
Facultad de Ciencias

**Dominancia de la Sensibilidad a la Estreptomici-
na sobre la Dependencia, en Merodiploides de
Escherichia coli K 12**

T E S I S

Que para obtener el título de :

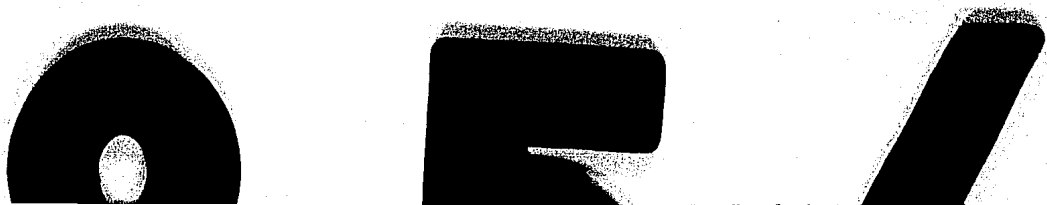
B I O L O G O

p r e s e n t a :

MARIA ALICIA GONZALEZ MANJARREZ

México, D. F.

1969





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Agradezco al Dr. Fernando Bastarrachea Avilés la dirección y apoyo prestados durante el desarrollo de este trabajo.

*Agradezco la ayuda técnica de la Srita. Esther Tam
Chi, en la realización de algunos experimentos;*

así como al

*Dr. Rubén López Revilla, la ayuda prestada
en la elaboración del manuscrito.*

*Con gran cariño a mis padres Sofía y José;
y a mi hermana Luigi.*

A mis tíos.

A mis amigos y compañeros.

A Patricia.

A mis maestros.

"....THUS THE MICROORGANISM IS A COMPLEX SYSTEM
BUILT OF A FEW BUILDING BLOCKS ASSEMBLED INTO
SPECIFIC MACROMOLECULES. EACH MACROMOLECULE IS
ENDOWED WITH A SPECIFIC FUNCTION. THE MACHINE IS
BUILT FOR DOING PRECISELY WHAT IT DOES. WE MAY
ADMIRE IT, BUT WE SHOULD NOT LOOSE OUR HEADS.
IF THE LIVING SYSTEM DID NOT PERFORM ITS TASK,
IT WOULD NOT EXIST. WE HAVE SIMPLY TO LEARN HOW
IT PERFORMS ITS TASK".

André Lwoff

C O N T E N I D O

	Pag. No.
Introducción	1
Material y Métodos	7
Resultados	18
Discusión	35
Resumen	43
Referencias	45

INTRODUCCION

La mayoría de los conceptos básicos que se tienen actualmente sobre la célula y la manera como se generan y funcionan sus componentes, han sido obtenidos con el estudio de microorganismos. De éstos, uno de los más utilizados es la bacteria Escherichia coli.

E. coli crece y se reproduce en medios de cultivo sintéticos con una fuente de nitrógeno y otra de carbono y energía. Su tiempo de generación es de aproximadamente 50', su núcleo es haploide y cada célula posee de uno a cuatro cromosomas en replicación dependiendo de la riqueza del medio en que se cultiva (Lark et. al., 1967).

Los espectaculares avances logrados en el campo de la genética bacteriana en particular y en el de la genética molecular en general se deben fundamentalmente a que estas bacterias pueden llevar al cabo intercambio de material genético.

Este intercambio de material genético en E. coli se lleva a cabo básicamente por medio de tres mecanismos: conjugación, transducción y transfección.

Al proceso de transferencia de material genético por contacto directo entre dos bacterias sexualmente distintas se le conoce como conjugación. Este proceso se comenzó a conocer cuando Lederberg (1946) - descubrió el proceso de recombinación genética en bacterias. Posteriormente Hayes (1953) demostró la existencia de dos tipos sexuales distintos en E. coli. Bacterias del primer tipo contienen un factor de fertilidad (F) y se denominan "machos"; el segundo tipo no contiene este factor y se conocen como "hembras". El factor F puede encontrarse en una célula en tres estados mutuamente exclusivos:

a) Como una entidad genética, que se replica y segrega independientemente del cromosoma; a este tipo de "machos" se les conoce como F^+ ,

b) En estado autónomo, pero a diferencia de las F^+ , el factor sexual contiene información genética que ha incorporado del cromosoma.

A estas células machos se les conoce como F-primas (F') y

c) Integrado al cromosoma como en las cepas Hfr.

Por las características arriba mencionadas, el factor sexual de E. coli encaja dentro de la definición de episoma (Jacob y Wollman, 1958).

