

Leji 69

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS DE: 2,6-DIAMINOPURINA (DAP),  
N-METIL-N'-NITRO-N-NITROSO Guanidina (MNNG) Y SALES DE MANGANESO  
EN LA INDUCCION DE MUTANTES MITOCONDRIALES RESISTENTES A ANTIMI  
CINA EN LA LEVADURA Kluyveromyces lactis.

# TESIS PROFESIONAL

GUILLERMO A. GONZALEZ FIGUEROA

México, D. F.

1983



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.

## CONTENIDO

	Pag.
I. INTRODUCCION	
Ia. La mitocondria como Organelo Respiratorio	1
Ib. Estructura y Función del ADN Mitocondrial	4
Ic. Síntesis de Proteínas Mitocondriales	7
Id. Mutagénesis y Actividad Mutagénica del MNNG; DAP y Sales de Manganeso	9
Ie. Ciclo de Vida de <u>Kluyveromyces lactis</u> .	14
If. Pruebas Nutricionales	14
Ig. Análisis Genético	16
Ih. Objetivo	18
II. MATERIALES Y METODOS	
IIa. Cepas de la Levadura <u>Kluyveromyces lactis</u> empleadas	19
IIb. Reactivos y Medios de Cultivo	19
IIc. Esterilización	23
IId. Inducción, Aislamiento y Purificación de Mutantes Resistentes a Antimicina	23
IIe. Estudios Fenotípicos Efectuados en las Cepas Mutantes	25
IIIf. Estudios Genéticos Efectuados en las Cepas Mutantes	25
III. RESULTADOS Y DISCUSION	
IIIa. Inducción y Aislamiento de Mutantes Resistentes a Antimicina	32
IIIa.1 Mutagénesis con DAP	32

IIIa.2 Mutagénesis con MNNG.	34
IIIa.3 Mutagénesis con Sales de Manganeso	34
IIIb. Determinación de los Marcadores Nucleares de Auxotrofia	36
Tablas de Resultados de los Estudios Genéticos efectuados en las Mutantes A <sup>R</sup> .	37
REFERENCIAS	50

## I. INTRODUCCION

### Ia. La Mitocondria como Organelo Respiratorio

La mitocondria es un organelo ampliamente estudiado, ya que es el lugar en donde se llevan a cabo los procesos de oxidación de los complejos del -- carbono y la reducción del oxígeno a agua. En este proceso los electrones -- provenientes de diversos sustratos se transportan por una serie de componen -- res que constituyen una cadena, llamada cadena respiratoria, que tiene como fin utilizar la energía libre de las reacciones oxidativas para formar Ade -- nosín Trifosfato (ATP) (Rose y Harri son, 1969). Debido a esto los organis -- mos eucariontes, contienen diferentes cantidades de mitocondrias con base -- en sus requerimientos energéticos.

La mitocondria para llevar a cabo los procesos respiratorios presenta -- una membrana interna en donde se encuentran la mayoría de las proteínas que son codificadas en parte por el ácido desoxirribonucleico mitocondrial -- (ADNmit.), en tanto que las proteínas de la membrana externa y la matriz son codificadas por genes nucleares (Crivell, 1983).

En la membrana interna se encuentran cuatro complejos fisicoquímicos -- que intervienen en los procesos de la cadena respiratoria. En este sistema, el complejo I acepta electrones del NADH, mientras que el complejo II reci -- be electrones del succinato, a su vez tanto el complejo I como el II, van a donar sus electrones a un catalizador no proteico, la coenzima Q (ubiquino -- na), que a su vez se oxida donando los electrones al complejo III, en donde son transportados a través del citocromo b y  $c_1$  hacia el citocromo C, que -- es el sitio de unión con el complejo IV, en donde los electrones del cito -- cromo c son transferidos a los citocromos  $a+a_3$ , y de aquí al oxígeno que se

reduce y forma agua. Como se indica, por cada molécula que presenta una pérdida de electrones (oxidación), existe una ganancia por otra (reducción). Se considera que como producto de las reacciones de oxidoreducción, se va a obtener la energía que utiliza la ATPasa para formar ATP. El complejo ATPasa -- se encuentra formado por tres partes que son: el factor  $F_1$ , una proteína que confiere sensibilidad a oligomicina y un factor  $F_0$ .

Como se muestra en la fig. 1, el paso de electrones en la cadena respiratoria, puede ser inhibido en diferentes sitios, tenemos a la rotenona que -- impide el paso de electrones entre el complejo I y la coenzima Q, la antimicina A que actúa a nivel del citocromo b, la azida, cianuro y el monóxido de carbono que bloquean el paso de electrones del complejo III hacia el oxígeno y la rutamicina y oligomicina que actúan sobre el complejo ATPasa (Gillham, 1978).

En el presente trabajo, se utilizó la antimicina A, por lo que se mencionarán algunos aspectos importantes de ésta.

Durante la selección de mutantes citoplásmicas de Saccharomyces cerevisiae se encontró que algunas mutantes presentaban pérdida en la habilidad para crecer sobre un sustrato no fermentable, siendo esto producto de la falta del citocromo b, sin afectarse su capacidad en la síntesis de proteínas -- (Fincham et al., 1979)

El citocromo b, sobre el que actúa la antimicina, ha sido purificado de la membrana interna mitocondrial; está formado por dos polipéptidos que son codificados por el ADN<sub>mit</sub> (Weiss, 1976).

El mecanismo más aceptado que describe la actividad de la antimicina A, es aquel que dice, que al oxidarse induce una reducción del citocromo b -- sin cambio en su potencial. Recientemente se tienen evidencias de que los

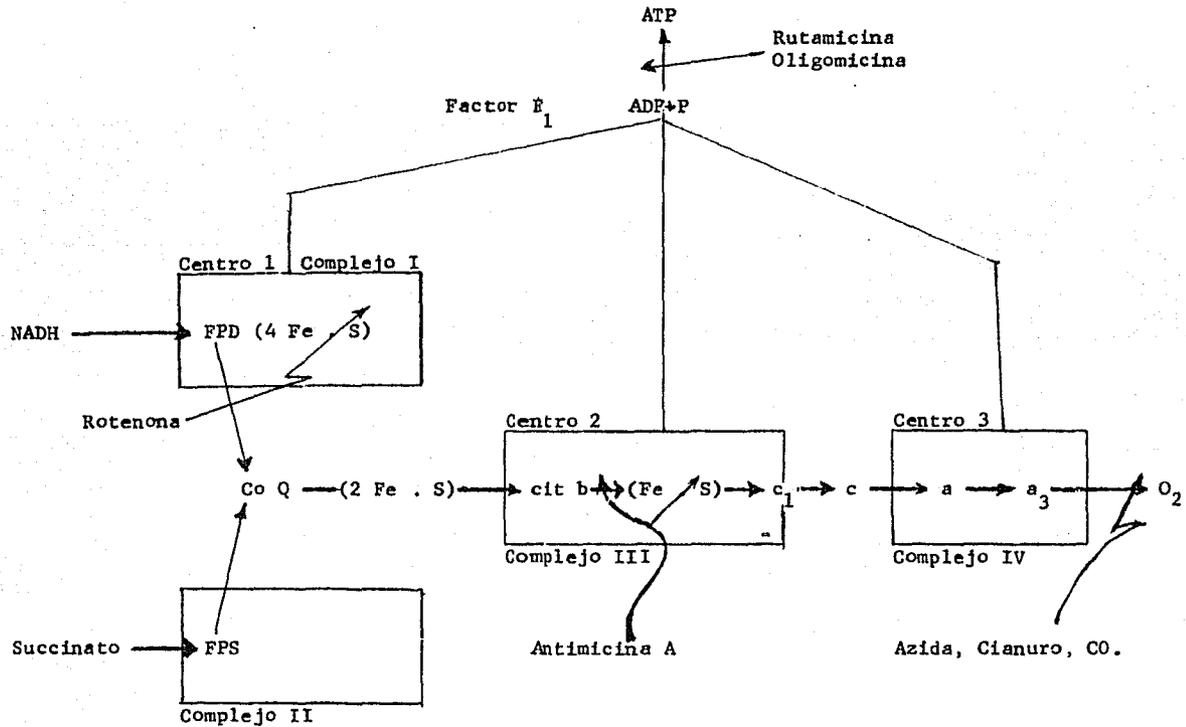


Fig. No 1. Diagrama de la Cadena Respiratoria.

FPD.- Flavoproteina de la Deshidrogenasa del NADH.

FPG.- Flavoproteina de la Deshidrogenasa Succínica.

FeS.- Ferrosulfoproteina.

citocromos b 562 y 566 presentan cambios de potencial, lo cual indica que -  
funcionan como un solo sistema redox ante la acción de la antimicina A - -  
(Rieske, 1976).

En K. lactis, la antimicina inhibe su crecimiento en una gran variedad  
de sustratos no fermentables (glicerol, etanol, etc.), excepto en glucosa -  
en donde a una concentración del 1% se provoca insensibilidad a ésta (Ferre  
ro, et al, 1981).

#### Ib.- Estructura y Función del ADN mitocondrial (ADNmit).

Alrededor de 1960, se planteaba la posibilidad de que la mitocondria -  
tuviera una dotación de ADN, no fue sino hasta 1964, que mediante gradientes  
de densidad en cloruro de cesio, por medio de ultracentrifugación, que se -  
logró separar el ADNmit del ADNn en Neurospora crassa. Entre 1964 y 1965, -  
se aisló el ADN de un vertebrado (células de corazón de embrión de pollo), -  
posterior a esto se ha aislado ADNmit de una amplia variedad de organismos -  
(Crivelli, 1983).

El ADNmit se presenta en tres formas (fig. 2):

- a) Moléculas lineales: Una doble cadena unida por puentes de hidrógeno, se  
observa comunmente en protozoarios.
- b) Moléculas circulares abiertas: Se presenta una sola ruptura en un enlace  
covalente, de una de las cadenas del ADNmit, pero no en la cadena comple  
mentaria. Se observa en la mayoría de los animales y hongos (entre los -  
que está K. lactis)
- c) Moléculas circulares superenrolladas: Estas moléculas no presentan ningún  
rompimiento. Son moléculas que se enrollan sobre sí mismas; esto es, de-

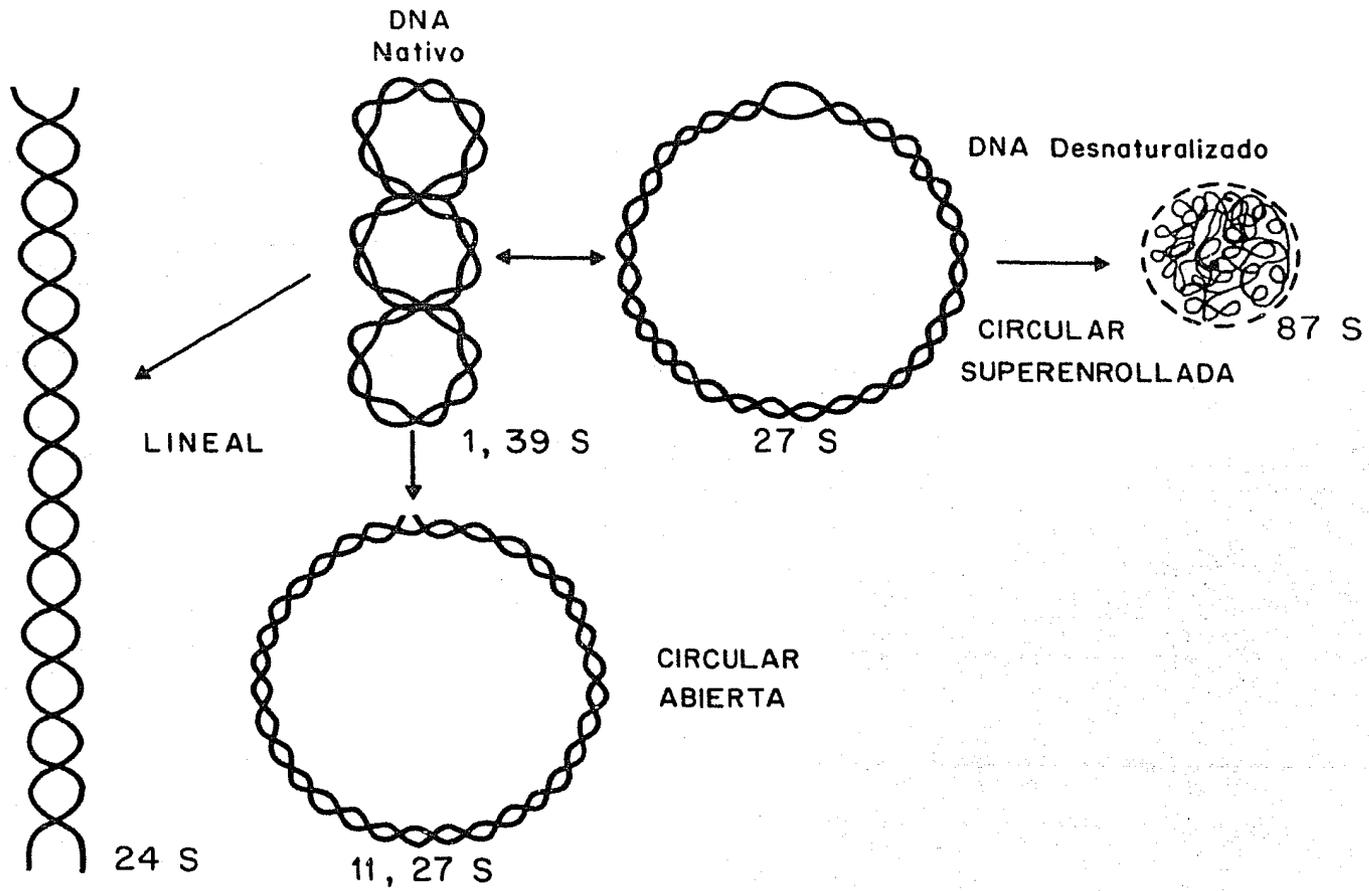


Fig. No. 2.- Formas del DNA mitocondrial(Gillham, 1978).

