

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Química

INDUCCION Y CARACTERIZACION GENETICA DE MUTANTES RESPIRATORIO DEFICIENTES DE LA LEVADURA Kluyveromyces lactis OBTENIDAS POR TRATAMIENTO CON NITROSO METIL GUANIDINA Y LUZ ULTRAVIOLETA.

TESIS

Que para obtener el título de QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

MA. EUGENIA VARELA URIBE



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

México, D. F. 1987



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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 está 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.

I N D I C E

I.	INTRODUCCION.	1
	1. Mutagénesis	1
	2. Herencia Nuclear y Citoplásmica	2
	3. Agentes Mutagénicos	7
	4. Modo de interacción de M N G y Luz U V.	7
	5. Efecto de mutágenos en levaduras.	15
	6. Mutación "petite"	16
II.	MATERIALES Y METODOS.	18
III.	RESULTADOS Y ANALISIS DE ELLOS.	43
	1. Mutagénesis con M N G.	48
	2. Mutagénesis con Luz U V.	49
	3. Caracterización Genética	53
	4. Pruebas Bioquímicas	64
	5. Pruebas de Alelismo	82
IV.	CONCLUSIONES	86
V.	BIBLIOGRAFIA	88

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

Los cromosomas controlan las propiedades hereditarias de todas las células; son agrupaciones lineales de factores genéticos llamados genes. Cada gen puede alterar las propiedades de una célula de una manera muy característica. (31)

El conocimiento de la estructura molecular de los cromosomas es todavía incompleto. Gran parte del trabajo inicial de la genética se realizó con organismos multicelulares grandes como plantas y animales, y la mayoría de los genes mutantes estudiados por los primeros genetistas Mendelianos habían surgido espontáneamente (31).

Hoy en día dos elementos muy útiles para el estudio de la naturaleza de un gen y de sus funciones han sido los microorganismos y el fenómeno conocido como "mutación". Los microorganismos por presentar la ventaja de poseer ciclos de vida muy cortos y de crecer fácilmente bajo condiciones controlables de laboratorio; y las mutaciones por la relativa facilidad con que pueden inducirse hoy mediante la utilización de agentes físicos o químicos (31).

Una mutación, es un proceso por el cual un gen sufre un cambio estructural, que se refleja en alteraciones fenotípicas en el organismo o microorganismo que la ha sufrido; alteraciones que pueden ser muy útiles para conocer el mecanismo de acción de una determinada proteína (11).

El término mutante es usado para identificar un cambio fenotípico expresado individualmente, resultante de una mutación

(29).

Los cambios mutacionales pueden deberse a deleciones, inserciones o cambios de bases (transversiones y transiciones) en el DNA o RNA (caso de algunos virus) (15). Las mutantes producidas por substituciones de bases son los tipos más comunes a nivel molecular (11).

Hasta hace relativamente poco tiempo, eran los cromosomas considerados como las únicas entidades en la célula responsables de llevar las unidades básicas de la herencia (control genético), en virtud de la notable correspondencia entre segregación y recombinación de los genes y la conducta de los cromosomas en células reproductivas. Es la configuración precisa de esta segregación la que forma las bases del Mendelismo (32).

Sin embargo, por otro lado surgía la pregunta: ¿contiene el DNA cromosomal la información completa para el patrón de cada organismo, o también es necesaria información de fuentes citoplásmicas?

En otras palabras, se dudaba ya del monopolio del núcleo sobre este control y comenzaba a pensarse en la existencia de sistemas hereditarios estables en el citoplasma, actuando directamente o en conjunción con genes nucleares o productos de ellos para determinadas características celulares (32).

Es obvio que parecía difícil la concepción de dos sistemas genéticos actuando independientemente en la célula, no obstante si sus actividades fueran complementarias se podría lograr un desarrollo normal.

Actualmente esta pregunta sobre la existencia de unidades genéticas en el citoplasma puede contestarse afirmativamente con

respecto sólo a ciertas entidades celulares como son mitocondrias, plástidos y centriolos.

Esta conclusión está basada en evidencias genéticas y en la presencia de DNA en estos organelos, sobreentendiéndose que todo el DNA tiene una función genética (32).

Uno de los organelos más estudiados en cuanto a la estructura y funciones de su material genético, es la mitocondria y dentro de ellas son las mitocondrias de hongos, protozoarios y animales las que han recibido más atención. El DNA mitocondrial varía extensamente en cuanto a sus dimensiones. Dentro de las levaduras oscila entre 25 μm (Saccharomyces), 11.5 μm (Kluyveromyces) y 5 μm (Schizosaccharomyces), mientras que en los organismos multicelulares alcanza dimensiones más homogéneas de alrededor de 5 μm . La biogénesis de la mitocondria involucra tanto sistemas genéticos mitocondriales como nucleares (10,15,26,33).

Aunque la mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas por genes nucleares y sintetizadas en ribosomas del citosol, se sabe que algunos componentes de la membrana interna mitocondrial, tales como la citocromo oxidasa, citocromo "b" y el complejo ATP sintetasa, son sintetizados cooperativamente por la maquinaria de síntesis protéica mitocondrial y extramitocondrial (21,29,33).

Las levaduras y específicamente la levadura de cerveza, ha jugado un papel fundamental en la comprensión de las interrelaciones nucleocitoplásmicas de una célula (25).

Las levaduras fueron de los primeros organismos en los que se sospechó la presencia de material genético mitocondrial. Estos

organismos son aeróbicos facultativos y pueden crecer sin una mitocondria funcional, siempre y cuando se les proporcione un sustrato fermentable como la glucosa (10,25).

En la década de los 40's, Ephrussi y colaboradores aislaron mutantes de la levadura de panadería que crecían lentamente en sustratos fermentables, dando lugar a colonias pequeñas; debido a esto último, a estas mutantes se las denominó "petite-colonie" y posteriormente "petite" (26). Las mutantes "petite" eran incapaces de crecer en sustratos respirables (etanol, lactato, glicerol), carecían de citocromos "a" y "b" y de algunas otras enzimas implicadas en la respiración. Cuando se estudió el comportamiento genético de estas mutantes, se vió que la mutación no seguía las leyes de la herencia Mendeliana, sino que daba segregaciones adjudicables a la presencia de material genético extracromosómico. Ya que en estas mutantes estaban afectadas las funciones respiratorias y por ende la mitocondria, se dedujo correctamente que los cambios se debían a una alteración en un factor mitocondrial al que en aquella época se le denominó " ρ " (ρ) por su vinculación con los fenómenos respiratorios, y por ello a las mutantes "petite" se las llamó ρ^- (ρ^-).

Si bien la mutación petite aparecía con una frecuencia muy alta (1%), se encontró que ciertos agentes como la acriflavina y más específicamente la euflavina, llegaban a producir hasta un 100% de estas mutantes (5). Todos estos estudios se habían llevado a cabo con la levadura de cerveza S. cerevisiae. Dos investigadores: De Deken y Bulder reexploraron la acción de la acriflavina sobre una serie de levaduras distintas y encontraron que en la mayoría, la mutación inducida por este colorante era

letal. Dividieron por lo tanto a las levaduras en dos grandes grupos según que dieran origen o no, a mutantes "petite", cuando se crecían en presencia de acriflavina. Las primeras se denominaron "petite positivas" y las segundas "petite negativas" (5).

Trabajos ulteriores de varios investigadores, demostraron que distintos agentes físicos (temperatura, radiaciones U.V.) y químicos (detergentes, colorantes, etc.) inducían la mutación "petite". En la actualidad el colorante más empleado para inducir esta mutación es el bromuro de etidio (3,18). Además de las "petite" debidas a mutaciones en el DNA mitocondrial, tenemos que el fenotipo "petite" puede aparecer también por mutaciones en el DNA nuclear; para distinguir a estas mutantes de las primeras, se las ha denominado "pet" o "petite" segregacionales ya que la mutación segrega de acuerdo a las leyes de Mendel, es decir, 2 petite vs. 2 grandes en los productos de la meiosis (1,16,26). Las petite mitocondriales se dividen a su vez en dos grupos: las neutrales y las supresoras. Las primeras dan diploides respiratorio competentes al ser cruzadas con una cepa normal y las segundas dan diferentes porcentajes de diploides respiratorio-deficientes (según el grado de supresividad) en los productos de la cruce con una grande (respiratorio competente). La diferencia entre las petite neutrales y las segregacionales (nucleares) es que en las primeras el carácter petite desaparece en los productos de la meiosis, mientras que en las segundas el carácter respiratorio deficiente se recupera en dos de las esporas (26).

En la figura 1 se esquematiza parcialmente el ciclo de vida

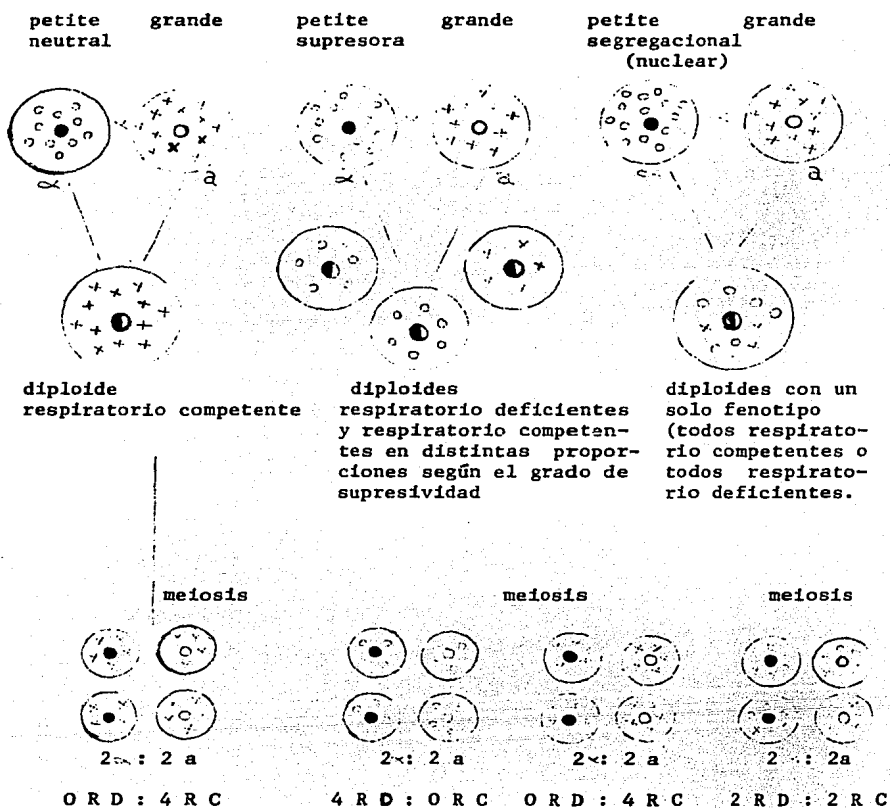


Fig. 1.- Segregación del carácter respiratorio deficiente en distintas mutantes de levadura.

R D Respiratorio Deficiente.

R C Respiratorio Competente.

de esta levadura y la forma en que segrega el fenotipo "petite" en las diferentes mutantes arriba discutidas (15,26).

Como puede verse esta levadura presenta dos factores de compatibilidad, llamados α o a ; cuando células de diferente factor de compatibilidad, se ponen en contacto, se forma un cigoto del cual derivan por gemación, células diploides. El estado diploide en K. lactis, a diferencia de S. cerevisiae, es sólo transitorio y eventualmente los diploides sufren la meiosis con la producción de cuatro esporas haploides, en que los caracteres nucleares segregan 2 : 2. (10, 15, 25, 26).

Agentes Mutagénicos.

Se dispone en la actualidad de numerosos agentes capaces de inducir mutaciones y aberraciones cromosómicas en una gran variedad de organismos, lo cual ha sido de gran ayuda en las investigaciones de desarrollo y evolución de estos organismos. Estos incluyen mutágenos físicos ampliamente usados tales como: rayos x, rayos γ , radiaciones UV, neutrones y rayos β ; mutágenos químicos entre los que podemos señalar los potentes agentes alquilantes: etil metano sulfonato, dietil sulfato, 2,6-dimetil amino purina y etil eneimina y compuestos nitrosos como: N-nitro, N-nitroso metil guanidina, nitroso etil uretano y metil nitroso urea (11,28,29,30).

Mutaciones inducidas por Rayos Ultravioleta.

Los rayos ultravioleta (UV) son un factor significativo, pero

menos potente que los rayos x en la inducción de mutaciones; a causa de la longitud de onda larga y por lo tanto de menor energía, los rayos UV no penetran tan bien como los rayos x, pero son rápidamente absorbidos por algunos compuestos, particularmente aquellos que contienen purinas y pirimidinas. Las pirimidinas timina y citosina, son especialmente susceptibles y son dimerizadas por la absorción de los rayos UV. Estos dímeros distorsionan la hélice del DNA y bloquean su replicación futura (11,16). La relación entre dosis de rayos UV y proporción de la mutación, generalmente no es lineal. La evidencia de muchos estudios en diferentes materiales, indica que el efecto mutagénico de los rayos UV es indirecto y que involucra precursores y enzimas presentes en la síntesis del DNA, más que afectar al DNA por sí mismo.

Las alteraciones del DNA inducidas por los rayos UV, son más evidentes cuando el proceso de replicación se está llevando a cabo, indicando que los errores ocurren durante el tiempo de incorporación de las bases. En este tiempo, uniones extrañas entre pirimidinas vecinas rompen el proceso regular de duplicación.

Mecanismos de Reparación para el daño causado por la luz UV.

El daño causado al DNA por irradiación con luz UV normalmente consiste en la formación de una unión covalente entre pirimidinas adyacentes, particularmente residuos adyacentes de timina. Los dímeros unidos covalentemente se comportan como cremalleras

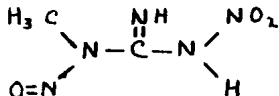
descompuestas y bloquean la replicación (fig. 2). Este defecto puede ser reparado enzimáticamente por un proceso recombinacional de post-replicación. Una endonucleasa corta la hebra que lleva el defecto y excluye los dímeros timina-timina. Los nucleótidos nuevamente sintetizados, complementarios a la hebra no dañada son entonces insertados para llenar el hueco. La ligasa polinucleótida, sella los extremos de las hebras escindidas y completa la reparación cromosomal (fig. 3).

Defectos de esta clase ocurren aparentemente con bastante frecuencia, pero pueden ser reparados si solamente una hebra del DNA duplex es dañada. Si las reparaciones son hechas inmediatamente, las mutaciones no ocurren. Algunas veces sin embargo, errores del tipo transición o transversión ocurren en el proceso de reparación y ocasionan un daño permanente o mutación.

Las radiaciones UV han sido asociadas con la incidencia de cáncer de la piel en humanos (11).

M N G como mutágeno.

N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, abreviada en la literatura como M N N G o M N G.



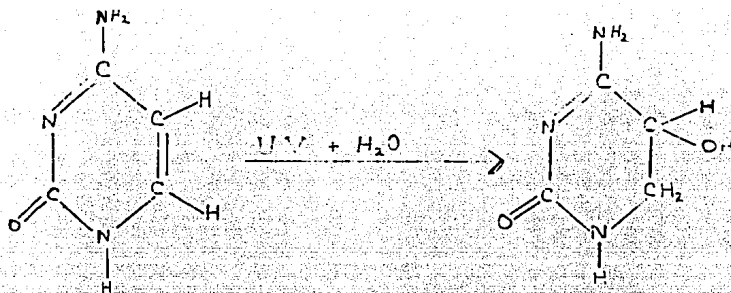
Peso molecular: 147.09

Punto de fusión: 118°C

Forma cristales que van del amarillo pálido al rosa cuando está en forma pura,

M N G es escasamente soluble en agua (0.5%) y soluble en solventes orgánicos, aunque es inestable en ambos tipos de solventes. La estabilidad más grande ha sido encontrada a pH 5.

a.



b.)

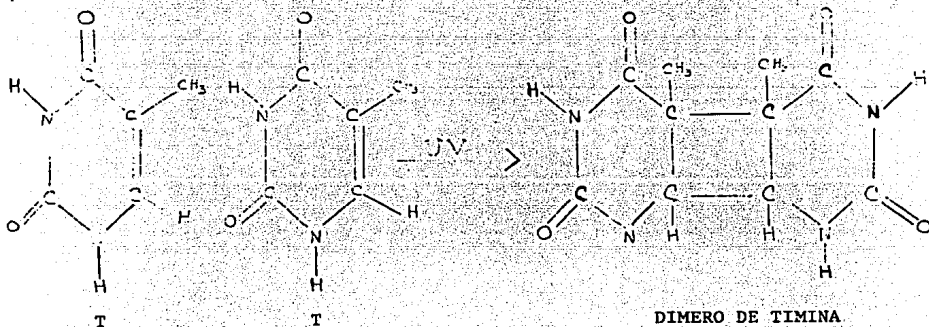
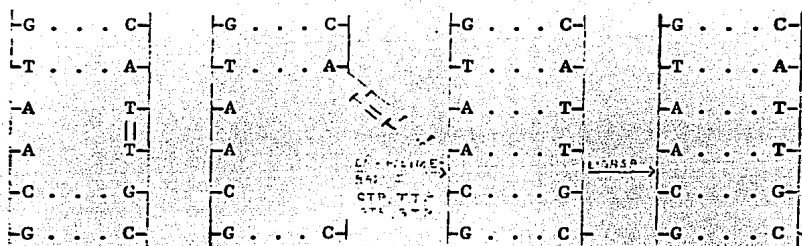


Fig. 2 EFECTO DIRECTO DE LA LUZ UV SOBRE PIRIMIDINAS.

- a) Hidrólisis de citosina a un producto que puede causar desaparéc y por lo tanto resultar en un cambio mutacional.
- b) Unión de moléculas de timina en la formación de un dímero de timina, el cual bloquea la replicación y entonces crea una mutación.



DINUCLEOTIDO REMOCION DEL DEFECTO
 TIMINA-TIMINA

Fig. 3. Mecanismo de reparación para el daño causado por la luz UV a una hebra de un DNA duplex.

El segmento dañado de una hebra es despegado de ella y nuevos nucleótidos complementarios a los de la hebra no dañada son insertados en el hueco que deja éste.

La estabilidad en buffer depende de la temperatura, pH, fuerza iónica y tipo de sal en el buffer (14).

La descomposición de M N G en buffer de fosfatos 0.1 M a 37°C parece obedecer a una cinética unimolecular.

La liberación del grupo alquilante es también acelerada por la reacción de M N G con aminas, una reacción que resulta en la formación de nitroguanidinas sustituidas.

El grupo alquil nitrosamino liberado reacciona rápidamente con nucleófilos que le rodean, por ejemplo el caso de las bases del DNA (centros nucleofílicos) conteniendo átomos de nitrógeno u oxígeno.

