

**EFFECTO MUTAGÉNICO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y AGENTES
ALQUILANTES SOBRE DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO
*PENICILLIUM***

Sergi Ferrer
Eulalia Alonso

y

Eduardo Vicente Pedrós
Departamento de Microbiología.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad de Valencia

SUMMARY

MUTAGENIC EFFECT OF ULTRAVIOLET RADIATION AND ALKYLATING AGENTS ON DIFFERENT Penicillium SPECIES.

The effects of different mutagenic agents (UV, DES and EMS) on the induction of genetic damage in P. chrysogenum, P. urticae and P. expansum are compared. Stable morphological, auxotrophic and drug-resistance modifications will be considered.

Survival curves in relation to the dosage of the mutagenic agents are homogeneous for the three species, except for EMS; that is probably due to different mutagen penetration into the spore. Slopes for DES and UV are similar, but the UV repair process is more effective.

The frequencies of different kinds of mutants, spore pigmentations, auxotrophies, and drug-resistances, have been calculated for a general survival of 0.5-1%. The results show significant differences; UV is more effective in inducing colour spore changes while DES produces more nutritional mutants. A different response has been obtained for P. urticae, which shows the highest frequencies for both kinds of mutants when treated with UV light.

The frequency of auxotrophic mutants has been increased by enrichment techniques. Also specific dyes have been used for visual selection of these mutants.

Drug-resistant strains have been obtained only when treated with UV radiation. Alkylating agents have been ineffective.

All these comparisons demonstrate that UV light and chemical mutagenic agents are useful to obtain genetic markers and that their suitability depends on the properties of the starting material and the type of selected mutant.

RESUMEN

Se estudian los efectos que diferentes agentes mutagénicos (radiación UV, DES y EMS) poseen en la inducción de lesiones genéticas traducibles en modificaciones fenotípicas estables de tipo morfológico, auxotrófico o resistente, en P. chrysogenum, P. urticae y P. expansum.

Las relaciones dosis-respuesta presentan un resultado homogéneo para los tratamientos considerados, excepto en el caso del EMS y debido posiblemente a diferencias en la penetración del mutágeno en la espora. Las curvas para DES y la radiación muestran características muy similares, siendo los fenómenos reparadores más efectivos en el caso de la Luz Ultravioleta.

Bajo una supervivencia general del 0,5-1%, se han calculado las frecuencias de los diferentes tipos de mutantes, presentándose diferencias altamente significativas; la radiación UV se ha mostrado más eficaz en la inducción de variaciones morfológicas, mientras que el DES lo ha sido en la de mutantes nutricionales. Los resultados para P. urticae son diferentes, presentando bajo el efecto de la radiación las máximas frecuencias para ambos tipos de marcadores.

En las tres especies estudiadas, ha sido posible aumentar la frecuencia de mutantes auxotróficos mediante la utilización de procedimientos de enriquecimiento. Asimismo, se ha realizado una selección visual de este tipo de marcadores por medio de colorantes específicos.

La obtención de cepas resistentes sólo ha sido posible mediante la utilización de la radiación UV, resultando los tratamientos químicos ineficaces.

Toda esta serie de intercomparaciones muestra que tanto los mutágenos alquilantes como la radiación, resultan eficaces en la obtención de marcadores genéticos, y que su idoneidad dependerá de las propiedades del material sobre el que actúan y del tipo de mutantes seleccionados.

INTRODUCCION

Las diferencias genéticas existentes entre los organismos, aún entre los más próximos filogenéticamente, hacen predecible que muy raramente vayan a responder de un mismo modo a un cierto tratamiento mutagénico (HOLLAENDER & EMMONS, 1946) o a un determinado programa de selección (PONTECORVO, 1952), lo cual trae consigo el desarrollo de una genética experimental para un organismo determinado del cual se precisa un amplio espectro de mutantes, o un método bien probado de obtenerlos. El objetivo, consiste pues en conseguir éstos por la vía más práctica posible, y considerar los mecanismos implicados sólo en la medida necesaria para la elección del procedimiento experimental idóneo.

Es un hecho empírico que el uso de diferentes mutágenos da como resultado el aislamiento de distintos espectros de mutantes (HOFFMANN, 1980); es por ello que la elección de un único agente no resulta deseable en la búsqueda de un tipo particular de modificación, y lo normal es el uso de varios tratamientos mutagénicos en escala limitada, en lugar de la utilización masiva de uno solo de ellos (BONHOEFFER & SCHALLER, 1965).

Los hongos, a causa de su diversidad y características esencialmente versátiles, proporcionan una importante herramienta de trabajo en el estudio de los efectos mutacionales, tanto de las radiaciones como de los agentes químicos, pero los estudios en estos organismos se han reducido a Neurospora crassa, Schizosaccharomyces pombe, Aspergillus spp. y pocos géneros más (PONTECORVO et al., 1953).

En el presente trabajo, al pretenderse obtener un amplio espectro de marcadores genéticos, que han de ser utilizados en experiencias de fusión somática y transformación genética, se realiza un amplio estudio del efecto de diversos agentes mutagénicos sobre diferentes especies del género Penicillium.

MATERIAL Y METODOS

Organismos. Se han utilizado tres especies del género Penicillium aisladas a partir de excipientes farmacéuticos, y que fueron cedidas por la Dra. María Angeles Calvo, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona: P. chrysogenum, P. expansum y P. urticae. Los clones se han mantenido por una parte en tierra estéril, y por otra en agar extracto de malta, a fin de obtener un cultivo de donde se han tomado cada vez las esporas a utilizar; así se evita al máximo la variabilidad genética y se mantienen las características de la cepa original.