bido a que se cierra la doble cadena, ya que algunos pares de bases se encuentran unidos a proteínas. Al aislarse el ADNmit, se pierden las proteínas y la cadena se enrolla parcialmente, dando como resultado que sean introducidas vueltas superhelicoidales (Gillham, 1978).

El tamaño del ADNmit en animales, es más o menos constante entre 4.4-6.0  $\mu\text{m}$ ; en protozoarios, es tres veces el tamaño respecto al de los animales (oscila entre 12.8-15.0  $\mu\text{m}$ ); en hongos varía según la especie: en K. lactis es de 11.44  $\mu\text{m}$ , en S. cerevisiae es de 21-25  $\mu\text{m}$  (Sanders et al, 1974).

El ciclo celular, se divide en cuatro fases, éstas son: G<sub>1</sub> (síntesis protéica), S (división del ADN), G<sub>2</sub> (síntesis protéica) y M (mitosis). La síntesis de ADNmit se efectúa de las siguientes maneras:

- a) Periódicas: El valor máximo de síntesis del ADNmit, coincide con la fase G<sub>2</sub> y con algo de síntesis durante la fase S; este patrón de síntesis ha sido reportado en S. cerevisiae y K. lactis (Sanders et al, 1974; y Gillham, 1978).
- b) Simultánea: Tanto la síntesis del ADNmit como del ADNn se presentan al mismo tiempo. Se reportó en Euglena gracilis.
- c) Continua: Ocurre durante todo el ciclo celular. Se ha reportado en Tetrahymena, Physarum, S. cerevisiae, etc. (Gillham, 1978).

En lo que se refiere al ADNmit de K. lactis éste se aisló en 1974 y al estudiarse se determinó que presenta una longitud aproximada de 11.44  $\mu\text{m}$ , con forma circular abierta, no presenta las largas regiones de Adenina-Timina -- que se observan en S. cerevisiae. Mediante su densidad de flotación se ha determinado que su contenido de Guanina-Citosina es del 24% (Sanders, et al, 1974).

## Ic.- Síntesis de Proteínas Mitocondriales.

Aunque las mitocondrias presentan su propio material genético no es autosuficiente para la codificación de todas las proteínas que utiliza para su estructura y funciones, ya que la mayoría de éstas se encuentran codificadas en el genoma nuclear. Se ha encontrado que el ADNmit forma un mRNA que codifica para algunas subunidades de las enzimas del complejo respiratorio como son: tres subunidades de la citocromo oxidasa, dos subunidades de la ATPasa y una subunidad del citocromo b (Crivell, 1983).

La mitocondria presenta todos los componentes para que se lleve a cabo la síntesis de proteínas. La molécula del ADNmit contiene la información -- que se transcribe al mRNA el cual la lleva al rARN en dónde el tARN acarrea y ensambla aminoácidos para formar proteínas específicas. Tanto el mRNA, -- rARN y el tARN son codificados por el genoma mitocondrial, mientras que el genoma nuclear controla la síntesis de la mayoría de las proteínas ribosomales, además, a otras proteínas que se encuentran en la matriz y en la membrana externa de la mitocondria.

En 1950, se obtuvieron mutantes de S. cerevisiae, las que por formar - colonias más pequeñas que las normales se les llamó mutantes "petite colonie". Estas mutantes "petite" aparecían de manera espontánea con una frecuencia - cercana al 1%. En estudios posteriores se encontró que eran respiratorio de - deficientes por lo que no crecían en ausencia de sustratos fermentables, como la glucosa. En estas mutantes al determinarse la presencia de citocromos, se observó la desaparición de los citocromos a, b y de algunas deshidrogenasas.

Cuando se efectuó el análisis genético de las mutantes "petite", se demostró que presentaban herencia nuclear y citoplásmica (Gilham, 1978).

Se observó que las mutantes "petite" se obtenían más fácilmente con una amplia variedad de mutágenos (acriflavina, euflavina, bromuro de etidio, etc.) Con acriflavina y euflavina (que es el componente activo de la acriflavina), se obtuvieron un 100% de mutantes "petite" en S. cerevisiae. La mutación "petite" es una mutación pleiotrópica que provoca la desaparición de los citocromos a, b y c<sub>1</sub>, de algunas deshidrogenasas y otras proteínas de la membrana interna, de la mitocondria, de ahí que no resulten de gran utilidad en estudios genéticos en que es deseable provocar mutaciones puntuales y observar qué proteínas son codificadas por el ADNmit y hasta que punto representa este organelo una entidad independiente del núcleo (Brunner, 1974).

El descubrimiento de que antibióticos como el cloranfenicol y la eritromicina inhiben el crecimiento de S. cerevisiae en medio con sustratos no fermentables (glicerol, etanol, lactato, etc.), mas no en presencia de sustratos fermentables (glucosa), trajo consigo que se demostrara que ésto era producto de la inhibición de la síntesis de proteínas mitocondriales y cuando se analizaron los espectros de los citocromos, se observó que los citocromos a+a<sub>3</sub> y b se encontraban muy reducidos (Gillham, 1978).

Wilkie et al, (1967), reportaron el aislamiento de mutantes de S. cerevisiae capaces de crecer en presencia de eritromicina o tetraciclina, en medio que contenga glicerol como fuente de carbono. Se observó que algunas de estas mutantes presentaban patrones de herencia no-Mendeliana y se demostró que era una mutación a nivel mitocondrial. En 1970 se publicó un artículo en el que se proponía una hipótesis para explicar el diferente comportamiento de las mutantes resistentes a cloranfenicol, mikamicina o eritromicina. Se propuso que la alteración en la síntesis de proteínas que promueve la

resistencia a los antibióticos, puede ser producto de una alteración directa en las proteínas de los ribosomas mitocondriales o de una alteración indirecta en la permeabilidad de las membranas mitocondriales a los antibióticos (Gillham, 1970).

#### Id. Mutagénesis y Actividad Mutagénica del MNNG, DAP y Sales de Manganeseo.

La mutagénesis es un evento biológico ineludible y no necesariamente un daño. En el contexto de la evolución según Darwin, la supervivencia del más adaptado, implica que la mutación puede conferir tanto ventajas como desventajas genéticas. Sin embargo, por lo general, las mutaciones se observan como errores. La suposición que propone que las mutaciones son producto de -- compuestos químicos y radiaciones del medio ambiente, es parcialmente cierta, ya que la inestabilidad intrínseca de los ácidos nucleicos por sí misma puede ser responsable de un alto nivel de mutaciones.

La mutación, es un cambio en el material genético, que puede ser letal o no para la célula u organismo en donde ocurre. La eficiencia mutagénica -- es producto del valor de las mutantes obtenidas entre los eventos letales. Los valores de la eficiencia mutagénica dependen de qué tan activo es el -- compuesto que se utilice, así como del sistema biológico de que se trate. -- Para obtener una mejor consideración de la actividad mutagénica de un compuesto, éste se prueba in vivo e in vitro, con lo que se puede determinar su toxicidad y la reparación celular. Sin embargo, tanto en bacterias, hongos o células de mamíferos, la mutagénesis involucra la activación o inactivación metabólica de varios sistemas de reparación, del estado de la célula y en general de los efectos del mutágeno sobre la fisiología celular (Singer y Kosmirek, 1982).

Los principales mecanismos propuestos para explicar como se producen - las mutaciones, señalan que son producto de errores en la replicación o producto de errores en la posición de las bases durante la reparación del ADN - (Gichner y Valeminsky, 1982). Se ha determinado que las mutantes espontáneas de S. cerevisiae son producto de la reparación defectuosa de lesiones espontáneas (Siew-Keen Q. et al, 1980).

Se ha ensayado la actividad mutagénica de una amplia variedad de agentes. En el presente trabajo se probó y comparó la efectividad de las siguientes sustancias consideradas como mutágenos: N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), 2,6-Diaminopurina (DAP), y Sales de Manganeso ( $MnCl_2$  y  $MnSO_4$ ) con la finalidad de determinar la capacidad mutagénica de cada una en la inducción de mutantes extracromosómicas en K. lactis.

#### M-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG):

La MNNG se sintetizó en 1947, por nitración de la N-metil-N-nitroguanidina en medio ácido en frío; es inestable en agua, estable en solución amortiguadora a pH de 5-5.5. Su estabilidad depende de la temperatura y del potencial iónico del tipo de sal que se utilice.

La MNNG puede actuar sobre las proteínas y las bases nitrogenadas del ADN de dos formas diferentes: el grupo metilo derivado de su descomposición puede alquilarlas o bien, por la guanidina pueden ser nitroaminadas. Esto se comprobó marcando con  $^{14}C$  el grupo metilo y la guanidina ubicando su acción sobre varias proteínas. Se ha observado, que mientras el grupo metilo reacciona tanto con proteínas como con ácidos nucleicos, el grupo guanidina actúa fundamentalmente sobre proteínas. Tanto la alquilación como la nitroaminación pueden producir cambios en la estructura de los cromosomas. La -- afinidad del MNNG hacia las proteínas, en particular el grupo nitroguanidina,

puede ser la causa de que inhiba enzimas importantes. Por otra parte se considera que el MNNG al igual que otros agentes metilantes, actúa sobre la posición N7 de la guanina, siendo probablemente el principal centro nucleofílico sobre el que actúa en el ARN y ADN. La metil guanidina ( $O^6$ -MeG) es el sitio de lesión más probable en el ADN para la inducción de mutación de un gen (Gichner y Valemisky, 1982).

El MNNG es extremadamente tóxico para algunas células, tal vez, se debe esto a que como agente metilante es cerca de veinte veces más reactivo que los agentes etilantes (Singer y Kosmierek, 1982).

En 1967 se encontró que al tratar S. cerevisiae con MNNG durante el crecimiento celular se indujeron un 50% de mutantes "petite" entre las sobrevivientes. Tanto el tratamiento con MNNG y UV (Ultravioleta) da como resultado un alto índice de "petite", tanto en células cultivadas en medio fermentable (glucosa) o no fermentable (glicerol, etanol, lactato, etc.). En K. lactis, también fueron inducidas mutantes "petite" que fueron clasificadas como "petite" vegetativas. Sin embargo, la mayoría de las mutantes que se obtuvieron mostraron herencia nuclear. En S. cerevisiae, se ha observado que se inducen mutaciones en un locus nuclear específico, que es el que confiere resistencia dominante a eritromicina, durante la fase S de la división celular. Se ha sugerido que si la MNNG altera la actividad de las proteínas, ésta opera sobre un mecanismo de represión que regula la integridad de la mitocondria siendo esta la causa de la inducción de "petite", que son debidas a una alteración de este represor (Gichner, 1982).