El grupo funcional metilante derivado de MNG, reacciona más selectivamente que el etilante del etil metano sulfonato, y aunque si bien las reacciones son nucleófilos, podría esperarse fueran preferencialmente mecanismos monomoleculares (SN₁) tienen también un cierto carácter bimolecular (SN₂) (28).

Desde el descubrimiento de la actividad mutagénica de MNG en 1960, este compuesto ha resultado ser uno de los mutágenos químicos más ampliamente usados.

Química Metabolismo y Modo de Interacción de MNNG con DNA y Proteínas y Efecto Genotóxico de este Agente en Microorganismos.
Interacción con Proteínas.

MNNG puede reaccionar con proteínas en dos formas diferentes. las proteínas pueden ser alquiladas por el grupo metilo liberado, por descomposición de la MNG, o nitroamidadas por el grupo guanidino. La afinidad excepcional de MNNG por proteínas,

particularmente de su grupo nitroguanidino puede ser la razón de que la MNNG más que muchos otros mutágenos y carcinógenos inhiban a algunas enzimas importantes. Esto fue demostrado por reacciones de marcaje con ^{14}C ya sea en el grupo guanidino o metilo con varias proteínas, in vitro e in vivo (14).

Mientras que el grupo alquilo reacciona tanto con proteínas como con ácidos nucleicos, el grupo nitroguanidino reacciona únicamente con las primeras, ya que sólo una pequeña radioactividad, derivada del grupo guanidino, pudo ser detectada en DNA.

Parece ser que las histonas tienen una afinidad 5 veces más alta para unirse con el grupo guanidino de MNNG, que las proteínas cromosomales "no histonas".

Interacción con ácidos nucleicos.

Ha sido demostrado ya repetidamente que la MNNG alquila ácidos nucleicos in vitro e in vivo del mismo modo, como lo hacen otros compuestos nitrosos y otros agentes alquilantes (Roberts, 1978).

Anteriormente el diazometano ($\text{C H}_2 \text{ N}_2$) fue considerado por muchos investigadores como el intermediario alquilante responsable de la reacción de metilación de la MNNG y por lo tanto de sus efectos genéticos aún a pH fisiológico (7). Sin embargo, experimentos en los cuales se usó un grupo metilo de MNNG completamente deuterado, demostraron que el producto de alquilación de DNA a pH 6, tiene un peso molecular compatible con la transferencia del grupo metilo deuterado intacto. Si el diazometano fuera el intermediario alquilante, el 7-Meg contendría

Únicamente dos átomos de deuterio y no tres como fue encontrado. Indirectamente, la evidencia que descarta la teoría del diazometano, viene de experimentos de los efectos mutagénicos de MNNG completamente deuterada en E. coli. Ahora es generalmente aceptado que el ión diazonio $C H_3 N^+_2$ representa el intermediario alquilante, el cual rápidamente produce el correspondiente catión carbonio (14,28).

Sitios de alquilación de ácidos nucleicos.

Propiamente, la reacción del intermediario alquilante es predominantemente SN_1 . La MNNG reacciona con centros nucleofílicos en el DNA. Se podría por lo tanto esperar una metilación en los sitios no sólo de alta nucleofilicidad, tal como la posición del nitrógeno 7 de la guanina y el nitrógeno 3 de la adenina, sino además en sitios de baja nucleofilicidad tal como aquellos con oxígeno, particularmente oxígeno 6 de la guanina, oxígeno 2 de la timina, oxígeno 2 de la citosina o también en los oxígenos de la ribosa y del fosfato.

La posición del nitrógeno 7 de la guanina representa el principal centro nucleofílico en DNA y RNA para todos los agentes metilantes, incluyendo la MNNG, en todos los tipos de células probadas (8).

Efecto de Mutágenos en Levaduras.

En las levaduras los mutágenos pueden inducir tres tipos principales de alteración genética:

- 1) Entrecruzamiento mitótico (Crossing - over)
- 2) Conversión génica mitótica
- 3) Mutaciones

El entrecruzamiento mitótico o recombinación intergénica no altera la información genética como lo hacen las mutaciones, pero conduce a nuevos arreglos de formas alélicas de un gene en una célula diploide heterocigota; Zimmermann comparó el efecto mutagénico y recombinogénico de la MNNG y algunos otros mutágenos en Saccharomyces y encontró que las frecuencias de los dos efectos fueron del mismo orden de magnitud para los diferentes mutágenos ensayados, excepto con uno de los compuestos de prueba, el ácido nitroso, en que el efecto recombinogénico fue 10 veces más fuerte que su efecto mutagénico (28).

Conversión génica mitótica

La conversión génica mitótica llamada recombinación no recíproca o interalélica es un proceso que conduce a una transferencia genética de un segmento de 100 a 1000 nucleótidos de longitud entre regiones homólogas de cromátidas de cromosomas homólogos (Zimmerman, 1973). Este proceso puede ser fácilmente seguido en diploides heteroalélicos, los cuales llevan dos alelos defectuosos en el mismo locus. La conversión génica mitótica puede ser inducida con una amplia variedad de mutágenos, y probablemente todos los mutágenos activos en levadura pueden

también inducir conversión génica mitótica.

Zimmermann probó la habilidad de MNNG para inducir conversión génica mitótica en Saccharomyces cerevisiae. La frecuencia de conversión fue alta y se alcanzó a dosis de baja toxicidad.

Mutaciones Petite.

La mutación petite descrita ya anteriormente puede ser inducida con una frecuencia relativamente alta en Saccharomyces cerevisiae. Se ha demostrado en esta especie que una alta proporción de las mutantes petite inducidas con MNG son de tipo nuclear, mientras que la luz UV ha causado mutaciones predominantemente citoplásmicas. Sin embargo, hay reportes de que dependiendo de la fase del ciclo celular, en la cual se encuentren las células al momento del contacto con la MNNG, este mutágeno puede dañar preferentemente al DNA mitocondrial (8).

No obstante, en estudios con Schizosaccharomyces pombe, los análisis de tétradas y esporas al azar mostraron que todas las mutantes petite respiratorio-deficientes, inducidas por MNNG contenían defectos cromosomales, es decir correspondían a mutantes "pet" o segregacionales (8).

En Kluyveromyces lactis, una especie clasificada como petite negativa, la MNNG también indujo mutantes petite, sin embargo, todas resultaron nucleares (16).

Muchas de las mutantes inducidas por MNNG crecen muy lentamente; también se ha visto que en promedio, las mutantes inducidas por MNNG son menos viables que las inducidas por etilmetanosulfonato (22). No es de sorprender este lento

crecimiento, pues probablemente las sobrevivientes de un tratamiento drástico con MNNG son en su mayor parte mutantes múltiples en otras partes del genoma (22,20).

Mutantes inducidas por MNNG con defectos específicos en funciones mitocondriales de ambos orígenes, nuclear y citoplásmico, han sido ya reportadas (1).

Otro tipo de mutaciones como la resistencia a drogas, puede surgir por mutación nuclear o mitocondrial heredada (4,5,9). El tratamiento de células de S. cerevisiae con MNNG produjo mutantes resistentes unas a eritromicina y otras a oligomicina de origen cromosomal y citoplásmico. Se ha visto que la frecuencia de estas mutantes es función de la edad celular (12).

Experimentos hechos sugieren que las mutaciones en levadura inducidas por MNNG son predominantemente del tipo de sustitución en pares de bases (14).

La MNNG tiene una mayor letalidad en células en fase estacionaria de S. cerevisiae que en células en fase exponencial y la frecuencia de auxótrofas en células en fase estacionaria es casi dos veces más alta según lo demuestran algunos autores (12).

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

1.- Cepas de la levadura Kluyveromyces lactis empleadas.

KC5-1D	α , ade ₁ , leu, met
KF71-5A	a, ade ₂ , ura
KF82-4A	a, ura
RF82-2C	a, ura, his
KA5-11A	α , ade ₁
WM-37	a, his
KA6-8A	a, his
KF71-2D	a, ura

2.- Reactivos y medios de cultivo.

Amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0

K H₂ P O₄ 2.62 g

K₂ H P O₄ 7.0 g

Agua destilada cbp 1000 ml

Amortiguador de fosfatos-citrato pH 7.7

Na H₂ P O₄ (0.2 M) 28 g

Acido cítrico (0.1 M) 21 g

Agua destilada cbp 1000 ml

El pH se ajusta con Na OH 10 N

Amortiguador de fosfato-glucosa.

Solución de glucosa 117 mM

Solución de K H₂ P O₄ 200 mM. El pH de esta solución se ajusta a 4.5 con Na OH

Composición : 100 partes de la solución de glucosa, 8.7 partes de la solución de K_2HPO_4 .

Solución de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (20 μ g/ml)

Se disuelven 5 mg de M-N-N-G en 250 ml de solución amortiguadora de fosfato citrato pH 7.7

Solución de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (100 μ g/ml)

Se disuelven 25 mg de MNNG en 250 ml de solución amortiguadora de fosfato-citrato pH 7.7.

Las soluciones de M-N-N-G son preparadas inmediatamente antes de usarse.

Solución de β -glucuronidasa de concentración 2 mg/ml.

Solución de β -glucuronidasa de concentración 10 mg/ml.

Solución de Tween 80 al 0.5% en agua.

Aceite de parafina Sigma.

Medio completo con glucosa YPAD.

Extracto de levadura 1.0% (P/V)

Peptona de gelatina 1.0% (P/V)

Dextrosa 2.0% (P/V)

Agar 2.0% (P/V)

Sulfato de adenina 80.0 μ g/ml

Medio completo con glicerol YPAG.

Extracto de levadura 1.0% (P/V)

Peptona de gelatina 1.0% (P/V)

Glicerol 3.0% (V/V)

Agar 2.0% (P/V)

Sulfato de adenina	80.0 $\mu\text{g/ml}$
Medio completo con glucosa y glicerol	Y P A D G.
Extracto de levadura	1.0 % (P/V)
Peptona de gelatina	1.0 % (P/V)
Dextrosa	0.2% (P/V)
Glicerol	3.0% (V/V)
Agar	2.0% (P/V)
Sulfato de adenina	80.0 $\mu\text{g/ml}$

Medio completo con etanol Y P A E

Extracto de levadura	1.0% (P/V)
Peptona de gelatina	1.0% (P/V)
Etanol absoluto	3.0% (V/V)
Agar	2.0% (P/V)
Sulfato de adenina	80.0 $\mu\text{g/ml}$

El etanol se esterilizó por filtración, adicionándose al resto del medio una vez que éste estuvo estéril y a una temperatura inferior a los 45°C.

Medio completo con lactato Y P A L.

Extracto de levadura	1.0% (P/V)
Peptona de gelatina	1.0% (P/V)
Lactato de sodio al 50%	2.0% (V/V)
Agar	2.0% (P/V)
Sulfato de adenina	80.0 $\mu\text{g/ml}$

Medio mínimo S D

Base nitrogenada de levadura libre de aminoácidos (DIFCO)	0.67% (P/V)
---	-------------

Dextrosa	2.0% (P/V)
Agar	2.0% (P/V)

Medio con extracto de malta

Extracto de malta	5.0% (P/V)
Agar	3.0% (P/V)

Medio mínimo con aminoácidos

Base nitrogenada de levadura libre de aminoácidos (DIFCO)	0.67% (P/V)
Dextrosa	2.0% (P/V)
Agar	2.0% (P/V)

Los aminoácidos y bases púricas se adicionan al medio en diferentes combinaciones para formar medios selectivos carentes de uno o varios aminoácidos. La concentración final de aminoácidos o bases en el medio fue la siguiente:

Sulfato de adenina	2.0 mg % (P/V)
L-arginina	2.0 mg % (P/V)
L-histidina-HCl	2.0 mg % (P/V)
L-leucina	3.0 mg % (P/V)
L-lisina	3.0 mg % (P/V)
L-metionina	2.0 mg % (P/V)
L-triptofano	2.0 mg % (P/V)
Uracilo	2.0 mg % (P/V)

Medio de agar-tetrazolio T T C

Cloruro de trifenil tetrazolio	0.5 g
Glucosa	5.1 g

Agar

15.0 g

Se afora a un litro con agua destilada

Preparación: 5.1 g de dextrosa + 15 g de agar se aforaron a 1 litro con agua destilada y se esterilizó por 25 minutos en autoclave. Una vez esterilizado se le adicionaron 0.5 g de cloruro de trifenil tetrazolio y se agitó suavemente. Ya disuelto el TTC se esperó a que el medio tuviera una temperatura entre 45° C - 50°C antes de verterlo sobre las colonias de levadura.

Medio de disección

Ion agar

1.5% (P/V)

Las mutantes aisladas en este trabajo derivan de la levadura Kluyveromyces lactis cepa KC5-1D : α , ade₁, leu, met, sometida a mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina o luz ultravioleta.

Curvas de supervivencia.

Se elaboraron con objeto de ver qué dosis de mutágenos y tiempo de acción de estos eran los más eficientes en la inducción de las mutantes deseadas.

Curvas de Supervivencia con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

Se utilizó un cultivo fresco de 24 horas de la cepa KC5-1D, el cual fue puesto en contacto con la droga a diferentes dosis y tiempos, tomando muestras en cada uno de ellos, para poder determinar el tiempo en el cual se podía obtener el mayor número de mutantes viables; basándonos para ello en que estudios ya reportados dicen que esta probabilidad es mayor cuando la población celular mutagenizada decrece hasta un 10% de supervivencia, pues se ha visto que a una supervivencia mayor las células no alcanzan un estado mutante estable y tienden a revertir muy pronto; y a una supervivencia menor la letalidad en las células es mayor y por tanto muchas mutantes posibles se pierden, logrando aislarse sólo unas cuantas (1,28).

También se probaron dos dosis para precisar cual era más efectiva, pues se deseaba que el efecto tóxico de la droga fuera tal, que sin ser totalmente letal si fuera capaz de producir una mutación en las células.

Técnica:

1.- Tres asadas (con una asa de siembra de 3 mm. de diámetro) de un cultivo fresco de 24 horas de la cepa a mutagenizar, se suspenden en un tubo con 10 ml. de amortiguador de fosfatos pH 7.0 con objeto de tener una concentración de 10^8 cél/ml, pues calculando que una asada completa contiene 4.5×10^8 células, tres asadas de células suspendidas en 10 ml darán una concentración aproximada de 1.35×10^8 cél/ml. Esta concentración se confirma contando las células en una cámara de recuento celular de Neubauer.

2.- La solución de nitroso metilguanidina (MNNG) debe ser preparada justamente antes de ser usada, pues la MNNG sufre rápida descomposición en estas condiciones. Disolver 5 mg de MNNG en 250 ml de amortiguador de fosfatos citrato pH 7.7 estéril, contenido en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, todo esto en condiciones estériles. Agitar hasta disolución completa.

3.- 10 ml de la solución de MNNG se colocan en un matraz Erlenmeyer de 50 ml estéril, y 10 ml de amortiguador de fosfatos citrato sin MNNG se colocan en un segundo matraz, el cual servirá como testigo. Los matraces se preincuban por 5 minutos a 30°C con objeto de que las soluciones tomen la temperatura deseada al momento de adicionar las células; al cabo de este tiempo, los matraces son inoculados con 1 ml de la suspensión celular preparada en el paso 1 y en este momento se toma la primera muestra, que corresponderá al tiempo cero; y a partir de aquí se toman alícuotas de estos matraces cada 10 minutos durante dos horas. La incubación se lleva a cabo en un baño de agua a 30°C con agitación constante.

Cada muestra tomada es diluida en una serie de tubos conteniendo cada uno 10 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.0, hasta tener para los testigos, que serán las muestras incubadas sólo en amortiguador, una dilución de 10^3 y para los problemas diluciones que van desde 10^3 hasta 10^5 . De estas diluciones finales se sembrarán alícuotas de 0.2 ml en cajas de Petri con medio YPAD con objeto de que crezcan aproximadamente 200 colonias en cada caja. Al tomar las muestras de los matraces, éstas se colocan inmediatamente en baño de hielo para que el mutágeno ya no siga actuando. Una vez que se han sembrado todas las muestras, se incuban en una estufa a 30°C por un período de tiempo que puede ir de 48 a 72 horas o un poco más, dependiendo del crecimiento que vayan teniendo las colonias supervivientes. Normalmente a las 72 horas ya se observan colonias definidas, las cuales se clasifican por tamaños en: chicas, medianas y grandes. Se procede a contar las colonias y así estimar el verdadero porcentaje de supervivencia obtenido de acuerdo con el crecimiento en los testigos.

A partir de las curvas de supervivencia se determina el tiempo al cual se obtiene el 10% de supervivencia y es a este tiempo al que se efectúan propiamente ya las mutagénesis, ahora sí seleccionando todas las mutantes posibles.

Aislamiento de mutantes. Pruebas selectivas de identificación.

Una vez que se han desarrollado las colonias supervivientes después de la mutagénesis, se seleccionan las posibles mutantes

respiratorio-deficientes replicando estas colonias en medio YPAG; este medio es selectivo para aislar mutantes con deficiencia respiratoria por contener glicerol, el cual es un sustrato no fermentable y por tanto las colonias con esta deficiencia, no podrán desarrollarse en este medio. Las colonias replicadas en medio con glicerol, se incuban a 30°C durante 48 a 72 horas, para asegurar que efectivamente las posibles mutantes no crecen en glicerol; al cabo de este tiempo, se sacan de incubación y se comparan con las que se tienen en YPAD, seleccionando todas aquellas colonias, que habiendo crecido en YPAD, no muestren desarrollo alguno en medio YPAG. Después de esta primera selección se crecen nuevamente en medio completo y se vuelven a probar una vez más en glicerol, pero ahora diluyendo cada colonia en 0.2 ml de amortiguador de fosfatos y sembrando por gota en ambos medios (medio con dextrosa y medio con glicerol con ayuda de un cepillo de siembra). Las cajas se incuban a 30°C durante 72 horas, observando su desarrollo cada 24 horas y al cabo de este tiempo, se comparan los crecimientos en ambos medios. Si las colonias consideradas como posibles respiratorio deficientes persisten en no crecer en glicerol, podemos considerar mayor la probabilidad de que efectivamente lo sean, ya que pudiera ser que no se tratara realmente de una deficiencia respiratoria, sino que estas colonias únicamente tuvieran alterada alguna vía relacionada con el metabolismo del glicerol. Por tanto, las colonias aisladas se siembran en medios con otros sustratos como lactato y etanol que requieren una mitocondria funcional para su metabolismo; la ausencia de crecimiento en estos medios, permite descartar que la deficiencia sea a nivel del metabolismo del

glicerol y nos hace suponer que la mutación sufrida por estas células, alteró realmente su capacidad respiratoria, debido a un daño ya sea a nivel del DNA nuclear o mitocondrial (3).

Prueba de reducción del colorante Rojo de Tetrazolio.