Métodos de cultivo. Para el cultivo en medio completo (MC), se empleó la siguiente composición: Extracto de Malta 2%, Glucosa 2%, Peptona Micológica 0,1%; y como medio mínimo (MM) el descrito por PONTECORVO et al., 1953, y compuesto por NaNO_3 6 g, KCl 0,52 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,52 g, KH_2PO_4 1,52 g, FeSO_4 0,01 g, ZnSO_4 0,01 g, Glucosa 10 g en un litro de agua destilada. Para los medios sólidos, se añadía Agar al 1,5%. El pH se ajustó siempre a 5,7, y posteriormente se esterilizaba en el autoclave, a 115°C durante 30 minutos. Para las determinaciones de posibles auxotrofías, se añadieron asépticamente los diferentes requerimientos a las concentraciones adecuadas, al MM ya estéril. En todos los casos las placas se incubaron a 28°C durante 4-5 días en oscuridad para permitir así el crecimiento de las cepas.

Obtención de suspensiones puras de esporas. Como base material para el tratamiento mutagénico, se eligieron los conidios del hongo, ya que constituyen un material mucho más uniforme que el micelio, y de esta forma se hace posible una fácil cuantificación de los efectos letales de cada tratamiento. Así, se añadían 10 ml de agua destilada estéril a un tubo que contenía el cultivo inclinado de cuatro días en MC, obteniéndose por ligero raspado de su superficie una suspensión de esporas, la cual se filtraba por un filtro de vidrio poroso Jena, con un diámetro de poro de 100-160 μm , y se lavaban dos veces las esporas por centrifugación (300 x g, 5 minutos).

Tratamientos mutagénicos. En cada caso se realizaron las correspondientes curvas de supervivencia, con la finalidad de determinar las dosis de tratamiento óptimo. Para la irradiación con Luz Ultravioleta (UV), se pusieron 10 ml. de una suspensión de 10^6 es-

poras por mililitro en una placa estéril de vidrio de 9 cm de diámetro, y se sometieron a una irradiación de $4 \text{ J} \times \text{mm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$. Cada cierto tiempo se tomaron muestras, que se sembraban en MC. Respecto al tratamiento con Etilmetanosulfonato (EMS) ó Dietilsulfato (DES), la suspensión de esporas se realizó esta vez en tampón de fosfato potásico 0,2 M y pH 7,0, colocándose 1 ml de esta solución en un erlenmeyer de 25 ml con 8,7 ml del tampón y 0,3 ml del mutágeno. Este erlenmeyer se mantenía en un agitador recíproco ajustado a 15 mm de radio de giro, 120 rpm y temperatura de 20°C. Cada cierto tiempo se tomaron muestras, que se sembraron en placas de MC. Las diluciones en el caso del EMS se realizaron en tampón fosfato potásico adicionado de tiosulfato sódico al 2%, a fin de inactivar el mutágeno (FREESE, 1971).

Aislamiento de mutantes. Para cada especie se eligieron las dosis mutagénicas que daban una supervivencia del 0,5-1% del total de las esporas tratadas (ALIKHANYAN, 1971). Respecto a los mutantes morfológicos, éstos se aislaron directamente de las placas mutagenizadas por selección visual, escogiendo preferentemente las colonias que presentaban una coloración amarillenta, ocre ó albina, en contraposición a las cepas salvajes, que son verdes. Posteriormente estas colonias eran sembradas tanto en MM como en MC varios pases, con el fin de determinar su estabilidad. Para los mutantes resistentes a sustancias químicas, Cristal Violeta, Verde de Malva, Nistatina, Clotrimazol y Benlate, el procedimiento a seguir era el mismo, pero sembrando esta vez en placas de MC con el inhibidor correspondiente en cada caso, y poniendo alrededor de 10^5 esporas por placa, ya que la frecuencia de obtención de estos mutantes es muy baja. En cuanto a los auxótrofos, el procedimiento inicial consistió en repicar una a una las colonias obtenidas después del tratamiento, en tubos con MM y MC. También se probó el procedimiento utilizado por LEDERBERG & LEDERBERG, 1952, consistente en repicar las colonias crecidas en dos placas, una con MM y otra con MC, por medio de un disco de terciopelo estéril, y también una modificación del mismo descrita por MACKINTOSH & PRITCHARD, 1963, en la cual se añadía a los medios de cultivo deoxicolato sódico, a fin de evitar la expansión de las colonias. Sin embargo, ambos tratamientos fueron rechazados por presentar numerosos problemas. Tanto en un caso como en otro, las colonias crecidas en MC y no en MM eran resembradas para comprobar su fenotipo, y por último se pasaba a determinar el tipo de auxotrofia. El procedimiento utilizado es el descrito por DAVIS et al., 1980, consistente en sembrar cada cepa en una serie de placas de MM adicionadas de los diversos requerimientos nutricionales. De esta manera, un mutante auxotrófico sólo crecería en las placas que tenían el requerimiento para el cual se condiciona dicha auxotrofia. Otra posibilidad para el aislamiento de mutantes auxotróficos se basó en una modificación del método utilizado por HORN & WILKIE, 1966, y por MIDDELHOVEN et al., 1976, consistente en añadir al medio $10 \mu\text{g/ml}$ de Floxina B (Rojo de Magdala), u otros colorantes químicamente relacionados, tal como la Eosina B y la Eosina Y, aislando las colonias que presentaban una pigmentación rosada por la acumulación del colorante en el micelio. Las colonias así seleccionadas eran sembradas en MM y MC para su confirmación.