Dawes et al., (1974) obtuvieron mutantes eritromicina y oligomicina-resistentes de S. cerevisiae inducidas por MNNG que presentaron tanto herencia citoplásmica como nuclear. Encontraron que la frecuencia de mutantes, es una función de la edad celular, ya que se presentan dos puntos de susceptibilidad

a la acción del MNNG, en dos de las etapas del ciclo celular; la de replicación del ADNn y la del ADNmit, en la primera se obtuvieron mutantes nucleares, en la segunda las mutantes obtenidas presentaron patrones de herencia mitocondrial.

Calderón y Cerdá Olmedo (1983) emplearon MNNG para inducir mutantes de S. cerevisiae, nucleares y "petite" resistentes a L-canavanina, éstas últimas presentaron herencia claramente citoplásmica. Además fueron aisladas mutantes auxotróficas termosensibles de S. cerevisiae y Escherichia coli:

#### 2-6 Diaminopurina (DAP).

El DAP ha sido utilizado en una amplia variedad de estudios genéticos, en donde se le considera:

- a) Un inhibidor por analogía, de la replicación del ARN y ADN en virus de células de fibroblastos L, esto sugiere que interviene en el metabolismo de ambos ácidos nucleicos.
- b) Con DAP marcado con  $^{14}\text{C}$ , en levaduras encontraron que se presentaba en lugar de la Adenina y la Guanina en los ácidos nucleicos; en E. coli - se ha observado que se convierte principalmente en Guanina.
- c) Presenta una actividad doble en el metabolismo celular, por un lado puede actuar como inhibidor y por otro se puede transformar en un precursor de las purinas de los ácidos nucleicos.
- d) Actúa como inhibidor por analogía de la adenina presente en los cofactores tales como: Adenosin-Trifosfato (ATP), Nicotinamida-adenin, dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) y Flavin-adenin-dinucleótido (FAD). En la formación de nucleótidos compite con la Adenina.
- e) Wallis y Wilkie (1979), encontraron que inducía mutantes extracromosómicas en S. cerevisiae resistentes a oligomicina y cloranfenicol mas no

a eritromicina, en medio no fermentable (glicerol). El análisis genético, sólo se efectuó en diploides, presentando evidencia de herencia citoplásmica. Debido a la poca viabilidad de las esporas no se determinó la segregación no-Mendeliana de los productos de la meiosis. A concentraciones muy altas (letales) de DAP se obtuvieron mutantes "petite".

#### Sales de Manganeso ( $MnCl_2$ , $MnSO_4$ )

Se considera como mutágeno con ligera actividad sobre genes nucleares- (Putrament et al, 1973) y como un eficiente inductor de mutantes mitocondriales resistentes a antibióticos.

El Manganeso es un catión divalente, que actúa sobre la ADN polimerasa mitocondrial disminuyendo su actividad. Ya que la ADN polimerasa presenta un papel activo en la selección de nucleótidos, una alteración debido a  $Mn^{+2}$  trae como consecuencia que se induzcan mutaciones puntuales en el ADNmit. Por lo menos dos polimerasas insertan de manera incorrecta bases, al aumentar la cantidad de  $Mn^{+2}$ . El Manganeso sólo induce mutaciones de resistencia a antibióticos cuando se encuentra en concentraciones muy altas, sin embargo, esto también puede afectar muchos procesos celulares y la mutagenicidad se provoca de manera indirecta (Putrament et al, 1975).

Por acción de sales de manganeso ( $MnCl_2$ ,  $MnSO_4$ ), se obtuvieron mutantes resistentes a cloranfenicol, eritromicina y oligomicina que presentaban herencia citoplásmica (Putrament et al, 1975).

Se ha observado que el magnesio y la hidroxurea provocan que se disminuya la actividad mutagénica del Manganeso (Putrament et al, 1975)

En 1979 Brunner, utilizando como mutágenos  $MnCl_2$  y  $MnSO_4$  encontró que éstos provocaban un aumento considerable del número de mutantes de K. lactis resistentes a antimicina, siendo más efectivo el  $MnSO_4$  en la inducción de éstas.

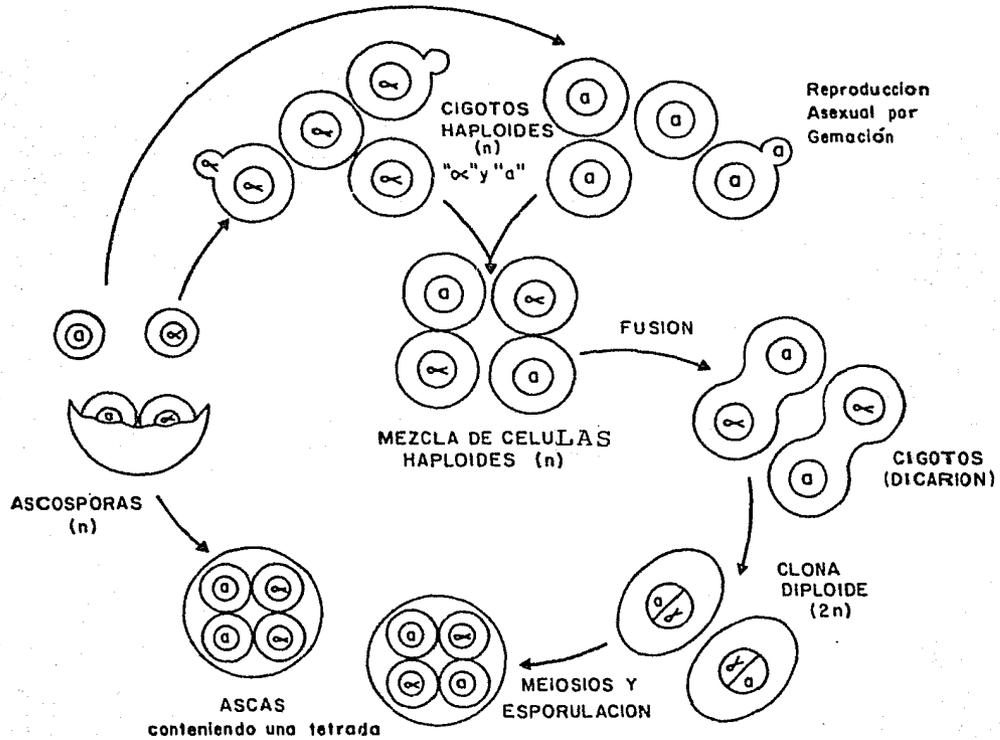
#### Ie. Ciclo de vida de Kluyveromyces lactis

Para efectuar estudios genéticos en levadura es necesario conocer las diferentes etapas del ciclo vital (fig. 3).

Tanto K. lactis como S. cerevisiae presentan un ciclo vital similar; cuando las células se encuentran en un estadio haploide pueden conjugarse con base en su factor de compatibilidad (factor sexual) "a" o "α" y formar un cigoto, que dará lugar a un clona diploide, que en K. lactis a diferencia de S. cerevisiae, es inestable. De cada uno de estos diploides emerge una tetrada de ascosporas haploides (Fincham et al., 1979).

#### If. Pruebas Nutricionales.

Al igual que S. cerevisiae, K. lactis, es un organismo aeróbico facultativo, por lo tanto puede crecer en ausencia de oxígeno, siempre y cuando se le proporcionen sustratos fermentables. La utilización de sustratos como glicerol, lactata, etanol y acetato quiere por el contrario la presencia de oxígeno y de una mitocondria funcional, de tal manera que cualquier alteración o modificación que se produzca en el funcionamiento adecuado de este organelo, traerá como consecuencia una falta de crecimiento en medios de cultivo - que contengan alguno de estos sustratos como fuente de energía. El organismo por ser aeróbico facultativo, podrá seguir obteniendo toda su energía a partir de glucólisis anaeróbica y crecerá por lo tanto en glucosa o lactosa como fuente de carbono. Esta propiedad de la levadura permite detectar alteraciones mitocondriales o la interferencia de cualquier sustancia con la función de la mitocondria, de tal manera que la ausencia de crecimiento en presencia de una droga de sustratos no fermentables es un fuerte indicio de que



Ciclo de vida de  
Kluyveromyces lactis

Fig. No. 3.

dicha droga interfiere con las funciones de este organelo (Brunner, 1974).

Para que se puedan llevar a cabo estudios genéticos de herencia citoplásmica, es necesario, tener mutantes que presenten alteraciones en el genoma nuclear, para tener un patrón de referencia claramente Mendeliano, para lo cual se utilizan mutantes auxotróficas.

Las mutantes auxotróficas, son aquellas que presentan deficiencia en la síntesis de una o más sustancias (aminoácidos, vitaminas, o bases que usualmente son producto de sus patrones biosintéticos, por lo que el o los nutriente(s) que se requieren deben de encontrarse presentes en el medio de cultivo, para que éstas puedan crecer (Fincham et al, 1979).

#### Ig. Análisis Genético

Los criterios más utilizados para establecer si una mutación es de naturaleza extracromosómica, son:

- a) Segregación de la mutación durante la mitosis: En este caso se observa cuál es el patrón de herencia que presentan las clonas diploides al probarse en medios con drogas.
- b) Segregación no-Mendeliana de los productos de la meiosis: Se basa en el análisis genético de tetradas individuales producto de la meiosis.
- c) Desaparición de los factores de resistencia concomitantemente con el ADN extracromosómico: Consiste en un tratamiento prolongado con algunas sustancias (bromuro de etidio, acriflavina, etc.) que provocan la desaparición de ADNmit y los factores de resistencia ligados a éste, lo cual sirve para determinar la naturaleza mitocondrial de una mutación citoplásmica. El tratamiento con bromuro de etidio se puede aplicar a S. cerevisiae más no a K. lactis, en donde se forman microcolonias no viables.

d) Diferencias en los productos obtenidos al hacer cruzas recíprocas: Se - cruzan dos cepas con factores de compatibilidad diferentes recíprocamente por ejemplo: a, A<sup>S</sup>, Lis<sup>1</sup>/α , A<sup>R</sup>, Ade<sup>1</sup>. Los productos de ésta, se vuelven a cruzar en sentido inverso: a, A<sup>R</sup>, Lis<sup>1</sup>/α , A<sup>S</sup>, Ade<sup>1</sup>. Se cuantifican las proporciones obtenidas en la primera y se comparan. En el caso de ser diferentes es una evidencia más para determinar si se presenta herencia citoplásmica (Brunner, 1978).

## I.h Objetivo

El presente proyecto se realizó con base en los trabajos efectuados en S. cerevisiae con mutágenos, tales como el DAP, que se ha reportado como inductor de mutantes citoplásmicas resistentes a oligomicina y cloranfenicol - (no a eritromicina) (Wallis y Wilkie, 1979); el MNNG que se considera que induce mutaciones preferentemente nucleares (Gichner y Valeminsky, 1982) y las sales de manganeso:  $MnCl_2$ ,  $MnSO_4$  que se consideran como inductores de mutantes preferentemente mitocondriales (Putrament et al., 1973, 1975).

La finalidad del presente trabajo fue el comprobar la eficacia del DAP como inductor preferente de mutantes extracromosómicas en S. cerevisiae extrapolando esta propiedad a la levadura K. lactis. Esto se realizó de manera comparativa con la actividad mutagénica de MNNG (mutágeno principalmente nuclear) y de las sales de manganeso:  $MnCl_2$  y  $MnSO_4$  (mutágenos mitocondriales).

Tomando las consideraciones anteriores se procedió a la inducción, aislamiento y purificación de mutantes resistentes a antimicina y a su caracterización genética mediante el análisis de la segregación de la mutación durante la mitosis y de la segregación no-Mendeliana de los productos de la meiosis.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 11a. Cepas de la Levadura Kluyveromyces lactis Utilizadas:

KA5-6C:  $\alpha$ ,ura,met<sub>1</sub>,C<sup>S</sup>O<sup>S</sup>(ura7)

KF65-R6: a,ade<sub>2</sub>,his,leu.

### I1b. Reactivos y Medios de Cultivo:

#### I1b.1 Soluciones Amortiguadoras:

##### a) Amortiguador de Fosfatos 50mM, pH 7.0

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.62 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.00 g

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

##### b) Amortiguador de Citrato 0.1 M, pH 7.7'

Acido Cítrico 21.0 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15.8 g

Aforado a 1000 ml con agua destilada

'Para ajustar a pH 7.7 se utiliza una solución de NaOH 10 M.

