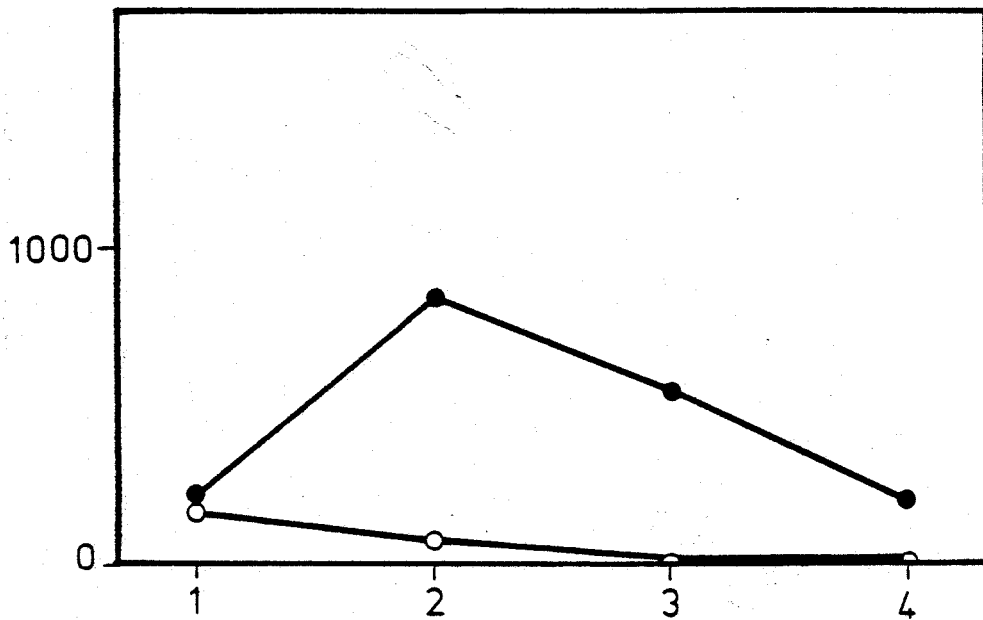


FIGURA 16. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe NRRL1555.  
Se trata de los mismos datos que en la figura 9 representados en nueva escala. En esta figura no están los datos sobre consumo de glucosa.

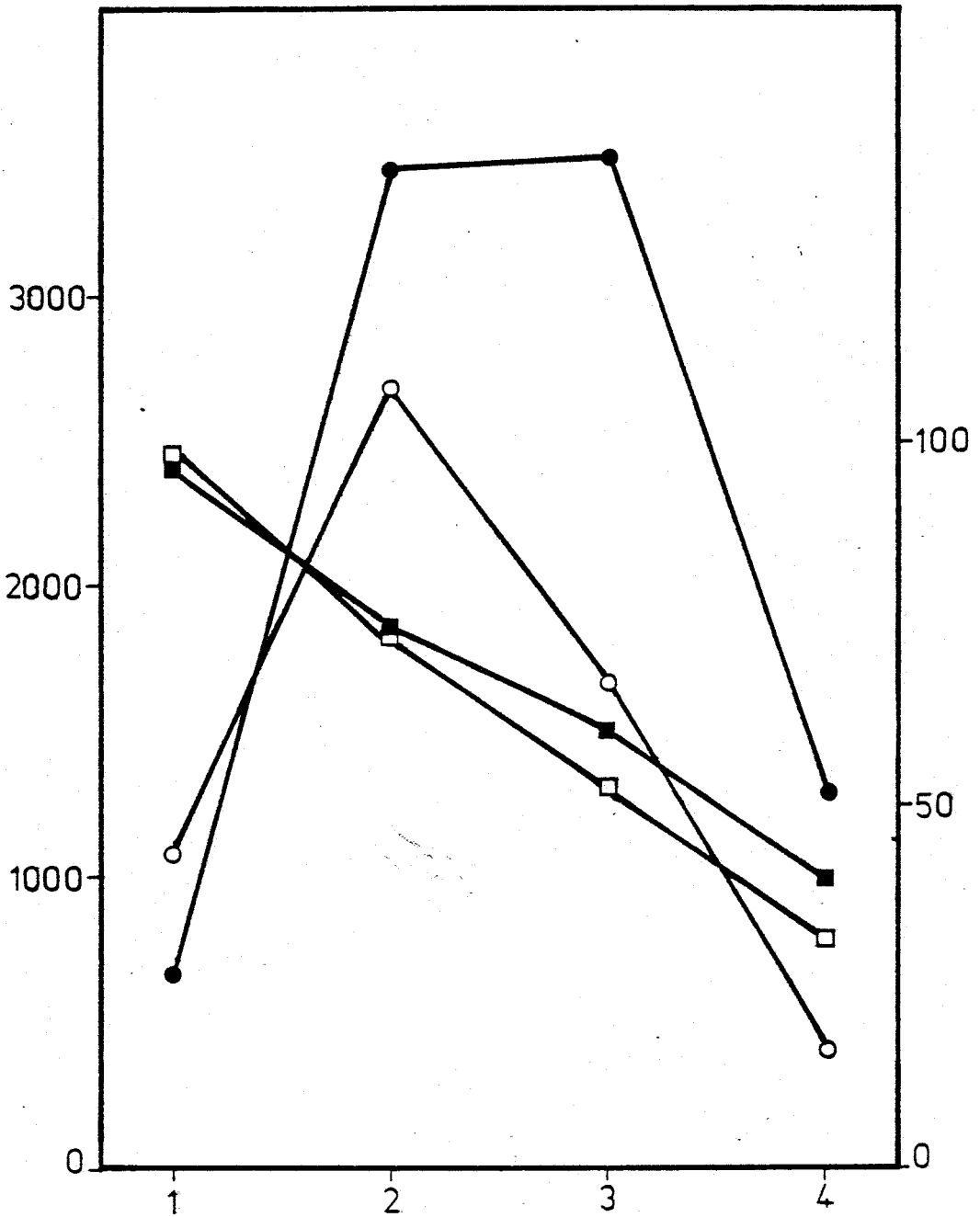


FIGURA 17. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe C5.  
 Esta figura se interpreta de modo idéntico que la figura 9.

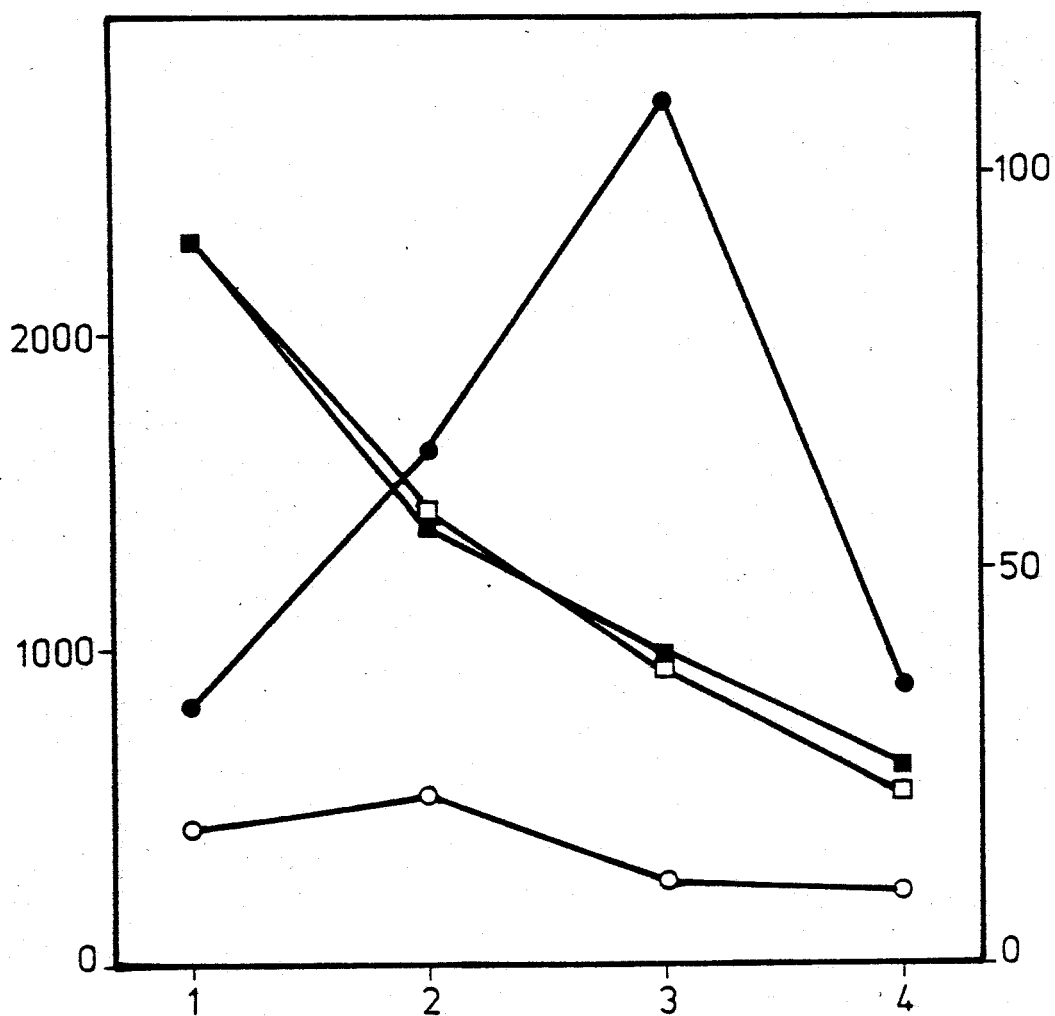


FIGURA 18. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe C9.  
 Esta figura se interpreta de modo idéntico que la figura 9.

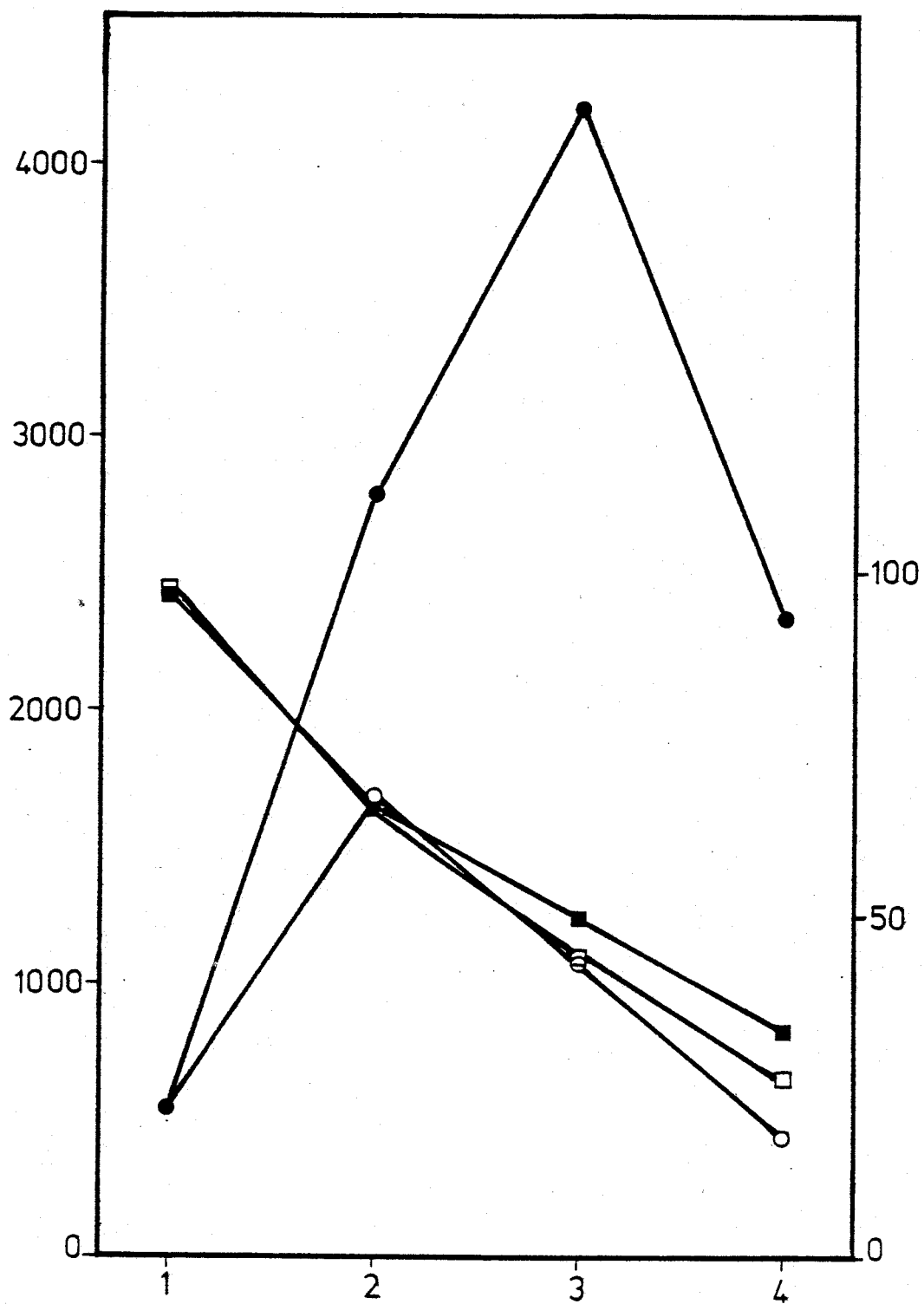


FIGURA 19. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe C2.  
 Esta figura se interpreta de modo idéntico que la figura 9.