Enriquecimiento de mutantes auxotróficos. Se ensayaron dos métodos para aumentar la proporción de auxotrofías sobre el total de colonias probadas. En el primero de ellos, el enriquecimiento por filtración, consistió en añadir parte de la suspensión de esporas mutagenizadas a un erlenmeyer con MM, y mantenerlo durante 36 horas en agitación a 28°C; de esta manera, las esporas prototrofas germinaban formando micelio, y las auxótroficas no, pudiéndolas así separar por filtración a través de vidrio poroso Jena (diámetro de poro 16-40 μm). El segundo método consistió en poner también las esporas en un erlenmeyer con MM, y añadirle esta vez Clotrima zol a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; así, las esporas prototrofas germinaban, siendo seleccionadas negativamente, mientras que las auxótroficas, no germinadas, sobrevivían al tratamiento.

RESULTADOS

Curvas de supervivencia. La finalidad de estos tratamientos mutagénicos, era obtener una colección de cepas con marcadores genéticos bien definidos, conservando el resto de sus características fisiológicas y somáticas en perfecto estado (viabilidad, velocidad de crecimiento, capacidad de esporulación, forma típica, etc). Por ello, se realizaron una serie de curvas de supervivencia de cada especie para los distintos tratamientos mutagénicos, con la finalidad de observar, en cada caso, el daño real causado, y escoger así la dosis óptima del mutágeno. Esta será la correspondiente a una supervivencia del 0,5-1% (ALIKHANYAN, 1971), ya que es en este rango donde podremos obtener una cantidad suficiente de mutantes que al mismo tiempo conserven su fondo genético lo más limpio posible.

Efecto de la Luz Ultravioleta. La Luz UV, en las condiciones en que ha sido utilizada, ha mostrado poseer un potente efecto muta-

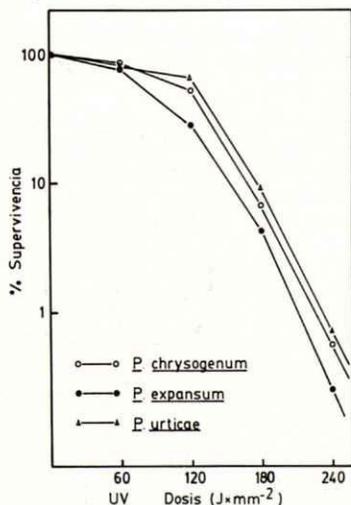


Figura 1. Efecto de la Luz UV sobre la supervivencia de las esporas en las tres especies de Penicillium.

génico, así como un gran índice de mortalidad. Los resultados pueden apreciarse en la figura 1, en la que se observa un comportamiento similar para las tres especies; después de un largo período inicial de escasa letalidad, la curva baja rápidamente hasta alcanzarse en menos de un minuto (240 J x mm^{-2}) una mortalidad del 99%.

Este comportamiento puede explicarse en base a un marcado efecto de los procesos reparadores, los cuales son eficaces durante los primeros 30 segundos (120 J x mm^{-2}), sobrepasando, a partir de este momento, los daños producidos a la capacidad de los sistemas reparadores, lo que conduce a una fase de muerte exponencial (WITKIN, 1976). Además, este efecto reparador es máximo en P. urticae, y mínimo en P. expansum, para el que la supervivencia es ya inferior a partir de los primeros instantes; P. chrysogenum presenta un comportamiento intermedio entre ambos. Así pues, vemos que si bien existen algunas pequeñas diferencias entre estas tres especies, todas responden de manera muy similar a un mismo patrón de reparación y letalidad, lo que nos permitirá estudios comparativos entre ellas.

Como base para la realización de un primer tratamiento, se escogió la irradiación de P. chrysogenum durante 45 segundos (180 J x mm^{-2}) y un minuto (240 J x mm^{-2}), pensando en estudiar para distintas dosis las frecuencias de mutantes obtenidos respecto del total de supervivientes, a fin de elegir así la que presentara una mayor eficacia. Tal y como se puede observar en la tabla 1, los valores encontrados para marcadores morfológicos tras una irradiación de un minuto, son netamente superiores a las de 45 segundos; 4,5% frente a 2,5%. Así pues, se determinó que para posteriores experiencias se utilizarían dosis de 240 J x mm^{-2} tanto para P. chrysogenum como para las restantes especies a tratar.

Tabla 1. Relaciones entre el nivel de supervivencia y la frecuencia de mutantes morfológicos en P. chrysogenum bajo la radiación UV.

Dosis de mutagenización	180 J x mm^{-2}	240 J x mm^{-2}
Supervivencia	6,82%	0,55%
Colonias	1140	1203
Variantes morfológicas	4,6% (100%)	6,6% (100%)
Estables réplica 1	3,1% (68%)	5% (76%)
Estables réplica 2	2,5% (54%)	4,5% (68%)
Estables finales	2,5% (54%)	4,5% (68%)
	A B	A B

A: Supervivencia. B: Estabilidad de los mutantes aislados.

Efecto de los agentes alquilantes. El efecto de los agentes químicos alquilantes ha sido estudiado a través del empleo del DES y el EMS, y ambos han mostrado poseer junto con un débil carácter mutagénico y letal, comportamientos diferentes frente a las tres especies estudiadas, posiblemente a causa de la poca permeabili-

dad que presentan frente a algunas sustancias las esporas fúngicas.