#### 11b.2 Medios de cultivo

##### a) Medio Mínimo con Glucosa (MD)

Base nitrogenada de levadura

libre de aminoácidos (Difco) 0.67% (p/v)

Dextrosa 2.0 % (p/v)

Agua destilada

##### b) Medio Mínimo con Glicerol (MG)

Base nitrogenada de levadura

libre de aminoácidos (Difco) 0.67% (p/v)

Glicerol 3.0 % (v/v)

Agua destilada

c) Medio sintético de Glucosa y Aminoácidos (SD+aa)

Base nitrogenada de levadura

libre de aminoácidos (Difco) 0.67% (p/v)

Dextrosa 2.0 % (p/v)

- Concentración final de aminoácidos

y bases:	Solución "stock"	ml de sol. "stock" para 100 ml.
Sulfato de Adenina	1.2 mg/ml	1.66
L-uracilo	2.4 mg/ml	0.83
L-metionina	2.4 mg/ml	0.83
L-histidina	2.4 mg/ml	0.83
L-leucina	3.6 mg/ml	0.83
L-arginina	2.4 mg/ml	0.83
L-lisina.HCl	3.6 mg/ml	0.83
L-triptofano	2.4 mg/ml	0.83
Agua destilada		

d) Medio Sintético de Glicerol y Aminoácidos (MG+aa)

Base nitrogenada de levadura

libre de aminoácidos (Difco) 0.67% (p/v)

Glicerol 3.0 % (v/v)

Agua destilada

' Los aminoácidos (soluciones "stock") pueden ser adicionados o no según sean las necesidades, debido a esto pueden prepararse medios con uno o varios aminoácidos o medios completos con falta de un aminoácido.

f) Mezcla sin Fuente de Carbono para Medios Completos (YPA)

Extracto de Levadura	1.0% (p/v)
Peptona de gelatina	2.0% (p/v)
Sulfato de adenina	80 µg/ml
Agua destilada	

g) Medio Completo con Glucosa (YPAD):

Dextrosa	2.0% (p/v)
Mezcla de YPA	

h) Medio Completo con Glucosa sin Adenina (YPD)

Dextrosa	2.0%
Extracto de levadura	1.0%
Peptona de gelatina	2.0%
Agua destilada	

i) Medio Completo con Glucosa y Amortiguador (YPADA)

Mezcla de YPA utilizando amortiguador de fosfatos 50mM, pH 7.0 en lugar de agua.

j) Medio Completo con Glicerol (YPAG)

Glicerol	3.0% (v/v)
Mezcla de YPA	

k) Medio Completo de Glicerol con Antimicina (YPAG-ANT)

Antimicina A'	5µg/mg o 1µg/ml.
Mezcla de YPAG.	

' Se preparó una solución de 1 mg/ml de antimicina, en 10 ml de etanol absoluto estéril (el etanol se esterilizó por filtración); en 600 ml de cultivo estéril en caliente (60-70°C) se agregaron 3 ml y 0.6 ml de la solución, para obtener concentraciones de 5 µg/ml y 1 µg/ml respectivamente.

l) Medio de Extracto de Malta (ME)

Extracto de Malta 5.0% (p/v)

Agua destilada

m) Medio de Disección

Ion-agar 1.8% (p/v)

Agua destilada

n) Solución de  $\beta$ glucuronidasa

$\beta$ glucuronidasa 3.0 mg/ml

Nota: En la preparación de placas o cultivos sólidos se adiciona el agar en proporción de 1.5 a 2.5%, excepto en el medio de extracto de malta, donde se utiliza agar al 3%.

## II.c Esterilización:

El material y reactivos empleados se esterilizaron en un autoclave durante 20 min. a 120°C y 20 lb de presión.

## II.d Inducción, Aislamiento y Purificación de Mutantes Resistentes a Antimicina.

Los agentes mutagénicos que se utilizaron para la inducción de mutantes antimicina-resistentes ( $A^R$ ) fueron los siguientes:

MNNG, DAP y Sales de Manganeso ( $MnCl_2$ ,  $MnSO_4$ ).

### Mutagénesis con MNNG:

La técnica que se utilizó con este mutágeno, se describe a continuación:

La cepa KA5-6C ( $10^6$  cel/ml, de 24 hrs. de crecimiento en YPAD), fue mutagenizada en matraces Erlenmeyer de 50 ml., que contenían 20 ml. de una solución de 40 $\mu$ g/ml de MNNG (previamente disuelto en amortiguador de citrato-fosfatos pH 7.7) con agitación a 30°C, durante 25 min. (tiempo en el que se obtuvo el 10% de supervivencia), al término de éste se sembraron 0.2 ml. distribuyéndose uniformemente, en placas de YPAG, las cuales contenían 5 $\mu$ g/ml. de antimicina. Se incubaron las placas durante varios días (15-20 días) a 30°C, aislándose las colonias de posibles mutantes, para ser purificadas y probadas.

### Mutagénesis con DAP:

Para la mutagénesis de la cepa KA5-6C, se inocularon  $10^6$  cel/ml. (de 24 hrs. de crecimiento en YPAD), en matraces Erlenmeyer de 50 ml., que contenían soluciones de 800 $\mu$ g/ml. ó 1 mg/ml de DAP en 20 ml. de MG (Uracilo y Metionina). Se incubó con agitación a 30°C durante 24 horas, se tomaron

alícuotas de 0.2 ml., vertiéndose uniformemente en placas de YPAG-antimicina, dejándose en incubación por varios días (15-20 días). Las posibles colonias mutantes se aislaron para ser purificadas y probadas.

#### Mutagénesis con $MnCl_2$ ó $MnSO_4$ :

En la mutagénesis de la cepa KA5-6C se inocularon  $10^6$  cel./ml. (24 hrs. de crecimiento en YPAD), en matraces Erlenmeyer de 50 ml. conteniendo 10 ml. de YPD preparada en amortiguador de fosfato pH 7 con concentraciones de 20, 30, 40 y 50 mM de  $MnCl_2$  ó  $MnSO_4$ . se incubaron con agitación a 30°C durante 24 hrs. Se recolectaron las células por centrifugación ( $\pm$  3500 rpm, durante 10 minutos) y se lavaron dos veces con agua destilada estéril, se colocaron alícuotas de 0.2 ml. de las células lavadas y se distribuyeron uniformemente en placas YPAG con 5µg de antimicina, se dejaron en incubación por varios días (15-20 días). Las posibles colonias mutantes se aislaron, para ser purificadas y probadas.

#### Aislamiento y Purificación de Mutantes Resistentes a Antimicina:

Por lo general, la antimicina actúa bloqueando el paso de electrones en la cadena respiratoria a nivel del citocromo b; esto trae como consecuencia que a concentraciones bajas, se inhiba el crecimiento de S. cerevisiae (0.001 µg/ml) y K. lactis (0.1 µg/ml.). Se puede considerar, que cualquier célula que sobreviva en concentraciones inhibitorias de medio con antimicina y forme una clona, presenta una mutación que confiere resistencia a antimicina.

Para aislar las mutantes  $A^R$ , se tomaron las clonas que crecieron en medio de YPAG-antimicina (5µg/ml), se sembraron en medio de YPAD incubándose a 30°C durante 24 horas, se purificaron por aislamiento de clonas individuales por estrías, se escogieron 3 ó 4 clonas.

## Ile. Estudios Fenotípicos Efectuados en las Cepas Mutantes:

La determinación de la presencia de los marcadores de auxotrofia es necesaria, ya que esto permite eliminar la posibilidad de que se trabaje con una cepa diferente a la deseada (por ejemplo una contaminación con otra levadura) siendo también necesario determinar la presencia y estabilidad del factor - que confiere resistencia a antibióticos. Con el fin de realizar estas pruebas se suspendieron las probales clonas A<sup>R</sup> (10<sup>8</sup> cel/ml. en agua destilada - estéril). Una gota de cada suspensión se colocó en placas con medios de YPAD, YPAG, YPAG-antimicina, MD y en cinco medios sintéticos producto de la adición de cuatro combinaciones distintas de aminoácidos a medio mínimo (SD+aa). Se incubaron durante 48 horas; en medio de YPAD se desarrollaron todas las cepas viables, en YPAG se eliminó la posibilidad de que la cepa sea respiratorio-deficiente ya que éstas no crecerían en YPAG + antimicina, en YPAG + antimicina solo crecieron las que presentan resistencia al antibiótico, en MD sólo crecen las cepas sin marcadores de auxotrofia y en los medios sintéticos con aminoácidos (SD+aa) se pudo determinar el carácter de auxotrofia.

## IIf. Estudios Genéticos Efectuados en las Cepas Mutantes.

La levadura K. lactis, es un organismo unicelular con un ciclo vital breve que presenta estadios haploides y diploides de un ciclo sexual que comprende un estadio de conjugación en el que dos células de sexo opuesto a y  $\alpha$ , se fusionan para dar un cigoto que a su vez origina cuatro ascosporas (tetrada), que se pueden aislar fácilmente permitiendo el estudio de los caracteres hereditarios por análisis de tetradas (Rose y Harrison, 1969). - Mediante la cruce de dos cepas que difieren en uno o más genes, puede deter-

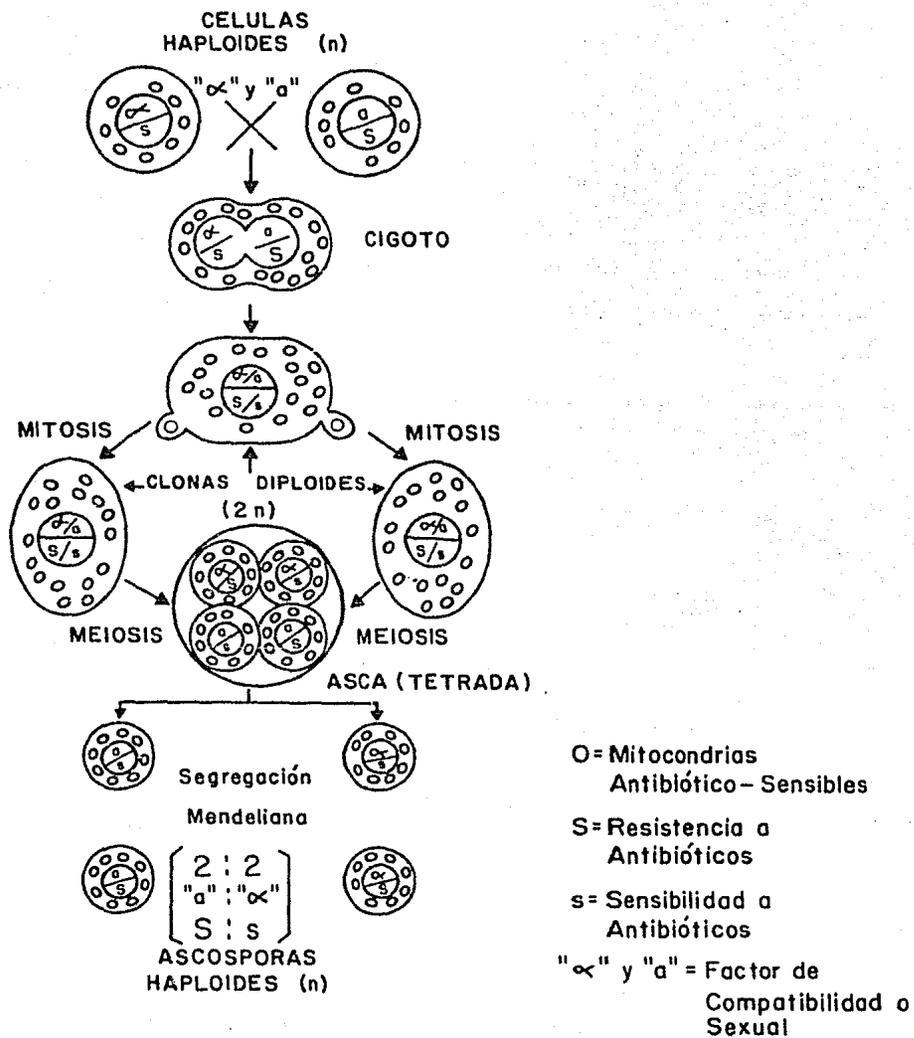
minarse como se comporta la herencia, tanto en clonas diploidas como en las ascosporas haploides mediante el análisis de tetradas, las pruebas anteriores permiten verificar si se presenta: segregación Mendeliana (2:2), citoplásmica (4:0 ó 0:4) o conversión génica (3:1 ó 1:3) (Mortimer y Hawthorne, 1969 y Fincham et al., 1979) (fig. 4 y 5).