Las mutantes de levadura respiratorio deficientes no reducen ciertos colorantes redox, tales como el cloruro de trifenil tetrazolio para formar un rojo de formazán (10).

Para detectar mutantes respiratorio deficientes en una población mixta, las células de levadura son sembradas en placas con medio diferencial de YPADG. Se calcula sembrar una dilución de células, que de un crecimiento aproximado de 200 colonias en cada caja de YPADG. Una vez que se tiene crecimiento en este medio, se cubren las cajas con una capa de medio agar-tetrazolio y se guardan en la oscuridad. El desarrollo del color puede tomar varias horas. Las células que respiran normalmente se tornarán rojas, mientras que las colonias respiratorio-deficientes permanecen blancas o toman un color levemente rosado.

Procedimiento.

1.- Placas de YPADG previamente sembradas y en las cuales ya hayan desarrollado colonias aisladas en un número de 200 colonias por caja.

2.- El medio de agar tetrazolio a 45°C es vertido suavemente sobre la superficie de la placa de YPADG hacia la orilla externa hasta que cerca de la mitad de la superficie sea cubierta. Entonces la placa es inclinada suavemente para cubrir la mitad remanente de la superficie. Si la capa de medio es vertida demasiado rápido, esto causará que las colonias se disgreguen.

3.- Incubar las placas en un cuarto de temperatura constante en un compartimento obscuro, dado que la luz interfiere con el desarrollo del color (De una a tres horas pueden ser suficientes para ver el desarrollo del color).

Las colonias respiratorio-deficientes deberán ser pequeñas y blancas, o casi blancas, mientras que las respiratorio-competentes reducirán al colorante, acumulando el formazán que las teñirá de rojo.

Mutagénesis con luz ultravioleta.

A partir de un cultivo fresco de 24 horas se toman tres asadas de células que se diluyen en un tubo conteniendo 10 ml de agua, ésto nos dará una concentración aproximada de 10^8 cel/ml, cifra que se verifica contando las células en una cámara de Neubauer para saber qué número de células se mutageniza realmente.

La lámpara de luz UV para la mutagénesis está dentro de una

campana de vidrio y su poder radiante es de $19 \text{ erg/mm}^2/\text{seg}$. Esta lámpara se enciende 15 minutos antes de iniciar la mutagénesis con objeto de esterilizar el ambiente. La mutagénesis se efectúa en la obscuridad, así como las diluciones y siembras posteriores como medida para evitar la reparación por foto-reactivación.

La suspensión celular se vacía en una caja de Petri de vidrio previamente esterilizada y envuelta en papel de aluminio, la cual se destapa al momento de comenzar a irradiar. Durante la irradiación la suspensión debe de estar en agitación continua con objeto de que aquélla sea homogénea; para ello se utiliza un agitador magnético. Desde el momento en que las células son expuestas a la luz UV se comienzan a tomar muestras cada 20 segundos por espacio de 5 minutos, tomando la primera al tiempo 0. Cuando ya han sido tomadas todas las muestras se preparan con ellas diluciones: 10^5 , 10^4 , 10^3 y se siembran alícuotas de 0.2 ml de cada una, en cajas de medio completo de YPAD para ver a qué dilución se tienen 200 colonias por caja. La muestra testigo se toma de la suspensión celular antes de irradiarla.

Las cajas sembradas se cubren con un paño oscuro para protegerlas de la luz y se incuban a 30°C durante 48 a 72 horas; al cabo de este tiempo, se observa si ya hay formación de colonias y si es así, se procede a contarlas con objeto de elaborar la curva de supervivencia y poder determinar el porcentaje de colonias viables a diferentes tiempos.

En el caso de la luz UV, se seleccionaron los tiempos que registraron 1 y 10% de supervivencia, pues se considera que a estos porcentajes se obtienen mutantes más estables. Ya

determinados estos tiempos las mutagénesis posteriores con UV se hacen hasta alcanzar sólo el 10% y el 1% de supervivencia y las posibles mutantes aisladas se seleccionan en igual forma que las obtenidas por tratamiento con MNNG; haciéndoles también pruebas en lactato, etanol y la prueba de reducción del tetrazolio.

Las posibles mutantes aisladas se someten continuamente a purificación con objeto de estabilizar el carácter mutante, pues pudiera ser que una colonia reversa apareciera y al ser competente respiratoria creciera más rápido y en poco tiempo dominara la población, enmascarando así a las células respiratorio-deficientes.

Esta purificación junto con la prueba de crecimiento en glicerol, se efectúa por lo menos cada 30 días.

Determinación de los marcadores de auxotrofia de las mutantes aisladas.

Ya que para la caracterización genética, es preciso cruzar a las mutantes con cepas respiratorio-competentes, se les determinan sus marcadores de auxotrofia, pues en las cruzas las cepas deben tener marcadores complementarios para que pueda haber crecimiento de los cigotos en medio mínimo. La determinación de marcadores de auxotrofia, también nos dirá si los mutágenos empleados, aparte de inducir mutaciones con carácter respiratorio-deficiente, produjeron simultáneamente mutaciones auxotróficas. Para ello probamos a las mutantes en medio mínimo y medio SD suplementado con diferentes combinaciones de aminoácidos.

Una vez sembradas todas las mutantes en cada medio selectivo, se incuban a 30°C y se espera su crecimiento en cada

uno de los medios, en un término de 24 a 48 horas, al cabo del cual se hacen las lecturas de las cajas, comparando el crecimiento en cada medio con respecto al crecimiento en medio completo y se ve entonces qué requerimiento adicional necesita cada mutante para crecer.

Pruebas para determinar factor de compatibilidad.

Puesto que para que haya conjugación entre dos cepas éstas necesitan ser de factor de compatibilidad opuesto, fue preciso determinar éste en cada mutante para poder llevar a cabo los experimentos de cruce con las cepas; aunque en principio se supone heredan el de la progenitora y éste no se ve alterado durante la mutagénesis.

Para esto, se escoge una cepa cuyo factor de compatibilidad es conocido y complemente en cuanto a marcadores de auxotrofia con las mutantes. Se eligen cepas de factor a y cepas de factor α, y dependiendo con cual de ellas se crucen las mutantes, el factor de éstas será contrario al de la cepa con la cual hubo conjugación.

Para cruzarlas es necesario partir de cultivos frescos de 24 horas. Las cruces se efectúan en medio de extracto de malta de la siguiente manera:

En un volumen de 0.5 ml de amortiguador de fosfatos se resuspende un inóculo de la cepa mutante y también se coloca un inóculo de la cepa de factor conocido. Se mezclan muy bien ambas cepas y por medio de un cepillo de siembra se depositan gotas de esta mezcla sobre placas con medio de extracto de malta; las cajas se incuban a 30° C durante 24 a 96 horas, haciendo observaciones

al microscopio cada 12 horas en busca de cigotos. La presencia de cigotos será indicio de que ha habido conjugación entre las cepas. Independientemente de la observación al microscopio, se replican los cultivos de la crucea en medio mínimo a las 24 y a las 48 horas de haber cruzado las cepas, pues puede ser que en ocasiones los cigotos no se lleguen a ver debido a que su número sea escaso, pero la aparición de colonias en medio SD es indicio de que sí hubo crucea.

Caracterización de las mutantes.

Al caracterizar genéticamente a las mutantes obtenidas, estaremos en condiciones de determinar si la mutación sufrida es de origen nuclear, o por el contrario si se trata de una mutación extracromosómica sufrida en la mitocondria, ya que se trabaja con mutantes respiratorio-deficientes. Esto se determinará basándose en el tipo de segregación que dé el carácter mutante al cruzar a las cepas; se sabe que cuando la mutación es de tipo nuclear la segregación de ésta sigue las leyes de Mendel y por el contrario, cuando es de origen citoplásmico muestra un patrón diferente al Mendeliano. Por tanto, para estudiar el tipo de herencia de las mutantes, se cruzan con cepas respiratorio competentes. Para los experimentos de conjugación nos apoyamos en el hecho de que en algunas especies de levaduras y entre ellas Kluyveromyces lactis, las células haploides de factor de compatibilidad opuesto se cruzan y pasan por una fase diploide, la cual en condiciones normales es inestable y por tanto susceptible de sufrir meiosis y esporular formando ascas que

encierran 4 ascosporas (retornando así la levadura a la fase haploide), las cuales al germinar nos permitirán estimar de qué manera segregaron las mutantes con respecto al carácter respiratorio-deficiente (25). El método de cruza ya ha sido detallado.

Aislamiento de diploides para ver el tipo de segregación mitótica

Una vez que ha sido detectada la conjugación por crecimiento de diploides en medio mínimo se procede a hacer una resiembra de ellos en el mismo medio, pero ahora por dilución, para que crezcan colonias aisladas. Esto tiene por objeto estabilizar el fenotipo de las clonas zigóticas, ya que éstas en el primer cultivo de SD todavía no tienen un genotipo extracromosómico estable (y por tanto su segregación puede ser muy variable), esto se logra al dejar transcurrir aproximadamente 40 generaciones, que se calcula se alcanzan durante su segundo aislamiento en medio SD. Una vez que se detectan colonias aisladas en este medio, con un diámetro aproximado de 1 mm, se replican en medios selectivos y en extracto de malta para inducir la esporulación.

A pesar de que el estado diploide en esta levadura es sólo transitorio, en medio mínimo, este estado se puede mantener por varias generaciones.

Los diploides se replican en medio con glicerol para ver la segregación mitótica con respecto al carácter respiratorio-deficiente y en medio completo que servirá como testigo. Los cultivos se incuban a 30°C de 24 a 48 horas; al cabo de este tiempo se cuenta el número de colonias diploides que crecieron en glicerol y de acuerdo a este resultado se determina si la

mutación de deficiencia respiratoria es de carácter extracromosómico o nuclear, y en este último caso si es dominante o recesiva; si se registra un 100% de crecimiento de los diploides en glicerol, esto indicaría que la mutación es de tipo recesivo, pero si por el contrario no hubiera crecimiento, significaría que es de carácter dominante. Por otra parte, si hay una mezcla de clonas que crecen y otras que no lo hacen, se podrá sospechar que la mutación es extracromosómica.

Determinación de segregación meiótica por aislamiento y análisis de tétradas.

Cuando las células replicadas en medio de extracto de malta comienzan a esporular, se procede al aislamiento de las esporas, lo cual se puede hacer por dos técnicas: disección de tétradas y análisis de esporas al azar.

Disección de Tétradas:

Consiste en la digestión de la pared del asca y en la separación de las esporas por medio de una aguja bajo el microscopio; para que una vez aisladas las esporas, procedentes de cada asca, sean puestas a germinar por separado, pero en forma ordenada, de tal manera que sea posible identificarlas como procedentes de una misma tétrada.

La disección de tétradas se hizo siguiendo la técnica de Mortimer y Hawthorne (19): una vez que se tiene a las células esporulando en medio de extracto de malta se toma una pequeña muestra del cultivo y se suspende en 0.3 ml de agua estéril, se agita hasta tener una suspensión homogénea y se adicionan 0.1 ml

de la enzima glucuronidasa (2 mg/ml), se agita nuevamente y se deja actuar la enzima por espacio de 10 minutos, con objeto de que la enzima digiera la pared del asca y libere las esporas.

Se hacen observaciones al microscopio para ver el momento en que la mayoría de las tétradas han sido liberadas, pero sin que las esporas se disgreguen, cosa que puede suceder si la enzima se deja actuar más tiempo. Cuando la mayoría de las ascas se ha roto se para la reacción poniendo la preparación en hielo.

En un bloque de medio de agar purificado al 1.5% se pone una asada de la muestra ya digerida en posición horizontal, este bloque va montado en una cámara especial que se colocará sobre la platina del microscopio, bajo el cual se harán las disecciones con ayuda de un micromanipulador Leitz y una aguja de vidrio muy delgada. Una vez separadas las esporas de varias tétradas, se deposita el bloque de agar sobre una caja con medio completo para que germinen éstas y se incuban a 30°C durante 48 a 72 horas. Una vez que las esporas han formado una colonia, se cuentan y se obtiene el porcentaje de germinación y entonces se pasa una por una, ordenándolas de acuerdo a su tamaño a una caja con medio de YPAD, esparciéndolas suavemente con un palillo estéril. Una vez que han desarrollado se replican en medios selectivos para ver el tipo de herencia que muestran.

Análisis de esporas al azar.

Este análisis aparte de darnos información sobre la segregación meiótica, también nos permite establecer pruebas de ligamiento o detectar eventos de recombinación entre genes.

La técnica consiste en que una vez que se tienen los

cultivos esporulando, se toma un inóculo de estas células y se suspende en 1 ml de agua estéril, se adiciona 1 ml de glucuronidasa (10 mg/ml) dejándose actuar a la enzima por 30 minutos hasta que las ascas sean digeridas; cuando la mayoría de las tétradas están libres se separan las esporas por medio de sonicación. El tiempo de sonicación varía de 4 a 7 minutos, dependiendo de cada cepa; por lo que durante este proceso deben hacerse inspecciones al microscopio para asegurarse de que no se están destruyendo las esporas.

Luego de separar completamente las esporas se procede a aislarlas de las células vegetativas que también se encuentran en la población; para esto se adiciona a la suspensión 1 ml de aceite mineral y se agita muy bien; después se dejan separar las dos fases que se formaron: acuosa y lipídica. En la fase oleosa quedarán suspendidas sólo las esporas y las células vegetativas quedarán asentadas en la fase acuosa, esto es debido probablemente a la diferente constitución de la pared celular de las esporas con respecto a las células vegetativas, que hace que tengan diferente afinidad por el aceite, permitiendo esto su separación (24,27).

Ya separada completamente la fase oleosa, se toma una muestra de ella y se observa al microscopio para constatar que efectivamente en ella, sólo han quedado las esporas; entonces se toma la fase oleosa con mucho cuidado y se transfiere a un tubo con 10 ml de agua y a partir de él se hacen diluciones: 10^5 , 10^4 y 10^3 , de las cuales se siembran alícuotas en placas de YPAD, incubándose éstas a 30°C durante 48 a 72 horas, tiempo que

tardarán en germinar aproximadamente las esporas.

Los tubos de agua para las diluciones contienen el detergente tween 80 a una concentración de 0.5% con objeto de que la suspensión sea más homogénea ya que lo que realmente tenemos es una emulsión del aceite con el agua y esto hace difícil la homogeneización de la mezcla.

Cuando las esporas han germinado se las crece en medios selectivos y se les determina el tipo de segregación que muestran (24,25,27).

Curvas de crecimiento.

Fue preciso elaborarlas ya que los estudios de oximetría, análisis de citocromos, así como las cruizas, requerían que las células se encontraran en fase estacionaria de crecimiento y el tiempo al cual la alcanzan se obtuvo realizando una curva de crecimiento de cada cepa. Esta curva también permitió conocer el tiempo medio de generación de las mutantes y relacionarlo con el de la cepa progenitora, dato que es importante, pues nos permitirá saber la extensión del daño en las mutantes con respecto a la progenitora y qué tanto difieren las mutantes entre sí.

Para las curvas de crecimiento, se suspendió un inóculo de un cultivo fresco de 24 horas de la cepa en estudio, en matraces nefelométricos conteniendo 100 ml de medio YPAD a una concentración celular de 10^6 células por ml de medio. Los matraces se incuban a 30°C en agitación constante y a partir de este momento se registró la densidad óptica cada 30 minutos en un fotocolorímetro Klett-Summerson a 640-700 nm (filtro rojo), hasta

que se alcanzó la fase estacionaria del cultivo. Se hizo una gráfica de densidad óptica contra tiempo en papel semilogarítmico y de aquí se obtuvo el tiempo en el cual las cepas llegaban a la fase estacionaria, así como el tiempo medio de generación de cada cepa.

Medida de la capacidad respiratoria.

El consumo de oxígeno por las mutantes también nos mostraría el grado de deficiencia respiratoria de éstas, por tanto, se realizaron oximetrías con cada una de las cepas mutantes, la progenitora y alguna otra cepa silvestre con el fin de relacionar el consumo de oxígeno de las mutantes, con cepas respiratorio-competentes.

Se hicieron cultivos en medio líquido y una vez que estos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento, se colectaron las células del medio por centrifugación a 3500 rpm durante 6 minutos, lavándose luego tres veces con agua destilada estéril, todo esto también en condiciones estériles; después de lavadas, las células se resuspendieron en el mínimo volumen de agua, aproximadamente 0.5 ml de agua y se determinó el consumo de oxígeno en un oxímetro equipado con un electrodo de Clark y un graficador; la determinación se llevó a cabo colocando 200 μ l de la suspensión celular en 3 ml de amortiguador de fosfato-glucosa pH 4.5 y se detectó el consumo de oxígeno de cada cepa.

Para relacionar el oxígeno consumido por cada cepa, con la cantidad de células de ésta que se emplearon, se determinó el peso seco de la muestra de la siguiente manera: 24 horas antes

del experimento, se pusieron planchetas en un horno a 60°C hasta que alcanzaron un peso constante; después se tomó una muestra de 200 ul de la suspensión celular ya lavada y resuspendida y se depositó en la plancheta, se volvió a secar en el horno por 12 horas, hasta que la muestra estuvo seca y por diferencia de pesos se obtuvo el peso seco de las muestras, el cual al relacionarlo con el consumo de oxígeno nos permitió medir el oxígeno consumido por minuto, por mg de peso seco de levadura.

Pruebas Bioquímicas.

Una de ellas es ver el grado de alteración de los citocromos de la cadena respiratoria, mediante el análisis cualitativo de los espectros de citocromos.

Las mutantes respiratorio-deficientes presentan anormalidades en su composición de citocromos, de tal manera que los citocromos "b" y "a + a₃" se encuentran muy disminuidos o ausentes; razón por la cual el análisis de citocromos en las mutantes aquí obtenidas, confirmará su carácter respiratorio-deficiente y nos dará una idea más precisa del daño sufrido (17).

Para el análisis de citocromos también se parte de las células en fase estacionaria de crecimiento, preparadas en igual forma que para los experimentos de oximetría.

Una vez que se tiene el paquete celular ya lavado y resuspendido en un volumen de agua igual al que ocupan las células, se hace una cuenta de células de esta suspensión en una cámara de Neubauer y de acuerdo a ella se hace la dilución necesaria para tener la concentración requerida en la determinación de espectros, que es de 10^{10} cél/3ml. Una vez que se tiene

esta concentración se toman 3 ml de ella y se vierten en una celdilla a la que se agrega una pizca de bisulfito de sodio, el cual reducirá los citocromos. Esta suspensión debe agitarse antes de correr el espectro, pues algunas cepas de levadura tienden a sedimentarse con cierta rapidez. Como blanco, se emplea una solución de leche, preparada con leche descremada "Difco", que contenga 1.35 g de leche en 9.4 ml de agua, y a partir de esta solución se hacen diluciones: 2:5, 1:5, y 1:10, empleándose la dilución de leche más apropiada.