La actuación del EMS (figura 2) sobre *P. chrysogenum* presenta características similares a las de la radiación UV, pero minimizándose el periodo reparador inicial, y alcanzándose una mortalidad del 99% sólo al cabo de seis horas de tratamiento. Por otra parte, tanto *P. urticae* como *P. expansum* se muestran altamente insensibles a este proceso, principalmente el último de ellos, en el que prácticamente no se observa ningún descenso en la población viable después de siete horas de exposición al mutágeno. Junto a esta escasa mortalidad, la observación de las colonias obtenidas a partir de esporas tratadas, demuestra que el EMS induce escasa o nula modificación morfológica de las mismas. Ante estos resultados, se ha descartado el uso del EMS de cara a posteriores experiencias, pues el objeto del presente trabajo consistía en comparar el efecto de distintos agentes mutagénicos sobre las tres especies fúngicas estudiadas, en condiciones similares de tratamiento.

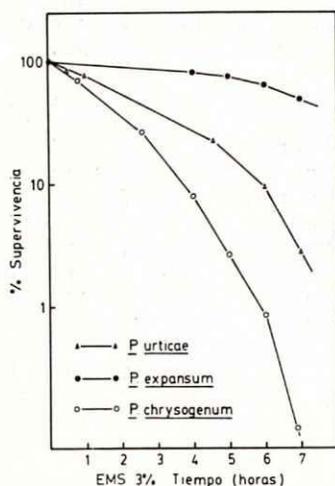


Figura 2. Efecto del EMS sobre la supervivencia de las esporas en las tres especies de *Penicillium*

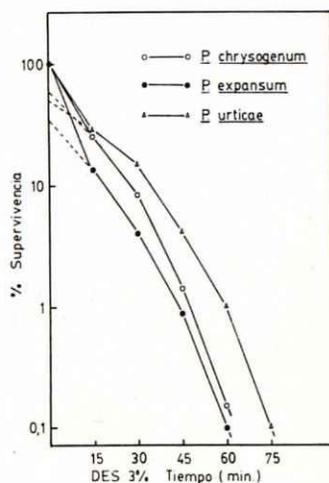


Figura 3. Efecto del DES sobre la supervivencia de las esporas en las tres especies de *Penicillium*

El uso del DES (figura 3), presentó frente al EMS una serie de aspectos positivos. En primer lugar, en análogas condiciones, puede alcanzarse una mortalidad igual o mayor al 99% en un periodo de exposición de aproximadamente una hora, lo cual reduce considerablemente la fase de mutagenización. Por otra parte, los tres hongos se comportan de un modo bastante similar frente al tratamiento, siendo de destacar la fuerte disminución de los fenómenos reparadores iniciales.

En el proceso de mutagénesis con DES, han mostrado particular importancia dos características relacionadas con las propiedades de las esporas y del propio mutágeno. En primer lugar, cuando ambos se ponen en contacto, el DES que es una sustancia oleosa y por ello altamente hidrofóbica, forma en el medio acuoso en el

que se va a realizar el tratamiento pequeñas esferas o micelas que actúan como centros captadores de las esporas presentes en la suspensión, ya que también presentan alto grado de hidrofobicidad. Ello determina que el número de esporas libres originalmente introducido en la suspensión, se reduzca según un parámetro (grado de hidrofobicidad) característico para cada especie. En P. expansum ésta es extrema, y no tanto en P. chrysogenum y P. urticae, comportándose estos dos últimos de un modo similar entre sí (figura 3). Las líneas punteadas que aparecen en la misma, representan el efecto real letal del mutágeno, y la distancia que separa el origen de dichas líneas con el 100% de supervivencia indica el porcentaje de adsorción a las micelas del DES (40, 50 y 60% respectivamente para P. chrysogenum, P. urticae y P. expansum). En segundo lugar, e independientemente de este hecho, el resultado para cada una de las especies, vendrá dado en función de la propia sensibilidad de éstas al mutágeno.

Consiguientemente, las condiciones que se escogieron para los tratamientos mutagénicos posteriores fueron DES al 3% durante 45 minutos ó una hora, eligiéndose una concentración tan elevada a fin de conseguir una supervivencia media del 1%, reduciendo al máximo el tiempo de exposición de las esporas al mutágeno.

Obtención de marcadores genéticos. Una vez caracterizado el comportamiento de las especies estudiadas frente a cada mutágeno, y escogidas las dosis óptimas para cada tratamiento, se pasó a elegir los tipos de marcadores genéticos idóneos para posteriores estudios. Así, se pensó en tres tipos de mutantes: morfológicos, auxotrófos y resistentes a productos de acción antifúngica. Los primeros, fueron elegidos por su fácil caracterización y manejo, y de entre ellos se seleccionaron los que presentaban una pigmentación de la colonia amarillenta, ocre ó albina, fácilmente distinguibles del color verde característico de la cepa salvaje. Los mutantes auxotróficos, se eligieron por presentar unos marcadores claros, constantes y, sobre todo, fácilmente seleccionables por la presencia/ausencia del requerimiento específico en el medio de cultivo. Los mismos criterios rigieron en cuanto a los resistentes a determinados productos de acción antifúngica.