#### Aislamiento de Clonas Cigóticas.

Se crecieron en medio de YPAD a 30°C durante 24 horas., una cepa mutante A<sup>R</sup> y una cepa A<sup>S</sup>, de sexo contrario con marcadores de auxotrofia complementarios (KF65-R6, ura, met<sub>1</sub>, A<sup>R</sup> y la KA5-6C, ade<sub>2</sub>, his, leu A<sup>S</sup>), se diluyeron individualmente en agua destilada estéril para obtener aproximadamente 10<sup>8</sup> cel/ml., una gota de cada suspensión se mezcló en medio de EM (con objeto de promover la formación de cigotos). En un lapso de 12-24 horas, se efectuaron observaciones en el microscopio con el fin de detectar la presencia de cigotos (en la cruce que se efectuó en este trabajo se observaron usualmente a las 18 hrs), se replicaron en medio de MD en donde por complementación únicamente crecieron clonas cigóticas diploides capaces de sintetizar todos los aminoácidos con una fuente de nitrógeno; se tomaron de 4-5 clonas cigóticas o bien clonas cigóticas individuales, se efectuaron diluciones en agua destilada estéril, sembrándose de 100-200 células en medio mínimo (MD), se incubaron a 30°C durante aproximadamente 72 hrs. (o cuando presentan un tamaño de 1-2 mm), se replicaron las clonas diploides de MD en medios de YPAD, YPAG e YPAG-antimicina (1 y 5 µg), se incubaron a 30°C registrándose el número de colonias (24, 48 y 72 horas).

#### Análisis de Tetradas (Ascas):

Las clonas diploides obtenidas se colocaron en medio de EM, con el propósito de inducir la formación de tetradas, incubándose a 30°C durante 24-48 hrs., se efectuaron observaciones periódicas al microscopio con el -



4.- Esquema Teórico de la Segregación Nuclear del Caracter: "Resistencia a Antibióticos".

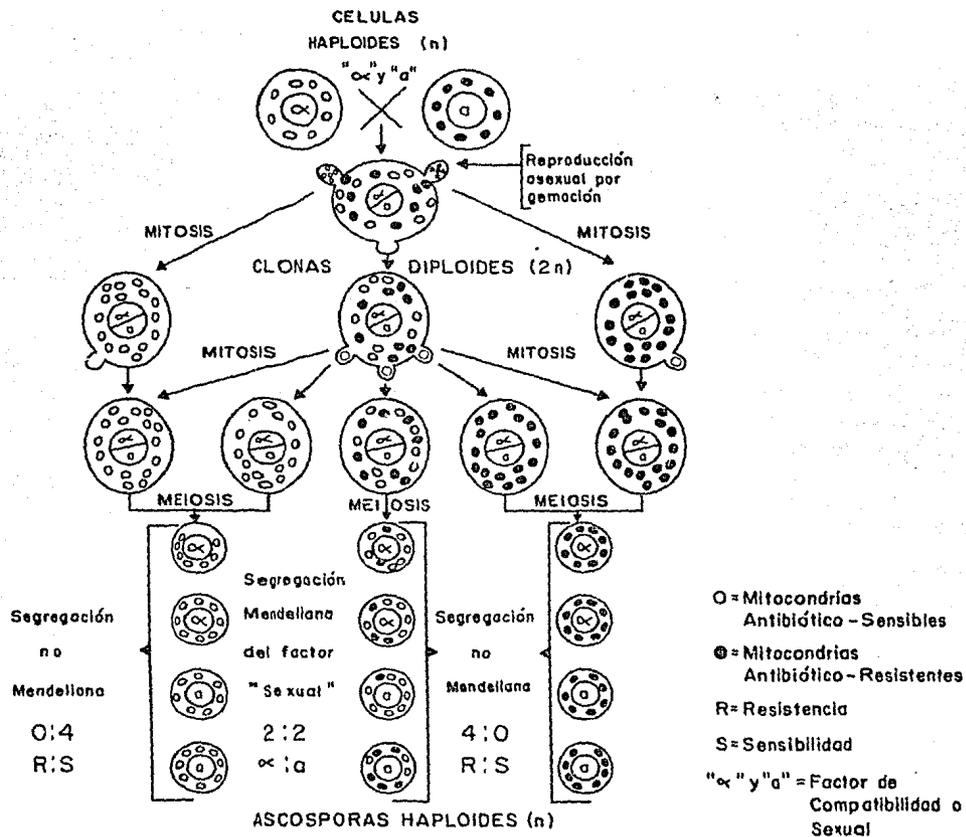


Fig. No. 5 .- Esquema Teórico de la Segregación Mitocondrial del Caracter: "Resistencia a Antibióticos".

fin de detectar la formación de tetradas.

Para elaborar el medio de disección, se esterilizó una solución al 1.8% de ionagar que se adicionó en cajas petri de vidrio en cantidades entre 14-15 ml. (éstas previamente esterilizadas), se dejaron solidificar a temperatura ambiente durante el tiempo necesario para que se adquiriera una consistencia adecuada (2-3 días).

De las clonas diploides replicadas en EM conteniendo tetradas, se seleccionaron aquellas que presentaron el carácter de resistencia o sensibilidad al antibiótico; se tomó una asada de la clona a diseccionar y se diluyó en una solución de  $\beta$ -glucuronidasa (3 mg/ml) en agua destilada estéril en proporción 2:1, se dejó a temperatura ambiente durante 10-15 min. observando al microscopio la digestión de la pared del asca, se tomaron de 1-2 asadas de esta solución y se distribuyeron de una manera adecuada en una placa de medio de disección (2 x 7.6 cm. aprox.) que contiene silicona como adhesivo. Con una microaguja de vidrio acoplada a un micromanipulador Leitz, utilizando el objetivo de 20 aumentos, se separaron cada una de las cuatro ascosporas y se sembraron cada una con una separación vertical de 3 milímetros y con una separación horizontal de la otra tetrada de 3 milímetros (fig. 6). Al término de la disección se colocó la placa de disección en medio de YPAD incubándose a 30°C durante 72 hrs. aproximadamente; se registraron los datos de ascosporas germinadas y la presencia de microcolonias. Se transfirieron las clonas individuales a placas con medio de YPAD con un orden de siembra de mayor a menor tamaño, se incubaron durante 24 horas a 30°C, se diluyeron en agua destilada estéril a una concentración aproximada de  $10^8$  cel/ml, gotas de cada suspensión, se probaron en medios de YPAD, YPAG, YPAG-antimicina

(1 y 5 $\mu$ g/ml) en MD y en cinco medios sintéticos producto de la adición de cuatro distintas combinaciones de aminoácidos a medio mínimo (SD+aa). Se incubaron a 30°C registrándose el crecimiento a las 24, 48 y 72 horas.

Notas:

- ' En cuanto se detecta la formación de cigotos se debe replicar en medio mínimo MD, con el fin de evitar su esporulación y recombinación.
- '' Cuando se tienen en refrigeración las placas de medio de disección se deben dejar a temperatura ambiente por lo menos 15 min. antes de realizar la disección.
- ''' Las tetradas no deben permanecer a temperaturas ambiente por un tiempo mayor de 20 min. en la solución de  $\beta$ -glucuronidasa, ya que se separan todas las ascosporas y disminuye su viabilidad.
- '''' Las tetradas que se encuentran en la solución de  $\beta$ -glucuronidasa, pueden conservarse a 4°C por 48 hrs. para su posterior disección.

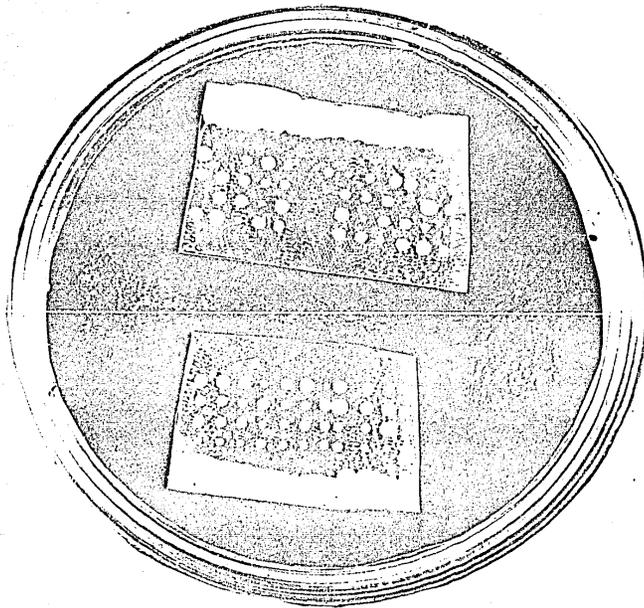


Fig.No.- Fotografia en donde se muestran clonas de esporas individuales producto de la Disección de Tetradas.

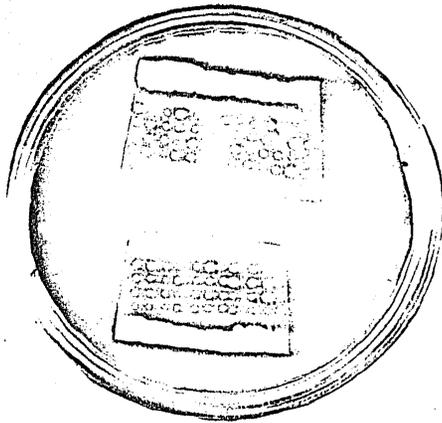


Fig.No.- Fotografía en donde se muestran clones de esporas individuales producto de la Diseción de Tetradas.

### III. RESULTADOS Y DISCUSION

#### IIIa. Inducción y Aislamiento de Mutantes Antimicina-Resistentes

##### IIIa.1 Mutagénesis con DAP.

Debido a que K. lactis presenta la propiedad de ser un organismo aerobio facultativo, puede crecer en ausencia de oxígeno en sustratos fermentables (glucosa, lactosa, etc.). Para la utilización de sustratos no fermentables (glicerol, lactato, etc). requiere de la presencia de oxígeno y de una mitocondria funcional. Esta propiedad permite deducir que la inhibición en el crecimiento de la cepa KF65-R6 en medio mínimo con glicerol (MD+aa), conteniendo concentraciones de 800 µg y 1 mg de DAP, es producto de alteraciones en las funciones mitocondriales, por lo que estas concentraciones se consideraron las más adecuadas para la obtención de mutantes mitocondriales.

En el presente trabajo, sólo se lograron obtener dos mutantes  $A^R$  en  $10^6$  cel/ml mutagenizadas, por lo que no se puede considerar como una evidencia de la actividad mutagénica del DAP, ya que existen posibilidades de que sean mutantes espontáneas. En las mutantes obtenidas se procedió a efectuar el análisis genético. Debido a que el análisis de clonas cigóticas no es un método muy adecuado, ya que no se pudo determinar de manera clara cómo se comporta la herencia, se procedió a efectuar el análisis de tetradas para lo cual los diploides se sometieron a esporulación (en medio de ME), tomándose cuando las clonas presentaban un tamaño de 1-2 mm (después de 20 generaciones) lo que indicó que los factores extracromosómicos se han estabilizado. En el análisis de tetradas se observó (Tabla III) que la cepa KAS-R2 -- presentaba una segregación 2:2 del carácter de resistencia, lo cual indica

que es de tipo nuclear ya que da segregación Mendeliana, presentando también tetradas en las que se obtenían valores de 4:0, 1:3 y 0:4, estas segregaciones son indicativas de herencia no-Mendeliana, debido a esto se podría considerar que esta clona estaba formada por una mezcla. La cepa KA5-R3 presentó una segregación 4:0 y 0:4; ésta proporción nos indica que es una segregación no-Mendeliana del carácter de resistencia.

Debido a que el número de mutantes obtenidas no es suficiente para considerar que el DAP es un inductor de mutantes, se podrían plantear algunas posibilidades con el fin de explicar por qué no se inducen mutantes en la cepa KF65-R6 (Tabla III):

- a) Una posibilidad es que las membranas celulares presenten poca permeabilidad al paso del DAP.
- b) Que la célula presente los mecanismos enzimáticos que le permite transformar o degradar al DAP a compuestos que no induzcan mutagénesis.
- c) Debido a que las concentraciones a las que se utilizó el DAP se dificultaba su solubilidad formándose un precipitado, esto podría traer como consecuencia que bajara la concentración real del mutágeno a la que se exponían las células y por lo tanto el porcentaje de mutagénesis.
- d) Con base en las observaciones efectuadas, de que el segmento del ADNmit que codifica para resistencia a cloranfenicol presenta un mayor número de pares de bases A-T con respecto al que codifica la resistencia a eritromicina y que debido a esto la mutagenicidad del DAP induce resistencia a cloranfenicol mas no a eritromicina (Wallis y Wilkie, 1979), probablemente en K. lactis el gen que -

codifica para el citocromo b presente pocos pares de bases A-T, lo que trae como consecuencia que no se induzca mutagénesis con DAP - en esta región específica.