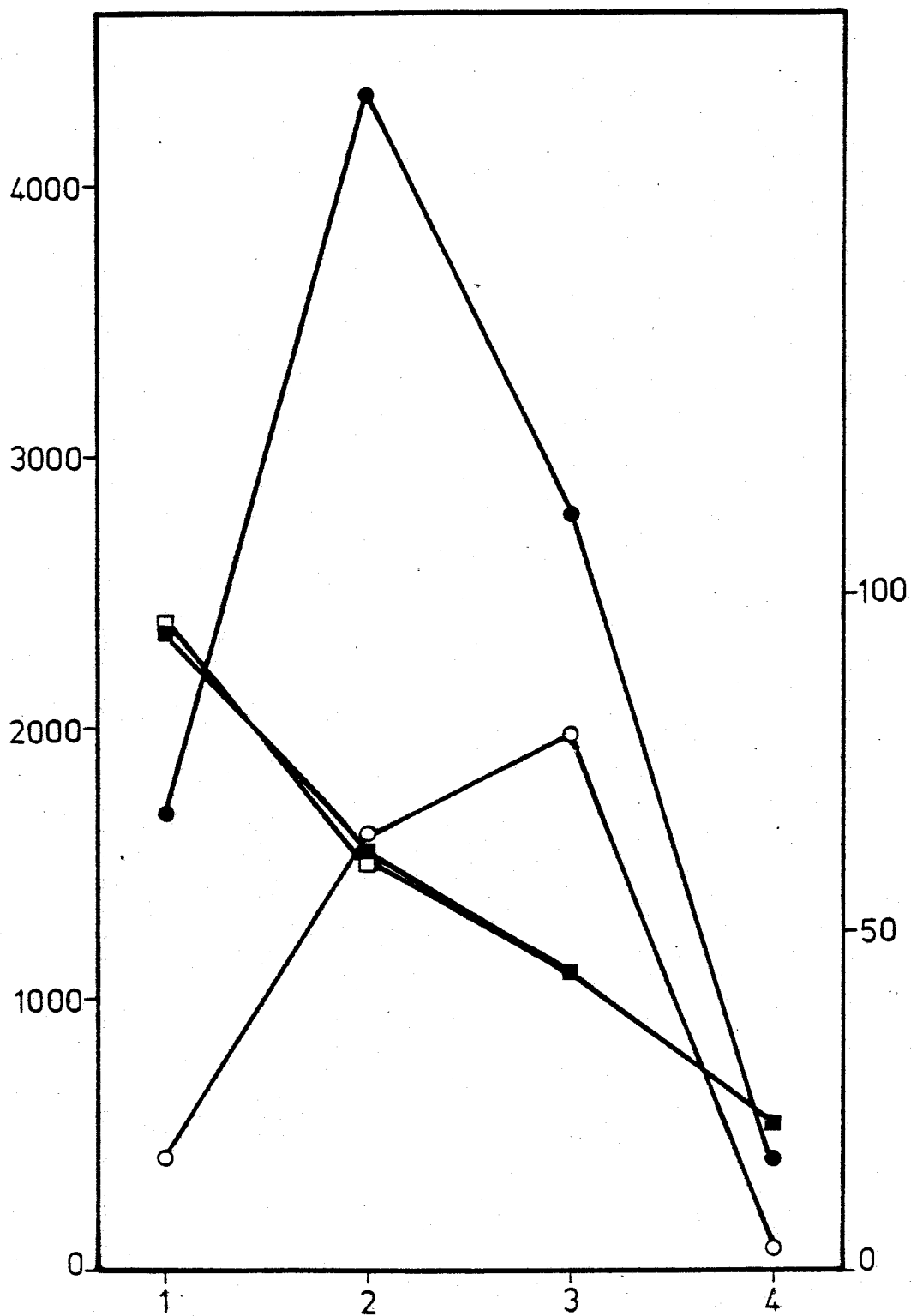


FIGURA 20. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe C171.  
 Esta figura se interpreta de modo idéntico que la figura 9.



valor medio de dicha actividad, alcanzándose más tarde si la actividad global es mayor de lo normal.

#### Actividad ADH de las estirpes S276 y S283

Los resultados referentes a las estirpes S276 y S283 se dan en las figuras 21 y 22 respectivamente.

La estirpe S276 exhibe un comportamiento normal en lo que a consumo de glucosa, fotorrepresión de la ADH, valores globales en luz y oscuridad de la actividad ADH y perfil temporal a la luz de dicha actividad se refiere.

Concluimos que la mutación carS por sí misma no ejerce efecto alguno sobre la actividad ADH ni sobre su fotorregulación.

La estirpe S283 exhibe un consumo de glucosa y una fotorrepresión de la ADH normales, pero sus valores de actividad ADH están incrementados por encima de lo normal, tanto en luz como en oscuridad y su perfil temporal de actividad ADH a la luz es diferente del perfil temporal del tipo silvestre y similar al de las estirpes car descritas en el párrafo anterior. En resumen, que la estirpe S283 exhibe las mismas anomalías que las demás estirpes carA, carB y carR. Atribuimos estas alteraciones al efecto de la mutación carA.

Comparando detalladamente los resultados de las estirpes C2, S276 y S283 se nota que el comportamiento del doble mutante carA carS es intermedio, tanto a la luz como a la oscuridad, entre los comportamientos de los mutantes sencillos carA y carS. Este fenómeno es análogo al efecto que sobre la acumulación de  $\beta$ -caroteno exhiben las estirpes carA, carS y carA carS.

La fotorrepresión de la ADH ocurre por un mecanismo distinto al de la fotocarotenogénesis, como prueban los siguientes hechos:

- los genes madA y madB intervienen en la fotocarotenogénesis pero no en la fotorrepresión de la ADH;
- los dobles mutantes carA carS y, presumiblemente, también los mutantes car sencillos tienen una fotocarotenogénesis alterada mientras que su fotorrepresión de la ADH es normal.

Nuestros resultados concuerdan perfectamente con los obtenidos por el grupo de Russo respecto a la inhibición de la forogénesis en ambiente cerrado, en el sentido de que en ambos casos la respuesta

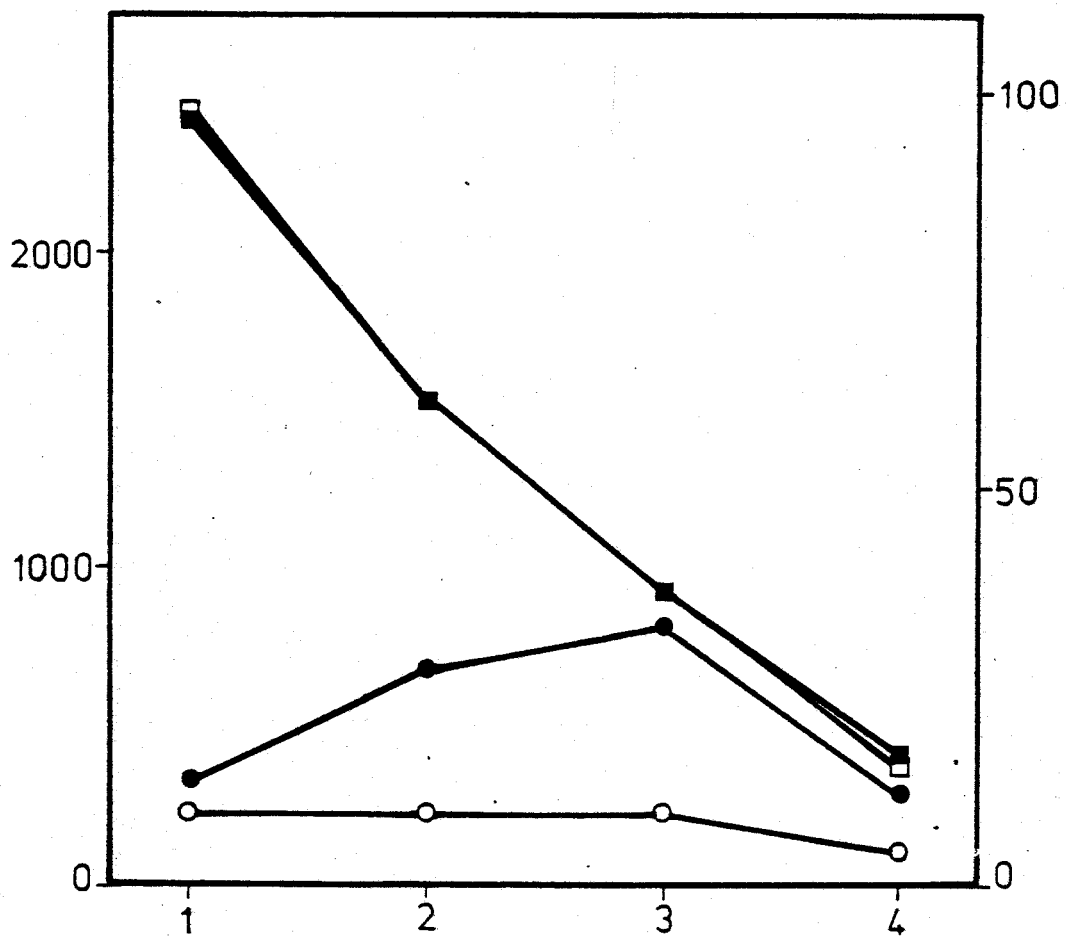


FIGURA 21. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe 276.  
 Esta figura se interpreta de modo idéntico que la figura 9.

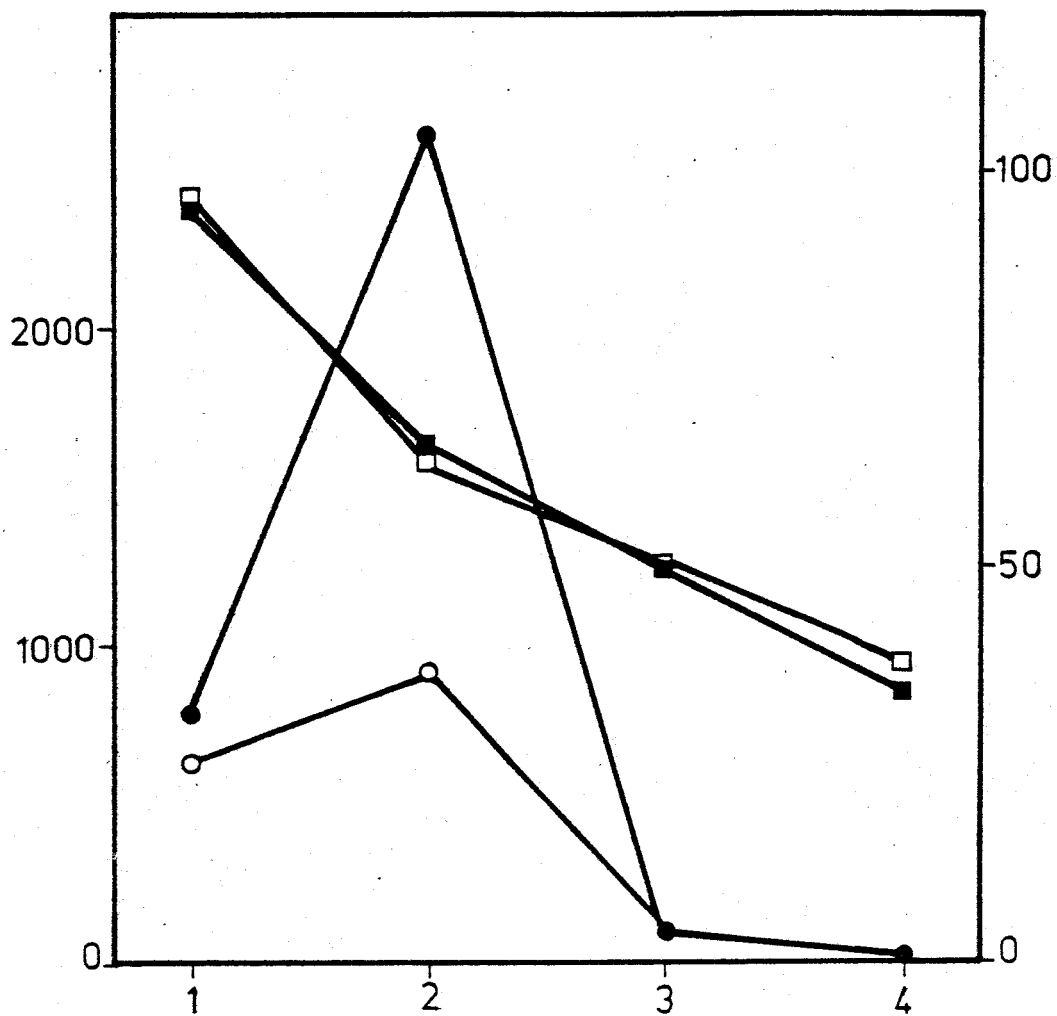


FIGURA 22. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe S283.  
 Esta figura se interpreta de modo idéntico que la figura 9.

es anormal en las estirpes C5, C9, C2 y C171 y normal en la estirpe superproductora de  $\beta$ -caroteno analizada. El grupo de Russo no ha publicado datos sobre la forogénesis de dobles mutantes carA carS, por lo que no cabe establecer comparaciones con los resultados obtenidos por nosotros con la estirpe S283.