Una vez que se tiene el blanco y las muestras de células, se corre el espectro de absorción de citocromos en un rango de 480 a 615 nm. Para esta determinación se usó un Espectrofotómetro Perkin-Elmer de doble rayo, con la cepa progenitora como patrón o testigo.

Pruebas de alelismo.

Como punto final de este estudio, se realizaron pruebas de alelismo con las mutantes con objeto de saber si la mutación de deficiencia respiratoria que impide crecer a las mutantes en glicerol, está en el mismo locus en las distintas mutantes obtenidas, o por el contrario si se encuentran en diferentes sitios del genoma.

Para esto fue necesario cruzar a las mutantes entre sí y después ver si los diploides surgidos de esta conjugación, aún siendo las dos progenitoras respiratorio-deficientes, eran capaces de crecer en medio con glicerol.

Como todas las mutantes resultaron de factor de

compatibilidad α , no era posible cruzarlas, a menos que hubiera fenómenos de homotalismo entre ellas, lo cual en K. lactis depende de cada cepa en particular. Para poder cruzarlas fue necesario realizar una cruce de las mutantes con cepas de factor de compatibilidad opuesto, o sea cepas a, con el objeto de que en la progenie se tuvieran aparte de esporas α , esporas a con el carácter de deficiencia respiratoria. Se trató por lo tanto de aislar todas aquellas esporas de factor de compatibilidad a que a su vez mostraran crecimiento negativo en glicerol y que fueran de marcadores de auxotrofia complementarios con las mutantes α , para que la cruce se pudiera efectuar.

Para determinar el sexo de las esporas se emplearon las cepas siguientes:

Cepa	Factor de compatibilidad	Marcadores de auxotrofia
KA5-4C	a	ade
KA5-11A	α	ade ₁
WM-37	a	his
KF71-5A	a	ade ₂ , ura
KF82-2C	a	ura, his

Una vez que se tuvieron las cepas respiratorio-deficientes a, se cruzaron con las α para determinar si las mutaciones de deficiencia respiratoria se localizaban en el mismo locus o en un locus distinto. Después de confirmada la conjugación por observación de cigotos al microscopio y aislamiento de los diploides formados en medio mínimo, estos se replicaron en medio con glicerol para observar si había crecimiento en este medio.

El crecimiento de los diploides en glicerol será indicio de

que las mutaciones que impiden el crecimiento en este medio están en sitios diferentes del genoma, es decir, que son no alélicas. Pero si no se observa crecimiento en glicerol, esto indicaría que se trata de mutaciones en un mismo locus, es decir, que las mutaciones son alélicas.

RESULTADOS

KC5-1D fue la cepa de la levadura Kluyveromyces lactis seleccionada para inducir en ella mutantes respiratorio-deficientes; usando como mutágenos luz ultravioleta y N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG).

Antes de someterla a mutagénesis, la cepa se purificó para tener la seguridad de que se trabajaría con células provenientes de una misma colonia y por lo tanto con una población más homogénea. Una vez purificada, se le comprobaron sus requerimientos de auxotrofia. A esta cepa, aún teniendo requerimientos auxotróficos la llamamos silvestre, porque lo es con respecto al carácter mutante que se persigue inducir en ella.

Los marcadores de auxotrofia determinados resultaron ser los mismos de la cepa original.

Una vez comprobado el fenotipo de la cepa, que fue: ade_1^- , leu^- , met^- , se realizaron las curvas de supervivencia empleando separadamente los dos mutágenos elegidos.

Se realizaron varias curvas de supervivencia con los dos mutágenos y todas ellas resultaron coherentes, mostrando sólo una pequeña variación con respecto al tiempo en que se debería dejar actuar el agente mutagénico, para obtener un 10% y un 1% de supervivencia, que es lo que se perseguía y determinar la dosis más adecuada en el caso de la MNNG. Para ilustrar esto, se muestran algunas curvas de supervivencia con los mutágenos empleados (Figuras 4, 5, 6 y 7).

Como puede apreciarse, al mutagenizar la cepa KC5-1D con MNNG se obtuvieron resultados diferentes según la dosis empleada.

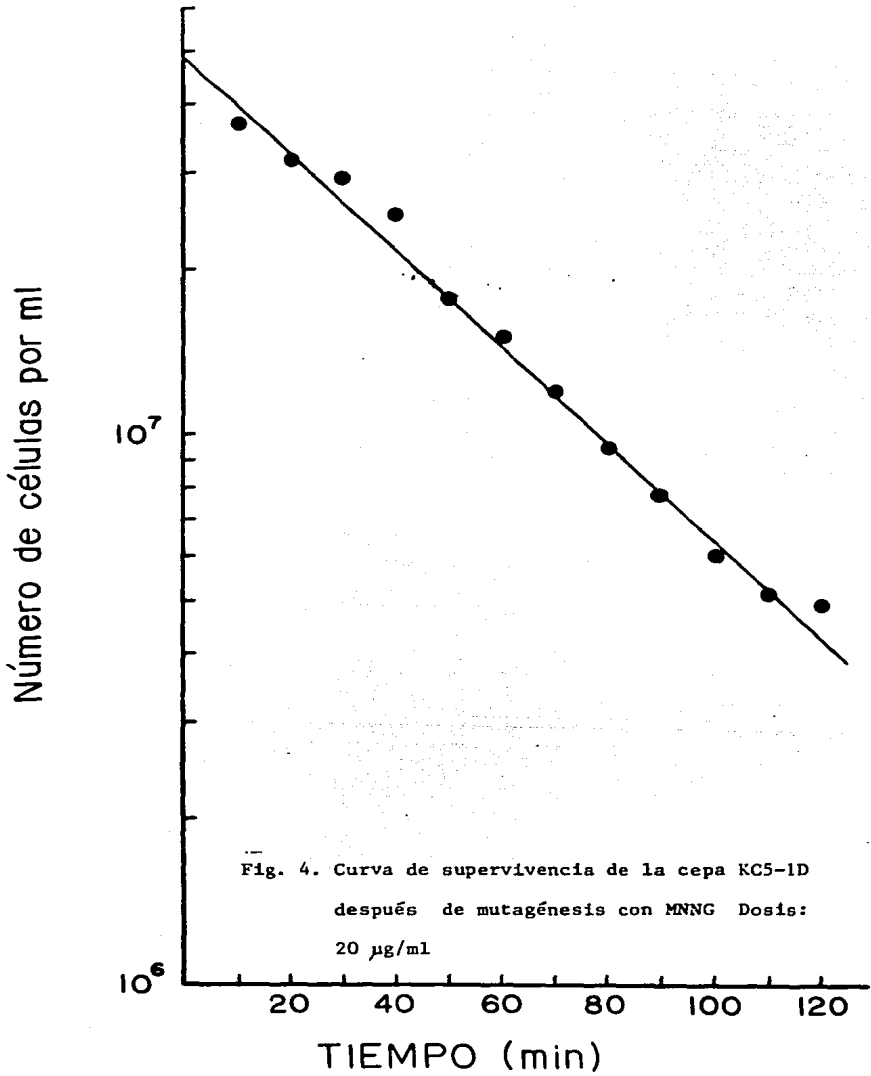


Fig. 4. Curva de supervivencia de la cepa KC5-1D después de mutagénesis con MNNG Dosis: 20 $\mu\text{g/ml}$

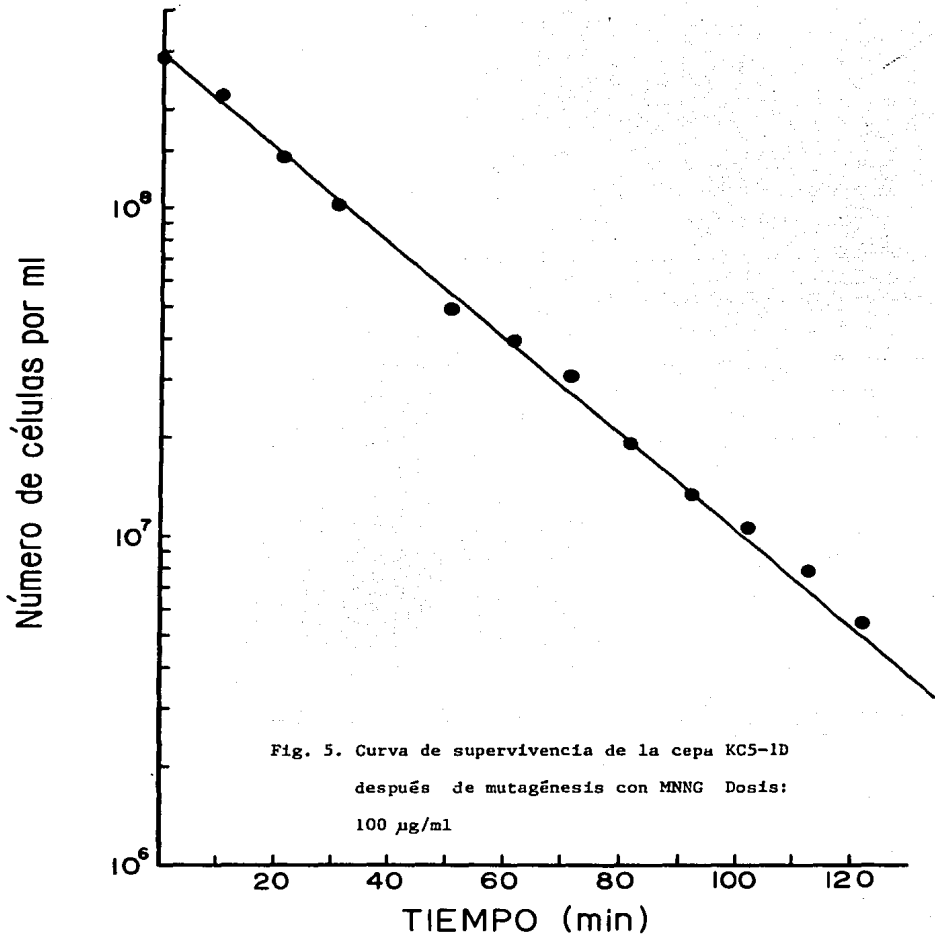
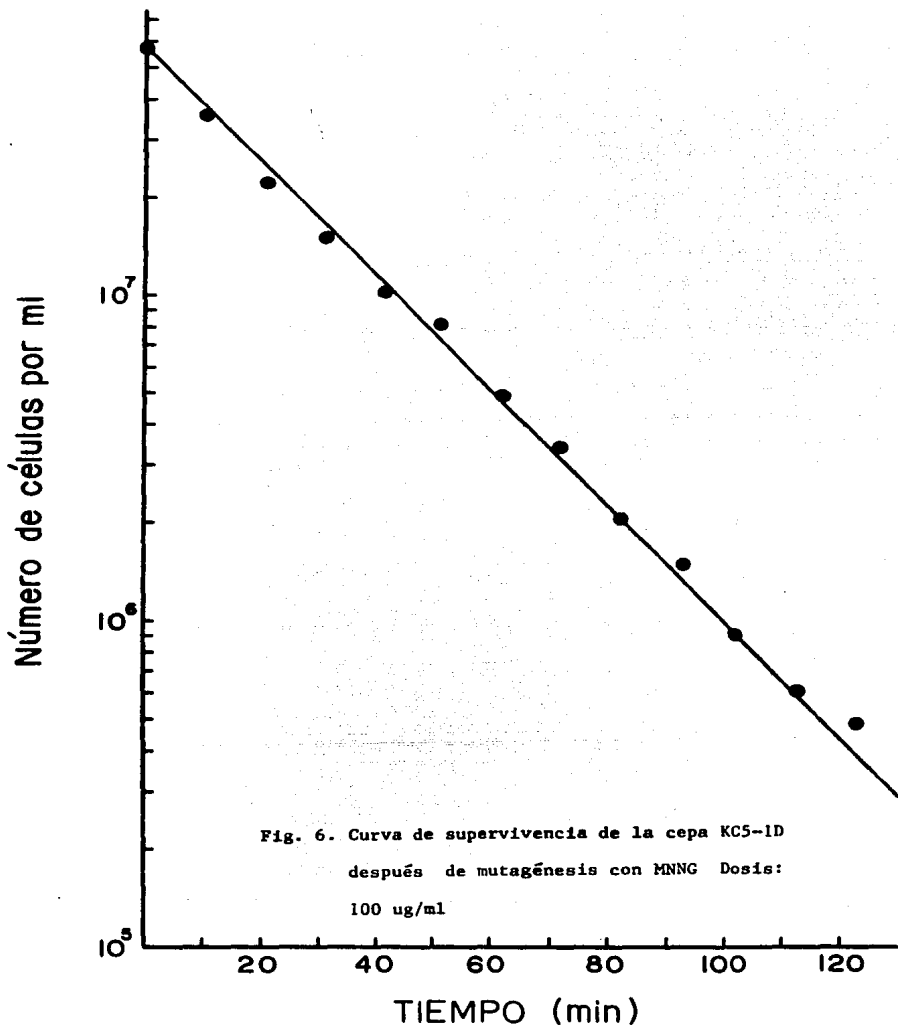
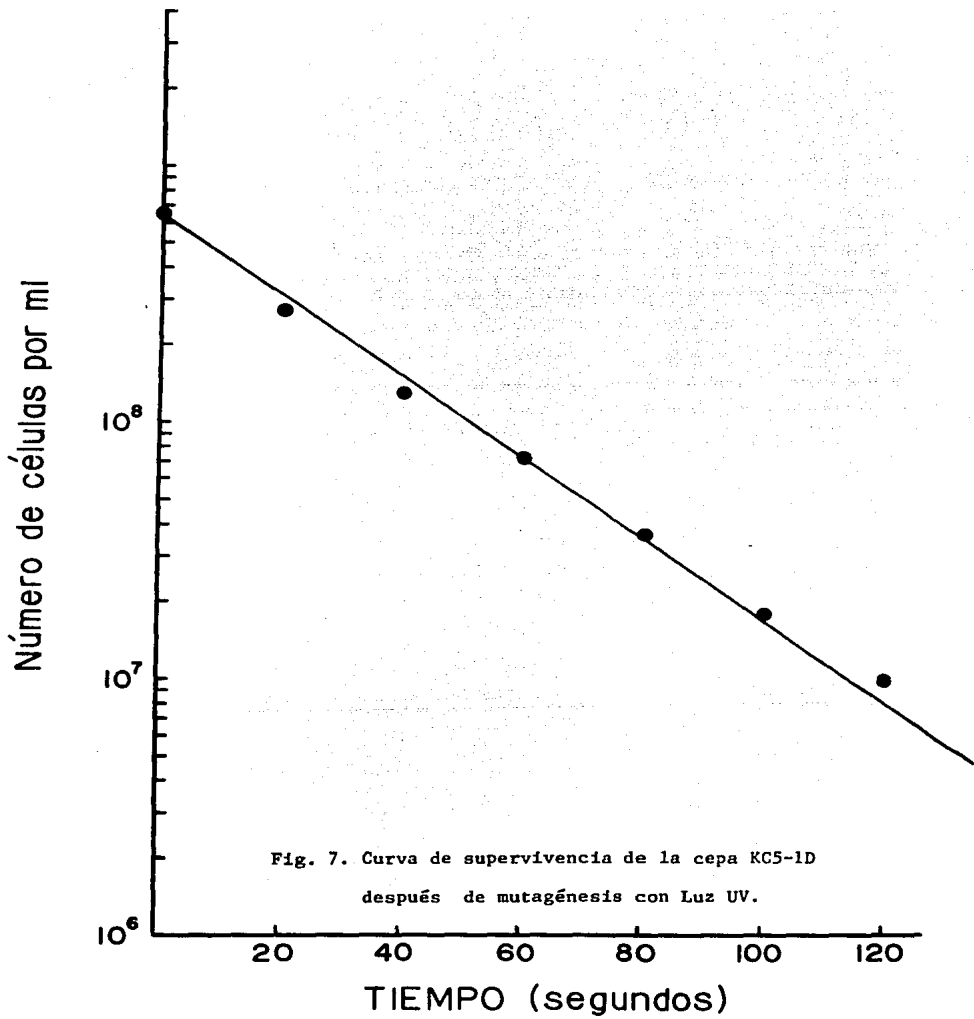


Fig. 5. Curva de supervivencia de la cepa KC5-1D
después de mutagénesis con MNNG Dosis:
100 µg/ml





Cuando se mutagenizó con una dosis de MNNG de 20 µg/ml, el tiempo en el que se alcanzó el 10% de supervivencia fue en promedio, de 120 minutos; para obtener el 1% se requerirían tiempos de tratamiento muy prolongados. A la dosis de 100 µg/ml, el 10% de supervivientes se obtuvo a los 55 minutos. Valorando estos datos se eligió la dosis de 100 µg/ml, porque nos permitió alcanzar un 10% y un 1% de supervivencia dentro de límites de tiempo de tratamiento razonables.

Con respecto a la luz UV se observó que a los 60 segundos, la supervivencia celular era ya de un 10%; no obstante, también se mutagenizó hasta un 1% de supervivencia, el cual se logró a los 114 segundos. Una vez establecidos los tiempos a los cuales se efectuarían las mutagénesis se iniciaron éstas.

Mutagénesis con MNNG

Se realizaron varias mutagénesis con MNNG y los resultados de algunas de ellas se ilustran en la tabla No. 1, por ser las que nos dieron las mutantes más estables. De una primera mutagénesis se obtuvieron un total de 42 posibles mutantes a partir de 1450 colonias sembradas; sin embargo, al cabo de 6 semanas, de estas 42 sólo sobrevivieron 7, de las cuales a su vez 4 tendieron a revertir con el tiempo, a pesar de las constantes purificaciones que se hicieron a las cepas, logrando mantener de esta primera mutagénesis sólo 2 mutantes estables hasta la fecha.

Esta tendencia de las células a revertir, se observó en todas las mutagénesis realizadas, dando como resultado un número

bajo de mutantes estables.

Mutagénesis con luz ultravioleta.

Las radiaciones ultravioleta parecen resultar más efectivas en la inducción de mutantes, ya que en las primeras pruebas se tiene un índice mayor de mutantes que las que se originan con la MNNG (tabla No. 2), sin embargo, a las primeras semanas de aisladas, su tendencia a revertir es mayor que las inducidas con MNNG; no obstante tomar medidas para evitar una posible foto-reparación, ya que se siembra en la obscuridad y los cultivos se mantienen también protegidos de la luz durante su incubación. A pesar de todo, un compuesto que mejoró la estabilidad de las mutantes obtenidas con UV fue la adición de cafeína al medio de cultivo, donde se aislaron las células después de mutagenizarlas. La cafeína se empleó porque se ha reportado que esta metil xantina, es un inhibidor de los procesos de reparación en la obscuridad (13).