### IIIa.2 Mutagénesis con MNNG.

Para la mutagénesis se procedió a obtener el 10% de sobrevivencia mediante la exposición de  $10^8$  cel/ml en  $40\mu\text{g/ml}$  de MNNG durante 25 - min. Se seleccionaron las mutantes en medio de YPAG con  $5\mu\text{g/ml}$  de antimicina ya que se había observado que mutantes  $A^R$  mitocondriales crecen a estas concentraciones del antibiótico, mientras que las nucleares sólo toleran -  $1\mu\text{g/ml}$ . En el presente trabajo sólo se obtuvo una cepa mutante en  $10^6$  cel/ml lo que no proporciona evidencia de su actividad como mutágeno.

Con el fin de explicar la razón por la que no se indujeron mutantes con MNNG, consideraremos la posibilidad de que esto sea debido a que las mutantes que se obtuvieron, fueron nucleares las cuales son más sensibles al antibiótico y que las concentraciones de  $5\mu\text{g/ml}$  utilizadas, con el propósito original de seleccionar mutantes citoplásmicas, fueron letales para las posibles mutantes nucleares. La única mutante obtenida la KA5-R4 (tabla IV) en  $10^6$  cel/ml dió por análisis de tetradas una segregación 4:0 y 0:4 por lo que esto nos indica que presenta herencia no-Mendeliana.

### IIIa.3 Mutagénesis con Sales de Manganeseo

Durante la mutagénesis con sales de manganeseo se encontraron las condiciones óptimas que permitían la obtención de un máximo número de mutantes. Para esto se determinó la concentración que daba el 10% de sobrevivencia encontrándose que en el caso de  $\text{MnSO}_4$  la proporción de viabilidad disminuyó en  $10^{-1}$  cel/ml al aumentar la concentración de éste de 20 mM a

30 mM; de 30 mM a 40 mM y de 40 mM a 50 mM. En  $MnCl_2$  se observó una disminución de la viabilidad en  $10^{-1}$  cel/ml en la concentración de 20 a 30 mM, en la misma proporción que con  $MnSO_4$ , en tanto que a concentraciones de 30 mM a 40 mM y de 40 mM a 50 mM, el número de células de mantuvo constante.

Se consideró que las condiciones óptimas para la mutagenización se lograron en presencia de amortiguador, ya que es posible que el pH del medio sea fundamental para la viabilidad de las células. En presencia de amortiguador las sales de manganeso se precipitaron disminuyéndose así la concentración real de  $Mn^{+2}$  lo cual probablemente sea la causa del aumento de viabilidad de las células y de la inducción de mutantes.

En el presente trabajo de las 31 mutantes  $A^R$  aisladas en total, 27 (el 87%) fueron producto de la acción mutagénica de las sales de manganeso ( $MnCl_2$  y  $MnSO_4$ ), determinándose mediante el análisis de tetradas que de las 27, 22 mutantes  $A^R$  presentaron herencia extracromosómica (probables mutantes mitocondriales), esto en  $10^6$  cel/ml mutagenizadas.

Mediante el análisis de los datos de las tablas de la IV a la XIII se determinó en particular los patrones de herencia que presentan las tetradas individuales: se observa que 15 cepas  $A^R$  (KA5-R6;R7;R8;R9;R10;R14;R18,R19;R21;R22;R24;R25;R28;R29 y R30) presentaron una segregación de 4:0 y de 0:4 lo que es característico de la segregación no-Mendeliana del carácter de resistencia. En otras 5 cepas (KA5-R4;R5;R11;R15 y R31) se tienen varios tipos de tetradas que segregan 4:0, 3:1, 2:2, 1:3 y 0:4; estas segregaciones son indicativas de herencia no-Mendeliana, pero la variación es probablemente debida a una falta de estabilización del genoma mitocondrial. En 4 cepas (KA5-R13;R17;R26 y R27) se presentaron varios tipos de tetradas que segregan 3:1, 2:2 y 1:3, esto se podría considerar como una evidencia de que se

presenta una mutación nuclear acompañada de cierto grado de conversión génica (esto relacionado a las proporciones obtenidas 3:1 y 1:3). El comportamiento de KAS-R20 es muy raro pues da segregación mitótica en diploides pero durante la meiosis, la segregación es claramente Mendeliana, podría pensarse que existe algún factor extracromosómico que afecta la permeabilidad al antibiótico en el estado diploide.

### IIIb. Determinación de los Marcadores Nucleares de Auxotrofia.

En lo que respecta a los marcadores nucleares de auxotrofia, éstos segregan en su mayoría 2:2 con excepción del marcador uracilo (s) que presenta una segregación 4:0, 3:1 y 2:2 observándose una proporción mayor de segregación 3:1. Este patrón de segregación puede ser debido a la presencia en esta capa de dos mutaciones no alélicas que dan auxotrofia para uracilo, es decir al mismo fenotipo. También se observó que todos los marcadores de auxotrofia presentaban, en una proporción mucho menor, la segregación 3:1 en tetradas producto de clonas cigóticas resistentes A<sup>R</sup> (KF65-R1;R3;R9;R13;R19 y R29), esto puede ser debido a las siguientes posibilidades que son: a) el producto de conversión génica ó b) formación de mutantes auxotróficas debido a la aparición de un nuevo sitio de auxotrofia por acción del mutágeno.

NUMERO DE MUTANTES A<sup>R</sup> AISLADAS EN 10<sup>6</sup> cel/ml PRODUCTO DEL TRATAMIENTO CON MUTAGENOS  
DE LA LEVADURA Kluyveromyces lactis.

No. de mutantes aisladas	DAP	DAP	MNNG	MnCl <sub>2</sub>				MnSO <sub>4</sub>				Espon láneas	
	100ug/ml	1 mg/ml	40ug/ml	20mM	30mM	40mM	50mM	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM		
1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
2	0	0	0	0	4	0	0	2	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	2	3	1	0	0	2	0	0	
6	0	0	1	0	0	7	0	0	0	1	4	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
9	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	0	
total	1	1	1	0	6	10	1	3	0	3	4	1	No. total de mutantes aisladas. 31

Tabla No.- 1

MUTANTES A<sup>R</sup> AISLADAS EN 10<sup>6</sup> cel/ml PRODUCTO DEL TRATAMIENTO CON MUTAGENOS DE LA  
 CEPA KF65-R6 DE LA LEVADURA Kluyveromyces lactis.

CEPA MUTANTE A <sup>R</sup>	TRATAMIENTO	CONCENTRACION	TIEMPO DE TRATAMIENTO
KA5-R1	NMG	40 µg/ml	25 min.
KA5-R2	DAP	800 µg/ml	24 horas
KA5-R3	DAP	1 µg/ml	24 horas
KA5-R4	MnSO <sub>4</sub>	20 mM	24 horas
KA5-R5	MnSO <sub>4</sub>	20 mM	24 horas
KA5-R6	MnSO <sub>4</sub>	20 mM	24 horas
KA5-R7	MnSO <sub>4</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R8	MnSO <sub>4</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R9	MnSO <sub>4</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R10	MnSO <sub>4</sub>	50 mM	24 horas
KA5-R11	MnSO <sub>4</sub>	50 mM	24 horas
KA5-R12	MnSO <sub>4</sub>	50 mM	24 horas
KA5-R13	MnSO <sub>4</sub>	50 mM	24 horas
KA5-R14	MnSO <sub>4</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R15	MnCl <sub>2</sub>	30 mM	24 horas
KA5-R16	MnCl <sub>2</sub>	30 mM	24 horas
KA5-R17	MnCl <sub>2</sub>	30 mM	24 horas
KA5-R18	MnCl <sub>2</sub>	30 mM	24 horas
KA5-R19	MnCl <sub>2</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R20	MnCl <sub>2</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R21	MnCl <sub>2</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R22	MnCl <sub>2</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R23	MnCl <sub>2</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R26	MnCl <sub>2</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R27	MnCl <sub>2</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R28	MnCl <sub>2</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R29	MnCl <sub>2</sub>	40 mM	24 horas
KA5-R30	MnCl <sub>2</sub>	30 mM	24 horas
KA5-R31	Espontánea	-----	-----

Tabla No.- II

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MUTANTES A <sup>o</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MNMG <sup>6</sup> , DAP <sup>6</sup> Y SALES DE MANGANESO <sup>6&amp;6</sup>																								
Cruza de la Cepa KA5-6C* con la Mutante <sup>6&amp;6</sup> Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>R</sup>			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>R</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUXOTROFIA, EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DISECCION DE TETRADAS.									
		Numero de Clonas Diploides.		Totales	Numero de Tetradas que Segregan A <sup>R</sup> : A <sup>S</sup>					Numero de Tetradas que Segregan S:s <sup>o</sup> .					Numero Total de Tetradas Diseccadas	% de Viabilidad.	% de Tetradas con 4 Esporas Viabiles.							
A <sup>R</sup>	A <sup>S</sup>	Feno-tipo.	4:0		3:1	2:2	1:3	0:4	Feno-tipo.	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4				Totales.						
KF65-R6	Cruza Testigo	0	138	138	A <sup>R</sup>	Ura																		
						Met																		
						Ade																		
						His																		
						Leu																		
						Ura								7										
						Met														7				
KA5-R1	NMG 40µg/ml	281	0	281	A <sup>R</sup> S <sup>o</sup>	Ura																		
						Met																		
						Ade																		
						His																		
						Leu																		
						Ura																		
						Met																		
KA5-R2	DAP 800µg/ml	24	194	218	A <sup>R</sup> S <sup>o</sup>	Ura																		
						Met																		
						Ade																		
						His																		
						Leu																		
						Ura																		
						Met																		

KA5-6C a, ade2, his, leu.

\* Mutante obtenida de la KF65-R6 cc, ura, met, C<sup>80</sup>

A<sup>S</sup> = Antimicina-Sensible.

A<sup>R</sup> = Antimicina-Resistente.

TABLA No. - III

6 MNMG = N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina

6&6 DAP = 2,6 Diaminopurina

6&6 Sales de Manganese: MnCl<sub>2</sub> MnSO<sub>4</sub>

6 S = Dominante y s = recesivo

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MUTANTES A<sup>11</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MING<sup>6</sup>, DAP<sup>66</sup> y SALES DE MANGANESO<sup>66</sup>.

Cruza de la Cepa KAS-6C* con la Mutante A <sup>11</sup> Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>11</sup>			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>11</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.						SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUXOTROFIA, EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DISECCION DE TETRADAS.						
		Numero de Clonas Diploides.			Numero de Tetradas que Segregan A <sup>11</sup> : A <sup>11</sup>						Numero de Tetradas que Segregan S: s <sup>1</sup> .					Total-les.	Numero Total de Tetradas Disecadas.	% de Viabi-lidad.	% de Tetradas con 4 Esporas Viabiles.			
		A <sup>11</sup>	A <sup>11</sup>	Total	Feno-tipo.	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Feno-tipo.	4:0	3:1	2:2	1:3					0:4		
KAS-R3	DAP 1mg/ml	20	140	160	A <sup>11</sup> S <sup>1</sup>	7						Ura	2	7	3			7	7	85.7	64	
												Met		3	4							
												Ade			7							
												His				6	1					
												Leu				5	2					
												Ura				4	8					
												Met					11					1
												Ade					12					
												His					12					
												Leu					12					
KAS-R4	MnSO <sub>4</sub> 20 mM	60	162	222	A <sup>11</sup> S <sup>1</sup>	5		2	2			Ura		9			9	9	76	53		
												Met			9							
												Ade				9						
												His				9						
												Leu				9						
												Ura				6					2	
												Met									8	
												Ade									8	
												His									8	
												Leu									8	
KAS-R5	MnSO <sub>4</sub> 20 mM	150	0	150	A <sup>11</sup> S <sup>1</sup>	5			3	2		Ura		7	3		10	10	48	33		
												Met			10							
												Ade				10						
												His				10						
												Leu				10						
												Ura										
												Met										
												Ade										
												His										
												Leu										

\* KAS-6C a, ade2, His, Leu.

\*\* Mutante obtenida de la KF65-R6cc, ura, met-, C<sup>0</sup>9

A<sup>11</sup> = Antimicina-Sensible.

A<sup>11</sup> = Antimicina-Resistente.

