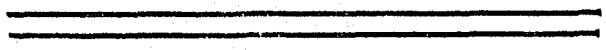


Lej: 40

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MUTANTES  
CON VARIOS MARCADORES DE AUXOTROFIA EN LA  
LEVADURA Kluyveromyces lactis.**

**TESIS PROFESIONAL**

Que para obtener el Título de:  
**B I O L O G O**  
P r e s e n t a:

**Ma. del Carmen Cruz Martínez**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

### I. INTRODUCCION

1. Estructura del ADN
2. Tipos de lesiones (mutaciones) encontradas en el ADN
3. Mutaciones auxotróficas
4. Caracterización de mutantes
5. Inducción de mutaciones
  - 5.1. Acción de la luz U.V.
  - 5.2. Mecanismos de reparación del daño provocado por la luz U.V.
6. Agentes alquilantes
  - 6.1. Tipos de interacción con los ácidos nucleicos.
  - 6.2. Posiciones susceptibles a alquilación en el ADN
  - 6.3. Hipótesis que explican la manera en que actúan los agentes alquilantes.
  - 6.4. Nitroso metilguanidina
  - 6.5. Etil metanosulfonato
7. Ciclo de vida de la levadura Kluyveromyces lactis

### II. MATERIALES Y METODOS

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

### IV. BIBLIOGRAFIA

Las mutantes de auxotrofia que muestran carencias en una vía biosintética y que vuelven a su crecimiento normal cuando se les proporciona el producto normal de dicha vía, han sido una herramienta muy apreciada en los estudios genéticos y bioquímicos. Se han utilizado para determinar los pasos que se siguen en la síntesis de un determinado metabolito, los intermediarios que se forman y los posibles pasos de regulación y bifurcación de vías metabólicas.

En Kluyveromyces lactis se han empleado comúnmente cepas "marcadas" con algún requerimiento, para llevar a cabo estudios de tipo genético

Durante el ciclo de vida de esta levadura, el estado diploide es una fase transitoria, que va seguida de una rápida haploidización, dando lugar a cuatro ascosporas. Particularmente, los estudios de segregación mitótica en diploides se ven afectados por este comportamiento. Si las cepas que se utilizan (a y  $\alpha$ ) llevan un solo requerimiento de auxotrofia es fácil que se aislen recombinantes protótrofos, que se confundan con los mismos diploides. La probabilidad de que esto suceda se reduce cuando las cepas que se están empleando, presentan un mayor número de requerimientos auxótrofos.

Por lo anterior, fue planteado como objetivo del presente trabajo: el aislar, caracterizar y construir cepas con dichas propiedades.

La inducción de las mutantes fue llevada a cabo con los agentes alquilantes: Etil metanosulfonato y N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, así como radiaciones ultravioleta.

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

## 1. Estructura del ADN

Es sabido que la molécula portadora de la información genética en los organismos vivos es el ácido desoxirribonucleico (ADN), cuya estructura consiste de dos cadenas poliméricas complementarias y antiparalelas, enrolladas una alrededor de la otra, en la forma de una doble hélice (como fue descrito en el modelo de Watson J.D. y F.C. Crick, (51)). Cada cadena es un polinucleótido, donde el azúcar de cada nucleótido, en la posición 5', está unido por un grupo fosfato al azúcar del nucleótido adyacente.

Las dos cadenas están unidas por enlaces de hidrógeno entre los pares de bases que se establecen entre: la purina adenina (A) con la pirimidina timina (T); y la purina guanina (G) con la pirimidina citosina (C).

Puesto que la secuencia de bases del ADN es la que determina las características genéticas de todo ser vivo, su replicación exacta asegura que la descendencia de una célula dada, tendrá la misma información que la progenitora.

Sin embargo, la estabilidad y continuidad del ADN puede ser alterada por varios factores, lo que contribuye a la existencia de diversidad genética y dependiendo del nivel en el que actúen tales factores, las alteraciones serán hereditarias o no.

El ADN está sujeto a daño por agentes químicos, agentes físicos que se encuentran en el medio ambiente y por radicales libres generados en el metabolismo, también puede sufrir errores durante su replicación.

Dentro de los agentes físicos están: la temperatura, el pH, las radiaciones ionizantes (partículas alfa, rayos X y rayos gamma) y radiaciones no ionizantes (luz ultravioleta).

Los agentes químicos provocan alteraciones a nivel molecular por el efecto que tienen en las bases del ADN. Entre ellos están: como ejemplos: los álcalis, los agentes alquilantes, los análogos

de bases y el ácido nitroso, entre otros.

## 2. Tipos de lesiones (mutaciones) encontradas en el ADN

Las mutaciones implican alteraciones en la forma, estructura y constitución nucleotídica del ADN.

Existen dos categorías principales en las que las mutaciones han sido agrupadas: a) Las mutaciones puntuales, donde sólo uno o un número muy pequeño de nucleótidos es afectado y b) Las alteraciones cromosómicas gruesas.

Basándose en el cambio introducido en el ADN por el agente mutagénico, las mutaciones puntuales sencillas pueden ser:

i) Mutaciones transicionales.- en ellas un par purina-pirimidina es sustituido por otro, esto es:



ii) Mutaciones transversionales.- es otro tipo de sustitución, en este caso un par pirimidina-purina por un par purina-pirimidina y viceversa, es decir:



iii) Mutaciones fuera de fase por corrimiento de armazón.- este tipo de alteración implica la inserción o supresión de un par de bases o más en el ADN, de tal manera que, la lectura normal de la secuencia de tripletes del armazón resulta alterada y puesta fuera de registro por la mutación.

Entre los daños producidos al ADN como alteraciones gruesas están:

i) Rompimiento de las cadenas del ADN, con pérdida de bases (Deleciones).- producido por el efecto de radiaciones y agentes químicos (24, 35). Puede ocurrir durante la replicación y posiblemente durante la transcripción, pudiéndose provocar rompimiento de cadena sencilla o de la doble cadena del ADN.

ii) Ligamiento cruzado ADN-ADN.- dado por la formación de enlaces covalentes entre las cadenas complementarias del ADN, provocando un bloqueo absoluto para su replicación y transcripción. Los agentes que lo producen incluyen: gas mostaza nitrogenada y azufrada, mitomicina, ácido nitroso, varios derivados del platino y varios agentes intercalantes (17).

iii) Ligamiento ADN-proteína.- poco es sabido acerca de él, puede ser producido después de irradiación con luz ultravioleta (35).

### 3. Mutaciones auxotróficas

Ahora se sabe que los genes son responsables de la secuencia de aminoácidos de una proteína, a través de los mecanismos de transcripción y traducción. Las proteínas tienen una gran variedad de funciones, tales como: de transporte, estructurales, enzimáticas, neurotransmisoras, macromoléculas reguladoras, etc.

Para identificar un gen, mapear su localización y conocer su función, se debe encontrar un gen que haya sufrido mutación, es decir que haya sufrido un error molecular en la secuencia de pares de bases y que esta mutación vaya acompañada de un cambio en la función de la proteína codificada por él.

La mutagénesis ha tenido un papel muy importante dentro de la Genética desde principios de siglo y su estudio ha procedido paralelamente con el de la replicación de los genes y su expresión.

Muchos conocimientos básicos para la Biología Molecular provienen, en particular, de los análisis de mutantes auxotróficas. Estas mutantes muestran carencias en una vía de biosíntesis, pero cuando se les proporciona el producto faltante de dicha vía, vuelven al crecimiento normal.

George Beadle y Edward L. Tatum (2), plantearon la relación "un gen-una enzima", basándose en sus estudios de mutantes auxo-

tróficas (nutricionales) del mohó rojo Neurospora crassa. Los genes que investigaron dirigen la síntesis de enzimas requeridas para la formación de nutrientes, tales como, aminoácidos y vitaminas, que son esenciales para el crecimiento de estos hongos. Estos investigadores postularon que cada gen define la estructura de una y sólo una proteína, suponiendo que una mutante deficiente en una enzima específica debe tener un defecto en el gen que controla la síntesis de esa enzima.

Su suposición de que cada gen define la estructura de una y sólo una proteína ignoró la posibilidad de que un gen pudiera codificar para diferentes proteínas ó que una proteína estuviera constituida por varios polipéptidos codificados a su vez, por varios genes, sin embargo, fundamentaron una serie de principios que condujeron a las bases de la Biología Molecular.

No todas las mutantes incapaces de sintetizar cierto metabolito son idénticas. Si dicho metabolito es la resultante de una serie de pasos metabólicos que implican varias enzimas, las mutaciones que ocurran en cualquiera de los genes que codifican a cada una de las enzimas, producirán el mismo fenotipo, es decir, incapacidad de sintetizar al metabolito (12).

Las mutaciones bloqueadas en diferentes puntos de una vía metabólica pueden emplearse para probar las sustancias que se piensa, pueden ser los precursores de un producto determinado, estableciendo la secuencia por la que esos precursores se convierten en el producto final.

Por lo tanto, las mutantes de auxotrofia pueden ser empleadas en el estudio de las vías metabólicas.



#### 4. Caracterización de mutantes

A partir de la caracterización de una mutación se pueden hacer deducciones en cuanto a la naturaleza de la lesión en el material hereditario.

Las mutaciones pueden ser caracterizadas por varias propiedades de los alelos mutantes, tales como: la revertibilidad con diferentes mutágenos, susceptibilidad a la reversión fenotípica por condiciones de cultivo, respuesta a los supersupresores y la respuesta a la complementación alélica (intergénica e intragénica) (12).

En el presente estudio la caracterización de las mutantes auxotrofas aisladas fue llevada a cabo a través de pruebas de complementación alélica.

La complementación alélica ayuda a tener una idea del número de genes necesarios para la síntesis de un determinado metabolito. Las pruebas de complementación son aplicables a todos los casos donde las mutantes tienen deficiencias claras, comparadas con el tipo silvestre (11, 12).

En las levaduras el fenotipo prototrófico o auxotrófico de la clona diploide, que resulta de la unión de dos haploides auxotróficos, nos proporciona una prueba simple de si los dos juegos de cromosomas mutantes son o no complementarios.

El hecho de que dos mutaciones complementen nos da, generalmente, evidencia de que no son alélicas; por ejemplo que están en diferentes sitios en el cromosoma, esquema A (página siguiente).

Si hay ausencia de complementación, se interpreta, generalmente, como prueba cercana de alelismo, esquema B (página siguiente).

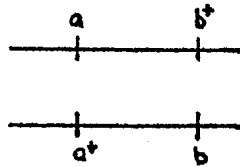
Esquema A

Esquema B

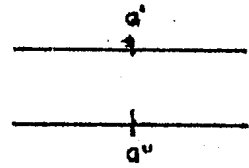
Genotipo mutante

Haploide

Mutación en diferente lugar



Mutación en el mismo lugar



Fenotipo

Silvestre

Mutante

(a+ b+)

(a y b pueden o no estar ligadas)

(Tomado de Fincham et al. (12))

## 5. Inducción de mutantes

Debido a que la mutación espontánea es un evento raro y su frecuencia es muy baja, resultaría muy difícil el estudio de un tipo particular de mutantes, obtenidas de esta manera.

La probabilidad de que un gen dado sea transformado a una forma defectuosa (que sufra mutación), puede ser incrementada en un porcentaje alto, mediante el uso de agentes mutagénicos.

Durante muchos años las diferentes formas de radiación fueron los mutágenos conocidos más poderosos. En la actualidad los agentes químicos son usados más frecuentemente, ya que producen una mayor proporción de mutaciones sin que haya una gran mortalidad celular.

En esta investigación, se aplicaron los agentes alquilantes: etil metano sulfonato (EMS) y nitroso metilguanidina (MNNG), así como radiaciones ultravioleta, como agentes mutagénicos. A continuación se describe la acción mutagénica de ellos.

### 5.1. Acción de la luz ultravioleta

La luz ultravioleta es uno de los agentes mutagénicos más comúnmente usados para inducir mutaciones en levaduras, bacterias y otros microorganismos.

Cuando se aplican grandes dosis de radiación ultravioleta se induce la formación de enlaces entre dos pirimidinas adyacentes en la cadena de ADN (dímeros de pirimidina).

De los tres tipos de dímeros de pirimidina posibles: timina-timina, timina-citosina y citosina-citosina, los primeros son los más comunes. La presencia de los dímeros bloquea la acción de la enzima ADN polimerasa, impidiendo la replicación correcta del ADN (24).

La luz ultravioleta parece inducir mutaciones de todos los tipos conocidos: transiciones, transversiones y deleciones (12). En cuanto a la producción de mutantes del tipo auxotrófico a ami-

noácidos, purinas y pirimidinas, ha sido reportado que la frecuencia para obtener este tipo de mutaciones en levaduras es del orden del 1% (44).

## 5.2. Mecanismos de reparación del daño provocado por la luz U.V.

Ya que todos los organismos están expuestos a agentes tanto externos como internos, capaces de alterar su estructura molecular, han desarrollado a lo largo de su evolución, mecanismos de reparación que contrarrestan los efectos de tales agentes.

El conocimiento básico sobre los procesos de reparación del ADN ha surgido a partir de experimentos genéticos con células bacterianas, expuestas a radiación ultravioleta y estudios bioquímicos de los procesos de replicación y reparación del ADN.

La capacidad de reparación de los organismos, no sólo determina la tasa de sobrevivencia después de la exposición a agentes que dañan su ADN, sino también influencia su respuesta a los efectos mutagénicos de dichos agentes.

Particularmente, los estudios de reparación del ADN se han llevado a cabo con la bacteria Escherichia coli, en cepas sensibles a la radiación ultravioleta, que presentan mutaciones en genes denominados el sistema uvr ABC y que condujeron a la elucidación del mecanismo de reparación por escisión (14).

Otro proceso de reparación fue también descubierto en este mismo organismo, pero con cepas que presentaban deficiencia en la recombinación; al gen que provocaba este comportamiento se le llamó rec A. Por medio de su estudio se llegó al conocimiento del mecanismo de reparación post-replicación, que funciona después de la replicación del ADN dañado por radiación U.V.

Los dos mecanismos de reparación funcionan en la oscuridad. Ha sido estudiado un tercer mecanismo, que opera con la luz visible, que es la fotorreactivación.

La conclusión general para E. coli es que las lesiones inducidas por U.V. , predominantemente dímero de pirimidina, son e-

noácidos, purinas y pirimidinas, ha sido reportado que la frecuencia para obtener este tipo de mutaciones en levaduras es del orden del 1% (44).

## 5.2. Mecanismos de reparación del daño provocado por la luz U.V.

Ya que todos los organismos están expuestos a agentes tanto externos como internos, capaces de alterar su estructura molecular, han desarrollado a lo largo de su evolución, mecanismos de reparación que contrarrestan los efectos de tales agentes.

El conocimiento básico sobre los procesos de reparación del ADN ha surgido a partir de experimentos genéticos con células bacterianas, expuestas a radiación ultravioleta y estudios bioquímicos de los procesos de replicación y reparación del ADN.

La capacidad de reparación de los organismos, no sólo determina la tasa de sobrevivencia después de la exposición a agentes que dañan su ADN, sino también influencia su respuesta a los efectos mutagénicos de dichos agentes.

Particularmente, los estudios de reparación del ADN se han llevado a cabo con la bacteria Escherichia coli, en cepas sensibles a la radiación ultravioleta, que presentan mutaciones en genes denominados el sistema uvr ABC y que condujeron a la elucidación del mecanismo de reparación por escisión (14).

Otro proceso de reparación fue también descubierto en este mismo organismo, pero con cepas que presentaban deficiencia en la recombinación; al gen que provocaba este comportamiento se le llamó rec A. Por medio de su estudio se llegó al conocimiento del mecanismo de reparación post-replicación, que funciona después de la replicación del ADN dañado por radiación U.V.

Los dos mecanismos de reparación funcionan en la oscuridad. Ha sido estudiado un tercer mecanismo, que opera con la luz visible, que es la fotorreactivación.

La conclusión general para E. coli es que las lesiones inducidas por U.V. , predominantemente dímero de pirimidina, son e-

eliminadas por los mecanismos de: reparación por escisión, post-replicación y fotoreactivación (17).