Mutantes morfológicos. La frecuencia y estabilidad de los mutantes morfológicos, obtenidos bajo los distintos tratamientos mutagénicos, se recopila en la tabla 2. El primer hecho destacable lo constituye la enorme diferencia entre el número de mutantes obtenidos mediante el tratamiento con luz UV y DES para iguales niveles de supervivencia de ambos; la radiación UV ha resultado altamente eficaz como medio de obtención de mutantes morfológicos de las tres especies, y principalmente en P. chrysogenum, en el que llegan a constituir hasta el 4,5% de los supervivientes cuando irradiamos un minuto (240 J x mm^{-2}). Otro hecho destacable lo constituye la diferente estabilidad de estos marcadores, manifiesta por el índice de reversión al carácter salvaje; mientras que en P. chrysogenum y P. urticae aproximadamente el 70% de los mutantes aislados permanecen estables, en P. expansum sólo lo eran el 43%. Respecto al DES, en todos los casos se observa una mayor eficacia que en el tratamiento con UV; concretamente, el P. chrysogenum es el que alcanza valores más elevados, alrededor del 0,3% del total de supervivientes, presentando un porcentaje de re

Tabla 2. Frecuencia y estabilidad de los mutantes morfológicos obtenidos bajo distintos tratamientos y procesos de selección.

Especie	P. chrysogenum		P. urticae		P. expansum	
	UV 1'	DES 45'	UV 1'	DES 1h	UV 1'	DES 45'
Colonias ensayadas	1203	3207	1936	15300	5769	29540
Variantes morfológicos	6,6%	0,6%	0,5%	0,4%	3,5%	-
Estables 1ª réplica	5%	0,3%	0,4%	0,04%	2,8%	-
Estables 2ª réplica	4,5%	0,3%	0,3%	0,04%	2,2%	-
Frecuencia real, estables 5ª réplica	4,5%	0,3%	0,3%	0,04%	1,5%	$< 2,9 \times 10^{-4}$
Frecuencia enriquecimiento filtración	2,4%	-	0,4%	-	$< 10^{-3}$	-
Frecuencia enriquecimiento antibiótico	0,7%	-	0,5%	-	$< 10^{-3}$	-

-: No obtenidos.

versión del 50%, mientras que *P. urticae* sólo llega al 0,04%, si bien es cierto que los aislados para esta especie no presentaron reversión. En cambio, no fue posible obtener mutantes morfológicos de *P. expansum*, con lo que, para este tratamiento, cabe decir que la frecuencia de obtención de estos marcadores es menor de 3×10^{-4} .

Otra característica importante es que la posibilidad de recuperación de los mutantes morfológicos, salvo en el caso de *P. urticae*, viene enormemente influenciada por el número de colonias crecidas en las placas (figura 4). Para *P. chrysogenum* y *P. expansum*, cuando este número excede de cien, la posibilidad de obtener mutantes morfológicos es excesivamente baja, siendo conveniente

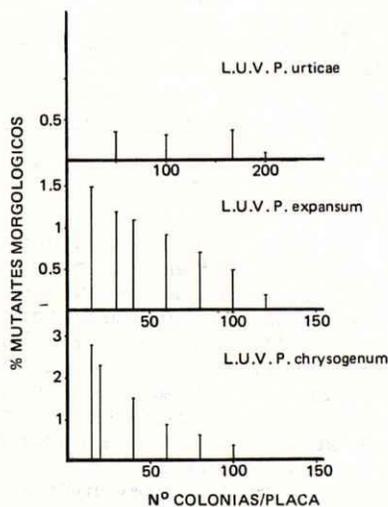


Figura 4. Efecto del número de colonias por placa en la frecuencia de mutantes morfológicos.

no sobrepasar las 30 colonias por placa. Esto se explica porque las esporas fúngicas presentan una fuerte competitividad a la hora de germinar en el medio de cultivo; por lo tanto, tras un tratamiento mutagénico, serán las esporas no dañadas las que tendrán una mayor ventaja frente a los mutantes, siempre más alterados, disminuyendo la relación de éstos a los salvajes al aumentar la proporción de colonias por placa. *P. urticae* presenta excepcionalmente una gran estabilidad en los mutantes obtenidos de los diferentes tratamientos mutagénicos, los cuales se han caracterizado por su alto grado de estabilidad (tabla 2), y ello es confirmado en estos resultados, que hacen suponer que los variantes morfológicos de esta especie compiten por el medio en igualdad de condiciones respecto a las cepas no alteradas.

Auxotrofías. Los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos y procedimientos de selección vienen expresados en la tabla 3. Puede comprobarse en ella, que el DES es más eficaz en la producción de este tipo de mutantes que de morfológicos, y que só

Tabla 3. Frecuencias de mutantes auxotróficos tras diferentes procedimientos de aislamiento y enriquecimiento.

Especie	<i>P. chrysogenum</i>		<i>P. urticae</i>		<i>P. expansum</i>	
	UV 1'	DES 45'	UV 1'	DES 1h	UV 1'	DES 45'
Aislamiento directo	0,47%	0,82%	1,4%	0,5%	10 ⁻³	0,2%
Enriquecimiento por filtración	1,8%	3,1%	0,95%	0,36%	4,7x10 ⁻³	1%
Enriquecimiento por antibiótico	0,9%	1,6%	1%	0,4%	5,9x10 ⁻³	1,2%
Colorante	0,47%	0,79%	1,2%	0,5%	10 ⁻³	0,16%
Variantes morfológicos iniciales	4%	-	1%	-	0,11%	-
Variantes morfológicos iniciales tras enriquecimiento	6,6%	-	1%	-	0,21%	-

--: No obtenidos.

lo en el caso de *P. urticae* la radiación con Luz UV es más efectiva que el DES para un mismo porcentaje de supervivencia.