Otra posible causa del bajo número de mutantes aisladas con luz UV y con MNNG, es que las células sometidas a mutagénesis, no estaban en fase de crecimiento sincronizados, pues se ha visto que cuando los cultivos están en fase "M" o en fase "S" del ciclo celular, se tiene mayor incidencia de mutantes (8,12).

La efectividad de la cafeína se comprobó, ya que en las primeras mutagénesis no se empleó y el número de mutantes estables fue casi nulo, (3%); número que se elevó cuando el medio de cultivo fue suplementado con ella (8-28%).

Sin embargo, el número de mutantes estables aisladas con luz UV fue pequeño en comparación con las obtenidas con MNNG.

Tabla No. 1

Mutagénesis con M N N G. Dosis 100 µg/ml

Mutagénesis No.	Tiempo (minutos)	% Supervivencia	Mutantes aisladas	Mutantes estables	% de Mutantes estables
1	55	8.7	42	2	4.8
2	55	11.8	64	14	21.9
3	55	12.4	9	0	0.0
4	55	11.3	15	4	26.7
5	40	14.2	18	5	27.8

Tabla No. 2

Mutagénesis con Luz Ultravioleta. Dosis 19 ergs/mm/seg.

Mutagénesis No.	Tiempo en segundos	% Supervivencia	Mutantes aisladas	Mutantes estables	% de mutantes estables
1	57	10.0	51	4	7.8
2	57	10.0	45	3	6.7
3	114	1.0	16	3	18.7
4	114	1.0	7	2	28.6

Después de lograr estabilizar un cierto número de mutantes provenientes de ambos tratamientos, se sometieron a otras pruebas para comprobar si realmente eran respiratorio-deficientes; para ello, se sembraron en medios con etanol y lactato (sustratos no fermentables) así como también se les hizo la prueba del tetrazolio. En la tabla No. 3 se enlistan las mutantes estables y algunas de sus propiedades.

Con respecto a las pruebas en lactato y etanol, sólo 3 cepas resultaron no ser realmente respiratorio-deficientes, pues 2 de ellas crecieron en ambos medios y una, sólo en lactato; de estas 3 cepas, 2 provenían de mutagénesis con UV y una del tratamiento con MNNG.

Después de estas pruebas se procedió a cruzar a las mutantes con objeto de ver el tipo de segregación en la progenie. Para ello, antes se les hicieron pruebas de auxotrofia, pues aunque se podía suponer que habían heredado los requerimientos de la progenitora, se tenía que comprobar si la mutagénesis había provocado mutaciones adicionales, y de manera interesante se vio que las mutantes: MV-2, MV-6, MV-25, MV-52, MV-0 y MV-T además de heredar los marcadores de la progenitora, mostraron ser auxótrofas para otros aminoácidos. El fenotipo de las mutantes también se enlista en la tabla No. 3.

Las cepas elegidas para la conjugación fueron:

KF71-5A a, ade₂⁻, ura⁻

WM37 a, his⁻

Se eligieron estas cepas porque fueron las que mejores resultados dieron en las cruces de prueba.

Tabla No. 3

RELACION DE LAS MUTANTES OBTENIDAS.

Mutante	Mutágeno empleado	Fenotipo	Crecimiento en Lactato	Crecimiento en Etanol	Reducción del TTC
MV-A	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-B	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-1	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-2	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻ , his ⁻	+	-	+ -
MV-5	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-6	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻ , trp ⁻ , ura ⁻	-	-	-
MV-9	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-25	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻ , arg ⁻	-	-	-
MV-26	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-41	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-52	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻ , trp ⁻	-	-	-
MV-74	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-76	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-111	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-C	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-E	Luz UV	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-F	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-G	MNNG	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-H	Luz UV	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-L	Luz UV	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-O	Luz UV	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻ , arg ⁻	+	+	+
MV-S	Luz UV	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-
MV-T	Luz UV	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻ , his ⁻	+	+	+
MV-Y	Luz UV	ade ⁻ , leu ⁻ , met ⁻	-	-	-

KC5-1D fue la cepa respiratorio competente de la cual derivan estas mutantes.

Su fenotipo es: ade⁻, leu⁻, met⁻ + + +

T T C cloruro de trifenil tetrazolio.

3.- CARACTERIZACION GENETICA

Una vez efectuada la conjugación entre cada una de las mutantes con la cepa respiratoria-competente por los métodos ya descritos, se procedió a ver la segregación mitótica en los diploides aislados probándolos en medio con glicerol. Estos resultados se registran en la tabla No. 4 y demuestran que la mutación fue de tipo recesivo en todas las mutantes, ya que todos los diploides probados crecieron en glicerol.

Análisis de la segregación meiótica.

Con el fin de establecer la naturaleza de la mutación respiratorio-deficiente en las mutantes, además del comportamiento en los diploides, se procedió a analizar la segregación meiótica en las esporas surgidas de los diploides puestos a esporular. Esto se hizo por dos métodos ya especificados: disección de tétradas y análisis de esporas al azar.

No todas las cruzas fueron probadas por disección de tétradas, pero sí todas se probaron por el método de análisis de esporas al azar, dando los dos métodos resultados similares en cuanto al carácter de la mutación.

Los resultados obtenidos con las mutantes cuya segregación meiótica se estudió por disección de esporas se muestran en la tabla No. 5. De estos resultados podemos deducir que la mutación de deficiencia respiratoria muy probablemente es de origen nuclear en las cepas: MV-5, MV-9, MV-25, MV-41, MV-52, MV-74 y MV-76.

De interés especial es la mutante MV-26, pues en ella los resultados nos inclinan a pensar que se trata probablemente de una mutación de tipo extracromosómico o la presencia de dos genes

Tabla No. 4

RESULTADOS DE LA SEGREGACION MITOTICA DEL CARACTER
RESPIRATORIO DEFICIENTE.

Cruza	No. de Zigotos observados a las 24, 48 y 72 horas.	Clonas diploides replicadas en YFD	Clonas diploides que crecieron en glicerol	% de diploides que crecieron en glicerol
MV-A x WM-37	1/c	200	190	95.0
MV-B x KF71-5A	-	197	196	99.0
MV-5 x KF71-5A	1/c	198	198	100.0
MV-1 x KF71-5A	1/c	200	199	99.0
MV-6 x WM-37	3/c	201	196	97.5
MV-9 x KF71-5A	3/c	193	193	100.0
MV-25x KF71-5A	2/c	215	212	98.6
MV-26 KF71-5A	1/c	186	148	80.0
MV-41 KF71-5A	4/c	225	221	98.2
MV-52 KF71-5A	1/c	188	188	100.0
MV-74 KF71-5A	2/c	221	221	100.0
MV-76 KF71-5A	1/c	201	201	100.0
MV-111 KF71-5A	2/c	190	190	100.0
MV-C x WM-37	3/c	187	183	97.8
MV-E x WM-37	4/c	214	208	97.1
MV-F x KF71-5A	1/c	199	199	100.0
MV-G x KF71-5A	-	no se cruzaron	-	-
MV-H x KF71-5A	-	no se cruzaron	-	-
MV-L x KF71-5A	1/c	229	225	98.2
MV-S x KF71-5A	-	172	166	96.5
MV-Y x KF71-5A	5/c	218	218	100.0
KC5-1D KF71-5A	7/c	214	214	100.0
KC5-1D WM-37	10/c	224	224	100.0

1/c: 1 cigoto por campo observado en el microscopio. En algunas cruza los cigotos se observaron a las 24 horas, pero en otras sólo se vieron hasta las 48 horas y en algunas más hasta pasadas 72 horas.

KC5-1D x KF71-5A y KC5-1D x WM-37 fueron las cruza testigos.

nucleares. Sin embargo, el hecho de haber tenido solamente 80% de diploides respiratorio-competentes no favorecería la segunda posibilidad. Estos resultados se comparan con los que dieron estas mismas mutantes analizadas por el método de esporas al azar con el fin de esclarecer la naturaleza de la mutación.

Estudio de la segregación meiótica por análisis de esporas al azar.

El resto de las mutantes se analizó por este método y también las analizadas por disección de tétradas.

La metodología en la cruce fue igual hasta llegar a la separación de las esporas, la cual difiere de la disección de tétradas, pues mientras que en ésta se estudia la segregación de las cuatro esporas procedentes de una misma asca, en el método de esporas al azar se analiza una determinada población de esporas de una manera individual y se establece el carácter de ellas en una forma porcentual con respecto a marcadores de auxotrofia y carácter mutante segregado. La segregación meiótica estudiada por este método se registra en la tabla No. 6. El análisis de estos resultados nos lleva a pensar que la mayoría de las mutantes aisladas presentan una mutación de tipo nuclear, pues la segregación del carácter mutante fue 2 : 2 y 1 : 3 a excepción de la cepa MV-26 que nuevamente al igual que en el análisis por disección de tétradas, muestra un patrón que no corresponde propiamente a un tipo Mendeliano.

Las esporas con el fenotipo de ade^- están por encima de la mitad, ya que hay dos mutaciones de auxotrofia para adenina (ade^-

Tabla No. 5 Segregación de los marcadores de auxotrofia y del carácter respiratorio-deficiente en los productos de la meiosis mediante el análisis de tétradas.

Cruza	Fenotipo	Número de tétradas que segregan:					No. de Tétradas Totales:
		4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	
KC5-1D x KF71-5A (Testigo)	ade ⁻ : ade ⁺	7	4	1	0	0	12
	leu ⁻ : leu ⁺	1	1	9	1	0	
	met ⁻ : met ⁺	1	3	8	0	0	
	ura ⁻ : ura ⁺	0	2	9	0	1	
	glic ⁻ : glic ⁺	0	0	0	0	12	
MV-5 x KF71-5A	ade ⁻ : ade ⁺	3	6	1	0	0	10
	leu ⁻ : leu ⁺	0	0	6	4	0	
	met ⁻ : met ⁺	0	0	8	2	0	
	ura ⁻ : ura ⁺	0	1	6	3	0	
	glic ⁻ : glic ⁺	0	0	6	4	0	
MV-9 x KF71-5A	ade ⁻ : ade ⁺	3	5	3	0	0	11
	leu ⁻ : leu ⁺	0	1	7	3	0	
	met ⁻ : met ⁺	0	0	8	3	0	
	ura ⁻ : ura ⁺	0	0	9	2	0	
	glic ⁻ : glic ⁺	0	2	6	3	0	
MV-25 x KF 71-5A	ade ⁻ : ade ⁺	7	5	2	0	0	14
	leu ⁻ : leu ⁺	0	0	9	5	0	
	met ⁻ : met ⁺	0	0	11	3	0	
	ura ⁻ : ura ⁺	0	1	8	5	0	
	glic ⁻ : glic ⁺	0	0	6	8	0	
MV-26 x KF71-5A	ade : ade	4	5	2	0	0	11
	leu : leu	0	1	7	3	0	

Tabla No. 5 (continuación)

No. de Tétradas que segregan:

Cruza	Fenotipo	No. de Tétradas que segregan:					No. de tétradas Totales:
		4:0	3:1	2:2	1:3	0:4	
	met ⁻ : met ⁺	0	0	8	3	0	
	ura ⁻ : ura ⁺	1	0	7	3	0	
	glic ⁻ : glic ⁺	0	0	1	2	8	
MV-41 x KF71-5A	ade ⁻ : ade ⁺	8	4	2	0	0	14
	leu ⁻ : leu ⁺	0	0	11	3	0	
	met ⁻ : met ⁺	0	0	10	4	0	
	ura ⁻ : ura ⁺	0	0	9	5	0	
	glic ⁻ : glic ⁺	0	0	10	4	0	
MV-52 x KF71-5A	ade ⁻ : ade ⁺	3	4	2	0	0	9
	leu ⁻ : leu ⁺	0	0	5	4	0	
	met ⁻ : met ⁺	0	0	6	3	0	
	ura ⁻ : ura ⁺	0	0	9	0	0	
	glic ⁻ : glic ⁺	0	0	5	3	1	
MV-74 x KF71-5A	ade ⁻ : ade ⁺	7	2	3	0	0	12
	leu ⁻ : leu ⁺	0	1	8	3	0	
	met ⁻ : met ⁺	0	2	9	1	0	
	ura ⁻ : ura ⁺	0	1	11	0	0	
	glic ⁻ : glic ⁺	0	0	9	3	0	
MV-76 x KF71-5A	ade ⁻ : ade ⁺	3	5	1	0	0	9
	leu ⁻ : leu ⁺	0	1	5	3	0	
	met ⁻ : met ⁺	0	2	4	3	0	
	ura ⁻ : ura ⁺	0	0	8	1	0	
	glic ⁻ : glic ⁺	0	0	6	2	1	

TABLA No. 6 Segregación meiótica de los marcadores de auxotrofia y del carácter respiratorio-deficiente en esporas analizadas al azar. Análisis por marcador individual.

Cruza	Total de esporas	Número de esporas											
		ade ⁻ No.	%	leu ⁻ No.	%	met ⁻ No.	%	ura ⁻ No.	%	his ⁻ No.	%	glicerol ⁻ No.	%
KC5-1D x KF71-5A	500	396	79.2	283	56.7	262	52.5	233	46.7	-	-	0	0.0
MV-A x WM-37	"	421	84.3	218	43.7	188	37.6	-	-	210	42.0	156	31.2
MV-B x KF71-5A	"	425	85.0	288	57.6	245	49.0	236	47.3	-	-	180	36.0
MV-1 x KF71-5A	"	437	87.5	343	68.7	218	43.7	187	37.5	-	-	140	28.1
MV-5 x KF71-5A	"	380	76.0	245	49.0	260	52.0	240	48.0	-	-	200	40.0
MV-6 x WM-37	"	406	81.2	281	56.3	275	55.0	-	-	285	57.0	218	43.7
MV-9 x KF71-5A	"	410	82.0	230	46.0	260	52.0	275	55.0	-	-	238	47.7
MV-25 x KF71-5A	"	255	51.0	260	52.0	208	41.6	260	52.0	-	-	255	51.0
MV-26 x KF71-5A	"	396	79.2	276	55.2	210	42	182	36.5	-	-	95	19.0
MV-41 x KF71-5A	"	411	82.2	240	48.0	181	36.2	229	45.9	-	-	209	41.9
MV-52 x KF71-5A	"	280	56.0	235	47.1	256	51.3	275	55.0	-	-	180	36.1
MV-74 x KF71-5A	"	406	81.3	261	52.3	198	39.6	195	39.0	-	-	218	43.7
MV-76 x KF71-5A	"	397	79.5	236	47.2	190	38.0	224	44.9	-	-	194	38.8
MV-111 x KF71-5A	"	388	77.6	246	49.2	240	48.0	230	46.0	-	-	255	51.0
MV-C x WM-37	"	383	76.6	240	48.0	210	42.0	-	-	198	39.6	215	43.0
MV-E x WM-37	"	391	78.3	260	52.0	205	41.0	-	-	225	45.0	155	31.0
MV-F x KF71-5A	"	295	59.0	295	59.0	280	56.0	263	52.7	-	-	265	53.0
MV-L x KF71-5A	"	415	83.0	265	53.0	255	51.0	270	54.0	-	-	240	48.0
MV-S x KF71-5A	"	390	78.0	245	49.0	193	38.7	185	37.0	-	-	215	43.0
MV-Y x KF71-5A	"	398	79.6	243	48.7	265	53.0	221	44.3	-	-	260	52.0

1 y ade⁻²), que mapean en sitios diferentes.

Pruebas de ligamiento.

El método de esporas al azar también permitió detectar un posible ligamiento de una o varias mutaciones y algunos eventos de recombinación entre genes.

Para ello, ya clasificadas las esporas, se analizaron todas las combinaciones posibles en cuanto a la segregación de marcadores y carácter mutante que dió cada una, y se agrupó cada espora analizada dentro de una de estas combinaciones, para determinar con qué frecuencia segregaban juntos estos caracteres en una población de esporas.

Una vez agrupadas las esporas dentro de cada combinación, se obtuvo el número de tipos parentales y tipos recombinantes segregados. Entendiéndose por tipo parental aquél en el que en una espora se manifiestan sólo las características de uno de los progenitores, mientras que en el tipo recombinante se manifiestan las características de ambos progenitores.

Luego de saber cuál es el tipo que predomina podemos tener una idea de qué tan ligadas están las mutaciones.

Si el tipo parental predomina sobre el recombinante, esto indica que las mutaciones están ligadas, pero si por el contrario el porcentaje de recombinantes es mayor que el tipo parental, implicaría que las mutaciones no están ligadas, o sea que los genes no están juntos y por lo tanto son más susceptibles de sufrir recombinación. Estos resultados se enlistan en la tabla No. 7.

El marcador de adenina no se analizó, pues no se puede

Tabla No. 7 Pruebas de Ligamiento en las Mutantes Respiratorio-Deficientes Aisladas.

Cruza	Par de marcadores analizados	Tipos Parentales		Tipos Recombinantes	
		No.	%	No.	%
KC5-1D x KF71-5A (testigo)	leu:met	279	55.8	221	44.2
	leu ura	245	49.0	256	51.2
	met ura	266	53.2	233	46.6
MV-A x WM-37	leu met	292	58.4	208	41.6
	leu his	258	51.6	248	49.6
	met his	264	52.8	236	47.2
	leu glic	266	53.2	234	46.8
	met glic	232	46.4	268	53.6
	his glic	251	50.2	249	49.8
MV-B x KF71-5A	leu met	304	60.8	196	39.2
	leu ura	283	56.6	217	43.4
	met ura	262	52.4	238	47.6
	leu glic	278	55.6	222	44.4
	met glic	299	59.8	201	40.2
	ura glic	266	53.2	234	46.8
MV-1 x KF71-5A	leu met	312	62.4	187	37.4
	leu ura	281	56.2	219	43.8
	met ura	259	51.8	241	48.2
	leu glic	125	25.0	375	75.0
	met glic	218	43.6	282	56.4
	ura glic	187	37.4	312	62.4
MV-5 x KF71-5A	leu met	296	59.2	204	40.8
	leu ura	232	46.4	268	53.6
	met ura	238	47.6	262	52.4
	leu glic	246	49.2	254	50.8
	met glic	286	57.2	214	42.8
	ura glic	242	48.4	258	51.6

Tabla No. 7 (continuación)

-2-

Cruza	Par de marcadores analizados	Tipos Parentales		Tipos Recombinantes	
		No.	%	No.	%
MV-6 x WM-37	leu met	277	55.4	223	44.6
	leu his	266	53.2	234	46.8
	met his	232	46.4	268	53.6
	leu glic	238	47.6	262	52.4
	met glic	298	59.6	202	40.4
	his glic	276	55.2	224	44.8
MV-9 x KF71-5A	leu met	246	49.2	254	50.8
	leu ura	286	57.2	214	42.8
	met ura	242	48.4	258	51.6
	leu glic	249	49.8	251	50.2
	met glic	308	61.6	192	38.4
	ura glic	282	56.4	218	43.6
MV-25 x KF71-5A	leu met	312	62.4	188	37.6
	leu ura	250	50.0	250	50.0
	met ura	249	49.8	250	50.0
	leu glic	280	56.0	220	44.0
	met glic	328	65.6	172	34.4
	ura glic	224	44.8	270	54.0
MV-26 x KF71-5A	leu met	301	60.2	199	39.8
	leu ura	223	44.6	276	55.2
	met ura	234	46.8	265	53.0
	leu glic	249	49.8	250	50.0
	met glic	283	56.6	217	43.4
	ura glic	245	49.0	257	51.4
MV-41 x KF71-5A	leu met	310	62.0	190	38.0
	leu ura	237	47.4	263	52.6
	met ura	217	43.4	283	56.6
	leu glic	255	51.0	245	49.0
	met glic	302	60.4	198	39.6
	ura glic	261	52.2	239	47.8

...