La reparación en la oscuridad consiste de dos operaciones: Reparación por escisión y reparación post-replicación, que pueden o no ser independientes.

REPARACION POR ESCISION.- este parece ser un mecanismo relativamente exacto, casi libre de errores, que raramente causa mutación (52).

Este sistema requiere de al menos los siguientes pasos:

1) Reconocimiento del daño, que puede ser detectado, por ejemplo, por la actividad de la nucleasa 5'---> 3' de la ADN polimerasa I, sin embargo, es posible que algún tipo de daño no sea reconocido.

En alguna instancia una glicosilasa\* puede comenzar el proceso completo, quitando las bases incorrectas o alteradas. Los sitiosapurínicos o apirimidínicos (AP) pueden entonces ser reconocidos por una AP endonucleasa específica (17).

2) Incisión, cuando la endonucleasa detecta el daño, provoca una incisión en el costado 5' del defecto (22).

3) Sustitución del segmento defectuoso por las bases correctas, esta acción puede ser ejercida por la ADN polimerasa I.

4) Escisión del trozo defectuoso por la acción de una exonucleasa 5' ---> 3'.

5) Ligamiento, donde la nueva hebra se une por su extremo 3' al

\* Las ADN glicosilasas tienen la propiedad común de actuar sólo en residuos nucleotídicos dañados o alterados. No requieren de cofactores, tales como cationes divalentes metálicos y aparentemente actúan por rompimiento hidrolítico simple del enlace glicosídico. El ADN de doble cadena es el sustrato preferido, con excepción de la uracilo-ADN glicosilasa.

Cada enzima tiene un sustrato específico y actúa en una lesión específica del ADN (27).

extremo 5' de la hebra remanente intacta, por medio de la acción de la enzima ligasa.

El mecanismo de escisión de bases ocurre únicamente en regiones dúplex del ADN, no puede operar en un ADN de cadena sencilla, tal como las horquetas de replicación. Ha sido encontrado en muchos tipos celulares, pero parece que las plantas carecen de él (35).

**REPARACION POST-REPLICACION.** Cuando la célula es expuesta a los efectos de la luz U.V., este mecanismo de reparación funciona después de la replicación del ADN dañado. Cuando la horqueta de replicación alcanza un dímero que no corrigió, se interrumpe la síntesis de una nueva cadena, dando lugar a la formación de espacios (separaciones) post-replicación en la cadena hija.

Para que la lectura original prosiga, la secuencia de bases correcta faltante en la cadena lesionada, es proporcionada por el dúplice hermano en la misma horqueta de replicación (14).

Este mecanismo es susceptible a errores, en el momento de la inserción de las bases puede haber una inducción alta de mutaciones. En el momento de llevarse a cabo la reparación post-replicación puede o no haber recombinación del ADN después de su duplicación.

**FOTOREACTIVACION.** Cuando son formados los dímeros de pirimidina, uno de los mecanismos que se pone en juego es el de la fotoreactivación. Una enzima se une a la región dañada, generando un cromóforo enzima-ADN, que absorbe la luz visible (300 a 600 nm) y cataliza el rompimiento de las bases unidas, sin romper enlaces fosfodiéster, dando finalmente el producto monomerizado (17).

La fotoliasa es la glicosilasa fotoreactivante del ADN, la fotoreactivación puede ocurrir también en la ausencia de enzimas, este proceso puede ser promovido por péptidos que contienen triptofano (27).

La fotoreactivación es un mecanismo químicamente reversible y

es el único que se realiza mediante un sólo paso enzimático, puede ser considerado libre de error (35).

Las enzimas fotoreactivantes son conocidas en muchos tipos celulares, desde micoplasmas hasta células animales, tales como, leucocitos humanos (24).

Se han llevado a cabo estudios de los mecanismos de reparación en organismos eucarióticos, en particular se tienen datos en las especies: Aspergillus nidulans, Chlamydomonas reinhardtii (10), Neurospora crassa (42), Saccharomyces cerevisiae (37), Schizosaccharomyces pombe y Ustilago maydis (10), Coprinus lagopus (41).

Los primeros experimentos realizados para estudiar los mecanismos de reparación en la oscuridad en organismos eucarióticos, se llevaron a cabo con levaduras. Cox y Parry (6), entre otros, fueron quienes intentaron determinar la existencia de las vías de reparación a través de sus investigaciones con las mutantes uvs; y se ha observado que con respecto a la reparación oscura bacteriana, no hay gran similitud.

Ha sido demostrado que la sensibilidad de las células de levadura a los efectos mutagénicos y letales de la luz U.V., depende de la fase del ciclo celular, durante la cual son expuestas a estas radiaciones. Tippins y Parry (50), arguyen que las células en fase G1 son más sensibles a los efectos letales de luz U.V., tal vez debido a su tamaño pequeño. En células en fase G2 y S con volumen más grande de citoplasma, éstas pueden proteger su ADN del daño de la irradiación más eficazmente.



## 6. Agentes Alquilantes

La investigación de los mutágenos químicos cubrió un período de 20 años (1920-1940), antes de que una de tales sustancias fuera conocida. Robson y Carr fueron de los primeros investigadores que, estudiando el efecto del gas mostaza, notaron que la inflamación e interferencia con la división celular causado por un agente químico, era similar al producido por los rayos X, siendo comprobado este hecho más tarde por Charlotte Auerbach (citado en 20).

Pronto, fueron conocidos muchos agentes químicos, pero el interés en ellos se centró en su uso como herramienta para el descubrimiento de hechos genéticos. Ha sido en las últimas décadas que se les ha dado mucha importancia, debido a la posibilidad de que algunos puedan causar daño para el hombre.

La clase más grande de mutágenos (que han demostrado inducir mutaciones, por lo menos, en uno de los sistemas de prueba genéticos usados), está representada por los agentes alquilantes.

Los agentes alquilantes han sido divididos en dos clases:

I) Los monofuncionales, que llevan un grupo reactivo alquil sencillo y II) Los bifuncionales o polifuncionales, con dos o más grupos alquilo. La principal diferencia entre ellos está relacionada con la capacidad para formar enlaces covalentes cruzados entre las dos cadenas de ADN, lo que evita que el dúplice lleve a cabo la separación completa, necesaria para su replicación (13).

Los agentes alquilantes se clasifican también como: directos o indirectos, dependiendo de la presencia o ausencia de grupos intermediarios para que se efectúe la alquilación en el ADN.

Entre los agentes alquilantes directos están:

a) Alquil sulfatos y sulfonatos, como: dimetil sulfato y etil metano sulfonato.

b) Pequeñas moléculas heterocíclicas, como: etilenimina (aziridina), trietilenmelamina [2,4,6-tris (1-aziridinil)-S-triazina], diepóxido butadieno (1,2,3,4-diepoxibutano),  $\beta$ -propiolactona.

c) Gas mostaza: Mostaza nitrogenada metil di (2-cloroetil) amina  
Mostaza azufrada bis (2-cloro-etil) sulfuro.

Entre los agentes alquilantes indirectos están:

a) Nitrosaminas, como: dimetilnitrosamina. Requieren oxidación enzimática para su actividad, son convertidas a iones alquil diazonio (18).

b) Nitrosamidas y Nitrosamidinas, como: N-metil-N-nitrosoourea, N-metil-N-nitrosoouretano y N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Son convertidos por hidrólisis a iones alquildiazonio.

#### 6.1. Tipo de interacciones con los ácidos nucleicos

Ha sido observado que la acción de los agentes alquilantes varía marcadamente con su naturaleza química. Reaccionan con un mecanismo de sustitución nucleofílica unimolecular ( $S_N1$ ) ó sustitución nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ). Los primeros reaccionan a través de ion carbonio intermediario que alquila a un nucleófilo. Las reacciones de este tipo dependen de la concentración de una sola sustancia(16). Como ejemplos de este tipo de agentes están: N-metil-N-nitrosoourea, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina e isopropil-metanosulfonato.

Los agentes del tipo  $S_N2$  proceden a través de un mecanismo concertado en un solo paso, en el cual se da la formación de un complejo de transición con el nucleófilo y presentan cinética de segundo orden. Aquí la formación del nuevo enlace y la ruptura del original ocurren simultáneamente. Como ejemplos están: gas mostaza y alquilalcano sulfonatos. Aunque el etil metano sulfonato presenta una actividad intermedia de  $S_N1/S_N2$ .

Según Fishbein, et al (13). No existen diferencias en los sitios de reacción en el ADN, ambos mecanismos parecen reaccionar preferencialmente con el N-7 de la guanina.

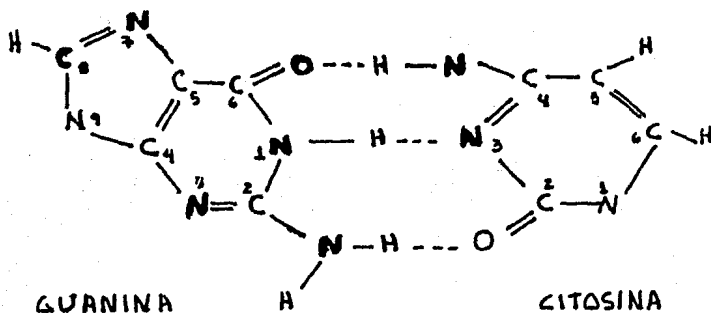
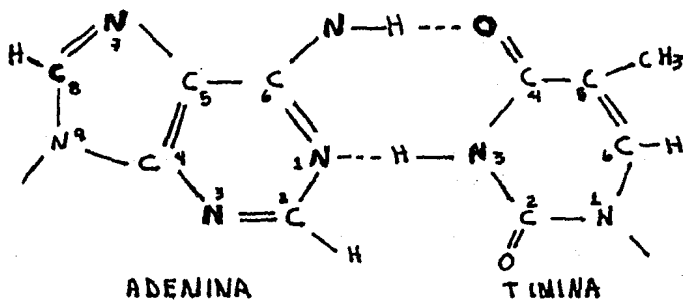
Lawley (25), sin embargo, dice que los agentes alquilantes que reaccionan a través de un mecanismo de tipo  $S_N1$ , lo hacen relativamente de manera más extensa con los átomos de oxígeno en el ADN y ARN. Da evidencia de que en este tipo de agentes es más ex-

tensa la formación de enlaces fosfodiéster. Argumenta a la vez que son menos efectivos como agentes depurinizantes, pero son más efectivos como agentes que producen rompimiento de cadena de ARN. Todos estos factores pueden afectar la respuesta a la dosis, en el sentido en que a bajos grados de alquilación del ADN, los agentes del tipo  $S_{N1}$ , serán menos tóxicos, pero producirán más grupos promutagénicos.

Los agentes del tipo  $S_{N2}$ , como metil metano sulfonato y - dimetil sulfato, reaccionan casi completamente con los átomos de nitrógeno (16).

## 6.2. Posiciones susceptibles a alquilación

Las posiciones susceptibles a la alquilación por los agentes alquilantes son: N1, N2, N3, O6, N7 y C8 de la guanina; N1, N3, N6, N7 y C8 de la adenina; N3 y N4 de la citosina; N3 y O4 de la timina (8). Todos los nitrógenos y oxígenos en los polinucleótidos (excepto el nitrógeno del azúcar) pueden ser alquilados en solución a pH neutro (47).



La alquilación de estos átomos conduce a efectos directos a través del mal apareamiento de las bases alquiladas y también efectos indirectos, a través de la operación de un sistema de reparación propenso al error.

Los blancos mutagénicos en el ADN para agentes etilantes y metilantes son en orden decreciente de reactividad: N3 de adenina, O6 de guanina, O4 de timina y N4 de citosina (8, 12).

La posición del N7 de la guanina representa el principal centro nucleofílico en el ADN y ARN para los agentes metilantes de todos los tipos celulares (25).

La 3-Metil adenina (3-MeA) representa uno de los productos de la alquilación más frecuentes del ADN. Un grupo alquil en esta posición no cambiaría la conformación de la cadena del ADN, pero evitaría el apareamiento de las bases modificadas con la base complementaria o no complementaria de la cadena opuesta.

La O6-Metil guanina representa la lesión más importante en el ADN con respecto a: la inducción de mutaciones génicas y cáncer por agentes alquilantes simples. Repercute en la frecuencia de transiciones del tipo GC ---> AT (28, 25).

### 6.3. Hipótesis que explican la manera en que actúan los agentes alquilantes

Hasta ahora, no se sabe con precisión cuáles son los mecanismos moleculares que median los efectos mutagénicos de los agentes alquilantes. Existen dos hipótesis por las cuales se explica que la alquilación conduce a la mutación.

La primera hipótesis implica un mecanismo en el que se da la alteración de una base por la reacción del mutágeno con el ADN. Se asume que la base alterada ioniza de manera diferente, conduciendo a errores de apareamiento ocasionales, por ejemplo: Guanina apareada con Timina en lugar de Citosina.

Si se asume que este es el único mecanismo que conduce a la mutación, sólo se esperarían mutantes de tipo transicional. Sin

embargo, Freese et al. (citado en 13) han encontrado que algunos agentes alquilantes producen tanto transversiones como transiciones.

La segunda hipótesis está basada en la observación de que el grupo alquilo labiliza el enlace  $\beta$ -glicosídico (16), dando lugar a una depurinización. La pérdida de esta base conduce a formación de una apertura (separación) en el templado de ADN, de tal manera que, durante la replicación se produce una deleción ó una base seleccionada al azar es insertada en el lado opuesto de la apertura, dando lugar a la combinación de transiciones o transversiones.

Existen otras razones para creer que hay otros modos de acción en la inducción de la mutación, por alquilación. Alexander et al. (1) han sugerido que el producto inmediato de la alquilación es un fosfotriéster. Sin embargo, Lawley (25) descuenta esta posibilidad, sosteniendo que la formación de fosfotriésteres no es una reacción significativa aún bajo condiciones que producen un alto grado de alquilación.

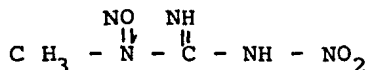
#### 6.4. Nitroso metilguanidina

N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) es un potente mutágeno, que fue sintetizado y caracterizado químicamente en 1974 por Mc Kay y Wright (citados en 20). El interés en su actividad biológica comenzó cuando se observó que producía efectos inhibitorios en el crecimiento de ratones. Es sintetizado vía la nitración de metil nitroguanidina; bajo condiciones alcalina se descompone lentamente dando diazometano y da ácido nitroso bajo condiciones más ácidas (es químicamente estable a pH 5) (4).

Su estabilidad en amortiguadores depende de la temperatura, pH, fuerza iónica y el tipo de sales presente en el amortiguador.

La descomposición de MNNG es catalizada por álcalis. Cisteína, tiosulfato y algunos otros tioles, son capaces de atacar el grupo nitroso de MNNG, así como otras aminas secundarias, liberando el N-metil-N'-nitroguanidina.

Su estructura química es la siguiente:



La molécula metilante derivada de MNNG reacciona más selectivamente que una molécula etilante y se puede esperar que las reacciones con nucliófilos presenten un mecanismo monomolecular ( $S_N1$ ), aunque tienen también cierto carácter bimolecular (30). De acuerdo a Laqley (25), MNNG sería más mutagénico y menos tóxico que metil metano sulfonato y similarmente tan mutagénico o tóxico como metil nitrosourea.

Se tienen datos de su acción mutagénica en : ácidos nucleicos, virus, insectos, plantas y microorganismos.

Específicamente ha sido estudiada su acción en : E. coli (34), Coprinus lagopus (31), Salmonella typhimurium (4,33), Saccharomyces cerevisiae (16, 29) Arabidopsis thaliana (4,12), Chlamydomonas reinhardtii (7), Euglena gracilis (30), Schizosaccharomyces pombe (4,16) y Drosophila melanogaster (16).

En general, para MNNG se han reportado propiedades: antitumorales, antileucémicas, antimalariales y carcinogénicas (13). Su actividad carcinogénica fue descrita por Sugimura et al. (48).