En otro orden de cosas, es destacable el hecho de que para las tres especies estudiadas, puede detectarse, de forma más directa, a los mutantes auxotróficos con ayuda de una serie de colorantes adicionados a los medios de cultivo, tales como la Eosina B, Eosina Y y Floxina B. En las tablas de resultados, sólo se muestran los que dieron frecuencias mayores, correspondiendo un colorante diferente para cada una de las especies (*P. chrysogenum* con Floxina B, *P. urticae* con Eosina B, y *P. expansum* con Eosina Y). Las colonias mutantes auxótrofes presentaban una coloración rosada debido a la acumulación en las mismas del colorante, mientras que las prototrofas mostraban pigmentación normal, siendo pues fá

cil su identificación y aislamiento. En ninguno de los casos, la adición del colorante afecta a la viabilidad de las esporas, tanto salvajes como las que presentan mutación, pues los resultados obtenidos mediante el aislamiento directo son numéricamente semejantes a los anteriores, si bien es cierto que si todas las colonias auxótrofas presentaban coloración rojiza, no se cumplía la relación inversa. En principio, la Floxina B se utilizó para la obtención de mutantes auxotróficos y deficientes en respiración (HORN & WILKIE, 1966), o bien incapaces de utilizar diversas sustancias nitrogenadas como única fuente de nitrógeno (MIDDELHOVEN et al., 1976) en levaduras, y esto explicaría la observación anterior: parte de las colonias rojizas serán auxótrofas, parte deficientes en respiración, parte incapaces de utilizar determinadas sustancias como única fuente de nitrógeno, etc.

Así pues, el verdadero valor del método descrito radica por una parte en su aplicación a nivel de hongos filamentosos, por otra en aumentar el espectro de colorantes útiles para este procedimiento, y finalmente por ser una técnica discriminatoria, aunque no de forma total, para el aislamiento de mutantes auxotróficos, permitiendo reducir así considerablemente el esfuerzo que supone la obtención de este tipo de marcadores, al disminuir drásticamente el número de colonias que ha de ser analizado, si bien se desconocen por el momento las bases moleculares de su mecanismo de acción.

Por otra parte, principalmente para P. chrysogenum y en menor medida para P. expansum, resulta indicada la utilización de procedimientos de enriquecimiento, bien sea mediante filtración o bien por el empleo de antibióticos. Sin embargo, en el caso de P. urticae no resultan efectivos estos métodos, ya que, como se comprueba por otros datos ya expuestos, las colonias de este hongo son extraordinariamente resistentes a las condiciones adversas del medio, lo que permitirá a los mutantes auxotróficos comportarse de modo análogo a las esporas no dañadas.

Resulta muy interesante el hecho de que en las tres especies, pero principalmente en P. expansum, pueden recuperarse algunas auxotroías procedentes del primer aislamiento de variantes morfológicos, tratándose sin duda de mutaciones independientes, ya que la frecuencia de comutación es extraordinariamente baja. Un hecho que refuerza este punto, radica en que el empleo de métodos de enriquecimiento para mutantes auxotróficos, bien sea mediante filtración o por el uso de antibióticos, no sólo no aumenta el porcentaje de morfológicos, sino que ejerce un efecto negativo sobre ellos.

Mutantes resistentes. Sólo han podido obtenerse cepas resistentes al fungicida Benlate (50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) bajo tratamiento con Luz UV (180-240 $\text{J} \times \text{mm}^{-2}$) y en una frecuencia que no sobrepasa a 2×10^{-6} .

Tanto para el resto de antifúngicos como para los colorantes utilizados (Cristal Violeta, Verde de Malaquita, Nistatina y Clotrimazol), han resultado ineficaces todos los tratamientos mutagénicos ensayados, no obteniéndose resultados positivos a pesar de que el número de esporas probadas ha sido extraordinariamente alto (alrededor de 10^7 en cada ensayo). Una posible explicación a este hecho puede encontrarse en que cualquiera de las resistencias buscadas requiera que se produzcan modificaciones genéticas tan numerosas como bien determinadas, con lo que la probabilidad

de obtener estas cepas es extraordinariamente baja.

DISCUSION

Tres especies del género Penicillium han sido comparadas respecto a los efectos mutagénicos que en ellos se producen tras el tratamiento con radiación UV o agentes alquilantes (DES y EMS).

La radiación UV ha sido, y es, un tratamiento mutagénico ampliamente descrito y utilizado en la obtención rutinaria de mutantes (PONTECORVO, 1952; BUXTON & HASTIE, 1962; JAMES & KILBEY, 1977). El EMS es bien conocido como un poderoso agente alquilante cuya efectividad mutagénica ha sido demostrada en innumerables experimentos con diferentes sistemas celulares (LOVELESS, 1966); sus mecanismos de acción, junto con el de otros agentes alquilantes, han sido investigados y discutidos en detalle (FREESE, 1971; HESLOT, 1965; OSTERMAN-GOLKAR & EHRENBERG, 1970; PRICE et al., 1969), y por estas razones fueron originalmente elegidos en la mutagenización de Penicillium.

Sin embargo, el uso del EMS ha presentado notables dificultades, principalmente relacionadas con problemas de absorción por las esporas fúngicas, por lo que fue sustituido en la práctica por el DES, el cual mostró poseer un mayor efecto letal y mutagénico; éste se manifestó inicialmente en un mayor número de lesiones morfológicas, lo cual fue posteriormente confirmado tras el cálculo de las frecuencias de los diferentes tipos de mutaciones producidas.