Cruza	Par de marcadores analizados	Tipos Parentales		Tipos Recombinantes	
		No.	%	No.	%
MV-52 x KF71-5A	leu met	250	50.0	249	49.8
	leu ura	244	48.8	256	51.2
	met ura	258	51.6	242	48.4
	leu glic	249	49.8	251	50.2
	met glic	279	55.8	221	44.2
	ura glic	238	47.6	262	52.4
MV-74 x KF71-5A	leu met	248	49.6	252	50.4
	leu ura	269	53.8	231	46.2
	met ura	233	46.6	267	53.4
	leu glic	265	53.0	235	47.0
	met glic	314	62.8	186	37.2
	ura glic	247	49.4	253	50.6
MV-76 x KF71-5A	leu met	288	57.6	212	42.4
	leu ura	236	47.2	264	52.8
	met ura	249	49.8	251	50.2
	leu glic	242	48.4	258	51.6
	met glic	228	45.6	272	54.4
	ura glic	232	46.4	268	53.6
MV-111x KF71-5A	leu met	266	53.2	234	46.8
	leu ura	252	50.4	248	49.6
	met ura	250	50.0	247	49.4
	leu glic	247	49.4	253	50.6
	met glic	294	58.8	206	41.2
	ura glic	249	49.8	251	50.2
MV-C x KF71-5A	leu met	305	61.0	195	39.0
	leu his	252	50.4	248	49.6
	met his	246	49.2	254	50.8
	leu glic	249	49.8	251	50.2
	met glic	338	67.6	192	38.4
	his glic	239	47.8	261	52.2

Cruza	Par de marcadores analizados	Tipos Parentales		Tipos Recombinantes	
		No.	%	No.	%
MV-E x WM-37	leu met	295	59	205	41.0
	leu his	241	48.2	259	51.8
	met his	248	49.6	252	50.4
	leu glic	242	48.4	258	51.6
	met glic	287	57.4	213	42.6
	his glic	249	49.8	251	50.2
MV-F x KF71-5A	leu met	242	48.4	258	51.6
	leu ura	286	57.2	214	42.8
	met ura	229	45.8	271	54.2
	leu glic	249	49.8	251	50.2
	met glic	244	48.8	256	51.2
	ura glic	250	50.0	250	50.0
MV-L x KF71-5A	leu met	293	58.6	207	41.4
	leu ura	248	49.6	252	50.4
	met ura	236	47.2	264	52.8
	leu glic	248	49.6	252	50.4
	met glic	251	50.2	249	49.8
	ura glic	225	45.0	275	55.0
MV-S x KF71-5A	leu met	321	64.2	179	35.8
	leu ura	241	48.2	259	51.8
	met ura	229	45.8	271	54.2
	leu glic	186	37.2	314	62.8
	met glic	234	46.8	266	53.2
	ura glic	192	38.4	308	61.6
MV-Y x KF71-5A	leu met	291	58.2	209	41.8
	leu ura	263	52.6	236	47.2
	met ura	228	45.6	272	54.4
	leu glic	244	48.8	256	51.2
	met glic	294	58.8	206	41.2
	ura glic	251	50.2	247	49.4

detectar fenotípicamente si estamos tratando con la mutación ade^{-1} o ade^{-2} .

4.- PRUEBAS BIOQUIMICAS

Resultados de las curvas de crecimiento.

Una alteración en el sistema respiratorio de las mutantes aisladas, va a hacer que sean incapaces de obtener la energía necesaria para sus funciones metabólicas, de otro modo que no sea mediante la utilización de una fuente de carbono fermentable, lo cual limita su desarrollo o lo retarda, aún dentro de un medio completo. Por lo tanto, el hacer las curvas de crecimiento, nos permitió ver qué tan grande fue el daño causado por la mutación al detectar en qué tiempo alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento y cuales fueron sus tiempos medios de generación, comparando estos datos con los de la cepa progenitora. Estos tiempos se registran en la tabla No. 8 y las curvas de crecimiento de las mutantes aparecen en las figuras No. 8, 9, 10, 11, 12 y 13. Como puede apreciarse, los tiempos medios de generación de las mutantes, difieren en un grado considerable con respecto a la progenitora. Por ejemplo en las cepas : MV-25, MV-26, MV-41 y MV-76 el tiempo medio de generación es casi el doble o superior al doble del de la progenitora.

Capacidad Respiratoria.

Los resultados de la determinación del consumo de oxígeno también muestran que las mutantes tienen una capacidad respiratoria muy disminuída, por ejemplo en las cepas : MV-A, MV-G, MV-S y MV-26 el consumo de oxígeno llega a ser casi nulo, ya

que apenas si pudo ser registrado (tabla no. 8). Algunas mutantes muestran un consumo de oxígeno superior al resto de las mutantes, pero siempre menor que el de la cepa progenitora, tal es el caso de las mutantes MV-52 y MV-74, siendo la cepa MV-F la que mayor consumo registra en comparación con las demás.

De los resultados expuestos en esta tabla, se puede notar también, que como era de esperarse, la capacidad respiratoria guarda cierta vinculación con los tiempos medios de generación, de tal manera que aquellas mutantes que registraron un consumo de oxígeno mínimo, tuvieron en general tiempos medios de generación mayores que el resto de las mutantes y por supuesto que la cepa progenitora.

Análisis de citocromos.

Ya que los citocromos son componentes esenciales del sistema respiratorio en las levaduras, es de esperarse que algunas de las mutantes respiratorio deficientes tuvieran alteraciones en uno o más de estos componentes de la cadena respiratoria.

Para determinar esto se procedió a obtener los espectros de citocromos de las mutantes aisladas. Los resultados se muestran en las Figs. 14 a 22. Los resultados del análisis se presentan en forma resumida en la tabla No. 8.

Analizando estos espectros vemos que todas las mutantes presentan una alteración en sus citocromos en mayor o menor grado, llegando en algunas a estar totalmente ausente alguno de ellos; y en una de ellas que es la cepa MV-26 no se registró presencia de los citocromos "b" ni "a + a₃".

También se pudo notar que en algunas cepas la disminución o

Tabla No. 8 Resultado del análisis fenotípico de las mutantes
Respiratorio-Deficientes.

Cepa	Capacidad Respiratoria nanoátomos O ₂ /mg peso seco/min	Tiempo medio de generación	Análisis Cualitativo de citocromos		
			"c"	"b"	"ata ₃ "
KC5-1D	65.4	1h 55'	++	++	++
KF-71-5A	75.5	-	++	++	++
MV-A	1.0	3h 20'	+	++	-
MV-B	2.40	2h 55'	+ -	+	-
MV-1	3.9	4h 30'	++	+	+
MV-5	6.9	3h 20'	++	+ -	+ -
MV-6	4.1	3h 10'	+++	+ -	-
MV-9	4.0	3h	++	+ -	+ -
MV-25	3.4	4h 20'	+++	+ -	++
MV-26	1.4	6h 15'	++	-	-
MV-41	3.80	4h 05'	+++	-	++
MV-52	16.2	2h 50'	+	++	-
MV-74	19.1	3h 20'	++	+	-
MV-76	4.2	3h 50'	++	+	-
MV-111	9.1	2h 35'	+	++	-
MV-C	3.3	3h 22'	+	+	-
MV-E	2.7	3h 35'	+	++	-
MV-F	21.0	2h 35'	++	+	++
MV-G	1.5	4h 05'	+ -	++	-
MV-H	7.5	2h 30'	++	++	+ -
MV-L	5.2	2h 55'	+++	-	+
MV-S	1.7	3h	+	+	-
MV-Y	11.0	3h 30'	+	+ -	+

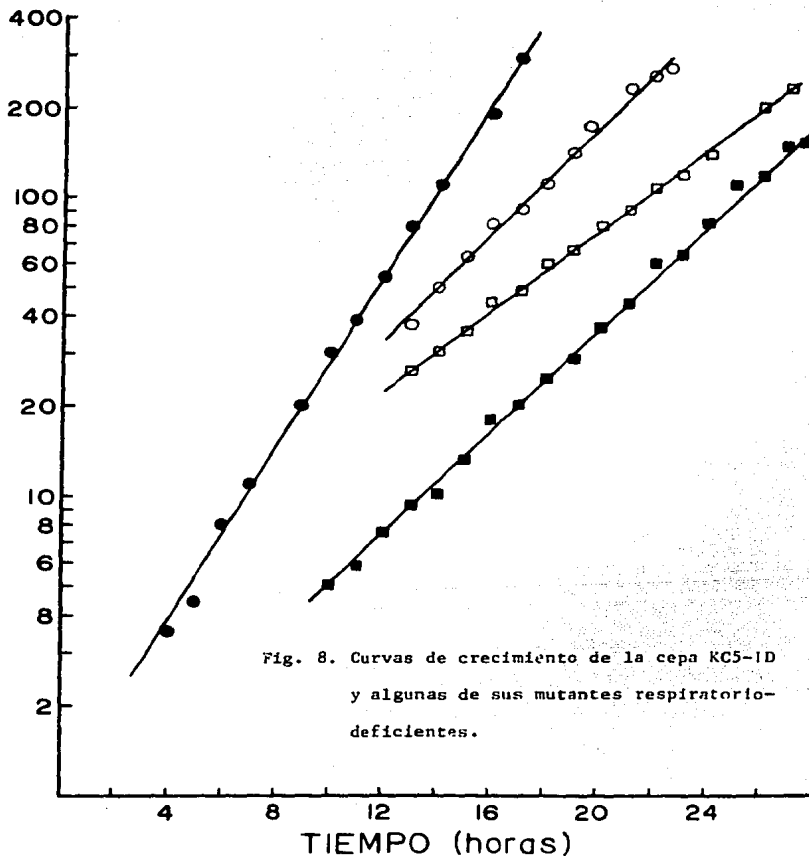
+++ aumentado
 ++ normal
 + disminuído
 + - escaso
 - ausente

KC5-1D cepa progenitora respiratorio competente

KF71-5A cepa respiratorio-competente

ABSORBANCIA U. K.

- KC5-1D
- MV-A
- MV-E
- MV-1



- KC5-1D
- MV-L
- MV-6
- MV-25
- △ MV-26

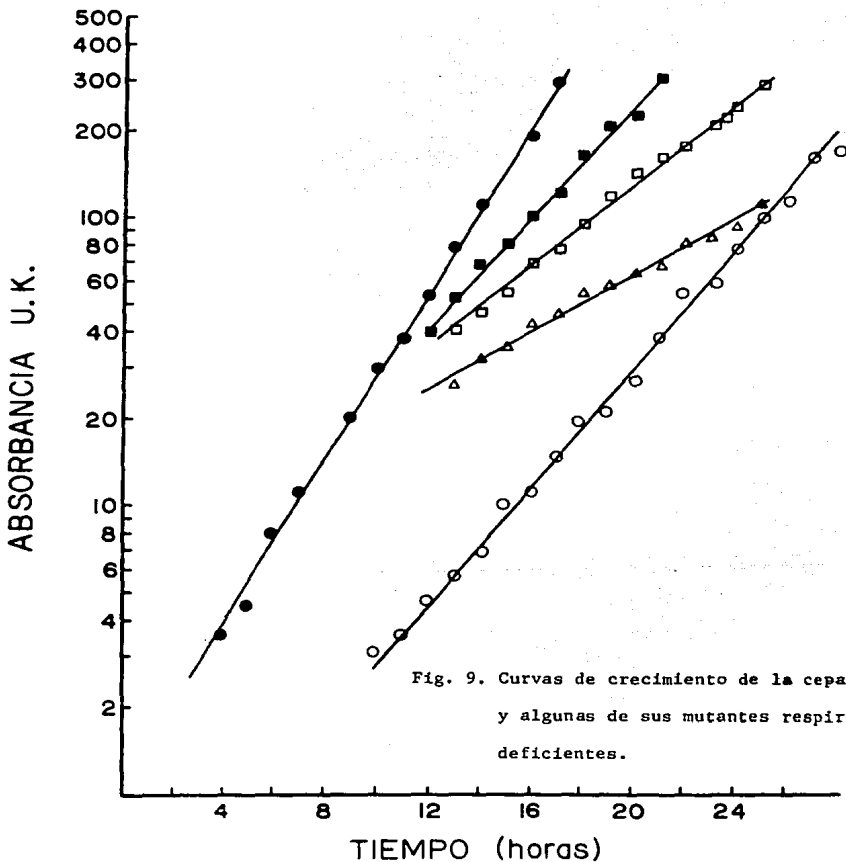


Fig. 9. Curvas de crecimiento de la cepa KC5-1D y algunas de sus mutantes respiratorio-deficientes.

- KC5-1D
- MV-9
- MV-41
- MV-76

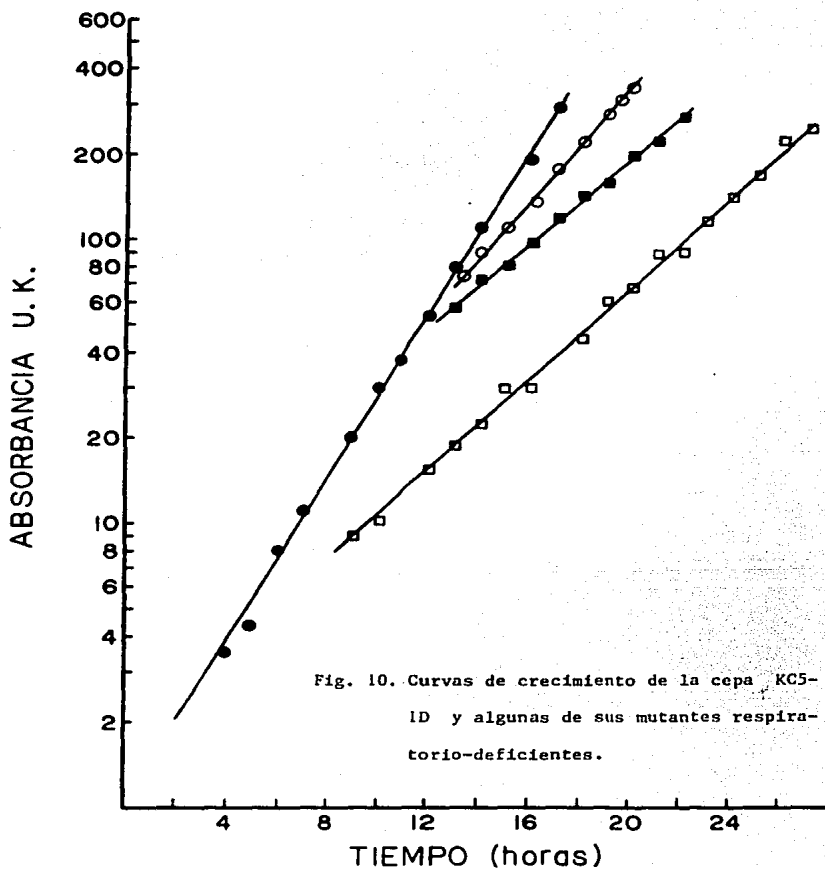
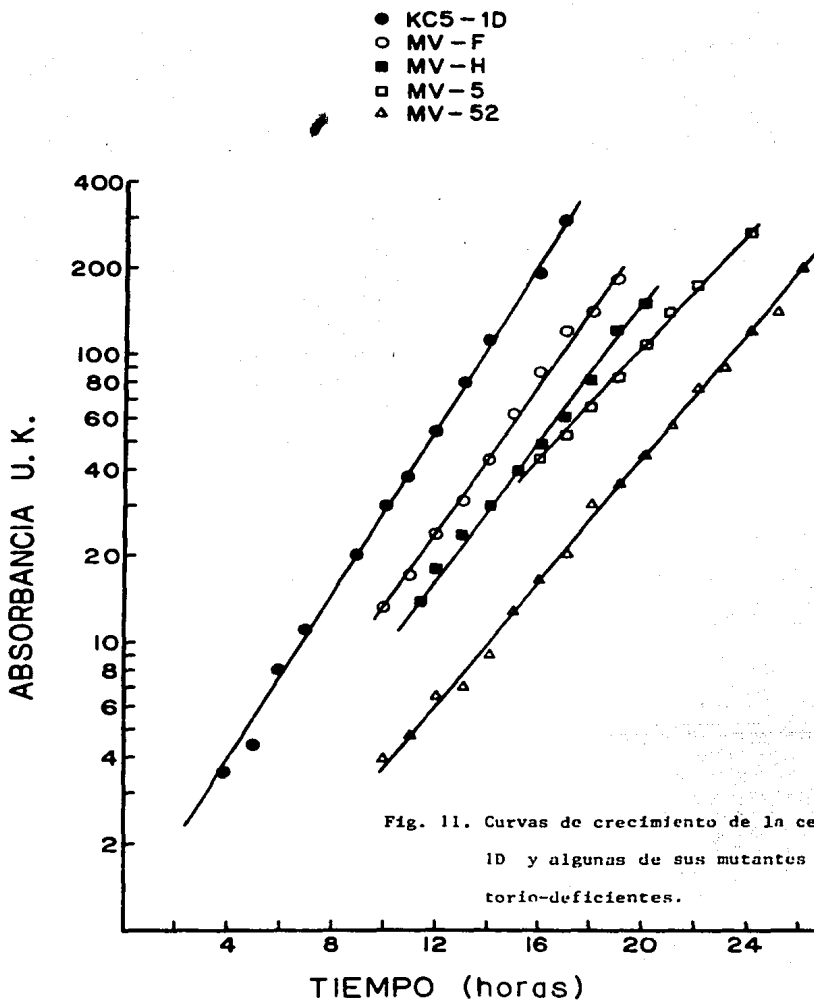


Fig. 10. Curvas de crecimiento de la cepa KC5-1D y algunas de sus mutantes respiratorio-deficientes.