TABLA No. 1V

6. MING = N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina

66. DAP = 2,6 Diaminopurina

66b. Sales de Manganese: MnCl<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>

S = Dominante y s = recesivo

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MUTANTES A<sup>11</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MTRNG<sup>6</sup>, DAP<sup>6&7</sup> Y SALES DE MANGANESO.<sup>6&8</sup>

Cruza de la Cepa KAS-6C* con la Mutante A <sup>11</sup> Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>11</sup>			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>11</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.						SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUXOTROPIA EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.						VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DISECCION DE TETRADAS.						
		Numero de Clonas Diploides.			Numero de Tetradas que Segregan A <sup>11</sup> : A <sup>11</sup>						Numero de Tetradas que Segregan S <sup>11</sup> : s <sup>11</sup> .						Numero Total de Tetradas Diseccionadas.	% de Viabilidad.	% de Tetradas con 4 Esporas Viabiles.				
		A <sup>11</sup>	A <sup>11</sup>	Totales.	Feno-tipo.	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Feno-tipo.	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4				Totales.			
KAS-R6	MnSO <sub>4</sub> 20mM	55	52	107	A <sup>11</sup> S <sup>11</sup> g	8							Ura	2	6				8	8	87	31	
							Met							8									
							Ade							8									
							Hia							8									
							Leu							8									
					A <sup>11</sup> S <sup>11</sup> g	14							Ura	3	8	3				14	14	73	37
							Met							14									
							Ade							14									
							Hia							14									
							Leu							14									
KAS-R7	MnSO <sub>4</sub> 40mM	60	152	212	A <sup>11</sup> S <sup>11</sup> g	6							Ura		6	2			8	8	65	38	
							Met							7									
							Ade							8									
							Hia							8									
							Leu							8									
					A <sup>11</sup> S <sup>11</sup> g	6							Ura		6				6	6	77	42	
							Met							5									
							Ade							6									
							Hia							6									
							Leu							6									
KAS-R8	MnSO <sub>4</sub> 40mM	193	0	193	A <sup>11</sup> S <sup>11</sup> g	9							Ura		8	1			9	9	60	68	
							Met							9									
							Ade							9									
							Hia							9									
							Leu							9									
					A <sup>11</sup> S <sup>11</sup> g								Ura										
							Met																
							Ade																
							Hia																
							Leu																

\* KAS-6C a, ade2, his, leu.

\*\* Mutante obtenida de la KF65-R6oc, ura, met, c<sup>30</sup>

A<sup>11</sup> = Antimicina-Sensible.

A<sup>11</sup> = Antimicina-Resistente.

TABLA No. - V

<sup>6</sup> MTRNG = N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina

<sup>6&7</sup> DAP = 2,6 Diaminopurina

<sup>6&8</sup> Sales de Manganese: MnCl<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>

<sup>11</sup> S = Dominante y s = recesivo

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MUTANTES A<sup>1</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MNNG<sup>6</sup>, DAP<sup>6&7</sup> Y SALES DE MANGANESO<sup>6&8</sup>.

Cruza de la Cepa KAS-6C* con la Mutante: A <sup>1</sup> Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>R</sup> "			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>R</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUXOTROFIA, EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DISECCION DE TETRADAS.				
		Numero de Clonas Diploides.			Numero de Tetradas que Segregan A <sup>R</sup> " : A <sup>S</sup> "					Numero de Tetradas que Segregan S : s <sup>9</sup> .					Tota-les.	Numero Total de Tetradas Diseccadas	% de Viabi-lidad.	% de Tetradas con 4 Es-poras Viabiles.	
		A <sup>R</sup> "	A <sup>S</sup> "	Totales	Feno-tipo. 4:0 3:1 2:2 1:3 0:4					Feno-tipo. 4:0 3:1 2:2 1:3 0:4									
KAS-R9	MnSO <sub>4</sub> 40mM	40	101	141	A <sup>R</sup> 5µg	4				4	Ura	1	7			8	8	96	83
											Met	4	4						
											Ade	1	7						
											His	1	7						
											Leu		8						
					A <sup>S</sup>					14	Ura	4	4			8	8	94.5	86
											Met		8						
											Ade		8						
											His		8						
											Leu		8						
KAS-R10	MnSO <sub>4</sub> 50mM	20	230	250	A <sup>R</sup> 5µg	12					Ura	9	2	1	12	12	100	100	
											Met		12						
											Ade		12						
											His		12						
											Leu		12						
					A <sup>S</sup>					10	Ura	10				10	10	96	85
											Met		10						
											Ade		10						
											His		10						
											Leu		10						
KAS-R11	MnSO <sub>4</sub> 50mM	120	10	130	A <sup>R</sup> 1µg		3	13	1		Ura	1	12	4	17	17	83	83	
											Met		17						
											Ade		17						
											His	2	15						
											Leu	1	16						
					A <sup>S</sup>					4	Ura	8	2			10	10	92	78
											Met		10						
											Ade		10						
											His		10						
											Leu		10						

\* KAS-6C a, ade2, his, leu.

\*\* Mutante obtenida de la KR65-R6oc, ura, met, C<sup>80</sup>

† A<sup>S</sup> = Antimicina-Sensible.

‡ A<sup>R</sup> = Antimicina-Resistente.

TABLA No. VI

6 MNNG= N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina

6&7 DAP= 2,6 Diaminopurina

6&8 Sales de Manganese: MnCl<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>

9 S= Dominante y s= recesivo

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MUTANTES A<sup>AR</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MNNG<sup>666</sup>, DAP<sup>666</sup> Y SALES DE MANGANESO.<sup>666</sup>

Cruza de la Cepa KA5-6C* con la ***A Mutante A Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>AR</sup>			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>AR</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUXOTROPIA, EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DISECCION DE TETRADAS.									
		Numero de Clonas Diploides.			Numero de Tetradas que Segregan A <sup>AR</sup> : A <sup>AS</sup>					Numero de Tetradas que Segregan S:sif.					Numero Total de Tetradas Diseccadas	% de Viabilidad.	% de Tetradas con 4 Esporas Viabiles.							
		A <sup>AR</sup>	A <sup>AS</sup>	Totales.	Feno-tipo.	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Feno-tipo.	4:0	3:1	2:2				1:3	0:4	Totales.				
KA5-R11	MnSO <sub>4</sub> 50 mM	35	95	130	A <sup>AR</sup> Sug					6	4	Ura	4	3			7	7	75	56				
												Met		7										
												Ade	1	6										
												His		7										
												Leu		7										
												Ura	8	2							10	10	92	78
												Met		10										
												Ade		10										
												His		10										
												Leu		10										
Ura					15	0.3	0																	
Met																								
Ade																								
His																								
Leu																								
Ura								15	15	100	100													
Met	3	8	4																					
Ade	1	14																						
His	1	14																						
Leu		25																						
Ura		25																						
Met																								
Ade																								
His																								
Leu																								

KA5-6C a, ade2, his, leu.

\*Mutante obtenida de la KF65-R6 oc, ura, met., C<sup>SO</sup>

A<sup>S</sup> = Antimicina-Sensible.

A<sup>AR</sup> = Antimicina-Resistente.

TABLA No. VII

<sup>666</sup> MNNG = N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina

<sup>666</sup> DAP = 2,6 Diaminopurina

<sup>666</sup> Sales de Manganese: MnCl<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>

<sup>666</sup> S = Dominante y s = recesivo

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MUTANTES A<sup>1</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MNNG<sup>6</sup>, DAP<sup>6,6</sup> Y SALES DE MANGANESO<sup>6,6</sup>

Cruza de la Cepa KAS-6C* con la Mutante A <sup>1</sup> Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>1</sup>			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>1</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUTOTROPIA, EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DISECCION DE TETRADAS.				
		Numero de Clonas Diploides.			Numero de Tetradas que Segregan A <sup>1</sup> : A <sup>2</sup>					Numero de Tetradas que Segregan S:s <sup>4</sup> .					Numero Total de Tetradas Disecadas	% de Viabilidad.	% de Tetradas con 4 Esporas Viables.		
		A <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	Total	Fenotipo.	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Fenotipo.	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Total.		
KAS-R14	MnSO <sub>4</sub> 40 mM	124	0	124	A <sup>R</sup> A <sup>1</sup> 5ug	4										12	12	97.5	90
							Ura	10	2										
KAS-R15	MnSO <sub>4</sub> 30 mM	89	100	189	A <sup>R</sup> A <sup>1</sup> 1ug	14	6	1	1	1						9	9	80	53
							Ura	3	6										
KAS-R16	MnCl <sub>2</sub> 30 mM	152	0	152	A <sup>R</sup> A <sup>1</sup> 5ug	8										8	8	86	72
							Ura	6	2										

KAS-6C a, ade2, his, leu.

\*Mutante obtenida de la KF65-R6oc, ura, met., c<sup>80</sup>

A<sup>1</sup> = Antimicina-Sensible.

A<sup>R</sup> = Antimicina-Resistente.

TABLA No. VIII

<sup>6</sup> MNNG = N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina

<sup>6,6</sup> DAP = 2,6 Diaminopurina

<sup>6,6</sup> Sales de Manganese: MnCl<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>

<sup>8</sup> S = Dominante y s = recesivo

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MUTANTES A<sup>100</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MNNG<sup>6</sup>, DAP<sup>6,6</sup> Y SALES DE MANGANESO<sup>6,6</sup>

Cruza de la Cepa KA5-6C* con la Mutante <sup>100</sup> Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>100</sup>			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>100</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUTOTROFIA, EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DIBECCION DE TETRADAS.									
		Numero de Clonas Diploides.			Numero de Tetradas que Segregan A <sup>100</sup> : A <sup>100</sup>					Numero de Tetradas que Segregan S <sup>100</sup> : S <sup>100</sup>					Numero Total de Tetradas Disecadas	% de Viabilidad.	% de Tetradas con 4 Esporas Viabiles.							
		A <sup>100</sup>	A <sup>100</sup>	Totales	Feno. tipo:	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Feno. tipo:	4:0	3:1	2:2				1:3	0:4	Total.				
KA5-R17	MnCl <sub>2</sub> 30mM	110	0	110	A <sup>100</sup>	2	11				Ura	5	8			13	13	100	100					
											Met		13											
											Ade		13											
											His		13											
											Leu		12	1										
					S <sup>100</sup>																			
					KA5-R18	MnCl <sub>2</sub> 30mM	100	128	228	A <sup>100</sup>	12					Ura	10	2		12	12	84	81	
																Met		12						
																Ade		12						
																His		12						
Leu		12																						
S <sup>100</sup>											9							9	9	89	80			
KA5-R19	MnCl <sub>2</sub> 40mM	27	99	126						A <sup>100</sup>	7					Ura	4	3		7	7	90	70	
																Met		7						
																Ade		7						
																His		7						
					Leu		7																	
					S <sup>100</sup>						7							7	7	86	64			

\* KA5-6C a, ade2, his, leu.

\*\* Mutante obtenida de la K765-R6 oc, ura, met, C<sup>80</sup>

A<sup>100</sup> = Antimicina-Sensible.

A<sup>100</sup> = Antimicina-Resistente.

TABLA No. IX

6 MNNG= N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina

6,6 DAP= 2,6 Diaminopurina

6,6 Sales de Manganese: MnCl<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>

S<sup>100</sup> = Dominante y s<sup>100</sup> = recesivo

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MUTANTES A<sup>10</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MING<sup>6</sup>, DAP<sup>6</sup> Y SALES DE MANGANESO.

Cruza de la Cepa KAS-60 <sup>6</sup> con la Mutante A <sup>10</sup> Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>10</sup> .			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>10</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.						SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUXOTROFIA, EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DIBECCION DE TETRADAS.			
		Numero de Clonas Diploides.			Numero de Tetradas que Segregan A <sup>10</sup> .						Numero de Tetradas que Segregan S <sup>+</sup> .					Numero Total de Tetradas Disacadas	% de Viabilidad.	% de Tetradas con 4 Esporas Viabiles.	
		A <sup>10</sup>	A <sup>10</sup>	Total	Fenotipo:	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Fenotipo:	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Total.		
KAS-R20	MnCl <sub>2</sub> 40mM	121	110	231	A <sup>10</sup> S <sup>+</sup>	16					Ura	3	8	5		16	16	93	93
											Met			16					
											Adc			16					
											His			16					
											Leu			16					
					Ura			11		11	11	98	92						
					Met	2	4	5											
					Adc			11											
					His			11											
					Leu			11											
KAS-R21	MnCl <sub>2</sub> 40mM	34	108	142	A <sup>10</sup> S <sup>+</sup>	13			2		Ura	2	3	10		15	15	96	86
											Met			14	1				
											Adc		1	14					
											His			14	1				
											Leu			15					
					Ura	5	14			19	19	93	73						
					Met			19											
					Adc			19											
					His			19											
					Leu			19											
KAS-R22	MnCl <sub>2</sub> 40mM				A <sup>10</sup> S <sup>+</sup>	8					Ura		5	3		8	8	88	79
											Met			8					
											Adc			7	1				
											His			8					
											Leu			8					
					Ura	3	4	2		9	9	97	85						
					Met			9											
					Adc			9											
					His			9											
					Leu			9											

KAS-60 a, sde2, his, leu.