No obstante, los genes madA y madB intervienen en la reversión por luz de la inhibición de la forogénesis por ambientes cerrados, lo que separa también este sistema del sistema de la fotorrepresión de la ADH.

#### Difenilamina y actividad ADH

La difenilamina (DFA) bloquea en Phycomyces blakesleeanus la deshidrogenación del fitoeno, provocando consecuentemente una drástica disminución de las concentraciones de carotenoides coloreados acumulados por las distintas estirpes. Puesto que la modificación del fenotipo silvestre producida por la mutación carB es similar a la producida por la DFA y puesto que la mutación carB ejerce un efecto pleiotrópico sobre la actividad ADH, hemos investigado si la DFA ejerce algún efecto sobre la ADH. Para ello hemos medido la actividad específica ADH en micelios cultivados durante 62 horas bajo iluminación constante en medio líquido suplementado o no con DFA. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 9.

La DFA provoca una fuerte estimulación de la actividad ADH en todas las estirpes estudiadas. La magnitud de la estimulación es del orden de 900 miliunidades o superior, salvo en la estirpe S276 que reacciona más débilmente a la DFA.

Hay que recalcar que la estirpe C5 también es sensible al efecto estimulador de la DFA por lo que cabe excluir que dicho efecto estimulador se debe únicamente a la inhibición de la síntesis de  $\beta$ -caroteno a nivel de fitoeno.

Hemos estudiado más detenidamente el efecto de la DFA sobre la actividad específica ADH en la estirpe silvestre cultivada de uno a cuatro días bajo iluminación constante o en oscuridad. Los resultados de estos experimentos están en la figura 23. La adición de DFA al medio de cultivo provoca un fuerte aumento de la actividad específica ADH tanto en luz como en oscuridad, sin interferir con la respuesta de fotorrepresión.

El perfil temporal de la actividad específica ADH cambia tras la adición de DFA, alcanzándose ahora, tanto en luz como en

TABLA 9. Efecto de la difenilamina o el retinol sobre la actividad ADH.

Estirpe	Control	DFA	Retinol
NRRL1555	106	932	1919
C9	936	2318	3550
C2	661	1584	1274
C171	1122	1956	1542
S283	464	2940	869
S276	358	837	698
C5	2301	3208	3441

En la primera columna se indica la estirpe utilizada en el experimento; en todos los casos las estirpes se cultivaron a la luz. Los números indican la actividad específica en miliU.E. por mg de proteína de los extractos purificados parcialmente con acetona.

oscuridad, el valor máximo ya al primer día de cultivo, lo que indica que el efecto de la DFA no es idéntico al de las mutaciones car.

La forma de la dependencia de la actividad ADH con el tiempo de cultivo indica que el incremento observado en el experimento puntual, realizado a los dos días y medio de cultivo, debe ser mucho menor para todas las estirpes que el que observaríamos al primer día de cultivo. Puesto que pequeñas diferencias en la tasa de caída de la actividad ADH con el tiempo de cultivo en presencia de DFA puede introducir variaciones notables en el incremento observable en experimentos puntuales, conviene interpretar los datos de la tabla 9 como una prueba cualitativa de si hay o no hay activación por DFA.

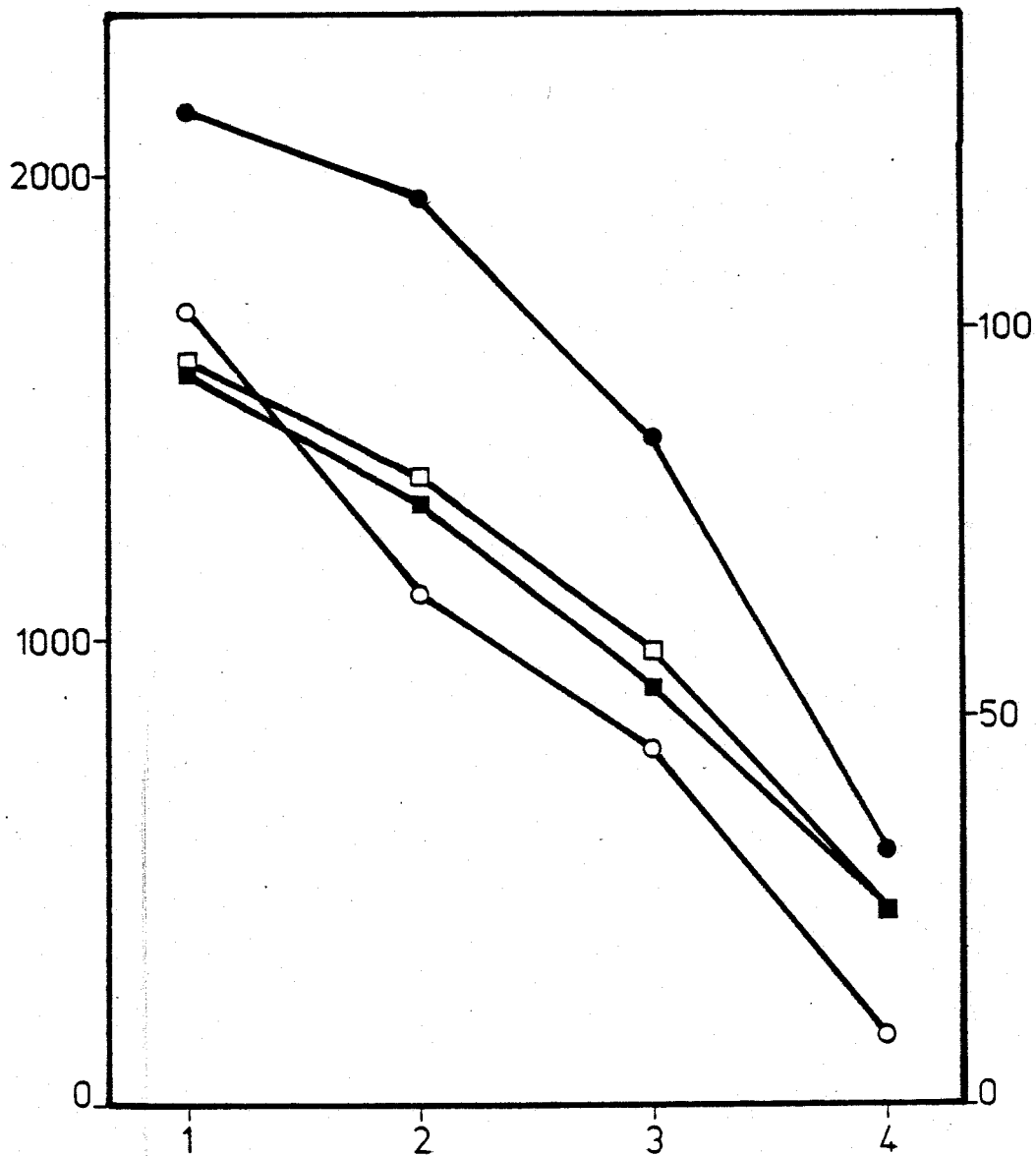


FIGURA 23. Perfil temporal de la actividad ADH en la estirpe NRRL1555 en presencia de difenilamina.

Esta figura se interpreta como la figura 9.

En presencia de DFA la cinética de consumo de glucosa es la misma en luz que en oscuridad. Sin embargo, la DFA provoca un retraso en el consumo de glucosa, al menos durante los tres primeros días de cultivo.

#### Retinol y actividad ADH

La adición de retinol al medio de cultivo provoca una estimulación de la carotenogénesis en P.blakesleeanus. Hemos estudiado el posible efecto del retinol sobre la actividad ADH en el tipo silvestre y en los mutantes car. Los resultados de estos experimentos se exponen en la tercera columna de la tabla 9.

El retinol estimula la actividad específica ADH en todas las estirpes estudiadas, aunque la magnitud de la respuesta al retinol es diferente de unas estirpes a otras, siendo menor en las estirpes C171, S276 y S283 que en las demas.

Datos preliminares no expuestos aquí indican que el retinol también estimula la actividad ADH de los micelios cultivados en oscuridad.

Dado que la estimulación provocada por el retinol sobre la actividad específica ADH de la estirpe S276 observada en los experimentos puntuales no es muy importante, hemos estudiado más detenidamente la respuesta de dicha estirpe al retinol en micelios cultivados de uno a cuatro días bajo iluminación constante. Los resultados se exponen en la figura 24. Como puede observarse en dicha figura el retinol provoca claramente un aumento de la actividad específica ADH en la estirpe S276.

El efecto del retinol sobre la actividad ADH es similar a su efecto sobre la carotenogénesis; el retinol estimula ambos procesos metabólicos en la estirpe silvestre y los mutantes carA, carB, carR y carS.

#### Resumen

En conjunto, nuestros resultados prueban que existe una estrecha relación entre regulación de la carotenogénesis y regulación de la actividad ADH, puesto que tanto las alteraciones genéticas como las químicas de la carotenogénesis introducen alteraciones en el nivel de la actividad ADH, con la única excepción de la mutación carS que afecta a la carotenogénesis sin afectar a la ADH.

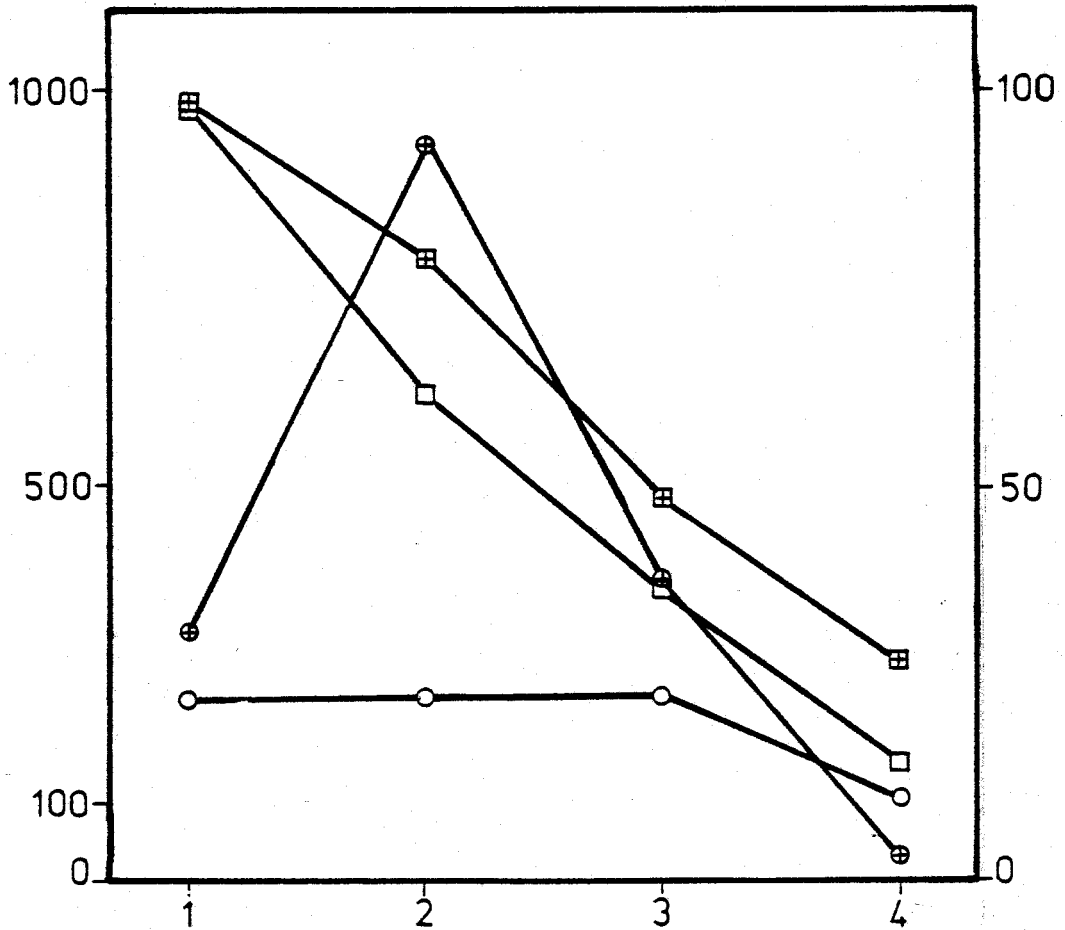


FIGURA 24. Influencia del retinol en la actividad ADH en la estirpe S276.