- KC5-1D
- MV-B
- MV-74
- MV-111

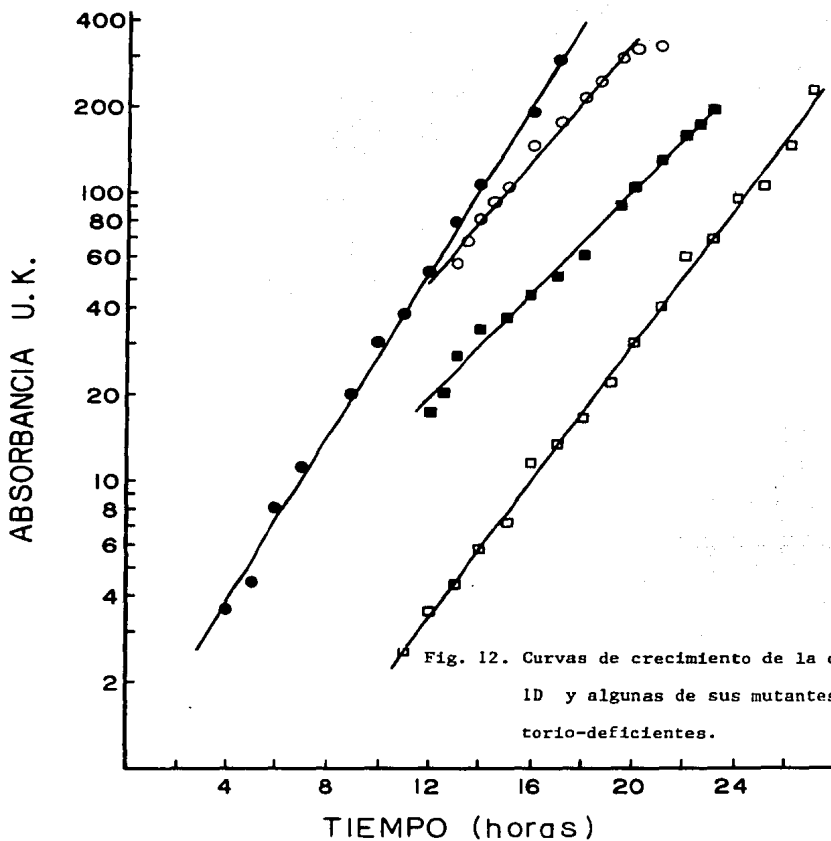


Fig. 12. Curvas de crecimiento de la cepa KC5-1D y algunas de sus mutantes respiratorio-deficientes.

ABSORBANCIA U. K.

- KC5-1D
- MV-Y
- MV-C
- MV-G
- △ MV-5

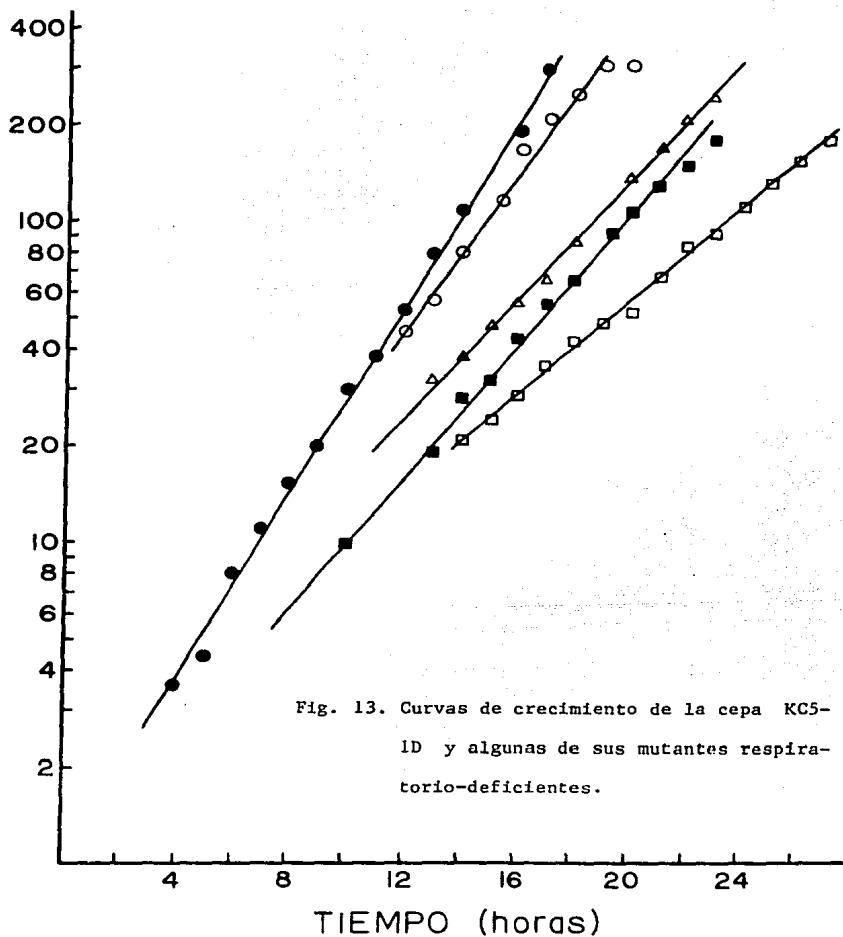


Fig. 13. Curvas de crecimiento de la cepa KC5-1D y algunas de sus mutantes respiratorio-deficientes.

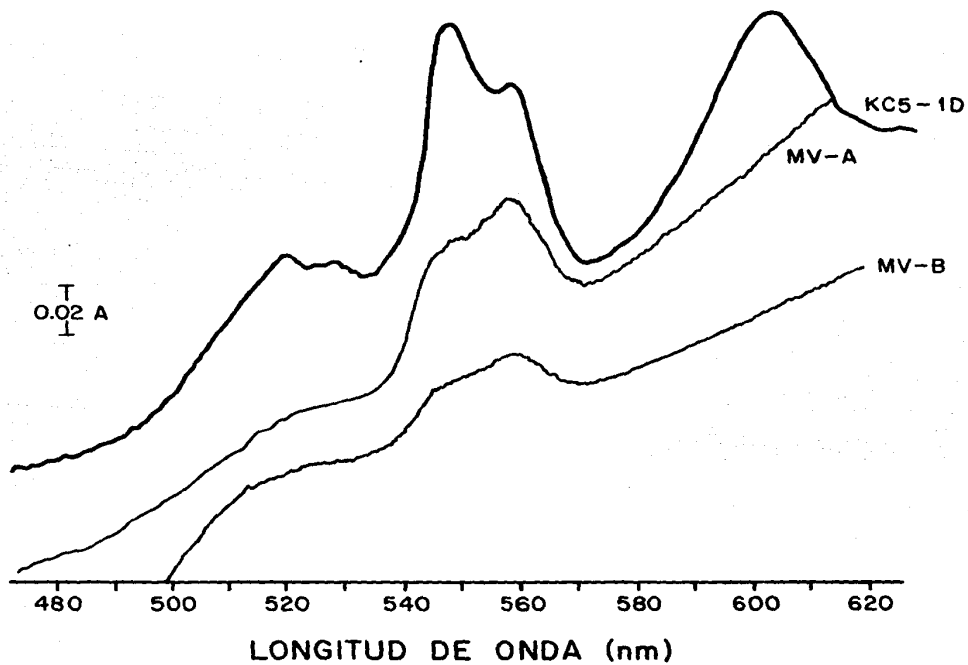


Fig. 14 Espectros de absorción de citocromos en la cepa KC5-1D y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" tiene una absorción máxima a 550 nm, el citocromo "b" a 560 nm y el "a₃" a 605 nm.

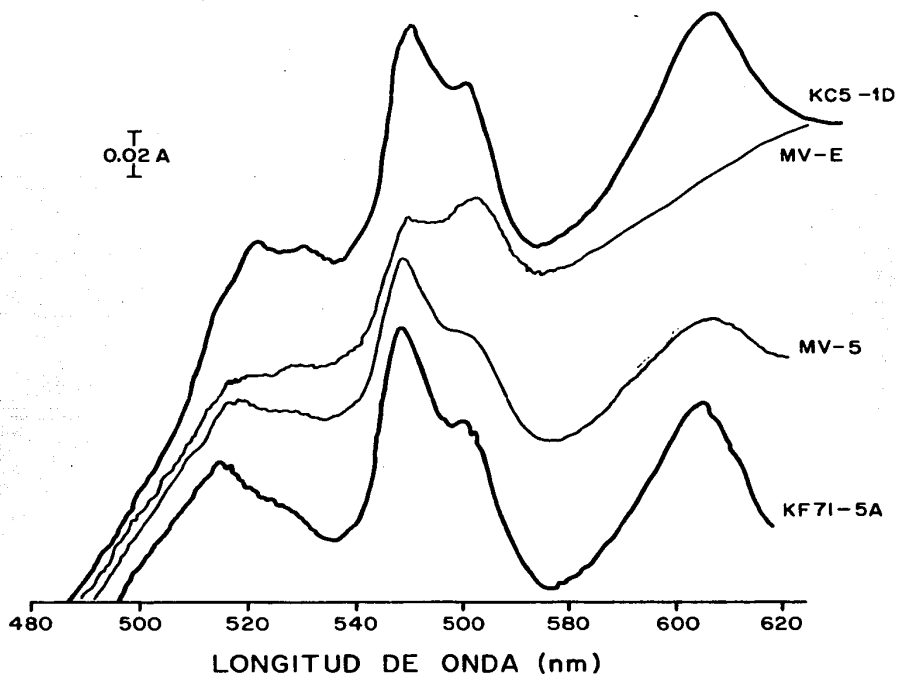


Fig. 15 Espectros de absorción de citocromos en la cepa KC5-1D y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" tiene una absorción máxima a 550 nm, el citocromo "b" a 560 nm y el "a+a₃" a 605 nm.

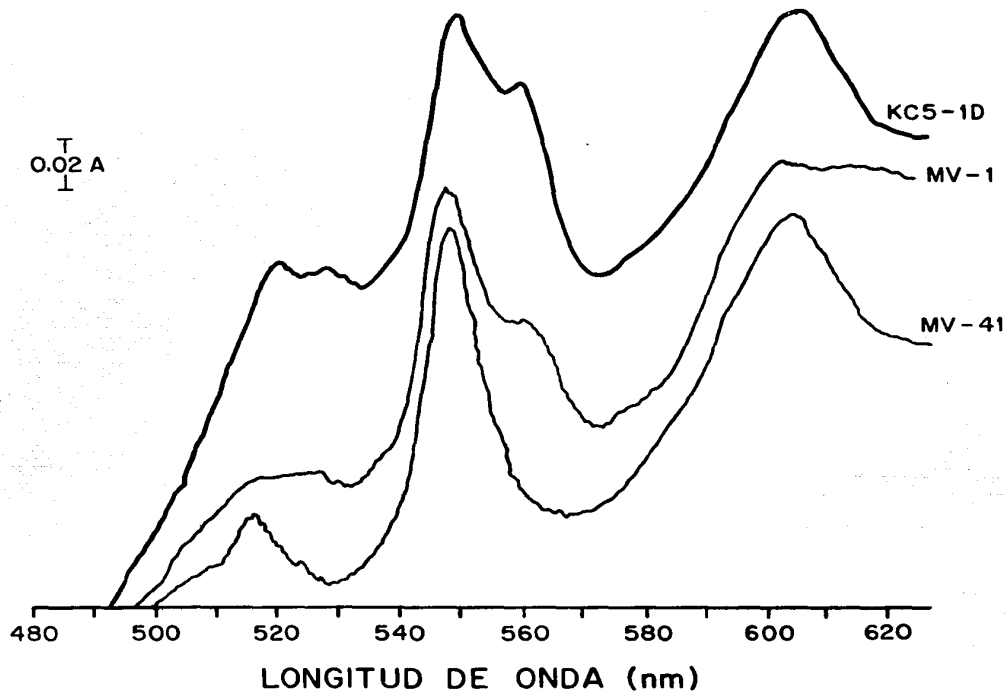


Fig. 16 Espectros de absorción de citocromos en la cepa KC5-1D y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" tiene una absorción máxima a 550 nm, el citocromo "b" a 560 nm y el "a+a₃" a 605 nm.

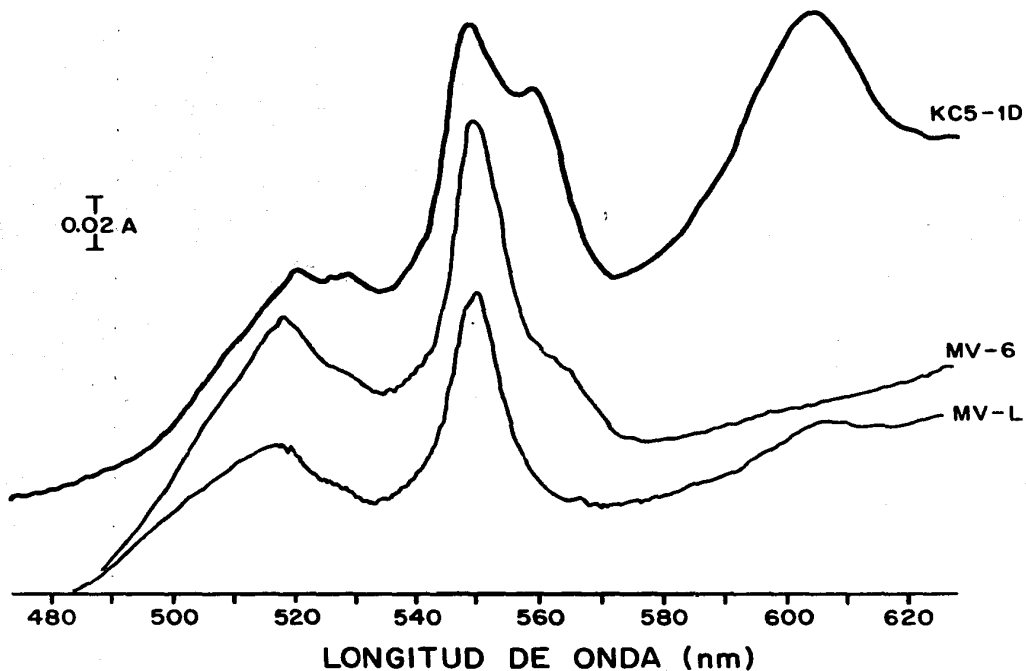


Fig. 17 Espectros de absorción de citocromos en la cepa KC5-1D y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" tiene una absorción máxima a 550 nm, el citocromo "b" a 560 nm y el "a₃" a 605 nm.

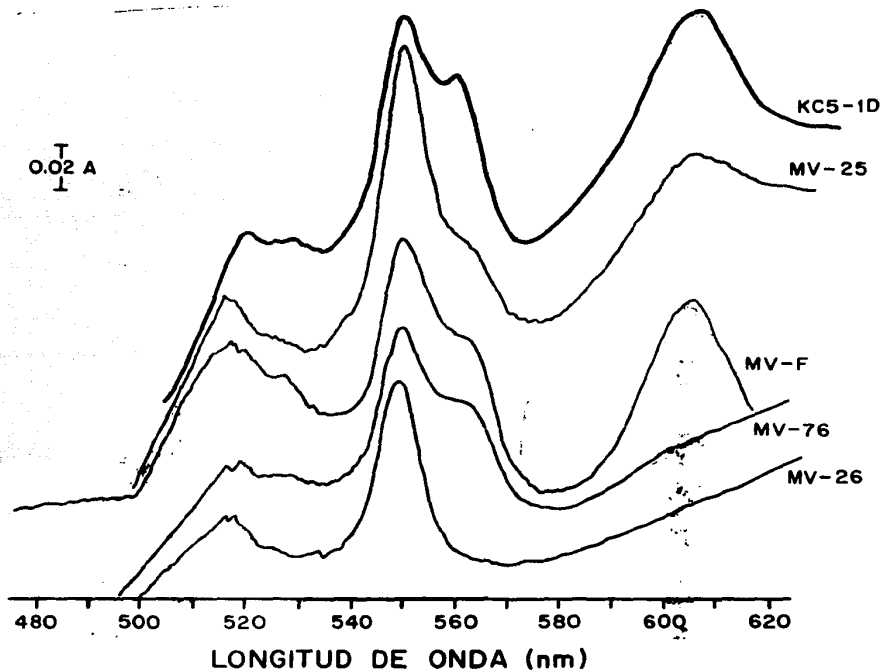


Fig. 18 Espectros de absorción de citocromos en la cepa KC5-1D y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" tiene una absorción máxima a 550 nm, el citocromo "b" a 560 nm y el "a+a₃" a 605 nm.

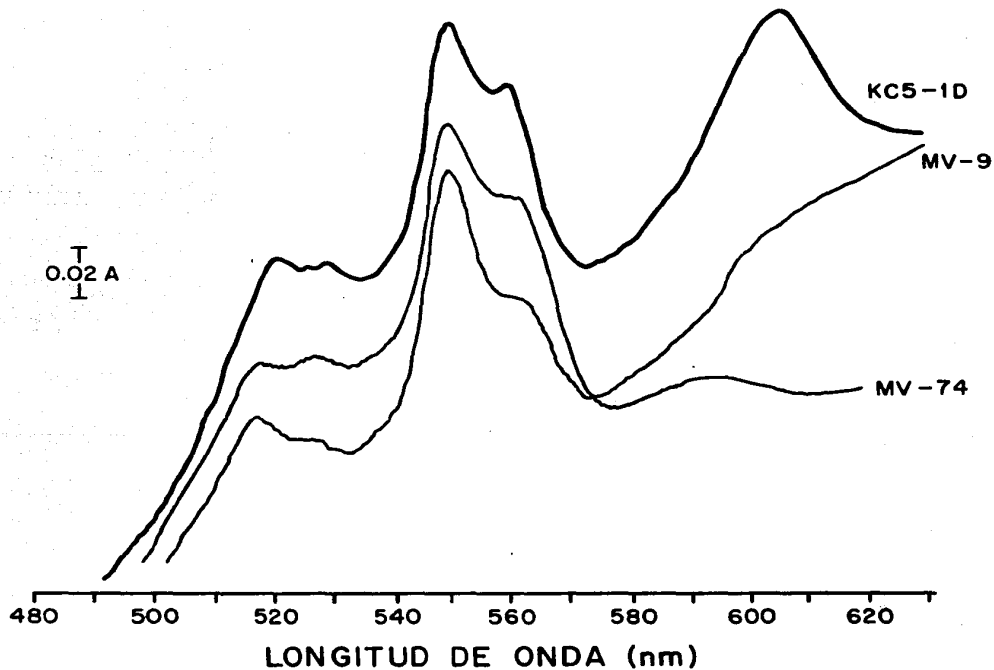


Fig. 19 Espectros de absorción de citocromos en la cepa KC5-1D y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" tiene una absorción máxima a 550 nm, el citocromo "b" a 560 nm y el "a+a₃" a 605 nm.