Mutante obtenida de la KF65-R6 of, ura, met, C<sup>60</sup>

A<sup>10</sup> = Antimicina-Sensible.

A<sup>10</sup> = Antimicina-Resistente.

TABLA No. 11

6-MSMG = 6-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina  
 6,6-DAP = 2,6 Diaminopurina  
 6,6-Sales de Manganeso: MnCl<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>  
 S<sup>+</sup> = Dominante y s<sup>-</sup> = recesivo

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MUTANTES A<sup>100</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MNMG<sup>6</sup>, DAP<sup>6</sup> y SALES DE MANGANESO<sup>6,65</sup>.

Cruza de las Ceas (KAS-6C* con la Mutante) Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>100</sup>			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>100</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.						SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUTOTROFIA EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.						VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DISECCION DE TETRADAS.		
		Numero de Clonas Diploides.			Numero de Tetradas que Segregan A <sup>100</sup> : A <sup>100</sup>						Numero de Tetradas que Segregan S <sup>100</sup> : S <sup>100</sup> .						Numero Total de Tetradas Disecadas	% de Viabilidad.	% de Tetradas con 4 Esporas Viabiles.
		A <sup>100</sup>	A <sup>100</sup>	Totales	Feno-tipo: 4:0 3:1 2:2 1:3 0:4						Feno-tipo: 4:0 3:1 2:2 1:3 0:4						Totales		
KAS-R23	MnCl <sub>2</sub> 40mM	138	0	138	138	13	0	0	0	0	0	Ura	1	9	3	13	13	96	87
												His			13				
KAS-R24	MnCl <sub>2</sub> 30mM	112	158	270	112	7	0	0	0	0	0	Ura		4	3	7	7	95	80
												His			7				
KAS-R25	MnCl <sub>2</sub> 40mM	80	110	190	80	8	0	0	0	0	0	Ura	2	0	3	14	14	96	83
												His			14				
KAS-R25	MnCl <sub>2</sub> 40mM	80	110	190	80	8	0	0	0	0	0	Ura	1		7	8	8	90	70
												His			8				
KAS-R25	MnCl <sub>2</sub> 40mM	80	110	190	80	8	0	0	0	0	0	Ura		0	1	10	10	94	77
												His			10				

\* KAS-6C a, ade2, his, leu.

\*\* Mutante obtenida de la KF65-R6 oc, ura, met-, c<sup>100</sup>

A<sup>100</sup> = Antimicina-Sensible.

A<sup>100</sup> = Antimicina-Resistente.

TABLA No. XI

Ura = 5-Fluor-Uracil-N<sup>6</sup>-Nitro-N<sup>7</sup>-Nitrosooguanidina

DAP = 2,6 Diaminopurina

SA = Sales de Manganese: MnCl<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>

S<sup>100</sup> = Dominante y s<sup>100</sup> = recesivo

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MITANTES A<sup>1</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MNNG<sup>6</sup>, DAP<sup>6,6</sup> Y SALES DE MANGANESO<sup>6,6,6</sup>

Cruza de la Cepa KAS-6C* con la Mutante A <sup>1</sup> Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>1</sup>			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>1</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.						SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUXOTROFIA, EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DIBSECCION DE TETRADAS.			
		A <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	Totales	Fenotipo	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Fenotipo	4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	Totales	Numero Total de Tetradas Disecadas	% de Viabilidad.
KAS-R26	MnCl <sub>2</sub> 40mM	21	357	378	A <sup>1</sup> S <sup>1</sup>			9	6		Ura	7	1			8	8	91	75
											Met		8						
											Ade	1	7						
											Hia		8						
											Leu	1	7						
		Ura	5	3			8	8	75	55									
		Met		8															
		Ade	1	7															
		Hia		8															
		Leu		8															
KAS-R27	MnCl <sub>2</sub> 40mM	261	0	261	A <sup>1</sup> R <sup>1</sup>			4	4		Ura	4	2	2	8	8	100	100.	
											Met		7	1					
											Ade		8						
											Hia		8						
											Leu		8						
		Ura					8												
		Met																	
		Ade																	
		Hia																	
		Leu																	
KAS-R28	MnCl <sub>2</sub> 40mM	106	222	328	A <sup>1</sup> S <sup>1</sup>		8				Ura	1	7		11	11	94	77	
											Met			7					1
											Ade		8						
											Hia		8						
											Leu		8						
		Ura	9	2			11	11	94	77									
		Met		11															
		Ade		11															
		Hia		10	1														
		Leu		11															

\* KAS-6C a, sde2, his, leu.

\*\* Mutante obtenida de la KF65-R6 α, ura, met., C<sup>6</sup>O<sup>6</sup>

A<sup>1</sup> = Antimicina-Sensible.

A<sup>2</sup> = Antimicina-Resistente.

TABLA No. XII

<sup>6</sup> MNNG = N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina

<sup>6,6</sup> DAP = 2,6 Diaminopurina

<sup>6,6,6</sup> Sales de Manganeso: MnCl<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>

<sup>6</sup> S = Dominante y <sup>6</sup> s = recesivo

DATOS DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS EN MUTANTES A<sup>11</sup> OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON: MNIG<sup>6</sup>, DAP<sup>6,6</sup> Y SALES DE MANGANESO<sup>6,6</sup>

Cruza de la Cepa KA5-6C* con la Mutante A <sup>11</sup> Numero.	Tipo de Tratamiento.	PRUEBAS DE SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER A <sup>11</sup>			SEGREGACION DEL CARACTER A <sup>11</sup> EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.						SEGREGACION DE LOS MARCADORES DE AUKOTROPIA, EN LOS PRODUCTOS DE LA MEIOSIS.					VIABILIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS POR DISECCION DE TETRADAS.								
		Numero de Clonas Diploides.			Numero de Tetradas que Segregan A <sup>11</sup> : A <sup>11</sup>						Numero de Tetradas que Segregan S: s <sup>1</sup> .					Numero Total de Tetradas Disecadas	% de Viabilidad.	% de Tetradas con 4 Esporas Viabiles.						
		A <sup>11</sup>	A <sup>11</sup> S <sup>1</sup>	Total	Genotipo: 4:0 3:1 2:2 1:3 0:4						Genotipo: 4:0 3:1 2:2 1:3 0:4													
KA5-R29	MnCl <sub>2</sub> 40mM	58	45	103	R A <sup>11</sup> 5ug	11															11	11	95	80
KA5-R30	MnCl <sub>2</sub> 30mM	156	25	181	R A <sup>11</sup> 5ug	7															7	7	98	92
KA5-R31 Espontanea.		39	215	254	R A <sup>11</sup> 5ug	6															8	8	80	50

\* KA5-6C a, ade2, his, leu.

\* Mutante obtenida de la KF65-R6 a, ura, met, C<sup>6</sup>O<sup>6</sup>

A<sup>11</sup> = Anticimicina-Sensible.

A<sup>11</sup> = Anticimicina-Resistente.

TABLA No. XIII

<sup>6</sup> MNIG = N-Metil-N-Nitro-N-Nitrosoguanidina  
<sup>6,6</sup> DAP = 2,6 Diaminopurina  
<sup>6,6</sup> Sales de Manganeso: MnCl<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>  
<sup>11</sup> S = Dominante y s = recesivo

## REFERENCIAS

- Brunner, A. (1974) Obtención y Caracterización de Mutantes Mitocondriales en una Levadura "Petite" Negativa: En los "Perfiles de la Bioquímica en México". Ed. Mora, J.: Estrada, Orihuela S. y Martuscelli, J. UNAM. México, pp. 91-99.
- Brunner, A. (1978) Herencia Citoplásmica de la Resistencia a Oligomicina, Eritromicina y Cloranfenicol en la Levadura "Petite" Negativa: *Kluyveromyces lactis*. En "Temas Bioquímicos de Actualidad" Ed. Piña, E.; Chagoya de Sánchez, V. y Martuscelli, J. UNAM. México, pp. 267-279.
- Brunner, A. (1979) Chromosomal and Extrachromosomal Inheritance to Antimycin Resistance in the Petite-Negative Yeast *Kluyveromyces lactis*. En Resúmenes del Congreso: "The Molecular Biology of Yeast". Agosto 14-19, (Broach, J.; Hicks, J.; Klar, A. y Strathern, J. Eds.) Cold Spring Harbor, New York, pp. 94.
- Calderón, L.I. y Cerdá-Olmedo E. (1983) Induction by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine of Nuclear and Cytoplasmatic Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* Mutat. Res., 108: 133-146.
- Crivell, L.A. (1983) Mitochondrial DNA. Sci. Am., 248 (3): 60-70.
- Dawes, I.W., Bruce, L.A. y Carter (1974) Nitrosoguanidine Mutagenesis during Nuclear and Mitochondrial Gene Replication Nature, 250: 709-711.
- Ferrero, I., Vicla, A.M. y Goffeau, A. (1981) Induction by Glucose of an Antimycin-Insensitive, Azide Sensitive Respiration in the Yeast *Kluyveromyces lactis*. Antonie van Leeuwenhoek 47: 11-24.
- Fincham, J.R.S., Day, P.R., Radford (1979) Fungal Genetics; Botanical Monographs Vol. 4. Blackwell Scientific Publications fourth Edition Oxford.

- Gichner, T. y Valeminsky (1982) Genetics Effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina and its Homologues. *Mutat. Res.* 99: 129-242.
- Gillham, N.W. (1978) "Organelle Heredity". Raven Press, New York.
- Mortimer, K.R. y Hawthorne, C.D. (1969) *Yeast Genetics; "The Yeast"* Rose H.A. y Harrison, J.S. Academic Press London-New York. pp. 386-453.
- Putrament, A., Baranowska, H., Ejchart, A. y Prazmo, W. (1973) Induction by Manganese of Mitochondrial Antibiotic Resistance Mutations in Yeast. *Mol. Gen. Genet.* 126: 357-366.
- Putrament, A., Baranowska, H., Ejchart, A. y Prazmo, W. (1975) Manganese Mutagenesis in Yeast. IV. The Effects of Magnesium, Protein Synthesis Inhibitors and Hidroxyurea on Ant<sup>R</sup> Induction in Mitochondrial DNA. *Mol. Gen. Genet.* 140: 339-347.
- Putrament, A., Baranowska, H., Ejchart, A. y Prazmo, W. (1975) Manganese Mutagenesis in Yeast. A Practical Application of Manganese for the Induction of Mitochondrial Antibiotic Resistant Mutations. *J. Gen. Microbiol.* 62: 265-270.
- Rieske, J.S. (1976) Composition, Structure and Function of Complex III of the Respiratory Chain. *Biochim. Biophys. Acta.* 156: 291-313.
- Rose, A.H. y Harrison, J.S. (1969) "The Yeast" Vol. 1. *Biology of Yeast*, Academic Press, London-New York.
- Sanders, J.P.M., Weijers, P.J., Groot, G.S.P. y Berst, P. (1974) Properties of Mitochondrial DNA from Kluyveromyces lactis. *Biochim. Biophys. Acta.* 374: 136-144.
- Singer, B. y Kosmirek, J.T. (1982) Chemical Mutagenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 655-693.

- Siew-Keen Quah, R.C., Von Borstel y Hastings, P.J. (1980) The Origin of Spontaneous in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 96: 819-839.
- Wallis, Ch. and Wilkie, D. (1979) Mitochondrial Activity of 2,6-Diaminopurine in Saccharomyces cerevisiae; Molec. Gen. Genet. 173: 307-313.
- Weiss, H. (1976) Subunit Composition and Biogenesis of Mitochondrial Cytochrome b. Biochim. Biophys. Acta 456: 291-313.
- Wilkie, D., Sanders, G. y Linnane, A.W. (1967) Inhibition of Mitochondrial Synthesis in Yeast by Chloroamphenicol: Relationship between Chloramphenicol Tolerance and Resistance to other Antibacterial Antibiotics. Genet. Res. (Camb). 10: 199-203.