La transferencia de material genético mediada por un bacteriófago, se denomina transducción. Durante la multiplicación de ciertos bacteriófagos, cuando pequeños fragmentos de material genético de la bacteria donadora se incluyen al azar dentro de la cubierta fágica, se constituyen las partículas transductantes; éstas pueden inyectar el material genético bacteriano que portan, de la misma manera que un fago virulento lo hace a bacterias receptoras. Una vez dentro de la bacteria receptora, los segmentos genéticos de la bacteria donadora acarreados por la partícula transductante, pueden recombinarse y quedar permanentemente incorporados al genoma de la bacteria receptora.

Se conoce como transfección, al fenómeno por el cual el material genético de un fago defectuoso como λ_{dg} , acarrea ADN puro procedente de E. coli conteniendo marcadores específicos no presentes en el genoma-fágico y ambos penetran a una bacteria receptora, obteniéndose una bacteria recombinante. Ni el bacteriófago ni el ADN por sí solos son capaces de dar lugar a recombinantes.

Como cualquier célula, E. coli tiene la capacidad de mutar dando lugar a variantes de diferentes tipos. Algunas de estas mutantes presentan el fenómeno de auxotrofismo, es decir, han perdido la capacidad de sintetizar algunos metabolitos tales como aminoácidos o vita

minas y sólo crecen en medios que contengan dichos metabolitos. Otros tipos de mutantes, son aquellas que varían en su respuesta ante la presencia en el medio de agentes como antibióticos o bacteriófagos específicos y en su capacidad para fermentar diferentes azúcares.

La respuesta de una bacteria ante la presencia del antibiótico estreptomycinina está determinada genéticamente (Lennox, 1955). Dicha respuesta se manifiesta por tres estados fenotípicos alternos: sensibilidad, resistencia y dependencia a la estreptomycinina.

Para una cepa sensible, la estreptomycinina es tóxica aún en pequeñas concentraciones (0.3 ug/ml). Una cepa altamente resistente puede soportar hasta 10,000 ug/ml de estreptomycinina; por el contrario para una cepa dependiente, la estreptomycinina es un factor de crecimiento indispensable.

A la fecha los efectos más importantes conocidos que se producen por estreptomycinina, son:

a) Inhibición de la síntesis de proteínas (Speyer et al., 1962) y (Flaks et al., 1962).

b) Alteraciones en la lectura de la clave genética (Gorini y - Davies, 1968).

c) Aumento en la permeabilidad de la membrana (Dubin et al., 1963).

El análisis genético de los tres fenotipos mencionados (sensibilidad, resistencia y dependencia) ha sido llevado a cabo por medio de estudios de conjugación (Newcombe y Nyholm, 1950) y de transducción (Hashimoto, 1960). Según los resultados obtenidos por este tipo de análisis, se puede suponer que los tres estados fenotípicos se deben a cambios en un solo gene (strA); sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que existan varios genes diferentes que también den lugar a éstos o a otros fenotipos similares. La conclusión de que los

fenotipos sensibilidad, resistencia y dependencia a la estreptomicina (Sm^S , Sm^R y Sm^D) son reflejos de estados alélicos del mismo gene; sólo puede llevarse al cabo mediante la construcción de heterodiploides. En el caso del alelismo múltiple se puede esperar la dominancia de un fenotipo sobre otro, es decir, no complementariedad.

De acuerdo con esto, la construcción de merodiploides estables es el único sistema accesible por el momento para realizar estudios de complementación de los genes responsables de la respuesta a estreptomicina en E. coli.

Las pruebas de complementación nos permiten estudiar la interacción de regiones homólogas de material genético dentro de una misma célula y son de gran importancia en la definición de un gene.

Hasta el momento no se han podido obtener diploides totales en E. coli.

Para obtener la diploidía de algunos genes o de ciertas regiones genómicas en E. coli, es necesario llevar al cabo procedimientos genéticos que nos permitan la construcción de F-merogenotes. Estos últimos son elementos genéticos derivados del factor sexual que contienen marcadores cromosomales.

La construcción de merodiploides que portasen pares alélicos para el gene strA, es decir, de heterodiploides estables se llevó al cabo por medio de la técnica de Low (1968). Esta técnica se basa en el hecho de que en una población de células Hfr siempre se encuentran células F' primarias cuyo F-merogenote contiene genes localizados cerca de F cuando éste se encuentra integrado al cromosoma. Cuando una población de machos de este tipo se conjuga con hembras deficientes en recombinación genética (recA) cuyo cromosoma contiene alelos recesivos correspondientes a los genes del F-merogenote que se quiere ais