**Interacción con proteínas .-** La unión de MNNG con proteínas parece ser importante en su acción biológica. Puede reaccionar con ellas de dos diferentes maneras: pueden ser alquiladas por el grupo metilo, liberado por la descomposición de MNNG ó nitroamidinas por el grupo guanidino. La interacción del grupo guanidino de MNNG en la célula acelera la alteración del compuesto alquilante, como se asume con el grupo tiol (48). La nitroamidación, así como la aminación de las histonas, puede dar lugar a cambios en las interacciones de los componentes de los componentes cromosómicos.

La afinidad de MNNG por las proteínas, particularmente por su grupo guanidino, puede ser la razón de que inhiba algunas enzimas importantes, más que muchos otros mutágenos y carcinógenos. Esto fue observado para : la  $\beta$ -galactosidasa, la metilasa de rata y la ADN polimerasa III de E. coli (4), entre otras.

**Interacción con ácidos nucleicos.-** MNNG alquila los ácidos nucleicos y sus constituyentes. Como se mencionó antes, la alquilación puede proceder por al menos dos vías, una es la catálisis alcalina y la otra representa los mecanismos catalizados por los grupos tiol o amino (16).

Aunque la alquilación del ADN (ó ARN en virus de ARN), los sitiosapurínicos y el rompimiento de cadena, surjan secundariamente, se considera que juegan papeles importantes en la mutagenesis, carcinogénesis y letalidad inducidas por MNNG.

Al igual que sucede con la mayoría de los agentes mutagénicos alquilantes, MNNG reacciona con el N-7 de la guanina y N-3 de adenina, que son los principales centros nucleofílicos en el ADN y ARN(25). Puede reaccionar también con sitios de baja nucleofiliidad, tales como O-6 de G; O-4, O-2 de T; O-2 de C; O de ribosa y O de fosfatos (16).

El mecanismo de reparación que opera después de la alquilación de MNNG, se cree es el de escisión de bases (27, 38). Los datos de la tasa de escisión de bases en células procariontas y eucariontas son utilizadas para tres bases alquiladas: 7-MeG, 3-MeA y O-6 MeG.

La eliminación de O-6 MeG en E. coli está relacionado con un sistema libre de error, llamado la respuesta adaptativa, esta respuesta es inducida por bajas dosis de mutágeno, bajo las cuales la célula desarrolla una resistencia a sus efectos letales (23). Las células adaptadas acumulan menos O-6 MeG en su ADN que las células no adaptadas, aunque inicialmente ambos tipos de células se metilan al mismo grado (9).

Inducción de mutaciones en regiones de crecimiento.- La evidencia de que MNNG induce mutación en los puntos de replicación del ADN, deriva de los estudios con células de E. coli, tomadas de cultivos en crecimiento exponencial, previamente sometidas a ayuno de aminoácidos (4).

La acción preferencial de MNNG por genes en puntos de crecimiento del cromosoma bacteriano en una población en crecimiento, muestra una distribución no al azar de mutaciones a lo largo del cromosoma y una larga incidencia de mutantes ligadas en una región muy pequeña (5, 7, 15).

La naturaleza molecular de la mutagénesis preferencial de MNNG en la región de replicación no es entendida completamente. Cerdá-Olmedo (5), anticipó una acción selectiva de MNNG sobre el ADN replicante debido a los cambios de conformación de las cadenas del ADN en replicación.

Otro modelo propuesto es que MNNG ataca al medio ambiente molecular en el ADN en replicación debido a su alta concentración de ADN polimerasa y otras sustancias ricas en aminoácidos y grupos sulfhidrilo.

Sin embargo, existen evidencias que no apoyan los modelos de mutagénesis preferencial de MNNG en la región de replicación, como son las obtenidas en estudios con Paramecium, Aspergillus,



células de hamster, Drosophila y células de mamíferos (16).

Inducción de mutantes auxotróficas.- Ha sido encontrado que MNNG produce una gran proporción de mutantes de auxotrofia, en una gran cantidad de organismos. Además, se ha observado que a través del uso de métodos de enriquecimiento selectivo, se obtiene una gran frecuencia de este tipo de mutantes en levaduras.

En Hansenula polymorpha se obtuvo una frecuencia de 75% de auxótrofos, donde la gran mayoría requería bases de ácidos nucleicos. Al aplicar MNNG a Candida albicans a dosis que conducían a una sobrevivencia del 1%, se obtuvieron auxótrofos con una frecuencia de  $4 \times 10^{-3}$  (16).

Moore (31), encontró que sin selección, MNNG produce auxótrofos a una frecuencia máxima, cuando la sobrevivencia se encuentra entre 8-20%.

Gichner y Veleminsky (16), citan el trabajo de Danilenko, en el que se dice que el tipo de auxótrofo inducido depende del estado en el ciclo celular, durante el cual se haya aplicado el mutágeno. Después de 20 min de tratamiento obtuvo predominantemente auxótrofos de alanina, después de 40 min encuentra una mayor frecuencia de auxótrofos a histidina y después de 60 min, predominan los auxótrofos a prolina.

Inducción de otro tipo de mutaciones.- Se ha reportado que los tratamientos con MNNG o luz U.V. dan una alta tasa de mutantes petite, con alta tasa de sobrevivientes en células cultivadas anaeróbicamente.

MNNG induce mutaciones con defectos específicos en funciones mitocondriales con origen de tipo nuclear y mitocondrial (16). Dawes y Carter (7) reportan que MNNG induce mutantes de resistencia antibióticos en dos estados del ciclo celular. Uno coincide con la replicación del ADN nuclear y otro en el que los genes mitocondriales se duplican.

## 6.5. Etil metanosulfonato

En Etil metanosulfonato (EMS) ha sido preparado por la reacción de ácido metano sulfónico y etileno.

Se ha demostrado que es un mutágeno altamente efectivo y se tienen datos de su acción en :ácidos nucleicos (tal como ADN transformante), virus, bacterias, levaduras y otros microorganismos, insectos, plantas y mamíferos. Como principales ejemplos están: Drosophila melanogaster (47), Hadrobracon, Bacillus subtilis, Bacilus cereus (13), Escherichia coli (3), bacteriófagos (28), en las levaduras : Schizosaccaromyces pombe (12) y Saccharomyces cerevisiae (26, 29); Vicia faba, Arabidopsis, Nicotiana tabacum, cultivos de células humanas y de ratones (13).

El EMS es un agente alquilante directo. Su interacción con los ácidos nucleicos se lleva a cabo a través de un ataque electrofílico, con posición intermedia entre los tipos de sustitución nucleofílica  $S_N1$  y  $S_N2$  ( $S_{N1}/S_{N2}$ ) (25).

Su fórmula química es: 
$$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{O} - \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} - \text{CH}_3$$

Al igual que MNNG alquila los átomos de N-3 y N-7 de las bases púricas.

EMS es capaz de inducir una respuesta adaptativa, al igual que otros agentes alquilantes, al crecer las células a bajos niveles del mutágeno. Aunque se ha observado que es un débil inductor (16).

Cerdá-Olmedo y Guerola (3) y Cerdá-Olmedo y Ruiz-Vázquez (5), reportan la inducción preferencial de mutaciones en las regiones de replicación en el cromosoma de E. coli, después del tratamiento mutagénico con: MNNG, MNU y ENU, no siendo observada después del tratamiento con EMS ó luz U.V..

Ha sido reportado que las mutaciones inducidas por EMS tienen máyor viabilidad que las inducidas por MNNG (16).

Loveless(28) reporta el descubrimiento de la alquilación en el O-6 de los residuos de guanina en el ADN tratado con: NMU, NEU y EMS, asumiendo que éstas reacciones conducen a un apareamiento atípico de bases. Prakash y Higgins (39) también apoyan esto, diciendo que la presencia de O-6 alquil guanina en el ADN les da potencialidad mutagénica y carcinogénica.

Prakash y Sherman (40) proponen que el principal evento mutacional inducido por EMS en todos los sistemas es la transición G-C ---→ A-T.

## 7. Ciclo de vida de Kluyveromyces lactis

Los microorganismos han constituido una herramienta muy valiosa para el desarrollo de los estudios de tipo genético.

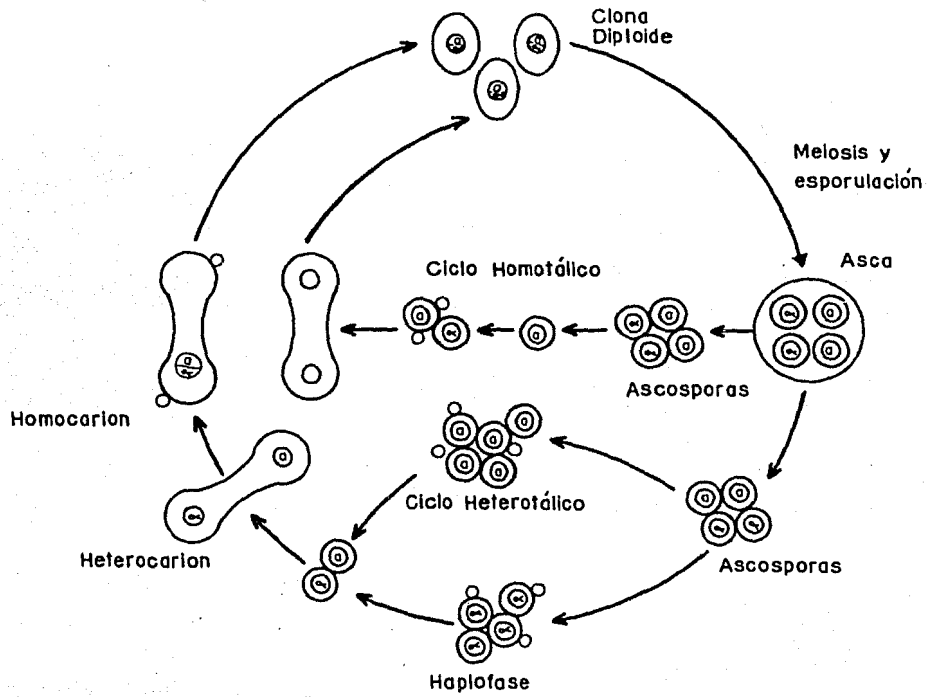
La levadura Kluyveromyces lactis perteneciente a la Clase de los hongos Ascomycetes, resulta ser un organismo ideal para llevar a cabo estudios genéticos y bioquímicos, en primer lugar por su fácil manejo en el laboratorio y además por presentar un ciclo de vida muy corto, que se ilustra en la figura 1.

Durante el ciclo de vida de K. lactis tiene lugar la unión entre dos células haploides de factor de compatibilidad opuesto, dando lugar a una célula diploide. Por meiosis cada célula diploide forma cuatro ascosporas haploides.

Cuando las ascosporas salen del asca comienzan a producir yemas y cada una forma una población de células haploides.

En general, las levaduras fértiles son clasificadas como: heterotálicas u homotálicas. En las cepas heterotálicas se presenta uno de los factores de compatibilidad ( a ó ) y las clonas de una espora permanecerán haploides por muchas generaciones (32).

En las levaduras homotálicas no se observa un sistema de apareamiento estricto y las células hijas se fusionan para formar cigotos, esto se debe a que los factores de homotalismo (H), ejercen su efecto cambiando el factor de compatibilidad a la forma alternativa de un cierto porcentaje de las células (19).



Ciclo de vida de  
K. lactis

Fig. 1

## II. MATERIALES Y METODOS

Cepas de la levadura Kluyveromyces lactis empleadas:

Y-14:a, +

KC2-12D:α, +

KF71-2D:a, ura<sub>1a</sub>

KF82-4A:a, ura<sub>3a</sub>

KT-1:a, ura<sub>4a</sub>

KT-15:a, ura<sub>1a</sub> ura<sub>2a</sub>

KA5-11B:γ ade<sub>1a</sub>

KT-11:α, ade<sub>3a</sub>

W 600B:α, ade<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub>

KA10-6C:a, ade<sub>1a</sub>

KT-4:a, ade<sub>2a</sub>

KT-24:a, ade<sub>4a</sub>

KA5-4C:a, ade<sub>2a</sub>

KT-13:H, arg<sub>1a</sub>

KG83-11D:a, arg<sub>1a</sub>

WM-37:a, his<sub>1a</sub>

K2(2):α, his<sub>1a</sub>

KT-2:a, ile<sub>1a</sub>

KC44-13D:a, leu<sub>1a</sub> leu<sub>2a</sub>

KG64-5A:a, leu<sub>2a</sub>

KT-7:α, leu<sub>2a</sub>

KF53-2B:α, leu<sub>2a</sub>

KG51-5A:a, lis<sub>1a</sub>

KF83-7C:a, lis<sub>2a</sub>

KT-20:a, lis<sub>3a</sub>

KT-3:a, met<sub>3a</sub>

KF68-R2:a, met<sub>1a</sub>

KF31-18B:a, met<sub>2a</sub>

KF31-18D:a, met<sub>2a</sub>

K-7:α, trp<sub>1a</sub>

KT-19:α, trp<sub>2a</sub>

KT-26:a, treo<sub>1a</sub>

## MEDIOS DE CULTIVO

### - Medio mínimo (SD)

Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco) 0.67% (P/V)  
Dextrosa 2.0% (P/V)  
Agar (Sigma) 2.0% (P/V)  
Agua destilada

### - Medio con extracto de malta (ME)

Extracto de malta 5.0% (P/V)  
Agar 2.0% (P/V)  
Agua destilada

### - Medio completo (YPAD)

Extracto de levadura 1.0% (P/V)  
Peptona de gelatina 2.0% (P/V)  
Dextrosa 2.0% (P/V)  
Sulfato de adenina 80 µg/ml  
Agar 2.0% (P/V)  
Agua destilada

### - Medio mínimo con aminoácidos (SD + aa)

Base nitrogenada de levadura s/ aa (Difco) 0.67% (P/V)  
Dextrosa 2.0% (P/V)  
Agar 2.0% (P/V)

Soluciones stock de aminoácidos, bases púricas y pirimídicas

Cantidad/200 ml

Sulfato de adenina	240 mg
Uracilo	480 mg
Triptofano	480 mg
L-Histidina-HCl	480 mg
L-Arginina-HCl	480 mg
L-Metionina	480 mg
L-Tirosina	180 mg
L-leucina	720 mg

L-Isoleucina	720 mg
L-Lisina-HCl	720 mg
L-Fenilalanina	600 mg
L-Ac. glutámico	1.2 g
L-Ac. Aspártico	800 mg
L-Valina	3.6 g
L-Treonina	4.8 g
L-Serina	9.0 g
Prolina	720 mg
Cisteína	360 mg
Alanina	108 mg
Guanina	240 mg

#### ANALISIS DE TETRADAS

##### - Medio de Disección

Ion agar                                    1.5% (P/V)  
 Agua destilada

##### - Solución -glucuronidasa:agua estéril (1:3)

#### MUTAGENESIS CON MNNG

##### - Solución amortiguadora de fosfato-citrato (0.2 M-0.1 M, pH 7.7)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$                                     28.39 g  
 Ac. cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )    21.014 g  
 Agua destilada                            1000 ml

##### - Solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH7)

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$                             7.0 g  
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$                                         2.62 g  
 Agua destilada                            1000 ml



- Solución de MNNG (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Solución amortiguadora de fosfatos-citrato (0.2M-0.1M, pH7.7)-500ml  
MNNG 10 mg

#### MUTAGENESIS CON EMS

- Solución amortiguadora de fosfatos (50mM, pH 7)
- Tiosulfato de sodio 5% (P/V)
- Agua destilada
- Solución de EMS (Eastman Kodak) al 3% y 6% (V/V)

## M E T O D O S

### MUTAGENESIS CON N-METIL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINA

Se inocula la superficie de una placa de medio completo (YPAD) con cada cepa a tratar (KC2-12D:α, +; Y-14: a, +), incubando a 30°C por espacio de 24 horas, cuando se ha alcanzado la fase estacionaria de crecimiento.

Se toman tres asadas de cada cepa y se resuspenden en 10ml de solución amortiguadora de fosfatos (50mM, pH 7), para tener una concentración de  $1 \times 10^9$  células/ml aproximadamente.