El significado de los ejes es el mismo que en la figura 9. Los símbolos vacíos se refieren a cultivos sin retinol; los que contienen una cruz, a cultivos con retinol. Los cuadrados se refieren a la concentración de glucosa en el medio, los círculos, a la actividad específica ADH.



Datos preliminares indican que el nivel de actividad ADH es normal en los heterocariotes intersexuales cultivados en medio líquido, aunque, en nuestras condiciones tampoco observamos incremento en la síntesis de carotenoides en dichos heterocariotes. Nuestros datos son:

Estirpe	ADH	$\beta$ -caroteno
A87	43	82
B36	254	97
A87*B36	119	72

Se obtuvieron tras 62 horas de cultivo a la luz en medio líquido; la actividad ADH se expresa en miliunidades por mg de proteína en el extracto purificado y la concentración de caroteno en ppm.

#### ESTUDIOS ELECTROFORETICOS CON LA ADH

##### Electromorfos con actividad ADH

Los estudios realizados en los apartados anteriores no aclaran si las variaciones de la actividad específica ADH observadas al alterarse la carotenogénesis o al variar las condiciones de iluminación implican a una o varias isoenzimas de la ADH.

Para tratar de aclarar cuántas enzimas distintas, capaces todas ellas de catalizar la deshidrogenación de los alcoholes, intervienen en nuestros experimentos, hemos realizado determinaciones del patrón de electromorfos con actividad ADH en los extractos de Phycomyces.

En la figura 25 se ve la distribución de bandas proteicas con actividad ADH tras la electroforesis de extractos de micelios de las estirpes NRRL1555, CBS188.27, CBS149.24, S271 e Indoh1522. Las cinco estirpes pertenecen al género Phycomyces, siendo las dos primeras de la especie P.blakesleeanus, la tercera de la especie P.nitens, ignorándose la especie a la que pertenecen las dos últimas.

Como se ve en la figura 25, la especie P.blakesleeanus posee un solo electromorfo con actividad ADH, mientras que la especie P.nitens posee tres electromorfos con actividad ADH, siendo la movilidad del más rápido de ellos inferior a la movilidad del electromorfo único de P.blakesleeanus. Las estirpes UBC24 y M1, ambas P.blakesleeanus también exhiben un electromorfo único de movilidad normal.

CBS149.	Indoh	S271	CBS188.	NRRL
24	1522		27	1555

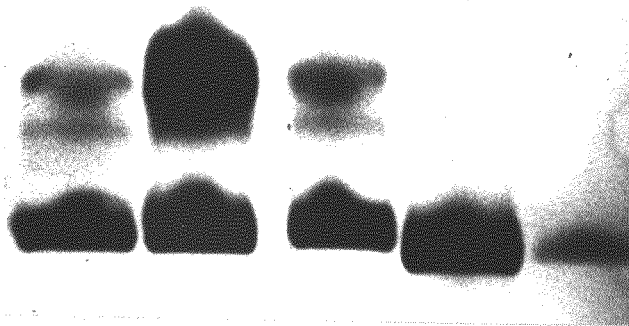


FIGURA 25. Distribución de electromorfos en diferentes estirpes del género Phycomyces.

Resultado de teñir para actividad enzimática ADH un gel de electroforesis cargado con extractos purificados parcialmente con acetona de las estirpes que se indican junto al origen de migración. Los micelios se cultivaron a la luz en todos los casos.

Que sepamos, se trata de la primera diferencia bioquímica observada entre las dos especies citadas. Ignoramos el número de genes que intervienen en la determinación de los tres electromorfos de la especie P.nitens; en el caso de la especie P.blakesleeanus lo más sencillo es suponer que un único gen estructural determina la única banda de actividad ADH observada.

Las estirpes S271 e Indoh1522 podrían pertenecer, según los resultados del análisis electroforético, a la especie P.nitens pero no a la especie P.blakesleeanus. Las dimensiones de sus esporas apoyan la idea de que S271 es una estirpe de la especie P.nitens (F. Rivero, comunicación personal).

Es interesante notar que las isoenzimas ADH de P.nitens utilizan, al igual que la enzima de P.blakesleeanus,  $\text{NADP}^+$  como cofactor. Además, las tres isoenzimas de P.nitens responden de modo similar que la enzima de P.blakesleeanus a la purificación parcial con acetona.

En la figura 26 se da la distribución de electromorfos con actividad ADH en extractos de micelios de la estirpe NRRL1555 cultivados a la oscuridad y a la luz con DFA, con retinol y sin DFA ni retinol. Se ve que la adición de DFA o retinol no provoca la aparición de nuevas bandas con actividad ADH. La intensidad de la banda correspondiente al micelio cultivado a la luz en medio normal es menor que la intensidad de las otras tres bandas, a pesar de que los cuatro extractos contienen la misma concentración total de proteína. Concluimos que la estimulación provocada por la adición de retinol o DFA no se debe a la aparición de nuevos electromorfos sino al incremento de actividad del único electromorfo existente. Análogamente, concluimos que la fotorrepresión se ejerce sobre dicho electromorfo.

En la figura 27 se observa la distribución de electromorfos con actividad ADH correspondiente a las estirpes NRRL1555, C5 y C9 cultivados a la luz en medio normal. Se observa que los mutantes car de la figura no poseen nuevas bandas de actividad ADH, siendo la intensidad del electromorfo único mayor en la estirpe C5 que en la C9 y mayor en ésta que en la estirpe silvestre. Puesto que la concentración total de proteína es la misma en los tres casos, concluimos que la estimulación de la ADH provocada por las mutaciones car tiene lugar a través del único electromorfo existente.

Luz+ Osc. Luz Luz+  
Retinol                      DFA

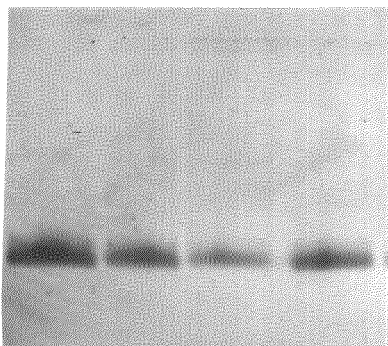


FIGURA 26. Intensidad de tinción del electromorfo con actividad ADH en la estirpe NRRL1555 bajo diferentes condiciones de cultivo.

Resultado de teñir para actividad ADH un gel de electroforesis cargado con extractos parcialmente purificados con acetona de la estirpe silvestre cultivada en las condiciones que se indican junto al origen de migración.

C5                      NRRL                      C9  
                                 1555

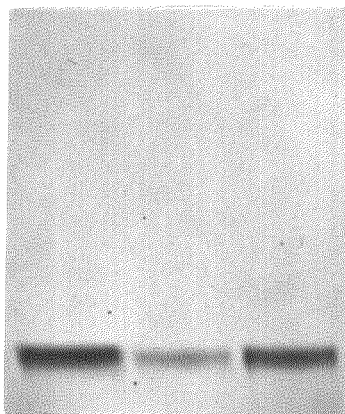


FIGURA 27. Intensidad de tinción del electromorfo con actividad ADH en las estirpes C9, NRRL1555 y C5.

Resultado de teñir para actividad ADH un gel cargado con extractos purificados parcialmente con acetona de las estirpes que se indican junto al origen de migración. En los tres casos los micelios se cultivaron a la luz y el gel se cargó con soluciones que contenían la misma cantidad de proteína total.

## Bandas proteicas con actividad ADH

Una vez aclarado que en las diferencias de actividad entre las distintas estirpes o condiciones de cultivo interviene una sola enzima, nos propusimos averiguar si dichas diferencias están originadas o no por diferencias en la concentración de enzima activa. Para ello hemos realizado experimentos de electroforesis en placa vertical de poliacrilamida. Tras la migración de las proteínas, dividimos el gel en dos partes, tiñendo una parte para actividad ADH y la otra parte, donde habían corrido extractos de los mismos micelios que en la primera, con reactivos específicos de proteínas. Por este método hemos logrado identificar una banda de proteína de igual movilidad que la enzima ADH.

En la figura 28 se ven los patrones de bandas proteicas correspondientes a extractos parcialmente purificados de micelios de la estirpe silvestre cultivados a la luz en presencia de DFA, a la luz en presencia de retinol, a la oscuridad y a la luz en medio normal. La banda de proteína de mayor movilidad es la que tiene la misma movilidad que la enzima ADH. A pesar de que los cuatros extractos contienen la misma concentración total de proteína hay diferencia en la intensidad de dicha banda proteica entre los diferentes tratamientos. Además, se observa que la banda correspondiente al cultivo iluminado se tiñe menos intensamente que la banda de los otros tres cultivos; es decir, que hay una buena correlación entre intensidad de tinción para proteína y actividad específica ADH. Este resultado sugiere que las diferencias de actividad entre condiciones de cultivo se deben a diferencias de concentración de enzima activa ADH.

En la figura 29 se ven los patrones de bandas proteicas de las estirpes NRRL1555, C5 y C9. Se observa que la banda proteica asociada a la actividad ADH se tiñe más intensamente en los dos mutantes car que en el tipo silvestre, por lo que concluimos que también las diferencias de actividad específica ADH entre los diferentes genotipos analizados se deben a diferencia en la concentración de enzima activa ADH.

Las variaciones de concentración de enzima activa ADH pueden deberse a variaciones a nivel de transcripción, de traducción, de maduración de precursores inactivos en activos o en la tasa de degradación de la enzima activa. Ignoramos cuál o cuáles de estos mecanismos interviene en la regulación de la actividad ADH en Phycomyces y si los mecanismos implicados en la fotorrepresión son los mismos que los implicados en la regulación por carotenogénesis.

Luz+ Luz+ Osc. Luz  
DFA Retinol

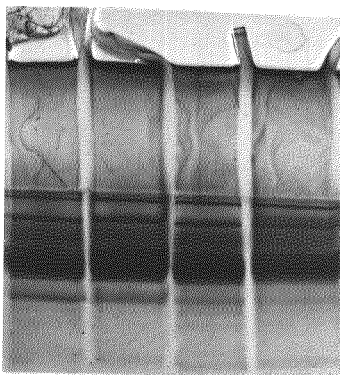


FIGURA 28. Distribución de bandas proteicas tras la electroforesis de extractos de la estirpe NRRL1555 bajo diferentes condiciones de cultivo.

Resultado de teñir con colorantes específicos de proteína un gel cargado con extractos purificados con acetona del tipo silvestre cultivado bajo las condiciones que se indican junto al origen de migración. En los cuatro casos la concentración total de proteína con que se cargó el gel fue la misma. La banda proteica cuya movilidad corresponde a la enzima ADH se indica en la figura.

C9 NRRL C5  
1555

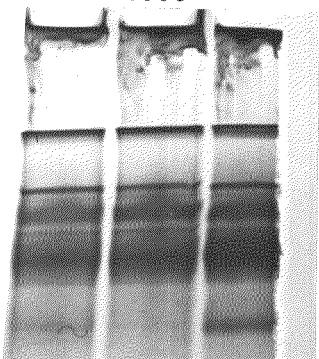


FIGURA 29. Distribución de bandas proteicas tras la electroforesis de extractos de las estirpes C9, NRRL1555 y C5.

Resultado de teñir con colorantes específicos de proteína un gel cargado con extractos purificados con acetona de las estirpes que se indican junto al origen de migración. En los tres casos la concentración total de proteína con que se cargó el gel fue la misma. La banda proteica cuya movilidad corresponde a la actividad ADH se indica en la figura.

Ferl et al. (1980) demostraron que la regulación por anaerobiosis de las dos isoenzimas ADH del maíz tiene lugar a nivel de transcripción. Asimismo, la cantidad de deshidrogenasa del alcohol reprimible por glucosa en la levadura está regulada vía la cantidad de ARNm funcional presente en la célula (Denis et al., 1981). En condiciones apropiadas los microplasmodios de Physarum polycephalum se enquistan para dar microesclerocios; durante el enquistamiento se sintetizan unos 26 ARNm y unas 20 proteínas específicas de la transición plasmodio-esclerocio (Putzer et al., 1983). La luz azul inhibe el enquistamiento y la síntesis de los mensajeros y proteínas específicos de dicho proceso. Muy probablemente la luz actúa inhibiendo la transcripción en este sistema (Putzer et al., 1983).

En Phycomyces hay pruebas de que la luz regula la transcripción de los mensajeros implicados en la carotenogénesis (Jayaram et al., 1979).

Sería factible, y muy interesante, determinar si la cantidad de ARNm de la ADH de Phycomyces está regulada por la luz y varía durante el desarrollo de este hongo.