Las amplias diferencias en las respuestas al EMS son evidentes (figura 2), y sin embargo las sensibilidades relativas al DES son muy similares y no difícilmente comparables a las obtenidas tras la irradiación; es por ello que la Luz UV y el DES representan un bloque homogéneo de comportamiento frente a la diversidad y falta de homogeneidad en la respuesta al EMS; las razones de estos comportamientos no son en la actualidad bien conocidas. Ciertas tentativas de explicación pueden realizarse para afrontar las diferencias interespecíficas hacia el mismo mutágeno: penetración diferencial del agente debido a diferencias fisiológicas entre las especies consideradas, variación en los sistemas reparadores que harán predecibles respuestas diferenciales (LAWLEY, 1974) entre otras. En general, nueva luz sobre estos aspectos podría obtenerse al ampliar estos experimentos a otros sistemas.

La variación de la respuesta de una misma especie a diferentes mutágenos, puede encontrarse influenciada por la penetración diferencial de éstos. Una explicación más discreta la constituye la distinta reactividad de uno de los mutágenos, en nuestro caso el DES, frente a otro, el EMS. Los mecanismos de reacción han sido discutidos con detalle (PATTERSON, 1973), y en general las reactividades específicas dependen del hecho en sí: el agente alquilante actúa mediante mecanismos S_N1 ó S_N2 , siendo el DES un típico S_N2 , mientras que el EMS reacciona por combinación de ambos mecanismos, lo cual concuerda con los datos obtenidos por COUCH & HSIE (1976) respecto al hecho de que el DES posee un mayor carácter mutagénico que el EMS, resultados éstos también confirmados en nuestro trabajo.

Las razones para las diferentes relaciones dosis-respuesta características, inducidas por la radiación y agentes químicos,

no están actualmente aclaradas. La falta de datos acerca de la velocidad y grado de penetración de los mutágenos químicos, dificulta la comparación cuantitativa del efecto mutagénico de una dosis química con una de irradiación, hablando en términos de exposición real (CHANDLER, 1974). Una de las más claras diferencias entre los efectos de ambos tipos de agentes mutagénicos, radica en el hecho de que las tres especies presentan respuestas esencialmente idénticas a la radiación, pero muy diferentes a los agentes alquilantes. Ello puede indicar que bien el número de lesiones inducidas y/o de reparaciones subsiguientes de ciertas de estas lesiones, difieren para ambos. La diferencia mejor conocida entre los mecanismos mutacionales de la acción de las radiaciones y de los agentes químicos, es el hecho de que éstos no ejercen sus efectos de modo general (BROCK, 1971); así, en *E. coli* el EMS produce preferencialmente mutaciones en genes activos, y no en los inactivos. Asimismo, pueden existir zonas de DNA que actúen como "puntos calientes" para los efectos de ciertos mutágenos químicos (FAHMY & FAHMY, 1971), cuya localización en los cromosomas pueda variar, así como con el agente químico que induce la lesión. En contraste, la radiación ejerce usualmente un daño general (BROCK, 1971).

Estos factores probablemente expliquen el hecho de que los espectros mutacionales hallados difieran para ambos tipos de mutágenos. Los datos reflejados en las tablas 2 y 3 muestran que la radiación es más eficaz en la inducción de mutantes morfológicos y resistentes, así como de auxotróficos en *P. urticae*, mientras que el DES lo es en la obtención de auxotrofías en *P. chrysogenum* y *P. expansum*. Estas diferencias pueden encontrarse también influenciadas por el hecho de que muy pocas aberraciones cromosómicas son producibles por los agentes alquilantes, y de ellas la mayoría lo son de tipo intracromosómico, frente a las inducidas por la radiación UV (NILAN & KONZAN, 1961). Además, los agentes químicos son más eficientes en la inducción de mutaciones en locus específicos (NAWAR et al., 1971), y probablemente reflejen una proporción más favorable en la relación mutación-supervivencia.

Son numerosas las especulaciones realizables a la vista de las enormes diferencias en las frecuencias de mutación para un mismo nivel de supervivencia, así como frente a las estabilidades y características de las cepas mutantes obtenidas. Sin duda muchos de estos aspectos, esencialmente aquellos relacionados con los daños genéticos asociados a las mutaciones inicialmente seleccionadas, pueden abordarse mediante las actuales técnicas de fusión de protoplastos, y a través de ellas puede llegarse a una mejor comprensión tanto de los mecanismos mutacionales de los agentes estudiados, como de las proximidades genéticas entre las diferentes especies seleccionadas. Finalmente, se ha obtenido una extensa colección de cepas que permitirán el diseño de sistemas de selección de híbridos somáticos en las experiencias de fusión, tanto intra como intergenéricas.