En un matraz Erlenmeyer (testigo) se colocan 5 ml de la solución amortiguadora de fosfatos-citrato (0.2 M, 0.1 M, pH 7.7) y en otro matraz (problema) 5 ml de la solución de MNNG (20µg/ml).

La solución testigo y la que contiene el mutágeno se incuban en un baño de agitación a 30°C. Y se añaden 0.5 ml de la suspensión celular a ambos matraces.

Se toman alícuotas de 0.1 ml en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos a intervalos de 10 minutos a partir del tiempo cero.

Las muestras se diluyen hasta una concentración final de  $10^3$ ,  $10^4$  o  $10^5$  células por ml. Sembrando 0.2 ml en placas con medio completo (YPAD).

El crecimiento de centros formadores de colonias es observado a las 48 horas, cuando pueden ser contados y determinada la curva de sobrevida.

### MUTAGENESIS CON ETIL METANO SULFONATO

Al igual que con MNNG, se parte de un cultivo fresco de 24 horas de crecimiento. Tomándose tres asadas de la cepa que se va a mutagenizar, resuspendiéndola en 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos (aproximadamente  $10^9$  células/ml).

Se transfieren 3.5 ml de la suspensión celular anterior a un matraz Erlenmeyer, agregando 5 ml de la solución amortiguadora de fosfatos (testigo). A un matraz problema se agrega lo mismo que al testigo y se preincuban durante 5 minutos en un baño de agitación a 30°C.

Se añaden 0.25 ml de EMS (3% V/V) al matraz problema y este mismo volumen, pero de solución amortiguadora de fosfatos, al matraz testigo.

Se incuban a 30°C tomando alícuotas de 0.1 ml a intervalos de 10 minutos, comenzando con la muestra correspondiente al tiempo cero.

Las alícuotas se transfieren a tubos de tiosulfato de sodio al 5% (8 ml por tubo), para destruir al mutágeno.

Cada muestra se diluye y se siembra el volumen estimado, en placas de medio completo, para que haya crecimiento de 200 colonias por placa, aproximadamente. A partir de conteo de los centros formadores de colonias se elabora la curva de sobrevivencia.

#### MUTAGENESIS CON LUZ ULTRAVIOLETA

En estos experimentos la fuente de luz U.V. empleada fue una lámpara germicida cuya dosis es de 19 erg/mm<sup>2</sup>/seg. Es importante que cuando se trabaja con luz U.V., se haga en ausencia total de luz azul, para evitar que haya reparación por fotoreactivación.

Se parte de un cultivo fresco de 24 horas, crecido en medio completo, en fase estacionaria de crecimiento.

Se toman tres asadas de inóculo de la cepa que se va a mutagenizar y se diluyen en 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7), vertiéndose esta suspensión celular en una caja de

Petri, cubierta con papel aluminio. La suspensión celular se coloca exactamente debajo de la fuente de irradiación y se provee de un agitador magnético, para que haya agitación continua e irradiación homogénea.

Al iniciar la mutagénesis se descubre la caja y se toman alícuotas a diferentes tiempos de irradiación. Se diluyen las muestras a una concentración final de  $10^3$ ,  $10^4$  o  $10^5$  células por ml y se siembran 0.2 ml en placas con medio completo.

\* Las diluciones y siembra también deben llevarse a cabo en la oscuridad y en condiciones de esterilidad. \*

## SELECCION DE MUTANTES AUXOTROFICAS

Cuando se han determinado las curvas de sobrevivencia de las cepas, se lleva a cabo una nueva mutagénesis, en la cual se aplica el mutágeno el tiempo calculado para obtener entre 1-10 % de sobrevivientes, siendo el porcentaje en el que se tiene la mejor relación de toxicidad y mutagenicidad (16).

Los centros formadores de colonias que crecen después de los tratamientos mutagénicos, se replican en placas con medio mínimo (SD), aquellos que no presentan crecimiento son aislados y purificados como posibles mutantes auxotróficas y se transfieren a medio completo, tomando una sola clona.

Para determinar el requerimiento específico de cada cepa mutante, son probadas en medio mínimo con aminoácidos (SD + aa), purinas y pirimidinas de acuerdo con el siguiente patrón (44):

	Mezcla #1	Mezcla #2	Mezcla #3	Mezcla #4	Mezcla #5
Mezcla #6	Adenina	Guanina	Cisteína	Metionina	Uracilo
Mezcla #7	Histidina	Leucina	Isoleucina	Valina	Lisina
Mezcla #8	Fenilalanina	Tirosina	Triptofano	Treonina	Prolina
Mezcla #9	Ac.glutámico	Serina	Alanina	Ac.aspártico	Arginina

Cuando una colonia presenta únicamente un requerimiento crecerá sobre una placa que contenga una de las mezclas del 1-5 y sobre otra que contenga una de las mezclas del 6-9.

Si una colonia presenta crecimiento sólo en una de las nueve mezclas, requiere más de un nutriente de esa mezcla,

## PRUEBAS PARA DETERMINAR FACTOR DE COMPATIBILIDAD

Se parte de un cultivo fresco de 24 horas de crecimiento, de una cepa testigo, cuyo factor de compatibilidad es conocido ( $\alpha$  o a) y un cultivo de la cepa problema, a la que será determinado el factor de compatibilidad. Ambas cepas deben llevar requerimientos de auxotrofia complementarios.

En 20 ml de agua estéril se resuspenden 2 asadas de cada una de las cepas y cada suspensión celular se vierte en cajas de Petri estériles.

Con ayuda de un cepillo de siembra se pasan gotas de la cepa problema a una placa de extracto de malta (ME), cuando se sequen se colocan gotas de la cepa testigo sobre las anteriores, haciéndolas coincidir.

Se incuban de 24 a 48 horas a 30°C y se observan al microscopio para ver si hubo formación de cigotos, si es positiva la observación, el factor de compatibilidad de la cepa problema es opuesto al de la cepa testigo.

Las cruces se replican en medio mínimo para ver la formación de clonas diploides, de tal manera que si no se observó formación de cigotos al microscopio, se pueda determinar el factor de compatibilidad por formación de protótrofos.

## PRUEBAS DE COMPLEMENTACION PARA LA CARACTERIZACION DE LAS CEPAS MUTANTES AISLADAS

Se seleccionan dos cepas haploides de 24 horas de crecimiento y de factor de compatibilidad opuesto con el mismo requerimiento de auxotrofia.

Las dos cepas son mezcladas en placas con extracto de malta

(cruza en masa) y son incubadas de 12 a 48 horas o hasta que sean observados cigotos al microscopio.

Se toma un poco del inóculo anterior y se siembra en medio mínimo (SD), se incuba de 24 a 48 horas o hasta que sea observado el crecimiento de clonas diploides. El crecimiento en medio mínimo nos indica que las mutaciones que llevan las cepas mutantes mezcladas no son alélicas.

La ausencia de complementación es prueba cercana de alelismo (12). Es importante que al hacer pruebas de complementación sean observados al microscopio los cigotos, si no son localizados debe hacerse nuevamente la cruce. Ya que, al no haber crecimiento de clonas diploides en medio mínimo, no se puede saber si esto fue debido a que las cepas no se cruzaran o a que las mutaciones se encuentran en el mismo sitio y no complementan.

El caso contrario, crecimiento en medio mínimo y no observación de cigotos se puede tomar como prueba positiva para la complementación.

#### CONSTRUCCION DE CEPAS MUTANTES CON VARIOS MARCADORES DE AUXOTROFIA

A partir de las cepas mutantes aisladas al aplicar los agentes alquilantes: EMS y MNNG e irradiación U.V., se construyeron cepas que llevaran varios factores de crecimiento. Esto se llevó a cabo por medio de la Disección de tétradas y la técnica de esporas al azar.

#### DISECCION DE TETRADAS

Este es un método aplicado para el aislamiento de tétradas de esporas, desarrollado a partir de la observación de que la pared del asca puede ser digerida enzimáticamente sin dañar la tétrada.

Jhonston y Mortimer (21) aplicaron la enzima  $\beta$ -glucuronidasa del aparato digestivo del caracol de jardín Helix pomatia.

La técnica en general es como sigue:

Las cepas de cultivos frescos son cruzadas en placas con extracto de malta. Después de 13-24 horas ó cuando hayan sido observados zigotos al microscopio, se transfieren a placas con medio mínimo.

Las clonas diploides son sembradas en medio de extracto de malta nuevamente, para que se lleve a cabo la esporulación, generalmente después de 24 horas, incubadas a 30 °C.

Tratamiento con  $\beta$ -glucuronidasa.- Se examina el cultivo esporulado bajo el microscopio y se toma un poco de este inóculo, poniéndolo en un tubo estéril pequeño que contenga 0.3 ml de agua estéril y 0.1 ml de enzima  $\beta$ -glucuronidasa (glusulasa). La digestión se lleva a cabo a temperatura ambiente por espacio de 8-10 minutos, haciendo observaciones periódicas al microscopio para ver si la enzima ha actuado sobre el asca.

Es conveniente que las células no se dejen mucho tiempo en glusulasa, ya que puede decrecer la viabilidad de las esporas.

Preparación de la microaguja.- se prepara una microaguja de vidrio, doblando el extremo de una varilla en ángulo recto, se rompe el extremo, de manera que tenga un diámetro de 10-100  $\mu$ m. Se monta esta aguja en el micromanipulador Leitz, (43).

Preparación de la placa agar.- Se coloca un cubreobjetos en una caja de Petri (ambos estériles). Se corta una placa de ion-agar rectangular de aproximadamente 2 X 5 cm con un bisturí estéril.

La placa se coloca en el centro del cubreobjetos, observándose que no queden burbujas entre el agar y el cubreobjetos. Se toma una asada de la suspensión celular digerida y se coloca a lo largo de uno de los lados de la placa de agar. El cubreobjetos con el agar se coloca sobre una cámara de vidrio, con la placa de agar hacia abajo.

Se coloca la cámara de vidrio sobre la platina del micros-



copio, localizando la asada puesta sobre el agar, a un aumento de 20X. Se toma una tétrada con la microaguja y se deposita sobre el agar, dejando separadas las esporas una de otra, por una distancia de 3 mm. Así se continúa hasta tener 10-15 tétradas por placa.

El rectángulo de agar es quitado de la cámara de disección y colocado sobre placas de YPAD (medio completo), se incuban a 30°C durante 48 horas ó hasta que haya crecimiento de las esporas, de tal manera que puedan ser aisladas como colonias individuales, para ser transferidas a medio completo. Se incuban a 30°C por espacio de 24 horas. Al término de este tiempo se prueban sobre medios selectivos con mezclas de diferentes aminoácidos y sobre placas de medio mínimo, para determinar los requerimientos auxotróficos de cada espóra disectado.

#### ANALISIS DE ESPORAS AL AZAR

Las muestras de esporas al azar pueden ser usadas para establecer ligamiento o para detectar eventos de recombinación (32). Para estudios de este tipo la técnica es eficiente y parece ser más deseable que el análisis de tétradas, que es más laborioso.

Como a nosotros nos interesa ailar clonas que por recombinación, presenten varios marcadores de auxotrofia, esta técnica resulta muy adecuada.

Para el análisis de esporas al azar, los cultivos esporulantes se guardan después del tratamiento enzimático y las tétradas se separan en un sonicador (MSE) con una intensidad de 2.0 amp. durante 5 minutos.

Las células separadas son diluidas y sembradas en placas con medio completo. Después de 48 horas se prueban en medios selectivos con aminoácidos, para detectar los requerimientos que puedan presentar las células recombinantes.

Para llevar a cabo los estudios de ligamiento es necesario que se separen las ascosporas de las células vegetativas, Siddiqui (45) reporta una técnica para ello.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Como es observado en las figuras 2 y 3 en los tratamientos con agentes alquilantes, las curvas presentan un decaimiento exponencial, en cuanto a la viabilidad celular.

En la figura 2 se tiene que el 1% de sobrevivida se alcanza aproximadamente a los 110 min de tratamiento con MNNG, en las dos cepas mutagenizadas; pero la sensibilidad varía de una a otra. Para la cepa KC2-12D donde se aplicó una dosis de 2 µg/ml de mutágeno, resulta ser 10 veces más sensible que la cepa Y-14, a la que se aplicó MNNG en una dosis de 20 µg/ml.

En la figura 3 se observa que el 1% de sobrevivientes se obtiene a los 55 min de tratamiento, aproximadamente, de exposición a EMS. A la cepa KC2-12D el mutágeno se aplicó a una concentración del 3%, para Y-14 se aplicó al 6%. Al igual que con el agente alquilante MNNG, la cepa de factor de compatibilidad  $\kappa$ , se comporta más sensible. En este caso es doblemente sensible con respecto a Y-14.

Para estas cepas, en particular, no se detectó una respuesta adaptativa al ser tratadas con mutágenos que generan grupos metilantes y etilantes en el ADN. Sin embargo, al aplicar MNNG en otras cepas de K. lactis sujetas a tratamiento, se induce esta respuesta de adaptación al mutágeno, como ha sido anteriormente observado (46).

Es claro, que para los dos agentes alquilantes, la cepa KC2-12D resulta ser más susceptible a sus efectos letales.

En la figura 4 se tiene la respuesta a los efectos de la irradiación ultravioleta. Se alcanza el 1% de sobrevivida a los 130 seg, aproximadamente.

Para la cepa Y-14 se observa que a los 210 seg de tratamiento mutagénico, la población que sobrevive se hace resistente a la acción de la luz U.V., permaneciendo más o menos constante después de ese tiempo de exposición a la irradiación.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Como es observado en las figuras 2 y 3 en los tratamientos con agentes alquilantes, las curvas presentan un decaimiento exponencial, en cuanto a la viabilidad celular.

En la figura 2 se tiene que el 1% de sobrevivida se alcanza aproximadamente a los 110 min de tratamiento con MNNG, en las dos cepas mutagenizadas; pero la sensibilidad varía de una a otra. Para la cepa KC2-12D donde se aplicó una dosis de 2 µg/ml de mutágeno, resulta ser 10 veces más sensible que la cepa Y-14, a la que se aplicó MNNG en una dosis de 20 µg/ml.

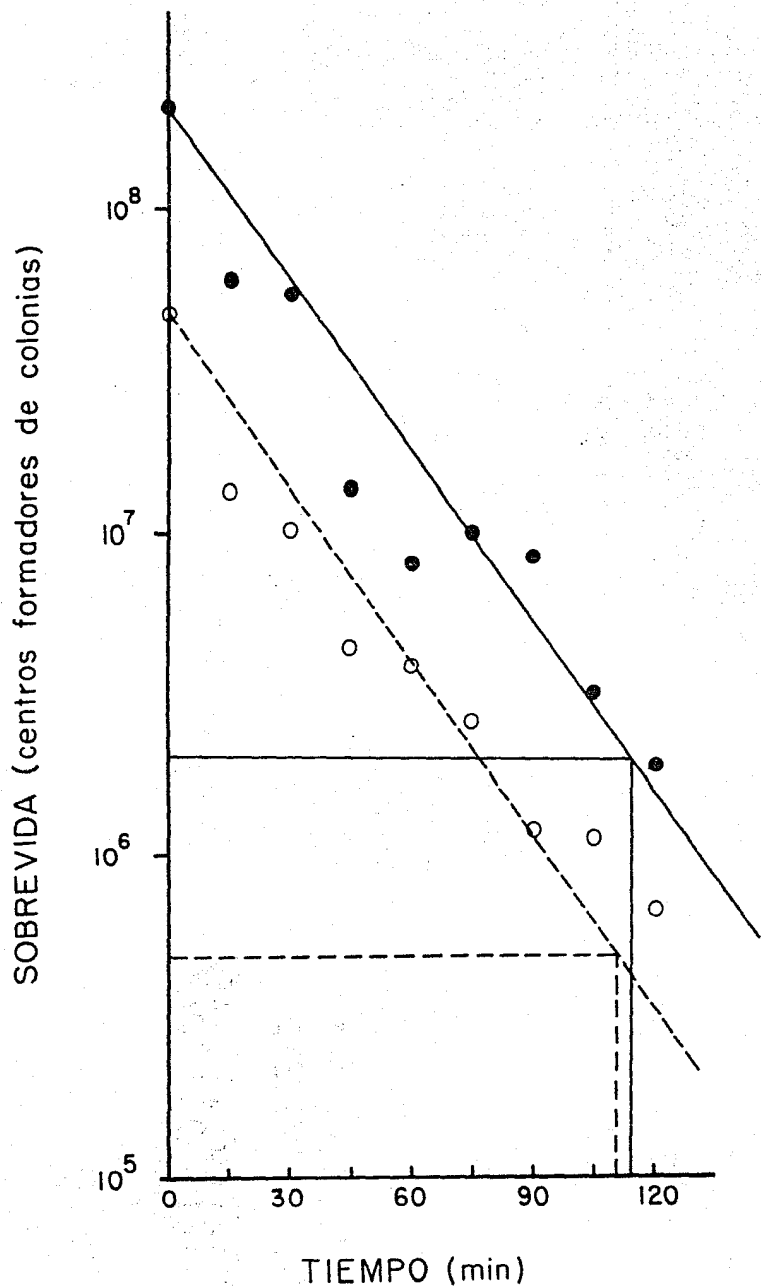
En la figura 3 se observa que el 1% de sobrevivientes se obtiene a los 55 min de tratamiento, aproximadamente, de exposición a EMS. A la cepa KC2-12D el mutágeno se aplicó a una concentración del 3%, para Y-14 se aplicó al 6%. Al igual que con el agente alquilante MNNG, la cepa de factor de compatibilidad  $\phi$ , se comporta más sensible. En este caso es doblemente sensible con respecto a Y-14.