#### GENETICA DE LA ADH DE PHYCOMYCES

Hemos aislado mutantes carentes de actividad ADH de Phycomyces como estirpes resistentes a concentraciones de alcohol alílico que matan al tipo silvestre. Previamente hemos realizado una serie de estudios sobre la resistencia de las estirpes dotadas de actividad ADH al alcohol alílico y a la acroleína.

#### Resistencia al alcohol alílico y acroleína

En la figura 30 se da la supervivencia de las esporas de la estirpe C2 a diversas concentraciones de alílico en medio sólido. Las concentraciones de alílico del orden de 2 mM ya ejercen un efecto tóxico, llegando a ser la supervivencia inferior al 10% para una concentración de 7.5 mM.

Conviene señalar que la dosis letal de alcohol alílico depende del número de esporas que se inoculan en la caja de Petri. Así, cuando se inoculó cada caja con  $10^5$  esporas de la estirpe S343, en vez de las cien esporas de la estirpe C2 empleadas en el experimento anterior, la dosis letal de alcohol alílico fue de 30 mM (tabla 10).

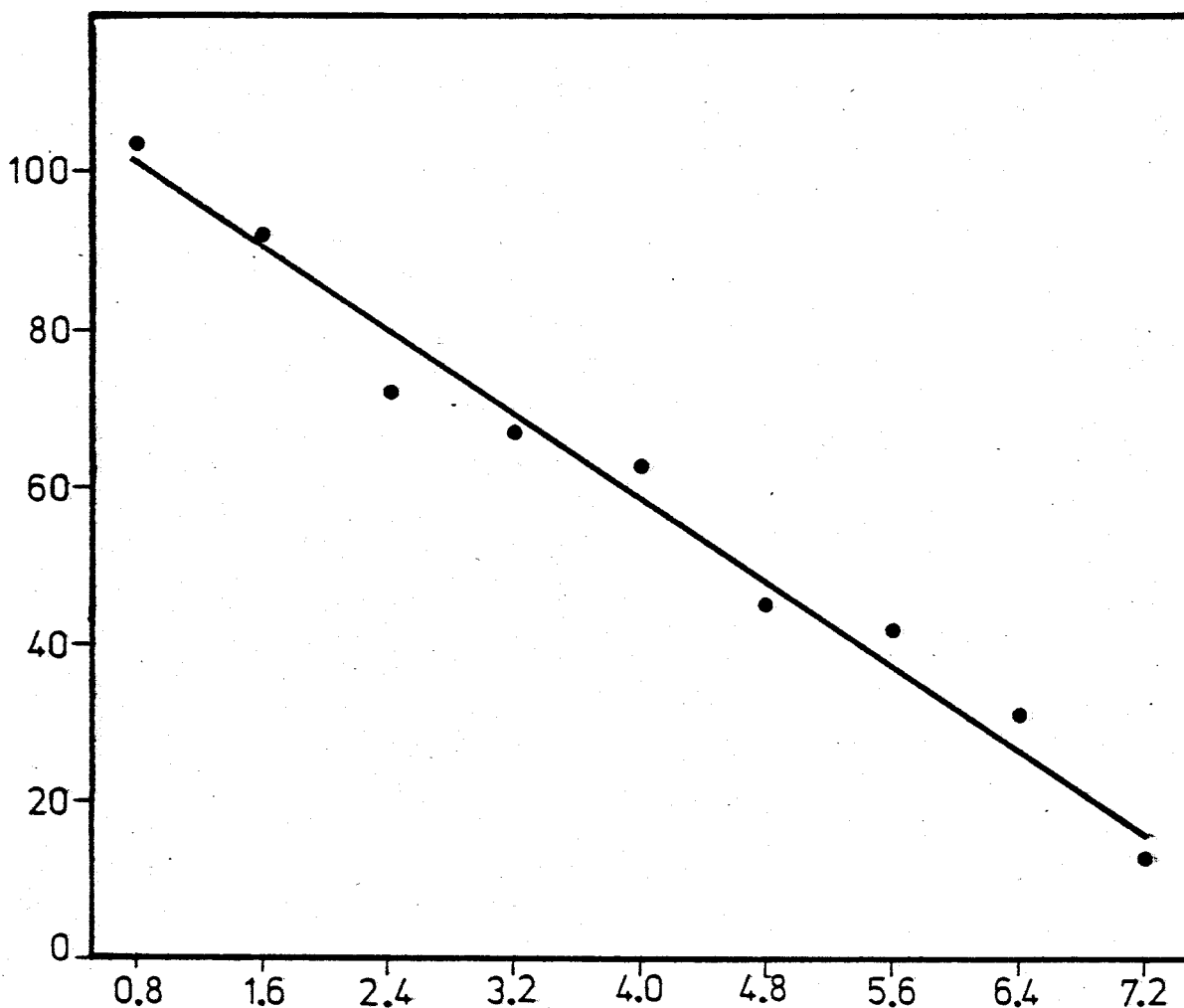


FIGURA 30. Supervivencia de las esporas de la estirpe C2 al alcohol alílico.

En el eje vertical el % de supervivencia al tratamiento; en el eje horizontal la concentración milimolar de alcohol alílico en el medio de cultivo. La recta de regresión de la supervivencia sobre la concentración de alílico en el rango de 0.8 a 7.2 mM es:  
 $Y = 111.84 - 13.25 X$ .



TABLA 10. Resistencia de las esporas de la estirpe S343 al alcohol alílico.

---

Tratamiento	Crecimiento
0	+
2	+
4	+
6	+
8	+
10	+
15	+
20	+
25	-
30	-

---

La primera columna da la concentración milimolar de alcohol alílico en el medio; la segunda columna, la resistencia al tratamiento, indicando un signo + que hubo crecimiento micelial en la caja y un signo - que no lo hubo. En todos los casos se sembraron  $10^5$  esporas viables por caja.

---

Si en vez de determinar la resistencia de las esporas, se mide la resistencia de micelios jóvenes trasplantándolos de cajas sin alílico a cajas con dicho alcohol, la dosis letal resulta ser del mismo orden que inoculando  $10^5$  esporas por caja (tabla 11).

En resumen, de estos experimentos se concluye que una concentración de 50 mM de alílico en medio sólido inhibe totalmente la capacidad de crecimiento de las esporas y los micelios de las estirpes de Phycomyces dotadas de actividad ADH.

Experimentos similares a los descritos se realizaron para determinar la resistencia a acroleína. La figura 31 muestra los resultados referentes a la inoculación con cien esporas por caja; en la tabla 12 los referentes a la inoculación con  $10^5$  esporas por caja y en la tabla 13 los referentes al trasplante de micelios jóvenes. La toxicidad de la acroleína para Phycomyces es más de cien veces superior a la del alcohol alílico.

TABLA 11. Resistencia de los micelios de las estirpes C5 y C9 al alcohol alílico

---

Tratamiento	C5	C9
0	+	+
20	+	+
40	-	-
60	-	-

---

En la primera columna figura la concentración milimolar de alcohol alílico en el medio de cultivo; en la segunda y tercera columna la presencia o ausencia de crecimiento de la estirpe correspondiente. En ambos casos los micelios sometidos al tratamiento provenían del trasplante de micelios anteriores cultivados en ausencia de alílico.

---

#### Mutantes resistentes a alcohol alílico

Los resultados del párrafo anterior nos permiten suponer que el sistema alílico-acroleína debe servir para aislar mutantes carentes de actividad ADH en Phycomyces.

Los detalles del protocolo de aislamiento de los mutantes resistentes a alílico figuran en Materiales y Métodos. Puesto que los diferentes micelios resistentes a alílico que provengan de una misma caja de reciclado pueden compartir la misma mutación original, para los estudios posteriores retuvimos solo un micelio mutante por caja de reciclado.

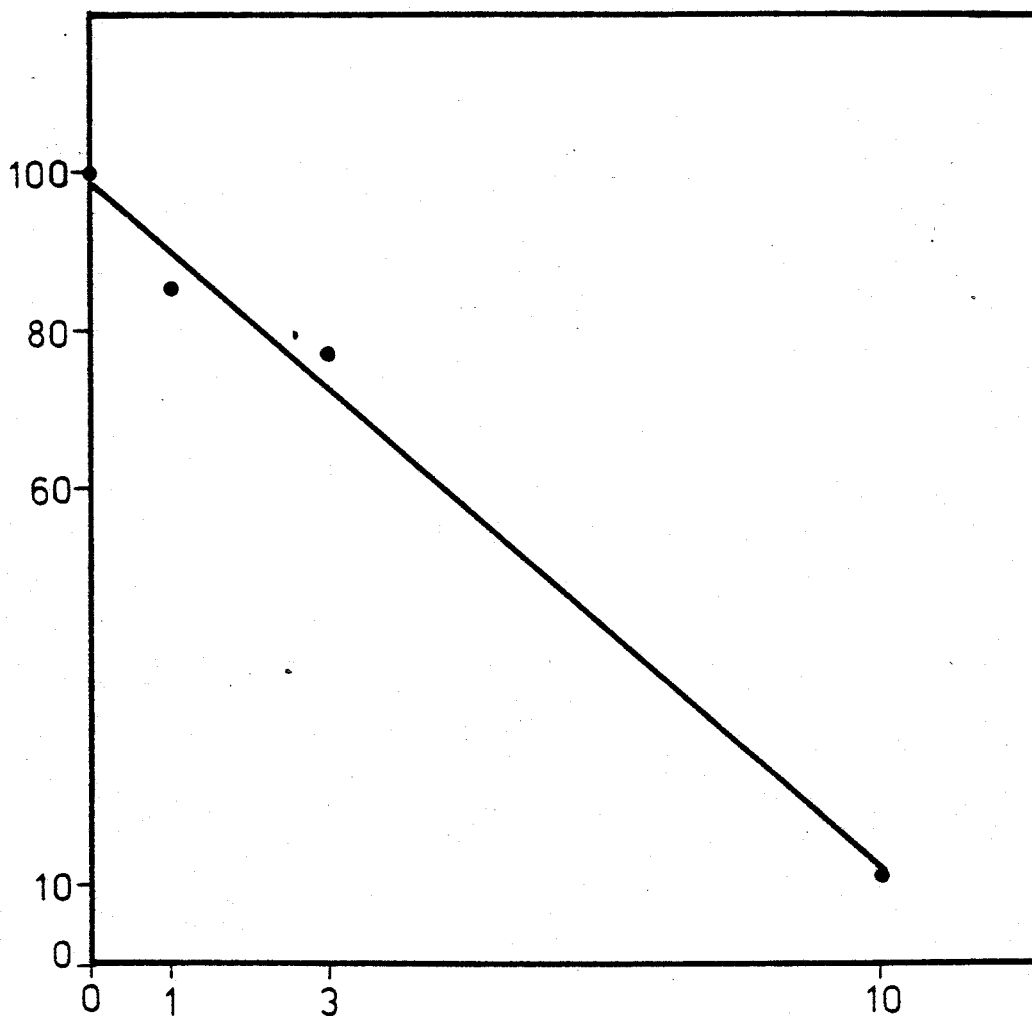


FIGURA 31. Supervivencia de las esporas de la estirpe C2 a la acroleína.

En el eje vertical el % de supervivencia al tratamiento; en el eje horizontal la concentración micromolar de acroleína en el medio de cultivo. La ecuación de la recta de regresión de la supervivencia sobre la concentración de acroleína es:  $Y = 98.81 - 8.73 X$ .

Los resultados de las mutagénesis con NG de las estirpes S343, C2, NRRL1555 y C9 se dan respectivamente en las tablas 14, 15, 16 y 17. Las supervivencias a las mutagénesis fueron del 5%, del 8.7%, del 4.1% y del 15.2% respectivamente. Como se observa en las tablas citadas, la frecuencia media de mutantes por cada  $10^4$  esporas de reciclado fue de 1.5 en la estirpe S343, 1.2 en la estirpe C2, 1.7 en la estirpe silvestre y 0.8 en la estirpe C9. El que esta última tasa de mutación sea anormalmente baja puede estar relacionado con el hecho de que la supervivencia al tratamiento con NG de la estirpe C9 fue anormalmente alta.

---

TABLA 12. Resistencia de las esporas de la estirpe C2 a la acroleína

---

Tratamiento	Crecimiento
0.1	+
1	+
10	+
20	+
40	+
60	+
80	+
100	-
120	-
140	-

---

En la primera columna figura la concentración micromolar de acroleína en el medio de cultivo; en la segunda columna si hubo o no crecimiento micelial en la caja. En todos los casos se sembraron  $10^5$  esporas viables por caja.

TABLA 13. Resistencia de los micelios de las estirpes C5 y C9 a la acroleína

---

Tratamiento	C5	C9
20	+	+
40	+	+
60	+	+
80	+	+
100	+	+
120	+	+
140	-	-
200	-	-

---

En la primera columna figura la concentración micromolar de acroleína en el medio de cultivo; en la segunda y tercera columna la presencia o ausencia de crecimiento de la estirpe correspondiente. En ambos casos los micelios sometidos al tratamiento provenían del trasplante de micelios anteriores cultivados en ausencia de alílico.