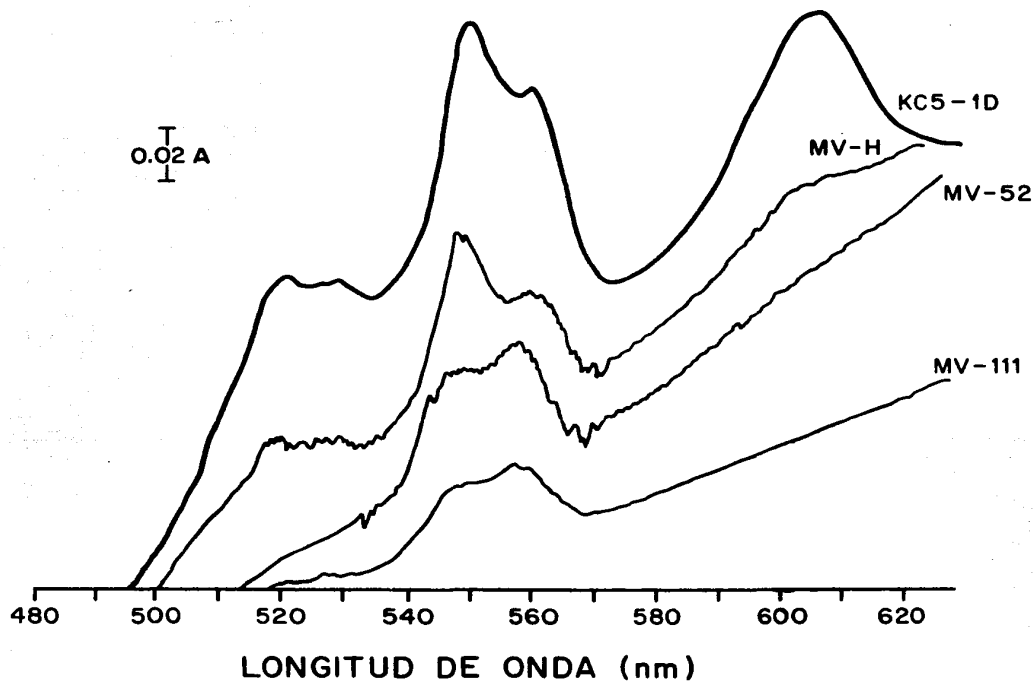


Fig. 20 Espectros de absorción de citocromos en la cepa KC5-1D y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" tiene una absorción máxima a 550 nm, el citocromo "b" a 560 nm y el "a+a₃" a 605 nm.

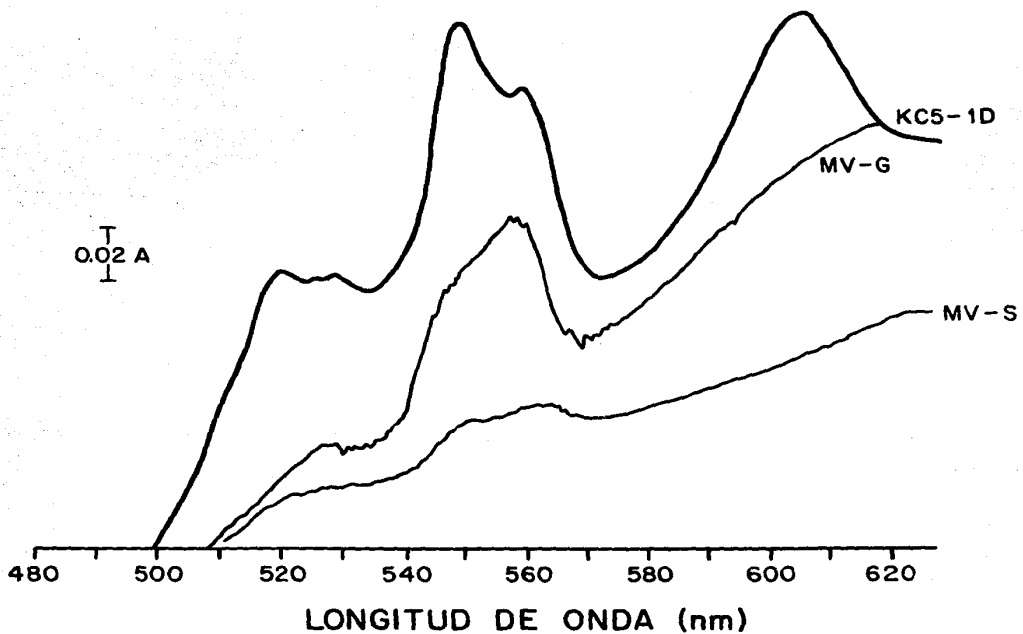


Fig. 21 Espectros de absorción de citocromos en la cepa KC5-1D y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" tiene una absorción máxima a 550 nm, el citocromo "b" a 560 nm y el "a₃" a 605 nm.

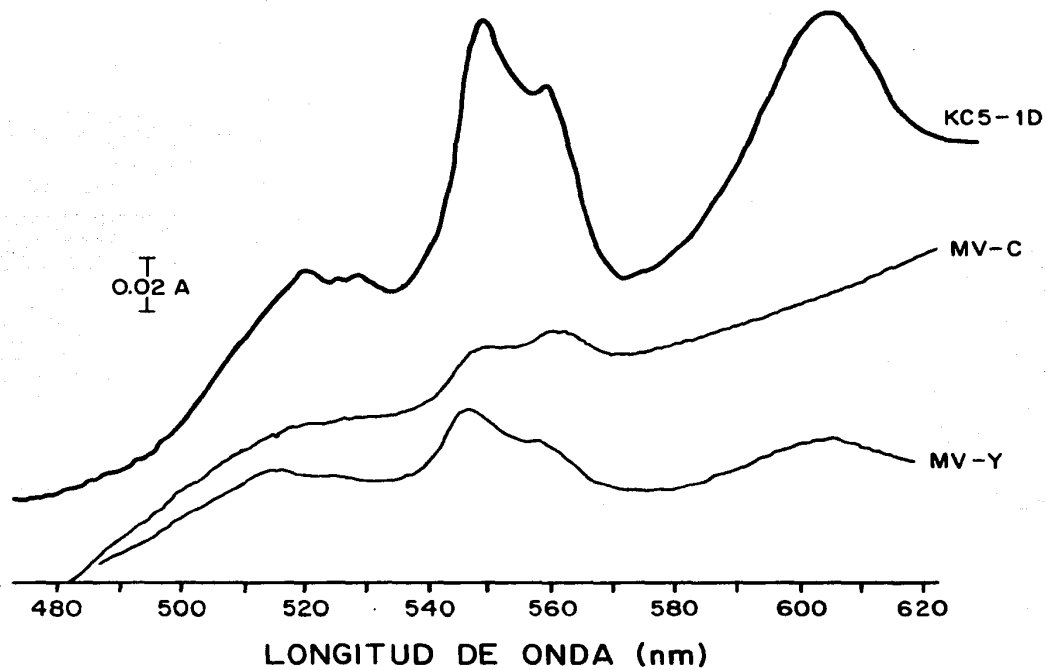


Fig. 22 Espectros de absorción de citocromos en la cepa KC5-1D y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" tiene una absorción máxima a 550 nm, el citocromo "b" a 560 nm y el "a₃" a 605 nm.

desaparición del citocromo "b" o el "a + a₃" va acompañada de un aumento en el citocromo "c", tal es el caso de las mutantes MV-6, MV-25, MV-41 y MV-L.

Pruebas de Alelismo.

Para poder efectuar las pruebas de alelismo fue necesario hacer cruza con cada una de las mutantes entre sí.

La metodología de los experimentos de cruza ya fue detallada en la sección de métodos.

Una vez seleccionadas las mutantes que mostraron capacidad de conjugación entre ellas mismas, se procedió a investigar con cada una si la mutación de deficiencia respiratoria podría estar en sitios diferentes del genoma y por tanto podría dar lugar a complementación entre ellas mismas aún siendo todas respiratorio deficientes; o si por el contrario estaba localizada en un mismo locus.

Esto se logró probando los diploides procedentes de estas conjugaciones en medio con glicerol y viendo si habían sido capaces de complementar con respecto al carácter mutante de los padres.

Los resultados fueron los siguientes:

En la tabla No. 9 se registran cada una de las cruza de todas las mutantes entre sí, y se señala los casos en los que hubo conjugación y aquellos en los que ésta no se llevó a cabo.

Como puede apreciarse, en la mayoría de los casos la conjugación entre las mutantes no tuvo lugar, y de 231 cruza realizadas sólo se efectuaron realmente 29, dentro de las cuales

intervienen de manera frecuente 5 cepas. Así tenemos que:

MV-B se cruzó con las cepas: MV-1, MV-25, MV-41, MV-F, MV-L, MV-Y

MV-25	"	: MV-B, MV-1, MV-52, MV-74, MV-76,
	"	MV-111, MV-C, MV-E, MV-F, MV-G, MV-H
MV-41	"	: MV-B, MV-52, MV-C, MV-E, MV-G, MV-H
MV-C	"	: MV-1, MV-25, MV-41, MV-F, MV-Y
MV-F	"	: MV-B, MV-6, MV-25, MV-52, MV-C, MV-E,
		MV-G, MV-H.

En la tabla No. 9 se señalan dentro de las cepas que sí se cruzaron, aquellos diploides que lograron complementación en cuanto al carácter respiratorio-deficiente.

Basándonos en estos resultados podemos inferir que la mutación de las cepas : MV-B, MV-25, y MB-C tal vez se localice en el mismo locus, ya que estas mutantes además de no complementar entre sí respecto al carácter mutante, presentan patrones de complementación iguales con las cepas MV-1 Y MV-F, a las cuales podríamos agrupar también dentro de un mismo grupo de complementación.

Por tanto de las 16 mutantes estudiadas en las pruebas de alélismo, podríamos clasificar 5 de ellas dentro de 2 grupos diferentes de complementación, que serían:

Grupo I	Grupo II
MV-B	MV-F
MV-25	MV-1
MV-C	

Tabla No. 9 Resultados de las Pruebas de alelismo

Cruza de Mutantes entre sí.

a/	A	B	1	5	6	9	25	26	41	52	74	76	111	C	E	F	G	H	L	S	Y
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	⊞	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	⊞	-	-	+	-	+
1	-	⊞	-	-	-	-	⊞	-	-	-	-	-	-	⊞	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	+	⊞	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	⊞	+	+	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	⊞	⊞	-	-
52	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
111	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	⊞	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	⊞	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
F	-	⊞	-	-	+	-	⊞	-	-	+	-	-	-	⊞	+	-	+	+	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	+	-	⊞	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	+	-	⊞	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Observación de Zigotos Crecimiento en medio mínimo

(-) no hubo conjugación

No se observaron.

no crecieron.

(+) sí hubo conjugación

⊞ diploides que crecieron en glicerol.

Dada la dificultad de que las cepas respiratorio deficientes se crucen entre sí (ver tabla No. 9) no fue posible establecer con claridad la presencia de otros grupos de complementación.

CONCLUSIONES

Siendo el objetivo primordial de este trabajo el aislamiento de mutantes respiratorio deficientes preferentemente de tipo extracromosómico en la levadura Kluyveromyces lactis y en base a los resultados obtenidos podemos concluir que:

La probabilidad de inducción de este tipo de mutación en esta especie de levadura es muy pequeña y su aislamiento en caso de que esta inducción se lleve a cabo resulta muy difícil de lograr; esto probablemente se deba a la escasa viabilidad de esta mutación en esta especie de levadura.

No obstante en este estudio se logró aislar una mutante que después de analizarla presenta todas las características de haber sufrido una mutación extracromosómica, ya que tanto su segregación mitótica y meiótica son compatibles con una mutación de este tipo. Aunado a esto su curva de crecimiento fue la más lenta de todas las mutantes analizadas y carece totalmente de citocromos "a + a₃" y "b".

Por el contrario, la obtención de mutantes petite segregacionales de esta levadura después de tratamiento con MNNG y luz UV resultó considerablemente ser más favorecida. Sin embargo, estas mutantes son sumamente inestables y revierten con facilidad, lo que indicaría que se trata de mutaciones puntuales.

Por otra parte ninguna de las mutaciones obtenidas estuvo ligada a los marcadores de auxotrofia de las cepas empleadas.

Con respecto a las pruebas de alelismo y en base a estos resultados podríamos decir que la mutación de deficiencia respiratoria en algunos casos resultó ser no alélica y debido a

esto algunas mutantes pudieron complementarse en cuanto a esta deficiencia cuando fueron cruzadas.

Nuevamente la dificultad que presentan estas cepas para cruzarse no permite que se puedan establecer con más claridad grupos de complementación entre ellas que pudieran darnos más datos acerca de esta mutación.

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

1. Allmark, B.M., Danks, S.M. y Whittaker (1977). Isolation and characterization of respiratory-deficient mutants of Kluyveromyces lactis, a petite-negative yeast. *Biochemical Society Transactions*. 5: 1498-1500.
2. Birky, Jr. C.W. (1973). On the origin of mitochondrial mutants: evidence for intracellular selection of mitochondria in the origin of antibiotic-resistant cells in yeast. *Genetics*. 74: 421-432.
3. Brunner, A.L. (1974). Obtención y caracterización de mutantes mitocondriales en una levadura "petite negativa". Los perfiles de la bioquímica en México. Ed. Mora, J.; Estrada, O.S.; Martuscelli, J. UNAM. México 91-99.
4. Brunner, A.L., Tuena de Cobos, A. y Griffiths, D. (1977). The isolation and genetic characterization of extrachromosomal chloramphenicol and oligomycin-resistant mutants from the petite negative yeast Kluyveromyces lactis. *Molec. Gen. Genet.* 152: 183-191.
5. Brunner, A.L. (1978). Herencia citoplásmica de la resistencia a oligomicina, eritromicina y cloranfenicol en la levadura "petite negativa": Kluyveromyces lactis. *Temas bioquímicos de actualidad*. Ed. Piña, E., Peña, A., Chagoya de S.V. y Martuscelli, J. UNAM. México 267-279.
6. Brunner, A.L., Tuena de Cobos, A. (1980). Extrachromosomal oligomycin-resistant mutants of the petite negative yeast Kluyveromyces lactis. Properties of mitochondrial ATPase and cross-resistance to inhibitors of phosphoryl

- transfer reactions. *Molec. Gen. Genet.* 178: 351-355.
7. Cerdá-Olmedo, E., y Hanawalt, P.C. (1968). Diazomethane as the active agent in nitrosoguanidine mutagenesis and lethality. *Molec. Gen. Genet.* 101: 191-202.
 8. Dawes, I.W. y Carter, B.L. (1974). Nitrosoguanidine mutagenesis during nuclear and mitochondrial gene replication. *Nature* 250: 709-712.
 9. Del Giudice, L. y Brunner, A.L. (1977). Chromosomal and extrachromosomal inheritance of erythromycin-resistance in the petite negative yeast *Kluyveromyces lactis*. *Molec. Gen. Genet.* 152: 325-329.
 10. Fincham, J.R.S., Day, P.R. y Radford, A. (1979). *Fungal genetics*. Vol. 4 4th ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
 11. Gardner, E.J. (1975). *Principles of genetics*. 5th ed. John Wiley & Sons. Inc. New York.
 12. Gek-Kee, S. y Haber, J.E. (1975). Cell cycle dependent induction of mutations along a yeast chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 1179-1183.
 13. Gentner, N.E., Werner, M.M. y Hannan, M.A. (1978). Contribution of a caffeine-sensitive recombinational repair pathway to survival and mutagenesis in UV-irradiated *Schizosaccharomyces pombe*. *Molec. Gen. Genet.* 167: 43-49.
 14. Gichner, T. y Velemínsky, J. (1982). Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs. *Mutat. Res.* 99: 129-242.
 15. Gillham, N.W. (1978). *Organelle Heredity*. Raven Press. New

York.

16. Heritage, J. y Whittaker, P.A. (1977). Isolation and biochemical characteristics of petite mutants of Kluyveromyces lactis. Biochemical Society Transactions. 5: 1500-1502.
17. Lemberg, R. y Barrett, J. (1973). Cytochromes. Academic Press Inc. New York.
18. Luha, A.A., Whittaker, P.A. y Hammond, R.C. (1974). Biosynthesis of yeast mitochondria (some effects of ethidium bromide on Kluyveromyces (Saccharomyces) fragilis). Molec. Gen. Genet. 129: 311-323.
19. Mortimer, R.K. y Hawthorne, D.C. (1966). Yeast genetics. Ann. Rev. Microbiol. 20: 151.
20. Oakley, K.M. y Clark-Walker, G.D. (1978). Abnormal mitochondrial genomes in yeast restored to respiratory competence. Genetics. 90: 517-530.
21. Packer, L. (1974). Biomembranes. Architecture, biogenesis, bioenergetics and differentiation. Academic Press, Inc. New York.
22. Polakowska, R. y Putrament, A. (1981). Mitochondrial mutagenesis in Saccharomyces cerevisiae V. ethyl methanesulfonate. Mutat. Res. 84: 29-36.
23. Put, H.M.C. y De Jong, J. (1982). Heat resistance studies of yeasts; vegetative cells versus ascospores: erythromycin inhibition of sporulation in Kluyveromyces and Saccharomyces species. Journal of Applied Bacteriology. 53: 73-79.

24. Resnick, M.A., Tippetts, R.D. y Mortimer, R.K. (1967). Separation of spores from diploid cells of yeast by stable-flow free-boundary electrophoresis. Science. 158: 803-804.
25. Rose, A.H. y Harrison, J.S. (1969). The Yeast. Vol. 1. Biology of yeast. Academic Press Inc. London-New York.
26. Sager, R. (1972). Cytoplasmic genes and organelles. Academic Press, Inc. New York.
27. Siddigi, B.A. (1971). Random-spore analysis in *S. cerevisiae*. Hereditas. 69: 67-76.
28. Singer, B. y Kuřmíerek, J.T. (1982). Chemical mutagenesis. Ann. Rev. Biochem. 52: 655-693.
29. Srb, A.M. (1973). Genes, enzymes and populations. Basic life Sciences Vol. 2. Plenum Press. New York - London.
30. Wallis, Ch. y Wilkie, D. (1979). Mitochondrial activity of 2,6-Diamino-purine in Saccharomyces cerevisiae. Molec. Gen. Genet. 173: 307-313.
31. Watson, J.D. (1978). Biología Molecular del gen. Ed. Fondo Educativo Interamericano.
32. Wilkie, D. (1964). The cytoplasm in heredity. Ed. Kenneth Mellanby. Methuen & Co. LTD. London.
33. Wilkie, D. y Evans, T. (1982). Mitochondria and the yeast cell surface: implications for carcinogenesis. Tibs. 147-150.