Para estas cepas, en particular, no se detectó una respuesta adaptativa al ser tratadas con mutágenos que generan grupos metilantes y etilantes en el ADN. Sin embargo, al aplicar MNNG en otras cepas de K. lactis sujetas a tratamiento, se induce esta respuesta de adaptación al mutágeno, como ha sido anteriormente observado (46).

Es claro, que para los dos agentes alquilantes, la cepa KC2-12D resulta ser más susceptible a sus efectos letales.

En la figura 4 se tiene la respuesta a los efectos de la irradiación ultravioleta. Se alcanza el 1% de sobrevivida a los 130 seg, aproximadamente.

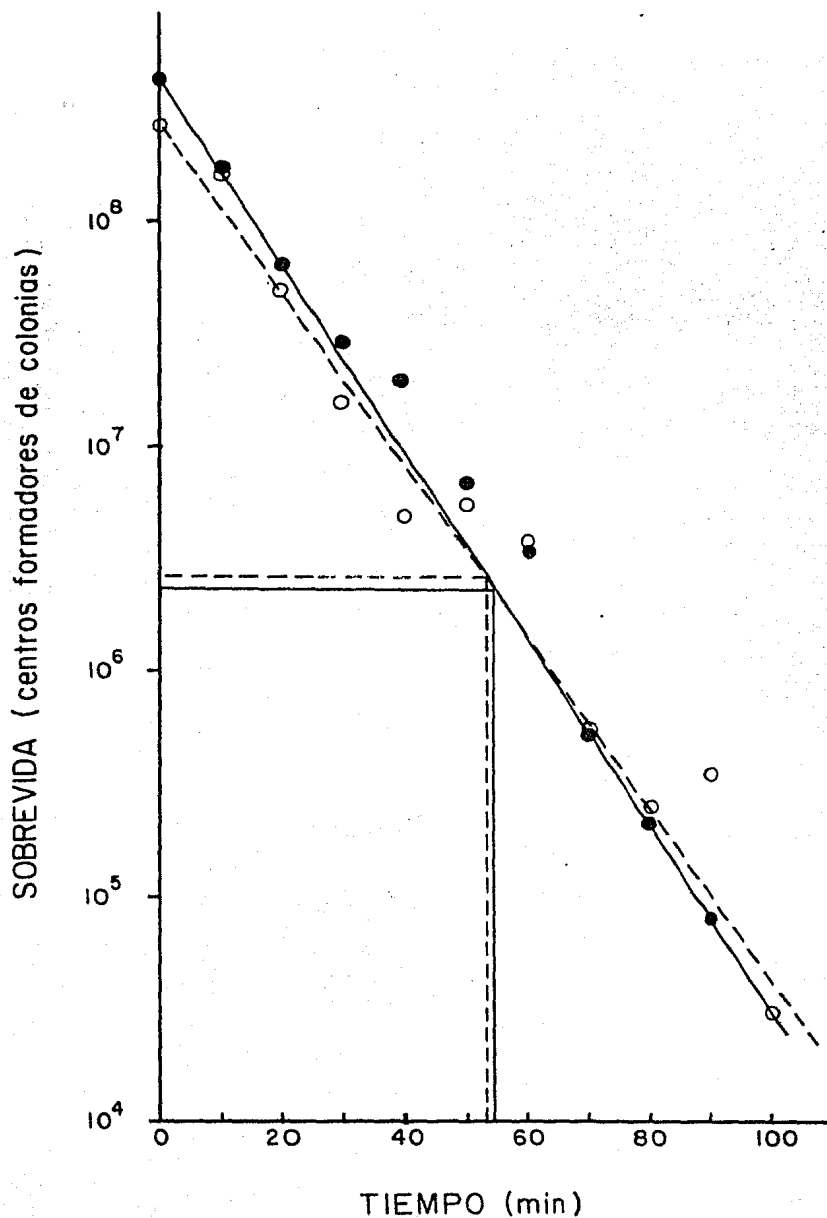
Para la cepa Y-14 se observa que a los 210 seg de tratamiento mutagénico, la población que sobrevive se hace resistente a la acción de la luz U.V., permaneciendo más o menos constante después de ese tiempo de exposición a la irradiación.



TRATAMIENTO CON MNNG

FIG. 2 Curva de sobrevida para las cepas:

Y-14: a, + (○) DOSIS: 20 µg/ml  
 KC2-12D: <math>\leq</math>, + (●) DOSIS: 2 µg/ml

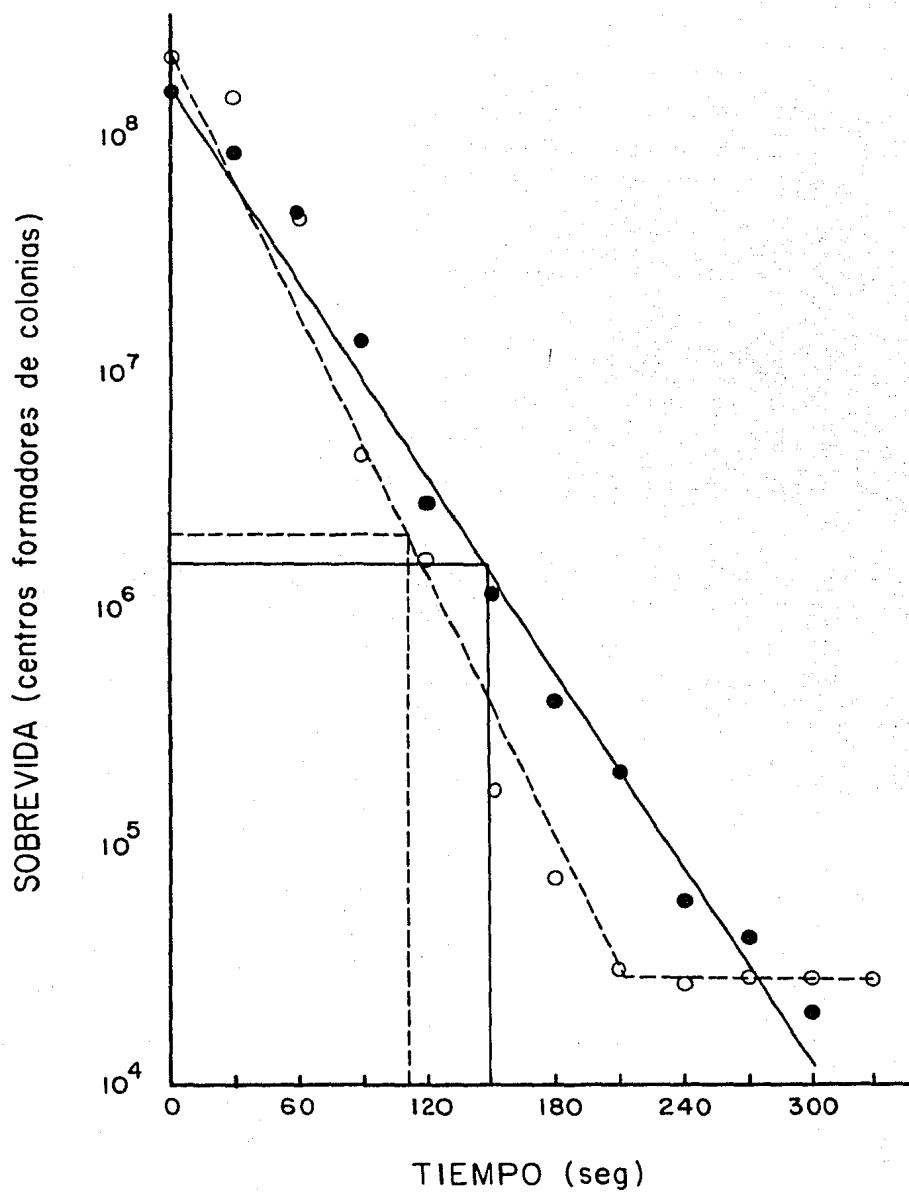


TRATAMIENTO CON EMS

FIG. 3 Curva de sobrevida para las cepas:

Y-14: a, + (○) DOSIS: EMS 6% (V/V)

KC2-12D: c, + (●) DOSIS: EMS 3% (V/V)



TRATAMIENTO CON LUZ U.V.

FIG. 4 Curva de sobrevida para las cepas:

Y-14: a, + (○)  
 KC2-12D: α, + (●)

Parry, J.M. (36) reporta que la viabilidad de un cultivo después de la exposición a luz U.V. depende de un número de parámetros, que son: la frecuencia de las lesiones inducidas por la luz U.V., la presencia de genes funcionando para las enzimas de reparación celular y la actividad metabólica del cultivo tratado.

Es posible que para esta población que se mantiene viable después de cierto tiempo de irradiación, se encuentre funcionando más efectivamente las enzimas de reparación y no se acumulen muchas lesiones en su ADN. Esto queda sujeto a un mayor número de estudios.



En las tablas 1, 2 y 3 se enlistan las cepas mutantes auxótrofas aisladas después de los tratamientos alquilantes y con irradiación U.V. El factor de compatibilidad que se asigna a cada una de ellas es igual al de la cepa progenitora. En principio, heredan el mismo, sin embargo, puede verse alterado por los factores de homotalismo. Se ha observado que esto sucede frecuentemente en K. lactis. Al caracterizar estas cepas se detectó para algunas otro factor de compatibilidad, como se podrá notar en las tablas 4 a la 11.

La figura 5 ilustra la relación entre el número de mutantes aisladas para cada requerimiento de auxotrofia con su respectivo porcentaje, para cada tratamiento mutagénico.

Para la cepa KC2-12D, que resulta ser más sensible a los agentes alquilantes que la Y-14 se aislaron un mayor número de mutantes auxotróficas, en una gama más amplia de requerimientos. Así, se tiene que para el tratamiento con MNNG se encontraron 9 requerimientos en las 18 cepas aisladas. Mutagenizando con EMS, se determinaron 10 factores de crecimiento entre las 44 mutantes aisladas.

Para la cepa Y-14 se detectaron 5 requerimientos, mutagenizando con MNNG; y un total de 15 mutantes. Al tratar con EMS se obtuvieron 4 mutantes para 3 requerimientos auxotróficos.

Podría asumirse que para la cepa KC2-12D, en particular, los agentes alquilantes están ejerciendo un mayor daño, en cuanto a toxicidad y letalidad, tal vez porque los mecanismos de reparación son menos efectivos. Una causa podría ser la introducción de lesiones letales en exceso en su ADN, de tal manera que, aunque su reparación sea eficiente se llegue a copiar algún error. Otra razón sería la inhibición de las enzimas de reparación específicas en la alquilación.

Es importante hacer notar que los tratamientos mutagénicos no se llevaron a cabo con cultivos sincronizados. Ya que, se ha reportado que el tipo de mutante auxótrofo inducido, depende de la fase del ciclo celular en la que se haya aplicado el mutágeno (16). Por

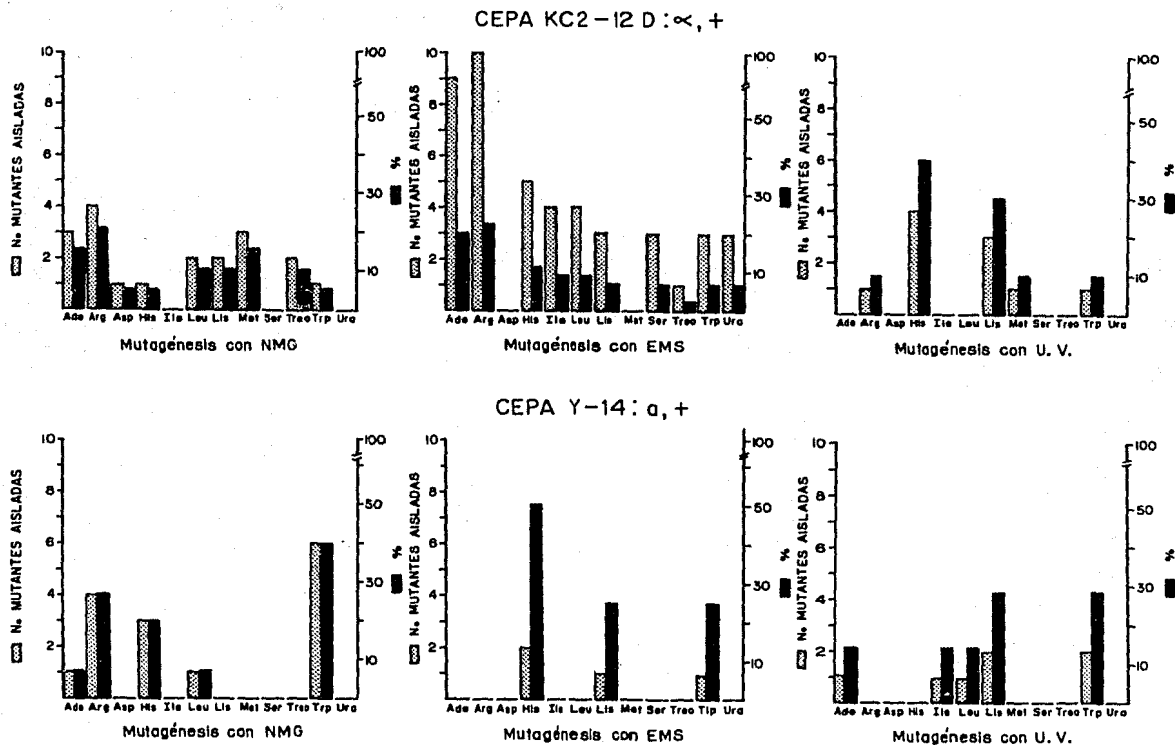


FIG. 5 Histogramas que representan el número de mutantes aisladas para cada marcador de auxotrofia contra su respectivo porcentaje, después del tratamiento mutagénico con los agentes alquilantes: EMS, MNNG y radiación U.V., aplicados a las cepas: KC2-12D:  $\infty$ , + e Y-14: a, +.

lo tanto, en estos experimentos es un evento totalmente al azar el tipo de auxótrofo aislado.

sin embargo, es sobresaliente el hecho de encontrar un mayor número de mutantes del tipo arg<sup>-</sup>, con los agentes alquilantes (excepto para la cepa Y-14 al tratarse con EMS).

En las mutagenésis con irradiación ultravioleta, para las celsilvestres tratadas, se aisló un número muy pequeño de mutantes, comparado con el número obtenido al tratar con los agentes alquilantes (EMS y MNNG).