---

Una vez demostrado que es posible obtener mutantes resistentes a alcohol alílico mutagenizando con NG, se aislo una colección de cinco mutantes de ese fenotipo a partir de la estirpe A87 (lysA401 (-)) y otros cinco a partir de B36 (nicA101 (+)). Estos mutantes se emplearon en los estudios de complementación que se describirán posteriormente.

También hemos obtenido mutantes resistentes a alcohol alílico mutagenizando esporas de las estirpes A87 y B36 con ICR-170. El protocolo se detalla en Materiales y Métodos.

TABLA 14. Aislamiento de mutantes resistentes a alílico en la estirpe S343

---

A	B	C	D
1	4.0	77	1.9
2	4.0	103	2.6
3	1.2	14	1.2
4	1.0	14	1.4
5	0.9	19	2.1
6	0.9	27	3.0
7	1.0	9	0.9
8	1.0	15	1.5
9	0.8	11	1.4
10	0.9	8	0.9
11	0.4	4	1.0
12	1.0	7	0.7
13	0.5	2	0.4
14	0.4	2	0.5
15	0.4	19	4.8
16	0.6	5	0.8
17	0.3	4	1.3
18	0.4	3	0.7
19	0.4	5	1.3
20	0.2	3	1.5

---

En la columna A se indica el número de orden de la caja de reciclado; en la B el número ( $\times 10^{-5}$ ) total de esporas viables sembradas en medio selectivo proveniente de la caja de reciclado pertinente; en la columna C el número total de mutantes aislados a partir de dicha caja de reciclado y en la columna D el cociente ( $\times 10^{-1}$ ) entre los números que figuran en las columnas C y B. En todos los casos las esporas fueron tratadas con NG según se indica en Materiales y Métodos. Las esporas provenientes de cada caja de reciclado se distribuyeron entre diez cajas con medio selectivo.

TABLA 15. Aislamiento de mutantes resistentes a alílico en la estirpe C2

A	B	C	D
1	0.25	5	2
2	0.30	3	1
3	0.27	2	0.7
4	0.32	3	0.9

Esta tabla se interpreta de modo idéntico a la tabla 14, excepto que las esporas provenientes de cada caja de reciclado se distribuyeron en cinco cajas de medio selectivo.

TABLA 16. Aislamiento de mutantes resistentes a alílico en la estirpe NRRL1555

A	B	C	D
1	0.38	1	0.3
2	0.25	8	3.2
3	0.32	3	0.9
4	0.32	8	2.5

Esta tabla se interpreta de modo idéntico a la tabla 14, excepto que las esporas provenientes de cada caja de reciclado se distribuyeron en cinco cajas de medio selectivo.

TABLA 17. Aislamiento de mutantes resistentes a alílico en la estirpe C9

---

A	B	C	D
1	0.7	10	1.4
2	1.0	3	0.3
3	1.0	4	0.4
4	1.0	2	0.2
5	1.0	15	1.5

---

Esta tabla se interpreta de modo idéntico a la tabla 14, excepto que las esporas provenientes de cada caja de reciclado se distribuyeron en cinco cajas de medio selectivo.

---

En el caso de la estirpe A87 se realizaron dos experimentos de mutagénesis, siendo la supervivencia al tratamiento del 6% y del 8% respectivamente y la frecuencia media de mutantes entre las esporas recicladas de  $10^{-5}$  en ambos casos. Se emplearon diez placas de reciclado en cada experimento de mutagénesis. Cinco de estos mutantes se retuvieron para experimentos posteriores.

Resultados similares se obtuvieron mutagenizando con ICR-170 la estirpe B36. La colección de mutantes resistentes a alílico se amplió con otros cinco mutantes provenientes de B36 obtenidos por este método.

Hemos estudiado más detenidamente la resistencia al alcohol alílico de algunas de estas estirpes. Los resultados figuran en las tablas 18 y 19. Los mutantes analizados resisten concentraciones de hasta 100 mM de alcohol alílico, concentración más de dos veces mayor que la dosis letal para el tipo silvestre.



TABLA 18. Resistencia a alcohol alílico de las esporas de las estirpes S295, S296 y S300

---

Tratamiento	Crecimiento		
	S295	S296	S300
25	+	+	+
50	+	+	+
75	+	+	+
100	+	+	+
200	-	-	-

---

Esta tabla se interpreta como la tabla 10.

---

Los mutantes S292, S295, S300 y S313 carecen de actividad ADH determinable por métodos espectrofotométricos, siendo los únicos mutantes analizados por esta técnica.

No se detectó banda de actividad ADH en ninguno de los mutantes ensayados por electroforesis, todos los de la tabla 4 (página 50) excepto S317, S318 y S319.

En resumen, hemos aislado, mutagenizando con NG e ICR-170, una amplia colección de cepas de Phycomyces blakesleeanus resistentes a concentraciones de alcohol alílico letales para el tipo silvestre. Puesto que los mutantes analizados carecen de actividad enzimática ADH proponemos denominarlos adh. Si en el futuro se aíslan mutantes resistentes al alílico dotados de actividad ADH proponemos que dichos mutantes se denominen aly.

En ninguno de los mutantes adh obtenidos se ha observado alteración alguna de la carotenogénesis; en cada uno de ellos el color del micelio es el que cabría esperar según el genotipo car del parental dotado de actividad ADH.

TABLA 19. Resistencia a alílico de los micelios de las estirpes S313, S317, S318 y S319

---

Tratamiento	Crecimiento			
	S313	S317	S318	S319
20	+	+	+	+
40	+	+	+	+
60	+	+	+	+
80	+	+	+	+
100	+	-	-	-
120	-	-	-	-
140	-	-	-	-

---

Esta tabla se interpreta como la tabla 11.

---

Se estudió la posible excreción de etanol al medio de cultivo por los mutantes adh con ayuda del cromatógrafo de gases Perkins-Elmer modelo F-11, con integrador automático M-2, propiedad de la empresa cervecera Cruzcampo S.A. Al tercer día de cultivo en la oscuridad en medio líquido, las estirpes NRRL1555 y C5 acumulan respectivamente un 0.024% y un 0.033% (v/v) de etanol en el medio; las estirpes S292 y S371 no acumularon etanol en el medio.

Los resultados anteriores sugieren que la pérdida de la deshidrogenasa del alcohol va acompañada de la pérdida de la capacidad de producir etanol.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por autores precedentes en organismos tan diversos como Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae, Zea mays y Drosophila melanogaster (ver bibliografía en la introducción). Hay que añadir Phycomyces blakesleeanus a la lista de organismos en los que se pueden obtener mutantes carentes de actividad ADH cultivando en presencia de alcohol alílico.

La mera existencia de los mutantes carentes de actividad ADH demuestra que la función que cumple dicha enzima no es imprescindible para la vida y reproducción asexual de Phycomyces.

No se sabe cuál es dicha función; la ausencia de excreción de etanol en los mutantes carentes de actividad ADH indica que una de sus funciones es la conversión de acetaldehído en etanol. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con los de Hilgenberg y Sandmann (1977), puesto que el incremento de la actividad ADH en la oscuridad habría que interpretarlo como otro mecanismo que favorece la fermentación del piruvato en ausencia de luz.

#### Recesividad de las mutaciones adh

El que los mutantes resistentes a alílico exhiban el mismo fenotipo no implica que estén mutados en el mismo gen. Para tratar de averiguar el número mínimo de genes que determinan la sensibilidad al alcohol alílico en Phycomyces, hemos realizado pruebas de complementación. Puesto que, como es bien sabido, los resultados de las pruebas de complementación son de dudosa interpretación en el caso de que alguna de las mutaciones bajo estudio sea dominante sobre su alelo silvestre, hemos realizado previamente una serie de pruebas para determinar el grado de recesividad de las mutaciones adh aisladas.

Para ello procedimos a obtener micelios heterocariontes según la técnica de Ootaki (1973) entre la estirpe C9 y cada una de las estirpes S292, S295, S296, S300, S313 y S314. La estirpe C9 lleva una mutación carR, que determina en homocariosis micelio de color rojo y cada una de las estirpes adh citadas lleva una mutación carB, que determina en homocariosis micelio de color blanco y complementa a la carR de C9; pudimos identificar los heterocariontes por el color amarillo o naranja de sus micelios.

En lo que sigue designamos por la letra X cada una de las estirpes adh empleadas en este estudio. Esporas provenientes de un micelio heterocarionte C9\*X dado se inocularon (100 esporas por caja) en medio sólido a un pH=3.3 sin alcohol alílico. Entre los

pequeños micelios resultantes se escogieron 50 de diferentes colores y se transplantaron a cajas de Petri con medio sólido conteniendo una concentración de 50 mM de alcohol alílico. Si definimos una mutación adh como recesiva cuando en la prueba descrita ningún micelio coloreado, descendiente del heterocarionte inicial C9\*X, crece en la placa selectiva, resulta que sólo las estirpes S292 y S296 llevan mutaciones totalmente recesivas; en el caso de las otras cuatro estirpes algunos micelios amarillos o naranjas descendientes del heterocarionte pertinente lograron crecer en presencia de alílico.

Para estudiar más detalladamente la recesividad de las mutaciones adh realizamos el siguiente experimento: para cada una de las varias estirpes adh, portadoras todas ellas de una mutación que determina auxotrofia para lisina o nicotinamida, se obtuvo un heterocarionte intersexual con la estirpe A87 ó B36, portadora de la mutación auxótrofa complementaria; dicho heterocarionte puede ser aislado fácilmente porque éste resulta protótrofo; después, para cada heterocarionte A87\*X o B36\*X se obtuvieron 50 descendientes capaces de crecer en medio mínimo sin alcohol alílico. En la tabla 20 figura el número de micelios trasplantados que crecieron en el medio selectivo. Nótese que todos los micelios que se sometieron a trasplante son necesariamente heterocariontes puesto que son protótrofos; el número de la tabla multiplicado por dos nos daría, por tanto, el porcentaje de micelios heterocariontes resistentes al alílico en la descendencia de cada heterocarionte A87\*X o B36\*X inicial. Puede observarse que algunas estirpes, como la S291, S294, S315, S385 y S386, llevan mutaciones adh claramente recesivas, mientras que otras como la S298, S299, S380, S382, S384 y S387 llevan mutaciones adh claramente dominantes sobre el alelo silvestre. Estos resultados confirman que una buena proporción de los mutantes adh se comportan como dominantes en pruebas de heterocariosis.

Si la ADH de Phycomyces fuera una enzima monomérica, cabría esperar que las mutaciones en su gen estructural fueran recesivas; si fuera un homopolímero de monómeros inactivos cabría esperar que algunas de las mutaciones fueran recesivas (las que determinarían un monómero sin capacidad de polimerizar o si polimerizara no interferiría en la actividad de los otros monómeros) y otros exhibirían alguna dominancia (las que determinan un monómero capaz de polimerizar con monómeros normales para dar un polímero inactivo).

La ADH de Drosophila melanogaster es un dímero (Schwartz et al., 1975). Schwartz y Sofer, 1976 realizaron un estudio detallado de

TABLA 20. Recesividad de varias mutaciones adh

---

A	B	C	D
S297	22	S291	0
S298	44	S293	20
S299	45	S294	0
S316	32	S315	8
S387	43	S381	16
S388	19	S382	42
S389	30	S383	15
S390	39	S384	43
S391	36	S385	3
S392	35	S386	4
Media = 34.5		Media = 15.4	
Varianza = 71.8		Varianza = 231.6	

---

En la columna A se indica la estirpe que forma junto con la A87 el heterocariote de partida; en la B el número de micelios que lograron crecer al ser trasplantados a medio con alílico de entre 50 descendientes del heterocariote inicial que crecieron en medio mínimo; en las columnas C y D lo mismo cuando la estirpe con actividad ADH que entró en heterocariosis fue la B36.

16 alelos que en homocigosis determinan ausencia de actividad ADH y encontraron que algunos de dichos alelos determina un polímero inactivo que puede entrar a formar parte del dímero, alterando su movilidad electroforética aunque sin anular su actividad enzimática. Para averiguar si algo semejante está ocurriendo en los mutantes adh dominantes en Phycomyces sería preciso recurrir a técnicas inmunológicas.

Es curioso que la frecuencia media de heterocariontes resistentes a alcohol alílico en la descendencia del heterocarionte A87\*X es del 69%, mientras que en los descendientes de los heterocariontes B36\*X es del 30.8%. Los genotipos de ambos tipos de heterocariontes serían respectivamente lys<sup>-</sup> nic<sup>+</sup> adh<sup>+</sup> \* lys<sup>+</sup> nic<sup>-</sup> adh<sup>-</sup> (A87\*X) y lys<sup>+</sup> nic<sup>-</sup> adh<sup>+</sup> \* lys<sup>-</sup> nic<sup>+</sup> adh<sup>-</sup> (B36\*X); la mayor frecuencia de heterocariontes resistentes cuando los alelos nic<sup>-</sup> y adh<sup>-</sup> van en posición "cis" respecto a cuando van en "trans" posiblemente se explicaría si la mutación lys<sup>-</sup> fuera menos recesiva que la nic<sup>-</sup>, puesto que en ese caso en ambos tipos de heterocariontes la proporción de núcleos estaría desplazada a favor de los núcleos lys<sup>+</sup>, que arrastrarían con ellos a los alelos adh<sup>-</sup> en el caso de A87\*X y a los alelos adh<sup>+</sup> en el de B36\*X. Se sabe que la mutación nicA101 es extremadamente recesiva (Medina, 1977).