BIBLIOGRAFIA

- ALIKHANYAN, S.I., 1971. Selection of wine yeasts using mutagens. *Sov. Genet.* 7: 1200-1205.
- BONHOEFFER, F. & H. SCHALLER, 1965. A method for selective enrichment of mutants based on the high UV sensitivity of DNA con-

- taining 5-Bromouracil. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 20:93-97.
- BROCK, R.D., 1971. Differential mutation of the B-galactosidase gene of *E. coli*. *Mutation Res.* 11: 181-186.
- BUXTON, E.W. & A.C. HASTIE, 1962. Spontaneous and Ultraviolet Irradiation-Induced Mutants of *Verticillium albo-atrum*. *J. gen. Microbiol.* 28: 625-632.
- CHANDLER, J.L.R., 1974. The chemical dynamics of mutagenesis and carcinogenesis. I. A chemical-kinetic model of dose-response relationships. *Mutation Res.* 25: 169-178.
- COUCH, D.B. & A.W. HSIE, 1976. Dose-response relationships of cytotoxicity and mutagenicity of nonfunctional alkylating agents in chinese hamster ovary cells. *Mutation Res.* 38: 399.
- DAVIS, R.W., D. BOTSTEIN & J.R. ROTH, 1980. *Advanced Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor, New York.
- FAHMY, O.G. & M.J. FAHMY, 1971. Mutability at specific euchromatic and heterochromatic loci with alkylating and nitroso compounds in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* 13: 19-34.
- FRESE, E., 1971. Molecular mechanisms of mutations. In *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*. Vol 1. Hollaender Ed. Plenum Press. New York. pp 1-56.
- HESLOT, H., 1965. The nature of mutations. *Radiat. Bot. Suppl.* 5: 3-45.
- HOFFMANN, G.R., 1980. Genetic Effects of Dimethyl Sulfate, Diethyl Sulfate and Related Compounds. *Mutation Res.* 75: 63-129.
- HOLLAENDER, A. & C.W. EMMONS, 1946. Induced mutations and speciation in fungi. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 11:78-84.
- HORN, P. & D. WILKIE, 1966. Use of Magdala Red for the Detection of Auxotrophic Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 91: 1388.
- JAMES, A.P. & B.J. KILBEY, 1977. The Timing of UV Mutagenesis in Yeasts. A Pedigree Analysis of Induced Recessive Mutation. *Genetics* 87: 237-248.
- LAWLEY, P.D., 1974. Some chemical aspects of dose-response relationships in alkylation mutagenesis. *Mutation Res.* 23:283-295.
- LEDERBERG, J. & E.M. LEDERBERG, 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.* 63: 399.
- LOVELESS, A., 1966. *Genetic and allied effects of alkylating agents*. Butter Scientific Publications. London.
- MACKINTOSH, M.E. & R.H. PRITCHARD, 1963. Ailment of auxotrophic mutants with sodium deoxicolate. *Gen. Res.* 4: 320-322.
- MIDDELHOVEN, W.J., B. BROEKHUIZEN & J. VAN EIJK, 1976. Detection, with the Dye Phloxine B, of Yeast Mutants Unable to Utilize Nitrogenous Substances as the Sole Nitrogen Source. *J. Bacteriol.* 128: 851-852.
- NAWAR, M.M., C.F. KONZAK & R.A. NILAN, 1971. Comparative studies of the biological effectiveness of nitrogen mustards, ethyleneimine and gamma rays. *Mutation Res.* 11: 339-346.
- NILAN, R.A. & C.F. KOZAN, 1961. Increasing the efficiency of mutation induction. In *Mutation and Plant Breeding*. Nat. Acad. Sci. Res. Council. Washington D.C. pp 437-460.
- OSTERMAN-GOLKAR, S. & L. EHRENBERG, 1970. Reaction kinetics and biological action in barley of monofunctional methanesulfonyl esters. *Radiat. Bot.* 10: 303-327.
- PATTERSON, J.B., 1973. Chemical dosimetry in somatic cells and its utility to mutagenesis. *Env. Health Pers.* 6: 195-199.
- PONTECORVO, G., 1952. Genetic formulation of gene structure and function. *Adv. Enzymol.* 13: 121-149.

- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. MACDONALD & A.W.J. BUFTON, 1953. The genetics of Aspergillus nidulans. Adv. Genet. 5: 141-238.
- PRICE, C.C., G.M. GAUCHER, P. KONERU, R. SHIBAKAWA, J.R. SOWA & M. YAMAGUCHI, 1969. Mechanism of action of alkylating agents. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1963: 593-600.
- WITKIN, E.M., 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli. Bac. Rev. 40: 869-907.

TURNO DE PREGUNTAS

PREGUNTA (Dr. J. Guarro): Respecto a los mutantes de color, ¿son realmente estables o revierten finalmente a la coloración original?

RESPUESTA (S. Ferrer): Es cierto que no todas las colonias que presentaban cambios de color mantenían sus características a lo largo de las generaciones, y justamente por esto, es por lo que se realizaron pases sucesivos de las mismas tanto en medio completo como en medio mínimo. De este modo se encontraron frecuencias de reversión que oscilaban entre el 0 y el 57% según los casos, siendo los restantes realmente estables a lo largo de las resiembras (cinco como mínimo).

Generalmente los mutantes que revertían, lo hacían en el segundo pase, si bien algunos no manifestaban cambios hasta el tercero, pero ninguno modificó su fenotipo del cuarto pase en adelante.

Un aspecto importante a destacar es que si bien estas cepas presentaban una coloración diferente a la de las paternas, no se observaba en ellas otros cambios morfológicos que los ya citados. Justamente se las eligió por esta razón, descartándose ya de entrada tanto las colonias que mostraban una alteración en la forma de la misma, como las que poseían una coloración no claramente distinguible de la de la cepa paterna, como por ejemplo distintas tonalidades del verde. Resumiendo: los mutantes llamados morfológicos son aquellos que presentan como único rasgo diferencial una distinta pigmentación de las esporas, que bien puede ser en nuestro caso amarilla, ocre ó albina.