Para la cepa KC2-12D se aislaron 10 mutantes para 5 requerimientos auxotróficos y en el tratamiento con la cepa Y-14 se aislaron 7 mutantes para 5 marcadores.

No se puede decir que haya una diferencia notable entre las dos cepas, en cuanto al número de mutantes aisladas. Se ha observado que al irradiar otras cepas de K. lactis con luz U.V. se tiene siempre una baja incidencia de mutantes auxotróficas y de tipo extracromosómico, aún después de haber crecido las células irradiadas en presencia de cafeína, que se sabe es un inhibidor de los procesos de reparación en la oscuridad (34). Esto puede ser atribuido a la efectividad de los mecanismos de reparación que están operando en las células; ya sea fotoreactivación, escisión o reparación post-replicación.

Nuevamente aquí hay que hacer la aclaración de que los tratamientos no fueron realizados con cultivos sincronizados. Ya que ha sido previamente demostrado que la sensibilidad de las células de levadura a los efectos genéticos y letales de la luz U.V. dependen altamente del estado del ciclo celular durante el cual son expuestas (50). Por lo tanto no se favorecería la formación de un tipo particular de mutante durante estos tratamientos.

El orden decreciente para cada requerimiento, de acuerdo al número de mutantes aisladas, tomando en cuenta los tres tratamientos mutagénicos, fue el siguiente: Arg<sup>-</sup> > His<sup>-</sup> > Ade<sup>-</sup> = Trp<sup>-</sup> > Lis<sup>-</sup> > Leu<sup>-</sup> > Ile<sup>-</sup> > Met<sup>-</sup> > Ser<sup>-</sup> = Treo<sup>-</sup> = Ura<sup>-</sup> > Asp<sup>-</sup>.

El mayor número de mutantes arg<sup>-</sup> se obtuvo en la mutagénesis de la cepa KC2-12D al aplicar EMS. Este hecho resultó interesante y al llevar a cabo la caracterización de estas cepas se encontró que 7 de ellas corresponden al grupo de complementación ARG 1\* (Tabla 6).

La caracterización se realizó por pruebas de complementación con la cepa KT-13: H, arg<sub>1a</sub> (osmótica) y KG83-11D: a, arg<sub>1a</sub>. Estas mutantes cuando se crecen en medio con concentraciones altas de sales, repara el daño producido por la mutación (mutante reparable osmóticamente). Ha sido reportado que este tipo de mutantes son comunes entre las levaduras auxotróficas (11, 12).

Las cepas arg<sup>-</sup> aisladas fueron crecidas en medio mínimo con cloruro de potasio KCl (0.4M), para determinar cuál de ellas era reparable osmóticamente. Las cepas: MC-62: α, arg<sub>1c</sub>; MC-63: α, arg<sub>1d</sub> y MC-105: α, arg<sub>1i</sub> resultaron ser mutantes de este tipo.

La reparación osmótica fue probada sólo con las mutantes arg<sup>-</sup> y no para los demás requerimiento. Pero es posible que entre las cepas que presentan otros marcadores de auxotrofia, se tengan mutantes osmóticas.

-----  
\* En este trabajo, el orden del grupo de complementación dado a cada cepa auxotrofa aislada, no está en relación a los pasos de la vía de biosíntesis de cada aminoácido, ya que, no se efectuó una caracterización bioquímica de las cepas mutantes; sino al orden en que se fueron aislando. La caracterización se realizó tomando como referencia las cepas pertenecientes al Cepario del Laboratorio, en las que no se conoce el sitio exacto de la lesión; pero a partir de las pruebas de complementación con ellas se puede detectar si la mutación de las cepas aisladas se encuentra en algún locus distinto o el mismo.

Se ha observado que la cepa KT-13: H, arg<sub>1a</sub> tiene un alto grado de homotalismo y fue tomada como referencia para la caracterización del grupo de complementación ARG-1, por lo tanto, habría cierta duda al decir que las cepas que no complementan con ella sean verdaderamente ARG-1.

Si al llevar a cabo las pruebas de complementación se observa que hay crecimiento en medio mínimo, se puede estar seguro que las cepas presentan la mutación en sitios diferentes. En el caso de no observar crecimiento en medio mínimo, aún observando zigotos al microscopio, si se tiene una cepa homotálica, no se puede detectar si esto se debe a que las cepas son alélicas o a que la cepa, al intercambiar su factor de compatibilidad, se entrecruza y los diploides así formados no crezcan en medio mínimo.

Si se observa por ejemplo, la cepa MC-41: a, arg<sub>1-j</sub>(?) (Tabla 6), caracterizada indirectamente con las cepas: MC-75: α, arg y MC: 103: α, arg, que no complementan con KT-13; sí complementa con MC-50: α, arg; MC-62: α, arg; MC-63: α, arg; MC-82: α, arg y MC-101: α, arg, caracterizadas como ARG-1. Si todas estas cepas pertenecieran al mismo grupo de complementación, no se detectaría crecimiento en medio mínimo al analizar los diploides.

Se requiere pues, de un mayor número de estudios para poder afirmar que las mutantes del tipo ARG-1, caracterizadas con respecto a la cepa KT-13: H, arg<sub>1a</sub>, pertenecen efectivamente a este grupo de complementación o tienen la lesión en otro sitio.

Para las cepas auxótrofas de los grupos de complementación HIS-1 (Tabla 7) y TRP-1 (Tabla 10) ocurre lo mismo que para ARG-1, cepas que no deben complementar, presentan crecimiento de diploides en medio mínimo. Se requiere un análisis más fino de cada mutantes, para saber si esto se debe a la presencia de una cepa homotálica tomada como referencia para efectuar la caracterización.

En cuanto a los auxótrofos con requerimiento para Uracilo (Tabla 4), se determinó un nuevo grupo de complementación, dife-

En cuanto a los auxótrofos con requerimiento para Uracilo (Tabla 4), se determinó un nuevo grupo de complementación, diferente a los ya presentes entre las cepas de la Colección del Laboratorio.

Para el marcador Adenina (Tabla 5) se encontraron dos nuevos grupos de complementación, el 5 y 6.

Las 16 mutantes aisladas que requieren Histidina, cayeron en 4 grupos de complementación diferentes (Tabla 7). Se tiene reportado que los genes para histidina en *K. lactis* mapean en 4 lugares distintos (49). Los grupos de complementación determinados en este trabajo, quedarían sujetos a un mayor número de estudios para ver si coinciden con alguno de los grupos de ligamiento reportados.

Para el marcador de auxotrofia Leucina (Tabla 9) se aislaron dos grupos de complementación diferentes LEU-3 y LEU-4. Cinco de las cepas estudiadas cayeron en el grupo 3 de complementación, una en el grupo 2, una en el grupo 2, una en el grupo 4 y MC-73 que lleva dos mutaciones leu<sup>-</sup>.

En las mutantes Lis<sup>-</sup> (Tabla 10) se caracterizó un nuevo grupo de complementación (LIS-4) y una de las cepas, MC-58:  $\phi$ , lis, presenta dos mutaciones lis<sup>-</sup>, aunque está dudosa la prueba de complementación para la mutación LIS-2.

Las cepas que requieren Metionina (Tabla 11) caen dentro de los grupos de complementación 1 y 3, ya determinados para las cepas de la Colección.

Para el marcador Treonina (Tabla 12) se caracterizó a la cepa MC-7:  $\phi$ , treo como perteneciente al grupo de complementación TREO-2 y la cepa MC-95:  $\phi$ , treo, al grupo TREO-1.

Las cepas Triptofano (trp<sup>-</sup>) cayeron en dos grupos de complementación: TRP-1 y TRP-3 (Tabla 13).

Para las cepas con requerimiento para Isoleucina (Tabla 8) se detectó un nuevo grupo de complementación (ILE-2), diferente a la mutación ILE-1, ya caracterizada para las cepas de la Colección.

En la Tabla 14 se enlistan las cepas auxótrofas construidas a partir de las mutantes inducidas con agentes alquilantes e irradiación U.V.

Por medio del análisis de esporas al azar, únicamente se aislaron las cepas: MC-141: a, leu<sub>4a</sub> lis<sub>1f</sub>; MC-164: ,ser<sub>2a</sub> asp<sub>1a</sub>; MC-166: leu<sub>3a</sub> lis<sub>1f</sub> y MC-167: ,ura<sub>3a</sub> trp; las demás cepas mutantes fueron construidas por disección de tétradas.

Se aislaron 40 cepas con 2 marcadores de auxotrofia, 17 con tres marcadores, 7 con cuatro requerimientos y 5 con cinco marcadores.

Se había observado que las cepas con varios marcadores auxotróficos son inestables, debido esto probablemente a una presión selectiva por su crecimiento más lento. Para comprobar si el crecimiento de las mutantes era de hecho más lento, se siguió la curva de crecimiento de las cepas: Y-14:a, +; KC2-12D:κ, +; MC-7: κ, treo<sub>2a</sub>; MC-127:a, treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>; MC-120: , treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub> ile<sub>2b</sub> MC-182:a, treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub> his<sub>1a</sub> met<sub>1a</sub> y MC-173: σ, treo<sub>2a</sub> his<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> met<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub>. Obteniendo los tiempos de generación: 120 min, 110 min, 125 min, 120 min, 110 min, 100 min y 110 min, para cada una de ellas respectivamente.

A partir de los tiempos de generación no se puede decir que haya diferencias en las velocidades de crecimiento, entre las cepas con 1, 2, 3, 4 y 5 marcadores de auxotrofia, con respecto a las de tipo silvestre; por lo que, esta posible causa de la inestabilidad previamente observada debe descartarse, por lo menos en las cepas aquí estudiadas.

A través de las resiembras periódicas y pruebas en medios selectivos, para ver si se conservan los requerimientos de auxotrofia, se ha observado que las mutaciones que presentan estas cepas son más o menos estables. Excepto las cepas MC-175 y MC-176 con cinco requerimientos, que parecen haber perdido el marcador para adenina. Esto parece concordar con la inestabilidad presente

en otras cepas con gran número de requerimientos. Sin embargo, para poder decir algo concluyente con respecto a la estabilidad de estas cepas, se necesitaría aislar cepas con mayor número de requerimientos y ver si los conservan en cada resiembra periódica.

A pesar de que no todas las mutantes aisladas, quedaron propiamente caracterizadas en cuanto al grupo de complementación al que pertenecen, considero que uno de los objetivos principales del presente trabajo, es decir la preparación de cepas que llevarán varios marcadores de auxotrofia, se logró ampliamente, pues se construyeron 7 cepas con cuatro y 5 con cinco marcadores de auxotrofia. Al emplear estas cepas en cruza se deberá disminuir notablemente el número de recombinantes auxótrofos, facilitando así los análisis genéticos de segregación mitótica en diploides y el de esporas al azar.



TABLA 1. Cepas mutantes auxótrofas aisladas por mutagénesis con MNNG

Cepa aislada y Requerimiento	Cepa progenitora	Cepa aislada y Requerimiento	Cepa progenitora
MC-1: $\alpha$ , <u>lis</u>	KC2-12D: $\alpha$ , <u>+</u>	MC-33: $\alpha$ , <u>his</u>	KC2-12D: $\alpha$ , <u>+</u>
MC-2: $\alpha$ , <u>asp</u>	"	MC-34: $\alpha$ , <u>met</u>	"
MC-4: $\alpha$ , <u>arg</u>	"	MC-35: $\alpha$ , <u>trp</u>	"
MC-6: $\alpha$ , <u>met</u>	"	MC-37: $\alpha$ , <u>ade</u>	"
MC-7: $\alpha$ , <u>treo</u>	"	MC-38: $\alpha$ , <u>leu</u>	"
MC-11: $\alpha$ , <u>arg</u>	"	MC-39: <u>a</u> , <u>arg</u>	Y -14: <u>a</u> , <u>+</u>
MC-15: $\alpha$ , <u>arg</u>	"	MC-40: <u>a</u> , <u>leu</u>	"
MC-19: <u>a</u> , <u>trp</u>	Y -14: <u>a</u> , <u>+</u>	MC-41: <u>a</u> , <u>arg</u>	"
MC-20: <u>a</u> , <u>his</u>	"	MC-42: <u>a</u> , <u>arg</u>	"
MC-21: <u>a</u> , <u>his</u>	"	MC-43: <u>a</u> , <u>trp</u>	"
MC-22: <u>a</u> , <u>arg</u>	"	MC-44: <u>a</u> , <u>trp</u>	"
MC-23: $\alpha$ , <u>leu</u>	KC2-12D: $\alpha$ , <u>+</u>	MC-45: <u>a</u> , <u>trp</u>	"
MC-25: $\alpha$ , <u>treo</u>	"	MC-46: <u>a</u> , <u>trp</u>	"
MC-27: $\alpha$ , <u>lis</u>	"	MC-47: <u>a</u> , <u>his</u>	"
MC-28: $\alpha$ , <u>ade</u>	"	MC-48: <u>a</u> , <u>ade</u>	"
MC-29: $\alpha$ , <u>met</u>	"	MC-49: <u>a</u> , <u>trp</u>	"
MC-31: $\alpha$ , <u>ade</u>	"	MC-50: $\alpha$ , <u>arg</u>	KC2-12D: $\alpha$ , <u>+</u>

NOTAS:

- Al aislar las cepas, se asumió que el factor de compatibilidad que llevaban era el mismo que el de la cepa progenitora silvestre.
- Las iniciales (MC) se asignan por el investigador que las aisló.
- El número indica el orden en que fueron aisladas.

TABLA 2. Cepas mutantes auxótrofas aisladas por mutagénesis con EMS

Cepa aislada y Requerimiento	Cepa progenitora	Cepa aislada y Requerimiento	Cepa progenitora
MC-61: <u>α</u> , <u>ile</u>	KC2-12D: <u>α</u> , <u>+</u>	MC-85: <u>α</u> , <u>his</u>	KC2-12D: <u>α</u> , <u>+</u>
MC-62: <u>α</u> , <u>arg</u>	"	MC-86: <u>α</u> , <u>ser</u>	"
MC-63: <u>α</u> , <u>arg</u>	"	MC-87: <u>α</u> , <u>ade</u>	"
MC-64: <u>α</u> , <u>ade</u>	"	MC-88: <u>α</u> , <u>ade</u>	"
MC-65: <u>α</u> , <u>ade</u>	"	MC-89: <u>α</u> , <u>his</u>	"
MC-66: <u>α</u> , <u>trp</u>	"	MC-90: <u>α</u> , <u>ser</u>	"
MC-67: <u>α</u> , <u>arg</u>	"	MC-91: <u>α</u> , <u>ade</u>	"
MC-68: <u>α</u> , <u>arg</u> ura	"	MC-92: <u>α</u> , <u>ile</u>	"
MC-69: <u>α</u> , <u>ile</u>	"	MC-93: <u>α</u> , <u>ile</u>	"
MC-70: <u>α</u> , <u>trp</u>	"	MC-94: <u>α</u> , <u>ade</u>	"
MC-71: <u>α</u> , <u>leu</u>	"	MC-95: <u>α</u> , <u>treo</u>	"
MC-72: <u>α</u> , <u>his</u>	"	MC-96: <u>α</u> , <u>his</u>	"
MC-73: <u>α</u> , <u>leu</u>	"	MC-97: <u>α</u> , <u>ade</u>	"
MC-74: <u>α</u> , <u>arg</u>	"	MC-98: <u>α</u> , <u>leu</u>	"
MC-75: <u>α</u> , <u>arg</u>	"	MC-99: <u>α</u> , <u>ura</u>	"
MC-76: <u>α</u> , <u>leu</u>	"	MC-100: <u>α</u> , <u>lis</u>	"
MC-77: <u>α</u> , <u>lis</u>	"	MC-101: <u>α</u> , <u>arg</u>	"
MC-78: <u>α</u> , <u>ade</u>	"	MC-102: <u>α</u> , <u>trp</u>	"
MC-79: <u>α</u> , <u>ura</u>	"	MC-103: <u>α</u> , <u>arg</u>	"
MC-80: <u>α</u> , <u>ura</u>	"	MC-104: <u>α</u> , <u>ade</u>	"
MC-81: <u>α</u> , <u>ser</u>	"	MC-105: <u>α</u> , <u>arg</u>	"
MC-82: <u>α</u> , <u>arg</u>	"	MC-106: <u>a</u> , <u>trp</u>	Y -14: <u>a</u> , <u>+</u>
MC-83: <u>α</u> , <u>lis</u>	"	MC-107: <u>a</u> , <u>lis</u>	"
MC-84: <u>α</u> , <u>his</u>	"	MC-108: <u>a</u> , <u>his</u>	"
		MC-109: <u>a</u> , <u>his</u>	"

TABLA 3. Cepas mutantes auxótrofas aisladas por tratamiento con luz U.V.