#### Complementación entre mutantes adh

A continuación exponemos el método por el que intentamos determinar por complementación entre las estirpes S291 y S315 por un lado y por el otro las estirpes S297, S298, S299, S316, S387, S388, S389, S390, S391 y S392; o entre las estirpes S298 y S316 de una parte y de la otra las estirpes S291, S293, S294, S315, S381, S382, S383, S384, S385 y S386. Cada una de las estirpes S297, S298, ... y S392 lleva la mutación nicA101 que determina en homocariosis auxotrofia para nicotinamida; cada una de las estirpes S291, S293, ... y S386 lleva la mutación lysA401 que determina en homocariosis auxotrofia para lisina. Se obtuvieron heterocariontes intersexuales aislados por su prototrofia, entre las estirpes S291 y S315 de un lado y cada una de las estirpes nic del otro y entre las estirpes S298 y S316 por una parte y cada una de las estirpes lys de la otra. Unas  $2 \times 10^5$  esporas provenientes de cada uno de los heterocariontes intersexuales se sembraron en medio mínimo líquido conteniendo una concentración de 75  $\mu$ M de DFA; a continuación se analizó la presencia o ausencia de banda de actividad ADH tras la electroforesis de los extractos crudos de los micelios que crecieron en medio mínimo. Dichos micelios deben ser obviamente heterocariontes; además, la presencia de DFA facilita la detección de la banda de

actividad ADH en caso de que estuviera presente. En ningún heterocarionte se detectó actividad ADH, es decir que no hemos encontrado pruebas de la existencia de más de un gen en la determinación de la resistencia a alílico. Proponemos denominar al gen mutado en la estirpe S291 como gen adhA.

Las estirpes S315 y S388, con mutaciones adh fuertemente recesivas frente al alelo silvestre, están mutados en el gen adhA. Dada la dominancia de sus respectivas mutaciones adh, no puede afirmarse taxativamente si las demás estirpes llevan mutaciones en el gen adhA o en otro gen distinto.

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



- Adelberg, E. A., Mandell, M. y Chen, G. C. G. (1965) Optimal conditions for mutagenesis by nitrosoguanidine in E.coli K12. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18:788-795.
- Alston, T. A., Mela, L. y Bright, H. J. (1979) Inactivation of alcohol dehydrogenase by 3-butyn-1-ol. Arch. Biochem. Biophys. 197:516-523.
- Alvarez, M. I., Peláez, M. I. y Eslava, A. P. (1980) Recombination between ten markers in Phycomyces. Molec. Gen. Genet. 179:447-452.
- Benyajati, C., Place, A. R., Powers, D. A. y Sofer, W. (1981) Alcohol dehydrogenase gene of Drosophila melanogaster: relationship of intervening sequences to functional domains in the protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2717-2721.
- Bergman, K., Burke, P. V., Cerdá-Olmedo, E., David, C. N., Delbrück, M., Foster, K. W., Goodell, E. W., Heisenberg, M., Meissner, G., Zalokar, M., Dennison, D. S. y Shropshire, W. Jr. (1969) Phycomyces. Bacteriol. Rev. 33:99-157.
- Bergman, K. (1972) Blue-light control of sporangiophore initiation in Phycomyces. Planta 107:53-67.
- Bergman, K., Eslava, A. P. y Cerdá-Olmedo, E. (1973) Mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. Molec. Gen. Genet. 123:1-16.
- Blakeslee, A. F. (1904) Sexual reproduction in the Mucorineae. Proc. Am. Acad. Arts. Sci. 40:203-319.
- Britton, G. (1976) Biosynthesis of carotenoids. En Chemistry & Biochemistry of Plant Pigments. 2ªed., Goodwin, T. W. ed. 1:262-327. Academic Press New York.
- Brunke, K. J., Mercurio, R. y Goodgall, S. H. (1977) A technique for the rapid selection of drug-sensitive and auxotrophic mutants of Phycomyces blakesleeanus. J. Gen. Microbiol. 102:287-293.
- Burgeff, H. (1925) Über arten und artkreuzung in der gattung Phycomyces Kunze. Flora 118-119:40-46.
- Burgeff, H. (1928) Variabilität, vererbung und mutation bei Phycomyces blakesleeanus BGFF. Z. Vererbungslehre 49:26-94.
- Cerdá-Olmedo, E., Hanawalt, P. C. y Guerola, N. (1968) Mutagenesis of the replication point by nitrosoguanidine: map and pattern of replication of Escherichia coli chromosome. J. Mol. Biol. 33:705-719.

- Cerdá-Olmedo, E. (1975) Genetics of Phycomyces blakesleeanus. Genet. Res. 25:285-296.
- Cerdá-Olmedo, E. (1977) Behavioral genetics of Phycomyces. Annu. Rev. Microbiol. 31:535-547.
- Cerdá-Olmedo, E. y Torres-Martínez, S. (1979) Genetics and regulation of carotene biosynthesis. Pure Appl. Chem. 51:631-637.
- Ciriacy, M. (1975a) Genetics of alcohol dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae I. Isolation and genetic analysis of adh mutants. Mutat. Res. 29:315-325.
- Ciriacy, M. (1975b) Genetics of alcohol dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae II. Two loci controlling synthesis of de glucose-repressible ADHII. Molec. Gen. Genet. 138:157-164.
- Ciriacy, M. (1976) "Cis"-dominant regulatory mutations affecting the formation of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADHII) in Saccharomyces cerevisiae. Molec. Gen. Genet. 145:327-333.
- Ciriacy, M. (1979) Isolation and characterization of further "cis"- and "trans"-acting regulatory elements involved in the synthesis of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADHII) in Saccharomyces cerevisiae. Molec. Gen. Genet. 176:427-431.
- Clark, D. y Cronan, J. E. Jr. (1980a) Escherichia coli mutants with altered control of alcohol dehydrogenase and nitrate reductase. J. Bacteriol. 141:177-183.
- Clark, D. y Cronan, J. E. Jr. (1980b) Acetaldehyde coenzyme A dehydrogenase of Escherichia coli. J. Bacteriol. 144:179-184.
- Coggins, C. W. Jr., Hennings, G. L. y Yokoyama, H. (1970) Lycopene accumulation induced by 2-(4-chlorophenylthio)-triethylamine hydrochloride. Science 168:1589-1590.
- Cohen, R. J. (1974) Cyclic AMP levels in Phycomyces during a response to light. Nature 251:144-146.
- Cohen, R. J. (1978) Aberrant cyclic nucleotide regulation in a behavioral mutant of Phycomyces blakesleeanus. Plant Sci. Lett. 13:315-319.
- Cohen, R. J. y Atkinson, M. M. (1978) Activation of Phycomyces adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase by blue light. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83:616-621.

Cummings, J. C. (1972) Genetic variation in alcohol dehydrogenase isozymes in yeast. Tesis Doctoral, Universidad de California, Berkeley.

Cheng, D. S. K. y Freeling, M. (1976) Methods of maize pollen "in vitro" germination, collection, storage, treatment with toxic chemicals and recovery of resistant mutants. *Maize Genet. Cooper. News Lett.* 50:11-13.

Davies, B. H. (1979) Solved and unsolved problems of carotenoid formation. *Pure Appl. Chem.* 51:623-630.

Dawes, E. A. y Foster, S. M. (1956) The formation of ethanol by Escherichia coli. *Biochem. Biophys. Acta* 22:253-265.

Delbrück, M., Katzir, A. y Presti, D. (1976) Responses of Phycomyces indicating optical excitation of the lowest triplet state of riboflavin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:1969-1973.

Demerec, M., Adelberg, E. A., Clark, A. J. y Hartman, P. E. (1966) A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* 54:61-76.

Denis, C. L., Ciriacy, M. y Young, E. T. (1981) A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNA for the glucose-repressible alcohol dehydrogenase from Saccharomyces cerevisiae. *J. Mol. Biol.* 148:355-368.

Dennison, D. S. y Bozof, R. P. (1973) Phototropism and local adaptation in Phycomyces sporangiophores. *J. Gen. Physiol.* 62:157-168.

Eslava, A. P., Alvarez, M. I. y Cerdá-Olmedo, E. (1974) Regulation of carotene biosynthesis in Phycomyces by vitamin-A and beta-ionone. *Eur. J. Biochem.* 48:617-623.

Eslava, A. P., Alvarez, M. I., Burke, P. V. y Delbrück, M. (1975a) Genetic recombination in sexual crosses of Phycomyces. *Genetics* 80:445-462.

Eslava, A. P., Alvarez, M. I. y Delbrück, M. (1975b) Meiosis in Phycomyces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:4076-4080.

Eslava, A. P., Alvarez, M. I., Lipson, E. D. Presti, D. y Kong, K. (1976) Recombination between mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. *Mol. Gen. Genet.* 147:235-241.

- Ferl, R. J., Brennan, M. D. y Schwartz, D. (1980) "In vitro" translation of maize ADH: evidence for the anaerobic induction of mRNA. Biochem. Genet. 18:681-691.
- Forrester, P. I. y Gaucher, G. M. (1972) m-Hydroxybenzyl alcohol dehydrogenase from Penicillium urticae. Biochemistry 11:1108-1114.
- Foster, K. (1972) The photoresponses of Phycomyces: analysis using manual techniques on an automated machine which precisely tracks and measures growth during programmed stimuli. Tesis Doctoral, Instituto de Tecnología de California.
- Foster, K. W. y Lipson, E. (1973) The light growth response of Phycomyces. J. Gen. Physiol. 62:590-617.
- Franke, W. W. y Reau, P. (1973) The mitotic apparatus of a Zygomycete, Phycomyces blakesleeanus. Arch. Mikrobiol. 90:121-129.
- Freeling, M. y Schwartz, D. (1973) Genetic relationships between the multiple alcohol dehydrogenases of maize. Biochem. Genet. 8:27-36.
- Freeling, M. (1974) Dimerization of multiple maize ADHs studied "in vivo" and "in vitro". Biochem. Genet. 12:407-417.
- Freeling, M. (1976) Intragenic recombination in maize: pollen analysis methods and the effect of parental Adh1<sup>+</sup> isoalleles.. Genetics 83:701-717.
- Freeling, M. y Cheng, D. S. K. (1978) Radiation-induced alcohol dehydrogenase mutants in maize following allyl alcohol selection of pollen. Genet. Res. 31:107-130.
- Furch, B. y Gooday, G. W. (1978) Sporopollenin in Phycomyces blakesleeanus. Trans. Br. Mycol. Soc. 70:307-309.
- Galland, P. y Russo, V. E. A. (1979a) Photoinitiation of sporangiophores in Phycomyces mutants deficient in phototropism and in mutants lacking  $\beta$ -carotene. Photochem. Photobiol. 29:1009-1014.
- Galland, P. y Russo, V. E. A. (1979b) The role of retinol in the initiation of sporangiophores of Phycomyces blakesleeanus. Planta 146:257-262.
- Galland, P. y Reddy, M. V. (1982) A new allele with abnormal cAMP phosphodiesterase activity in Phycomyces. Phycomyces 5:17-19.

Gauger, W., Peláez, M. I., Alvarez, M. I. y Eslava, A. P. (1980) Mating type of heterokaryons in Phycomyces blakesleeanus. Exp. Mycol. 4:56-64.

Gleason, F. H. (1971) Alcohol dehydrogenase in Mucorales. Mycologia 63:906-910.

Goldberg, D. A. (1980) Isolation and partial characterization of the Drosophila alcohol dehydrogenase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5794-5798.

Gomori, G. (1955) Preparation of buffers for use in enzyme studies. Methods in Enzymology, I:138-146. New York, Academic Press.

Gooday, G. W., Fawcett, P., Green, D. y Shaw, G. (1973) The formation of fungal sporopollenin in the zygosporangium wall of Mucor mucedo: a role for the sexual carotenogenesis in the Mucorales. J. Gen. Microbiol. 74:233-239.

Goodwin, T. W. (1976) Distribution of Carotenoids. En Chemistry and Biochemistry of Plants Pigments, 2ªed., Goodwin, T. W. ed. Academic Press New York.

Grell, E. H., Jacobson, B. y Murphy, J. B. (1968) Alterations of genetic material for analysis of alcohol dehydrogenase isozymes of Drosophila melanogaster. Ann. N. Y. Acad. Sci. 151:441-455.

Gross, G. G. y Zenk, M. H. (1969) Reduktion sauren zu aldehyden and alkoholen im zellfreien system. 2. Reinigung und eigenschaften von aryl-alkohol: NADP-oxidoreduktase aus Neurospora crassa. Eur. J. Biochem. 8:420-425.

Gruen, H. E. (1959) Growth and development of isolated Phycomyces sporangioferes. Plant Physiol. 34:158-168.

Guerola, N., Ingraham, J. L. y Cerdá-Olmedo, E. (1971) Induction of closely-linked multiple mutations by nitrosoguanidine. Nature 230:122-125.

Hartz, T. K., Houston, M. R. y Lockwood, L. B. (1978) Substrate specificity and kinetic properties of NADP<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase of Phycomyces blakesleeanus. Mycologia 70:586-593.

Heisenberg, M. y Cerdá-Olmedo, E. (1968) Segregation of heterokaryons in the asexual cycle of Phycomyces. Molec. Gen. Genet. 102:187-195.

Hilgenberg, W. y Sandmann, G. (1977) Light-stimulated carbon dioxide fixation in Phycomyces blakesleeanus BGFF. Exp. Mycol. 1:265-270.

Jayaram, M., Presti, D. y Delbrück, M. (1979) Light-induced carotene synthesis in Phycomyces. Exp. Mycol. 3:42-52.

Jayaram, M., Leutwiler, L. y Delbrück, M. (1980) Light-induced carotene synthesis in mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. Photochem. Photobiol. 32:241-245.

Kunze, G. (1823) Phycomyces. En Kunze, G. y Schmidt, J. C. ed., Mykologische Hefte, Zweites Heft. Voss, Leipzig pp.113-116.

Leutwiler, L. S. y Brandt, M. (1982) The absence of light induced changes in cAMP concentration in the sporangiphore of Phycomyces. En Meeting on Phycomyces, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Lipson, E. D. (1975a) White noise analysis of Phycomyces light growth response system. I. Normal intensity range. Biophys. J. 15:989-1012.

Lipson, E. D. (1975b) White noise analysis of Phycomyces light growth response system. II. Extended intensity ranges. Biophys. J. 15:1013-1032.

Lipson, E. D. y Block, S. M. (1976) Adaptation kinetics in the light responses of Phycomyces. Biophys. J. 16:33a.

Lipson, E. D., Terasaka, D. T. y Silverstein, P. S. (1980) Double mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. Mol. Gen. Genet. 179:155-162.

Lipson, E. y Terasaka, D. T. (1981) Photogeotropism in Phycomyces double mutants. Exp. Mycol. 5:101-111.

López-Díaz, I. (1979) Bases genéticas de las respuestas a la luz de Phycomyces blakesleeanus. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

López-Díaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. (1980) Relationship of photocarotenogenesis to other behavioral and regulatory responses in Phycomyces. Planta 150:134-139.

López-Díaz, I. y Cerdá-Olmedo, E. (1981) Light-controlled phorogenesis and mycelial growth in Phycomyces mutants. Curr. Genet. 3:23-26.

Lorowitz, W. y Clark, D. (1982) Escherichia coli mutants with a temperature-sensitive alcohol dehydrogenase. J. Bacteriol. 152:935-938.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. y Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Lutstorf, U. y Megnet, R. (1968) Multiple forms of alcohol dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae. 1. Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-4. Arch. Biochem. Biophys. 126:933-944.

McDonald, J. y Ayala, F. (1978) Gene regulation in adaptative evolution. Can. J. Genet. Cytol. 20:159-175.

Medina, J. R. (1977) Continuous variation of genic dosage in Phycomyces. Genet. Res. 30:211-219.

Medina, J. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1977a) Allelic interaction in the photogeotropism of Phycomyces. Exp. Mycol. 1:286-292.

Medina, J. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1977b) A quantitative model of Phycomyces phototropism. J. Theor. Biol. 69:709-719.

Megnet, R. (1967) Mutants partially deficient in alcohol dehydrogenase in Schizosaccharomyces pombe. Arch. Biochem. Biophys. 121:194-201.

Meissner, G. y Delbrück, M. (1968) Carotenes and retinal in Phycomyces mutants. Plant Physiol. 43:1279-1283.

Murillo, F. J. y Cerdá-Olmedo, E. (1976) Regulation of carotene synthesis in Phycomyces. Mol. Gen. Genet. 148:19-24.

Murillo, F. J. (1980) Effect of CPTA on carotenogenesis by Phycomyces carA mutants. Plant Sci. Lett. 17:201-205.

Murillo, F. J., Torres-Martínez, S., Aragón, C. M. G. y Cerdá-Olmedo, E. (1981) Substrate transfer in carotene biosynthesis in Phycomyces. Eur. J. Biochem. 119:511-516.

Olson, J. A. y Knizley, H. Jr. (1962) The effect of diphenylamine on carotenoid, sterol and fatty acid synthesis in Phycomyces blakesleeanus. Arch. Biochem. Biophys. 97:138-145.

Ootaki, T. (1973) A new method for heterokaryon formation in Phycomyces. Molec. Gen. Genet. 121:49-56.

Ootaki, T., Lighty, A. C., Delbrück, M. y Hsu, W. J. (1973) Complementation between mutants of Phycomyces deficient with respect to carotenogenesis. Mol. Gen. Genet. 121:57-70.

Ootaki, T., Fischer, E. P. y Lockhart, P. (1974) Complementation between mutants of Phycomyces with abnormal phototropism. Molec. Gen. Genet. 131:233-246.

Otto, M. K., Jayaram, M., Hamilton, R. M. y Delbrück, M. (1981) Replacement of riboflavin by an analogue in the blue-light photoreceptor of Phycomyces. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:266-269.

Presti, D., Hsu, W. J. y Delbrück, M. (1977) Phototropism in Phycomyces mutants lacking  $\beta$ -caroteno. Photochem. Photobiol. 26:403-405.

Presti, D. y Delbrück, M. (1978) Photoreceptors for biosynthesis, energy storage and vision. Plant, Cell Environ. 1:81-100.

Pueyo, C. y Cerdá-Olmedo, E. (1981) Causes of cell death following exposure to different fungicides and heat. Exp. Mycol. 5:112-119.

Putzer, H. Werenskiold, K., Verfuether, C. y Schreckenbach, T. Blue light inhibits slime mold differentiation at the mRNA level. The Embo Journal. 2:261-267.

Rando, R. R. (1972) "In situ" generation of irreversible enzyme inhibitors. Nature 237:53.

Rando, R. R. (1974) Allyl alcohol-induced irreversible inhibition of yeast alcohol dehydrogenase. Biochem. Pharmacol. 23:2328-2331.

Reau, P. (1972) Uninucleate spores of Phycomyces. Planta 108:153-160.

Reddy, M. V. (1980) cAMP phosphodiesterase in wild type and mad mutants of Phycomyces. Phycomyces 4:50-53.

Reisner, A. H., Nemes, P. y Bucholtz, C. (1975) The use of coomassie brilliant blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 64:509-516.



Revuelta, J. L. (1981) Fotorregulación de la biosíntesis de  $\beta$ -caroteno en Phycomyces blakesleeanus. Tesis Doctoral, Universidad de León.

Roncero, M. I. G. (1980) Genética de Phycomyces blakesleeanus. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

Roncero, M. I. G. y Cerdá-Olmedo, E. (1982) Genetics of carotene biosynthesis in Phycomyces. Curr. Genet. 5:5-8.

Roncero, M. I. G., Zabala, C. y Cerdá-Olmedo, E. (1983) Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on Phycomyces spores. Enviado a publicación.

Rudolph, H. (1960) Weitere untersuchungen zur wärmeaktivierung der sporangiosporen von Phycomyces blakesleeanus II. Mitteilung. Planta 55:424-437.

Rudolph, H. (1961) Weitere untersuchungen zur wärmeaktivierung der sporangiosporen von Phycomyces blakesleeanus III. Mitteilung. Planta 57:284-312.

Russo, V. E. A. (1977) Ethylene-induced growth in Phycomyces mutants abnormal for autochemotropism. J. Bacteriol. 130:548-551.

Russo, V. E. A., Pohl, U. y Volpi, L. (1981) Carbon dioxide inhibits phorogenesis in Phycomyces and blue light overcomes this inhibition. Photochem. Photobiol. 34:233-236.

Sandmann, G. y Hilgenberg, W. (1979) Light-dependent intermediary metabolism of Phycomyces blakesleeanus BGFF. III. The contribution of asparagine to the formation of sporangiophores. Biochem. Physiol. Pflanz. 174: 794-801.

Schwartz, M., Gerace, L., O'Donnell, J. y Sofer, W. (1975) Drosophila alcohol dehydrogenase: origin of the multiple forms. En International Conference on Isozymes, 3d, Universidad de Yale, vol. I, pp. 725, Molecular Structure, Academic Press, New York.

Schwartz, D. y Osterman, J. (1976) A pollen selection system for alcohol dehydrogenase negative mutants in plants. Genetics 83:63-65.

Schwartz, M. y Sofer, W. (1976) Alcohol dehydrogenase-negative mutants in Drosophila: defects at the structural locus?. Genetics 83:125-136.

Singh, H. y Cama, H. R. (1975) Metabolism of carotenoids. *J. Scient. Ind. Res.* 34:219-230.

Sofer, W. H. y Hatkoff, M. A. (1972) Chemical selection of alcohol dehydrogenase negative mutants in Drosophila. *Genetics* 72:545-549.

Soler, J., De Arriaga, D., Cadenas, Q. y Cadenas, E. (1981) Substrate inhibition of lactate dehydrogenase from Phycomyces blakesleeanus: NADH dependence. *Exp. Mycol.* 5:357-362.

Sutter, R. P. (1975) Mutations affecting sexual development in Phycomyces blakesleeanus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:127-130.

Sutter, R. P. (1977) Regulation of the first stage of sexual development in Phycomyces blakesleeanus and in other mucoraceous fungi. En *Eukaryotic Microbes as Model Developmental Systems*. O'Day, D. H. y Horgen, P. A. ed., 2:251-272. Marcel Decker, Inc, New York y Basel.

Thatcher, D. R. (1980) The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase allelo enzymes ( $Adh^{N-11}$ ,  $Adh^S$  y  $Adh^{UF}$ ) from the fruitfly Drosophila melanogaster. *Biochem. J.* 187:875-886.

Thompson, J. N., Ashburner, M. y Woodruff, R. C. (1977) Presumptive control mutation for alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster. *Nature* 270:363.

Thornton, R. M. (1972) Alternative fruiting pathways in Phycomyces. *Plant Physiol.* 49:194-197.

Thornton, R. M. (1973) New photoreponses of Phycomyces. *Plant Physiol.* 51:570-576.

Thornton, R. M. (1975) Photoresponses of Phycomyces blakesleeanus. Initiation and development of sporangiophore primordia. *Am. J. Bot.* 62:370-378.

Torres-Martínez, S., Murillo, F. J. y Cerdá-Olmedo, E. (1980) Genetics of lycopene cyclation and substrate transfer in  $\beta$ -carotene biosynthesis in Phycomyces. *Genet. Res. Camb.* 36:299-309.

Ursprung, H., Sofer, W. y Burroughs, N. (1970) Ontogeny and tissue distribution of alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster. *Wilhelm Roux Arch.* 164:201-208.

Vigue, C. y Sofer, W. (1976) Chemical selection of mutants that affect ADH activity in Drosophila. III. Effects of ethanol. *Biochem. Genet.* 14:127-135.

Whitaker, B. D. y Shropshire, W. Jr. (1981) Spectral sensitivity in the blue and near ultraviolet for light-induced carotene synthesis in Phycomyces mycelia. *Exp. Mycol.* 5:243-252.

Williamson, V. M., Bennetzen, J., Young, E. T., Nasmyth, K. y Hall, B. D. (1980) Isolation of the structural gene for alcohol dehydrogenase by genetic complementation in yeast. *Nature* 283:214-216.

Wills, C. y Phelps, J. (1975) A technique for the isolation of yeast alcohol dehydrogenase mutants with altered substrate specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* 167:627.

Wills, C. (1976a) Controlling protein evolution. *Fed. Proc.* 35:2098-2101.

Wills, C. (1976b) Production of yeast alcohol dehydrogenase isoenzymes by selection. *Nature* 261:26-29.

Wills, C. y Jörnvall, H. (1979) The two mayor isozymes of yeast alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 99:323-331.

Worsfold, M., Marshall, M. J. y Ellis, E. B. (1977) Enzyme detection using phenazine methosulphate and tetrazolium salts: interference by oxigen. *Anal. Biochem.* 79:152-156.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis:

Al Prof. Juan Ramón Medina Precioso, director de esta Tesis, ya que sin el difícilmente podría haberse llevado a cabo.

Al Prof. Enrique Cerdá Olmedo, por sus brillantes sugerencias y comentarios.

A todos mis compañeros de trabajo durante estos años, entre ellos deseo recordar aquí especialmente a María Tortolero y Eduardo Santero.

A Asun por su inestimable ayuda técnica.

A Loli por su labor en el mecanografiado de esta Tesis.