Cepa aislada y Requerimiento	Cepa progenitora
MC-51: $\alpha$ , <u>his</u>	KC2-12D: $\alpha$ , <u>+</u>
MC-53: $\alpha$ , <u>met</u>	"
MC-54: $\alpha$ , <u>his</u>	"
MC-55: $\alpha$ , <u>his</u>	"
MC-56: $\alpha$ , <u>lis</u>	"
MC-57: $\alpha$ , <u>arg</u>	"
MC-58: $\alpha$ , <u>lis</u>	"
MC-59: $\alpha$ , <u>trp</u>	"
MC-60: <u>a</u> , <u>leu</u>	Y -14: <u>a</u> , <u>+</u>
MC-110: <u>a</u> , <u>his</u>	"
MC-111: <u>a</u> , <u>trp</u>	"
MC-112: <u>a</u> , <u>ade</u>	"
MC-115: $\alpha$ , <u>his</u>	KC2-12D: $\alpha$ , <u>+</u>
MC-117: $\alpha$ , <u>lis</u>	"
MC-118: <u>a</u> , <u>ile</u>	Y -14: <u>a</u> , <u>+</u>
MC-119: <u>a</u> , <u>lis</u>	"
MC-129: <u>a</u> , <u>lis</u>	"

TABLA 4. Pruebas de complementación para el marcador de auxotrofia: URACILO

	MC-79: <u>cf</u> , <u>ura</u>	MC-80: <u>cf</u> , <u>ura</u>	MC-98: <u>cf</u> , <u>ura</u>	
KF71-2D: <u>a</u> , <u>ura</u> <sub>1a</sub>	+	+	+	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">URA-1a</span>
KF82-4A: <u>a</u> , <u>ura</u> <sub>2a</sub>	+	+	-(?)	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">URA-2a</span>
KT-31: <u>a</u> , <u>ura</u> <sub>4a</sub>	+	+	+	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">URA-4a</span>
KT-15: <u>a</u> , <u>ura</u> <sub>1a</sub> , <u>ura</u> <sub>2a</sub>	+	+	-(?)	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">URA-1a, URA2a</span>
	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">URA-3a</span>	-----	<span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">URA-2b</span>	

Simbología usada:

- + Las mutaciones no son alélicas, se encuentran en diferentes sitios
- Las mutaciones no complementan, se encuentran, probablemente, en el mismo sitio o sitios muy cercanos
- (?) Al efectuar la cruce, no se observaron zigotos, sin embargo, se toma como probable que sean alélicas

n.c. Cruza que no se llevó a cabo

Grupo de complementación

----- No se determinó el grupo de complementación

(?) Grupo de complementación dudoso

TABLA 5. Pruebas de complementación para el mercador de auxotrofia:ADENINA

	MC-37: <u>a,ade</u>	MC-48: <u>a,ade</u>	MC-112: <u>a,ade</u>	KA10-6C: <u>a,ade</u> <sub>1a</sub>	KT-4: <u>a,ade</u> <sub>2a</sub>	KT-24: <u>a,ade</u> <sub>4a</sub>	KA5-4C: <u>a,ade</u> <sub>2a</sub>	
MC-28: <u>α,ade</u>	-	+	+	+	+	+	+	<u>ADE-5b</u>
MC-31: <u>α,ade</u>	-	+	+	+	+	+	+	<u>ADE-5c</u>
MC-37: <u>α,ade</u>	-	+	+	+	+	+	+	<u>ADE-5d</u>
MC-64: <u>α,ade</u>	+	+	+	+	+	-	+	<u>ADE-4b</u>
MC-65: <u>α,ade</u>	n.c.	+	+	+	+	+	+	-----
MC-78: <u>α,ade</u>	+	+	+	+	+	-	+	<u>ADE-4c</u>
MC-87: <u>α,ade</u>	+	+	+	+	-	-	+	<u>ADE-2b, ADE-4f</u>
MC-88: <u>α,ade</u>	+	+	+	+	+	-	+	<u>ADE-4d</u>
MC-91: <u>α,ade</u>	+	+	+	+	α (?)	n.c.	n.c.	<u>ADE-2c</u>
MC-94: <u>α,ade</u>	+	+	+	+	+	-	+	<u>ADE-4e</u>
MC-97: <u>α,ade</u>	+	+	+	+	+	+	+	-----
MC-104: <u>α,ade</u>	-	+	+	+	+	+	+	<u>ADE-5e</u>
KA5-11B: <u>α,ade</u> <sub>1a</sub>	+	+	-	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	<u>ADE-1a</u>
KT-11: <u>α,ade</u> <sub>3a</sub>	+	+	+	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	<u>ADE-3a</u>
W600B: <u>α,ade</u> <sub>1a</sub> <u>leu</u> <sub>1a</sub>		+	-	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	<u>ADE-1a</u>
	<u>ADE-5a</u>	<u>ADE-6a</u>	<u>ADE-1b</u>	<u>ADE-1a</u>	<u>ADE-2a</u>	<u>ADE-4a</u>	<u>ADE-2a</u>	

TABLA 6. Pruebas de complementación para el marcador de auxotrofia: ARGININA

	MC-22: <u>a, arg</u>	MC-39: <u>a, arg</u>	MC-41: <u>a, arg</u>	MC-42: <u>a, arg</u>	KT-13: <u>H, arg</u> <sub>1a</sub>	KG83-11D: <u>a, arg</u> <sub>1a</sub>	
MC-4: <u>α, arg</u>	-	+	+	+	+	+	ARG-2b
MC-11: <u>α, arg</u>	+	+	+	+	+	+	ARG-5a
MC-15: <u>α, arg</u>	+	+	+	+	+	+	-----
MC-50: <u>α, arg</u>	+	+	+	+	-	+	ARG-1b
MC-57: <u>α, arg</u>	+	-	+	+	+	+	ARG-3b
MC-62: <u>α, arg</u>	+	+	+	+	-	-	ARG-1c
MC-63: <u>α, arg</u>	+	+	+	+	-	-	ARG-1d
MC-67: <u>α, arg</u>	+	+	+	+	+	+	-----
MC-68: <u>α, arg</u>	+	+	+	+	+	+	-----
MC-74: <u>α, arg</u>	-	+	+	+	+	+	ARG-2c
MC-75: <u>α, arg</u>	+	+	-	+	-	+	ARG-1e
MC-82: <u>α, arg</u>	+	+	+	+	-	-	ARG-1f
MC-101: <u>α, arg</u>	+	+	+	+	-	-(?)	ARG-1g
MC-103: <u>α, arg</u>	+	+	-	+	-(?)	-	ARG-1h
MC-105: <u>α, arg</u>	+	+	-	+	n, c,	-	ARG-1i
	ARG-2a	ARG-3a	ARG-1j (?)	ARG-4a	ARG-1a	ARG-1a	

TABLA 7. Pruebas de complementación para el marcador de auxotrofia: HISTIDINA

	MC-20: <u>a,his</u>	MC-21: <u>a,his</u>	MC-47: <u>a,his</u>	MC-108: <u>a,his</u>	MC-109: <u>a,his</u>	MC-110: <u>a,his</u>	WM-37: <u>a,his</u> <sub>1a</sub>	
MC-33: <u>α,his</u>	+	+	-	-	+	+	+	<u>HIS-3a</u>
MC-52: <u>α,his</u>	+	+	+	+	+	+	+	<u>HIS-4a</u>
MC-54: <u>α,his</u>	+	-	+	+	+	+	+	<u>HIS-2b</u>
MC-55: <u>α,his</u>	+	+	+	+	+	-(?)	+	<u>HIS-1b</u>
MC-72: <u>ω,his</u>	-	+	+	+	n.c.	-	-	<u>HIS-1c</u>
MC-84: <u>α,his</u>	-	+	+	+	-	-	-	<u>HIS-1d</u>
MC-85: <u>ω,his</u>	+	+	+	+	+	-	-(?)	<u>HIS-1c</u>
MC-89: <u>ω,his</u>	-	+	+	+	-	-	-	<u>HIS-1f</u>
MC-96: <u>α,his</u>	-	+	+	+	+	+	-	<u>HIS-1g</u>
K2(2): <u>α,his</u> <sub>1a</sub>	+	+	+	+	-	n.c.	-	<u>HIS-1a</u>
	<u>HIS-1h</u> (?)	<u>HIS-2a</u>	<u>HIS-3b</u>	<u>HIS-3c</u>	<u>HIS-1j</u> (?)	<u>HIS-1j</u> (?)	<u>HIS-1a</u>	

TABLA 8. Pruebas de complementación para el marcador de auxotrofia: ISOLEUCINA

	MC-61: <u>Δ,ile</u>	MC-69: <u>H,ile</u>	MC-92: <u>α,ile</u>	MC-93: <u>α,ile</u>	
MC-118: <u>a,ile</u>	+	+	+	+	
KT-2: <u>a,ile</u> <sub>1a</sub>	+	+	+	+	<u>ILE-1a</u>
MC-69: <u>H,ile</u>	n.c.	n.c.	-	n.c.	<u>ILE-2a</u>
	-----	<u>ILE-2a</u>	<u>ILE-2b</u>	-----	

TABLA 9. Pruebas de complementación para el marcador de auxotrofia: LEUCINA

	MC-40: <u>a, leu</u>	MC-60: <u>a, leu</u>	KC44-13D: <u>a, leu</u> <sub>1a</sub> <u>ade</u> <sub>2a</sub>	KG64-5A: <u>a, leu</u> <sub>2a</sub>	
MC-23: <u>↵, leu</u>	-	-	+	+	<u>LEU-3a</u>
MC-38: <u>↵, leu</u>	+	+	+	+	<u>LEU-4a</u>
MC-71: <u>↵, leu</u>	+	+	+	-	<u>LEU-2b</u>
MC-73: <u>↵, leu</u>	+	+	-	-	<u>LEU-1b, LEU-2c</u>
MC-76: <u>↵, leu</u>	+	-	+	+	<u>LEU-3d</u>
MC-98: <u>↵, leu</u>	-(?)	-	+	+	<u>LEU-3e</u>
KT-7: <u>↵, leu</u> <sub>2a</sub>	+	+	n.c.	n.c.	<u>LEU-2a</u>
KF53-2B: <u>↵, leu</u> <sub>1a</sub>	+	+	n.c.	n.c.	<u>LEU-1a</u>
	<u>LEU-3b</u>	<u>LEU-3c</u>	<u>LEU-1a</u>	<u>LEU-2a</u>	



TABLA 10. Pruebas de complementación para el marcador de auxotrofia: LISINA

	MC-107: <u>a, lis</u>	MC-119: <u>a, lis</u>	MC-120: <u>a, lis</u>	KG51-5A: <u>a, lis</u> <sub>1a</sub>	KF63-7C: <u>a, lis</u> <sub>2a</sub>	KT-20: <u>a, lis</u> <sub>3a</sub>	
MC-1: <u>κ, lis</u>	-	+	-	+	+	+	<u>LIS-1b</u>
MC-27: <u>κ, lis</u>	-	-	-(?)	-	+	+	<u>LIS-1c</u>
MC-56: <u>κ, lis</u>	+	+	+	+	+	+	<u>LIS-4a</u>
MC-58: <u>κ, lis</u>	-	+	-(?)	-	-(?)	+	<u>LIS-1d, LIS-2b</u> (?)
MC-77: <u>κ, lis</u>	+	+	+	+	-(?)	+	<u>LIS-2c</u> (?)
MC-83: <u>κ, lis</u>	+	+	+	+	+	+	-----
MC-100: <u>κ, lis</u>	+	+	+	+	-	+	<u>LIS-2d</u>
MC-117: <u>κ, lis</u>	-(?)	+	-	-	+	+	<u>LIS-1e</u>
	<u>LIS-1f</u>	-----	<u>LIS-1g</u>	<u>LIS-1a</u>	<u>LIS-2a</u>	<u>LIS-3a</u>	

TABLA 11. Pruebas de complementación para el marcador de auxotrofia: METIONINA

	MC-6: <u>κ, met</u>	MC-29: <u>κ, met</u>	MC-34: <u>κ, met</u>	MC-53: <u>κ, met</u>	
KT-3: <u>a, met</u> <sub>3a</sub>	+	+	-	+	<u>MET-3a</u>
KF68-R2: <u>a, met</u> <sub>1a</sub>	-	-	+	-	<u>MET-1a</u>
KF31-18B: <u>a, met</u> <sub>2a</sub>	n.c.	n.c.	+	n.c.	<u>MET-2a</u>
KF31-18D: <u>a, met</u> <sub>2a</sub>	n.c.	n.c.	+	n.c.	<u>MET-2a</u>
	<u>MET-1b</u>	<u>MET-1c</u>	<u>MET-3b</u>	<u>MET-1d</u>	

TABLA 12. Pruebas de complementación para el marcador de auxotrofia: TREONINA

	MC-7: <u>tr</u>eo	MC-25: <u>tr</u>eo	MC-95: <u>tr</u>eo	
KT-26: <u>a, tre</u>o <sub>1a</sub>	+	+	-	TREO-1a
	TREO-2a	-----	TREO-1b	

TABLA 13, Pruebas de complementación para el marcador de auxotrofia: TRIPTOFANO

	MC-35: <u>tr</u>p	MC-59: <u>tr</u>p	MC-66: <u>tr</u>p	MC-70: <u>tr</u>p	MC-102: <u>tr</u>p	MC-1 : <u>tr</u>p	K-7: <u>tr</u>p <sub>1a</sub>	KT-19: <u>tr</u>p <sub>2a</sub>	
MC-19: <u>a, tr</u>p	+	+	-	+	+	+	+	+	TRP-3a
MC-43: <u>a, tr</u>p	+	+	+	+	+	+	-	+	TRP-1b
MC-44: <u>a, tr</u>p	-	+	+	+	-	+	+	+	TRP-1g
MC-45: <u>a, tr</u>p	+	+	+	+	+	+	-	+	TRP-1c
MC-46: <u>a, tr</u>p	+	n.c.	+	+	-	n.c.	+	+	TRP-1b
MC-49: <u>a, tr</u>p	-	n.c.	n.c.	+	-	n.c.	-	+	TRP-1d
MC-106: <u>a, tr</u>p	+	+	+	+	+	+	+	+	-----
MC-111: <u>a, tr</u>p	+	+	+	+	+	n.c.	+	+	-----
	TRP-1e (?)	-----	TRP-3b	-----	TRP-1f (?)	-----	TRP-1a	TRP-2a	

TABLA 14. con varios marcadores de auxotrofia, aisladas por análisis de esporas al azar\*  
y disección de tétradas.

Cepa construida por recombinación y Requerimientos	Cepas progenitoras
MC-120: <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>trp</u> <sub>1h</sub> <u>ile</u> <sub>2b</sub>	MC-7: <u>Δ</u> , <u>treo</u> <sub>2a</sub> ; MC-46: <u>a</u> , <u>trp</u> <sub>1h</sub> ; MC-92: <u>Δ</u> , <u>ile</u> <sub>2b</sub>
MC-121: <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>trp</u> <sub>1h</sub> <u>ile</u> <sub>2b</sub>	" " "
MC-124: <u>ile</u> (lky) <sub>2b</sub> <u>treo</u> <sub>2a</sub>	" " "
MC-126: <u>a</u> , <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>trp</u> <sub>1h</sub>	" " "
MC-127: <u>a</u> , <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>trp</u> <sub>1h</sub>	" " "
MC-131: <u>Δ</u> , <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>trp</u> <sub>1h</sub> <u>ile</u> <sub>2b</sub>	" " "
MC-135: <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>ura</u> <sub>2b</sub>	MC-126: <u>a</u> , <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>trp</u> <sub>1h</sub> ; MC-99: <u>Δ</u> , <u>ura</u> <sub>2b</sub>
MC-136: <u>a</u> , <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>trp</u> <sub>1h</sub> <u>ura</u> <sub>2b</sub>	" "
MC-137: <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>ura</u> <sub>2b</sub>	" "
MC-138: <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>ura</u> <sub>2b</sub>	" "
*MC-141: <u>a</u> , <u>leu</u> <sub>4a</sub> <u>lis</u> <sub>1f</sub>	MC-38: <u>Δ</u> , <u>leu</u> <sub>1a</sub> ; MC-107: <u>a</u> , <u>lis</u> <sub>1f</sub>
MC-154: <u>ade</u> <sub>1b</sub> <u>his</u> <sub>1b</sub>	MC-112: <u>a</u> , <u>ade</u> <sub>1b</sub> ; MC-55: <u>Δ</u> , <u>his</u> <sub>1b</sub>
MC-155: <u>a</u> , <u>ade</u> <sub>1b</sub> <u>his</u> <sub>1b</sub>	" "
MC-158: <u>Δ</u> , <u>ile</u> <sub>2b</sub> <u>trp</u> <sub>1h</sub>	MC-92: <u>Δ</u> , <u>ile</u> <sub>2b</sub> ; MC-46: <u>a</u> , <u>trp</u> <sub>1h</sub>
MC-162: <u>a</u> , <u>treo</u> <sub>2a</sub> <u>ile</u>	MC-118: <u>a</u> , <u>ile</u> ; MC-7: <u>Δ</u> , <u>treo</u> <sub>2a</sub>
MC-163: <u>a</u> , <u>ade</u> <sub>1b</sub> <u>trp</u> <sub>1e</sub>	MC-112: <u>a</u> , <u>ade</u> <sub>1b</sub> ; MC-35: <u>Δ</u> , <u>trp</u> <sub>1e</sub>
*MC-164: <u>ser</u> <sub>1a</sub> <u>asp</u> <sub>1a</sub>	MC-2: <u>Δ</u> , <u>asp</u> <sub>1a</sub> ; MC-86: <u>H</u> , <u>ser</u>
MC-165: <u>trp</u> <sub>1a</sub> <u>asp</u> <sub>1a</sub>	MC-2: <u>Δ</u> , <u>asp</u> <sub>1a</sub> ; MC-106: <u>a</u> , <u>trp</u>

TABLA 14 (Continuación)

Cepa construida por Recombinación y Requerimientos

Cepas progenitoras

- \*MC-166: ser<sub>1a</sub> asp<sub>1a</sub>
- \*MC-167: ura<sub>3a</sub> trp
- MC-168: ade<sub>1b</sub> ura<sub>2b</sub>
- MC-169: ade<sub>1b</sub> ura<sub>2b</sub> trp<sub>1e</sub>
- MC-170: his<sub>1h</sub> trp<sub>1h</sub>
- MC-171: his<sub>1h</sub> treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>
- MC-172: κ, his<sub>1h</sub> treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>
- MC-173: κ, treo<sub>2a</sub> his<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> met<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub>
- MC-174: a, treo<sub>2a</sub> met<sub>1a</sub>
- MC-175: a, trp<sub>1h</sub> his<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> met<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub>
- MC-176: κ, trp<sub>1h</sub> his<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> met<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub>
- MC-177: a, treo<sub>2a</sub> his<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> met<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub>
- MC-178: a, trp<sub>1h</sub> leu<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub> met<sub>1a</sub>
- MC-179: κ, trp<sub>1h</sub> leu<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub> met<sub>1a</sub>
- MC-180: his<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub> met<sub>1a</sub>
- MC-181: κ, his<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub> met<sub>1a</sub>
- MC-182: a, treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub> his<sub>1a</sub> met<sub>1a</sub>
- MC-183: a, treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub> leu<sub>1a</sub> met<sub>1a</sub>
- MC-184: trp<sub>1h</sub> treo<sub>2a</sub> his<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> met<sub>1a</sub>
- MC-185: κ, trp<sub>1h</sub> ade<sub>2a</sub> met<sub>1a</sub>
- MC-186: a, treo<sub>2a</sub> ade<sub>2a</sub>
- MC-187: κ, treo<sub>2a</sub> his<sub>1a</sub>
- MC-188: a, treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub> met<sub>1a</sub>
- MC-189: κ, trp<sub>1h</sub> his<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub>
- MC-190: his<sub>1a</sub> treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>

- MC-23: κ, leu<sub>3a</sub>; MC-107: a, trp
- MC-79: κ, ura<sub>3a</sub>; MC-106: a, trp
- MC-163: a, ade<sub>1b</sub>; MC-99: κ, ura<sub>2b</sub>
- " " "
- MC-20: a, his<sub>1h</sub>; MC-128: κ, treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>
- " " "
- " " "

- MC-127: a, treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>
- KF25Z-10A: κ, his<sub>1a</sub> met<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> ade<sub>2a</sub> <sup>OR</sup>93

TABLA 14. (Continuación)

Cepa construida por Recombinación y Requerimientos

MC-191: a, ura<sub>2a</sub> his<sub>1a</sub> treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>

MC-192: a, ura<sub>2a</sub> treo<sub>2a</sub>

MC-193: α, his<sub>1a</sub> trp<sub>1h</sub>

MC-194: H, his<sub>1a</sub> trp<sub>1h</sub>

MC-195: , his<sub>1a</sub> treo<sub>2a</sub>

MC-196: a, ura<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>

MC-201: H, leu<sub>3b</sub> trp<sub>1b</sub>

MC-203: α, leu<sub>3b</sub> treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>

MC-204: H, leu<sub>3b</sub> treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>

MC-205: a, leu<sub>3b</sub> treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>

MC-206: α, leu<sub>3b</sub> trp<sub>1h</sub>

MC-207: a, leu<sub>3b</sub> trp<sub>1h</sub>

MC-208: α, leu<sub>3b</sub> treo<sub>2a</sub>

MC-209: α, asp<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub>

MC-210: a, asp<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub>

MC-211: a, asp<sub>1a</sub> his<sub>1a</sub>

MC-212: H, asp<sub>1a</sub> his<sub>1a</sub>

MC-213: α, asp<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> his<sub>1a</sub>

MC-214: a, asp<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub> his<sub>1a</sub>

MC-215: H, asp<sub>1a</sub> leu<sub>1a</sub>

MC-216: a, arg<sub>3a</sub> treo<sub>2a</sub>

MC-217: a, ile<sub>2b</sub> arg<sub>3a</sub>

Cepas progenitoras

MC-128: α, treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>

KF82-2C: a, ura<sub>2a</sub> his<sub>1a</sub>

MC-40: a, leu<sub>3b</sub>

MC-128: α, treo<sub>2a</sub> trp<sub>1h</sub>

MC-2: α, asp<sub>1a</sub>

KF76-27A: a, leu<sub>1a</sub> his<sub>1a</sub> <sup>E<sub>31</sub></sup> <sup>C<sup>S</sup></sup>

MC-7: α, treo<sub>2a</sub>; MC-39: a, arg<sub>3a</sub>

MC-92: α, ile<sub>2b</sub>; MC-39: a, arg<sub>3a</sub>

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Alexander, P., J.T. Lett y G. Parkins. 1961. Instability of alkylated deoxyribonucleic acid in relation to the mechanism of chemical mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 48: 423-425.
- (2) Beadle, W.G. 1968. The genes of men and molds. En: *The molecular basis of life*. W.H. Freeman and Co. San Francisco, C.A.
- (3) Cerdá-Olmedo E, y N. Guerola. 1975. Distribution of mutations induced by ethyl methanesulfonate and ultraviolet radiation in *Escherichia coli* chromosome. *Mutat. Res.* 29: 145-147
- (4) Cerdá-Olmedo E. y P.C. Hanawalt. 1967. Macromolecular action of nitrosoguanidine in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 142: 450-464.
- (5) Cerdá-Olmedo E. y R. Ruiz-Vázquez. 1968. Curso sobre Mutagenesis con Nitrosoguanidina. Depto. de Genética, Fac. Ciencias Universidad de Sevilla. España.
- (6) Cox, B.S. y J.M. Parry. 1968. The isolation, genetics and survival characteristics of U.V. light-sensitive mutants in yeast. *Mutat. Res.* 6: 37-55.
- (7) Dawes, I.W. y B.L.A. Carter. 1974. Nitrosoguanidine mutagenesis during nuclear and mitochondrial gene replication. *Nature.* 250: 709-712.
- (8) Drake, J.M. y R.H. Balts. 1976. The biochemistry of mutagenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 45:11-37.
- (9) Evensen, G. y E. Seeberg, 1982. Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA glycosylase. *Nature.* 296: (5859): 773-775.
- (10) Fabre, F. 1972. Relation between repair mechanism and induced recombination after U.V. irradiation in the yeast *S. pombe*. *Molec. Gen. Genet.* 117: 153-166.

- (11) Fincham, J.R.S. 1966. Genetic complementation. Ed. W.A. Benjamin Inc. New York.
- (12) Fincham, J.R.S., P.R. Day y A. Radford. 1979. Fungal genetics. 4<sup>th</sup> ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- (13) Fishbein, L., W.G. Flamm y H.L. Falk. 1970. Chemical mutagens. Environmental effects on biological systems. Academic Press. New York.
- (14) Flanders, H.P. 1981. Induced repair of DNA. Sci. Am. 245: 56-64.
- (15) Gek-Kee, S. y J.E. Haber. 1975. Cell cycle dependent induction of mutations along a yeast chromosome. (DNA replication/ N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine). Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 1179-1183.
- (16) Gichner, T. y J. Velešínský. 1982. Genetic effects of N-methyl N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs. Mutat. Res. 99: 129-242.
- (17) Hanawalt, P.C., P.K. Cooper, A.K. Ganesan y Ch. A. Smith. 1979. DNA repair in bacteria and mammalian cells. Ann. Rev. Biochem. 48: 783-836.
- (18) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 1975. Ed. G. D. Fasman. 3<sup>th</sup> ed. Cleveland. Ohio. CRC.
- (19) Herman, A. y H. Roman. 1966. Allele specific determinants of homothallism in S. lactis. Genetics. 53:
- (20) Hollaender, A. 1971. Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. (v.2) Ed. by Hollaender A., E. Freese, K. Hirschhorn y M. Legator. Plenum Press. New York.
- (21) Johnston y Mortimer, 1969. Yeast genetics. In: The Yeast. v. 1 (Rose, A.H. y Harrison, J.S.? eds.) Acad. Press. New York.

- (22) Kaplan, C.J., S.R. Kushner y L. Grossman. 1969. Enzimatic repair of DNA. 1. Purification of two enzymes involved in the excision of thymine dimers from ultraviolet-irradiated DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 63: 144-151.
- (23) Karran, P., T. Hjelmgren y T. Lindhal. 1982. Induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptive to alkylating agents. Nature. 296(5859):770-773.
- (24) Kornberg, A. 1980. DNA replication. W.H. Freeman and Co. San Francisco. C.A.
- (25) Lawley, P.D. 1974. Some chemical aspects of dose-response relationships in alkylation mutagenesis. Mutat. Res. 23: 283-295.
- (26) Lindegren, G., Y.L. Hwang, Y. Oshima y C.L. Lindegren. 1965. Genetical mutants induced by ethyl methanesulfonate in Saccharomyces. Can. J. Genet. Cytol. 7: 491-499.
- (27) Lindhal T. 1982. DNA repair enzymes. Ann. Rev. Biochim. 51: 61-87.
- (28) Loveless, A. 1969. Possible relevance of O<sup>6</sup> alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamides. Nature. 223: 206-207.
- (29) Masselot, M. y H. de Robichon-Szulmajster. 1975. Methionine biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. 1. Genetical analysis of auxotrophic mutants. Mol. Gen. Genet. 139: 121-132.
- (30) Mc.Calla, D.R. 1968. Reaction of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and N-methyl-p-toluensulfonamide with DNA in vitro. Biochim. Biophys. Acta. 155: 114-120.
- (31) Moore, D. 1969. The mutagenic action of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on Coprinus lagopus. J. Gen. Microbio. 55: 121-125.



- (32) Mortimer, R.K. y D.C. Hawthorne. 1969. Yeast genetics. In: "The yeast" v.1. (Rose, A.H. y Harrison, J.S., eds.) Academic Press, New York, p.386.
- (33) Nagao, M. y T.Sugimura. 1978. Environmental mutagens and carcinogens. Ann. Rev. Genet. 12: 117-159.
- (34) Nasim, A. y B.D. Smith. 1974. Dark repair inhibitors and pathways for repair of radiation damage in S. pombe. Molec. Gen. Genet. 132:13-22.
- (35) Painter, R.B. 1974. DNA damage and repair in eucaryotic cells. Genetics. 78(1):139-148.
- (36) Parry, J.M. 1972. A quantitative analysis of negative liquid holding in some U.V. sensitive mutants of yeast. Molec. Gen. Genet. 118: 33-43.
- (37) Parry, M.E., J.M. Parry y R. Waters. 1972. Genetic and physiological analysis of U.V. sensitive mutants of S. cerevisiae Mutat. Res. 15: 135-146.
- (38) Prakash, L. 1974. Lack of chemically induced mutation in repair deficient mutants of yeast. Genetics. 78: 1101-1118.
- (39) Prakash, L. y D. Higgins. 1982. Role of DNA repair in ethyl methanesulfonate-induced mutagenesis in S. cerevisiae. Carcinogenesis. 3(4):439-444.
- (40) Prakash, L. y F. Sherman. 1973. Mutagenic specificity. Reversion of iso-1-cytochrome c mutants of yeast. J. Mol. Biol. 79: 65-82.
- (41) Rahman, M.A. y J.W. Cowan. 1974. Ultraviolet light sensitive mutants of Coprinus lagopus. Mutat. Res. 23: 29-40.
- (42) Schroeder, A. 1974. Properties of a U.V. sensitive Neurospora strain defective in pyrimidine dimer excision. Mutat. Res. 24: 9-16.

- (43) Sherman, F. 1973. Micromanipulator for yeast genetics studies. *Applied Microbiology*. 26(45): 829.
- (44) Sherman, F., G.R. Sink y C. W. Lawrence. 1974. "Methods in yeast genetics". Manual de Laboratorio del curso del Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor. New York.
- (45) Siddiqi, B.A. 1971. Random-spore analysis in S. cerevisiae. *Hereditas*. 69: 67-76.
- (46) Silva-Aguirre, Y. 1980. Inducción y estudio de mutantes Respiratorio deficientes en la levadura "Petite-negativa" Kluyveromyces lactis Tesis. Fac. Química. U.N.A.M.
- (47) Singer, B. y J.T. Kusmierck. 1982. Chemical mutagenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 655-693.
- (48) Sugimura, T, S. Fugimura y M. Nagao. 1968. Reaction of N-methyl N'-nitro-N-nitrosoguanidine with protein. *Biochim. Biophys. Acta*. 170: 427-429.
- (49) Tingle, M., A. Herman y H.O. Halvorson. 1968. Characterization and mapping of histidine genes in S. lactis. *Genetics*. 58: 361-371.
- (50) Tippins, R.S. y J.M. Parry. 1981. The influence of cell size on U.V. induced cell cycle variation in lethality and mitotic recombination in the yeast S. cerevisiae. *Int. J. Radiat. Biol.* 40(3):327-331.
- (51) Watson, J.D. y F.H.C Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids. A structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. Abril 25.:737.
- (52) Witkin, E.M. 1966. Radiation-induced mutations and their repair. *Science*. 152: 1345-1351.