POBLACION DE CELULAS Hfr

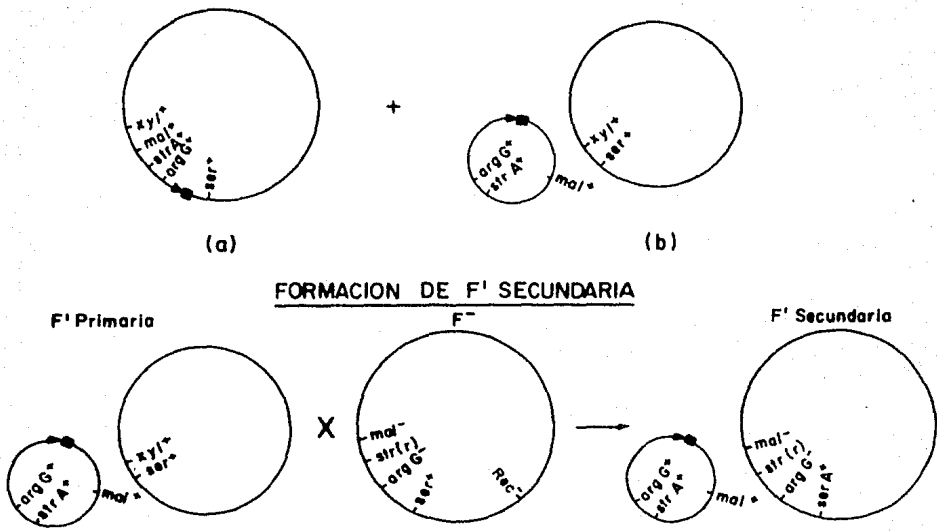


Figura 1

Obtención de merodiploides estables según la técnica de Low (1968). (Ver texto)

lar, obtendremos merodiploides estables o F' secundarios (Fig. 1).

Lederberg (1951); Apirion y Schlessinger (1968) y Sparling *et al.* (1968) han demostrado ya la dominancia del alelo sensible strA⁺ sobre el resistente strA(r). Los estudios recientes de Apirion y Schlessinger y de Sparling *et al.* se lograron por medio de la construcción de F-merogenotes estables que portaban el gene strA.

En nuestros experimentos utilizamos el F-merogenote KLF41 que contiene además de otros marcadores, el gene strA y el gene argG⁺.

El objetivo de este estudio fue el de continuar el análisis del gene strA. Para este objeto se construyeron cepas merodiploides estables en las cuales se demostró que los alelos que contienen sensibilidad y dependencia a la estreptomycin pueden coexistir dentro de una misma célula, siendo la sensibilidad dominante sobre la dependencia.

La importancia de estos merodiploides y de sus relaciones de dominancia-recesividad radica en que nos permite un mayor conocimiento del papel de los ribosomas en el mecanismo de la síntesis de proteínas, en vista de que recientemente se ha demostrado que el producto del gene strA es una proteína de la fracción subribosómica 30S (Ozaki *et al.*, 1969).

MATERIAL Y METODOS

CEPAS BACTERIANAS.

Todas las cepas bacterianas utilizadas para estos estudios se enumeran en la Tabla 1.

La cepa merodiploide MX2 portadora del episoma KLF41 nos fue proporcionada por el Dr. Brooks Low. El episoma KLF41 contiene la región entre los minutos 60 y 66 del mapa de Escherichia coli (Fig. 2).

Un requisito indispensable para construir cepas merodiploides estables es que la cepa receptora (F^-) lleve en su cromosoma alelos recesivos de los genes que porta el episoma de la cepa donadora (F') con la que se conjuga, de tal manera que por ejemplo, al cruzar una cepa receptora leu⁻ con una F' cuyo episoma sea portador del gene leu⁺ la progenie obtenida de esta cruce sería fenotípicamente Leu⁺, pero portadora de leu⁻ en el cromosoma y de leu⁺ en el episoma y los diploides que perdieran el episoma no serían viables en medios mínimos carentes de leucina ya que serían fenotípicamente Leu⁻. Las células diploides leu⁺/leu⁻ cultivadas en un medio mínimo en ausencia de leucina serían necesariamente heterodiploides para el gene leu.

De acuerdo con esto, ya que el F-merogenote KLF41 es portador del gene argG⁺ se consideró conveniente construir una cepa receptora F^- que portara en su cromosoma el marcador argG⁻, y que fuera sensible a la estreptomycin; para que a partir de ella se aislaran diferentes mutantes en el gene strA. Posteriormente la mutante argG⁻ se cruzaría con machos portadores de KLF41 (argG⁺).

La cepa W3350 se sometió a dos tratamientos sucesivos con el mutágeno etil-metano-sulfonato (EMS) (Clark, 1967), obteniéndose así la cepa MX30 portadora de las mutaciones argG31 y leu26.

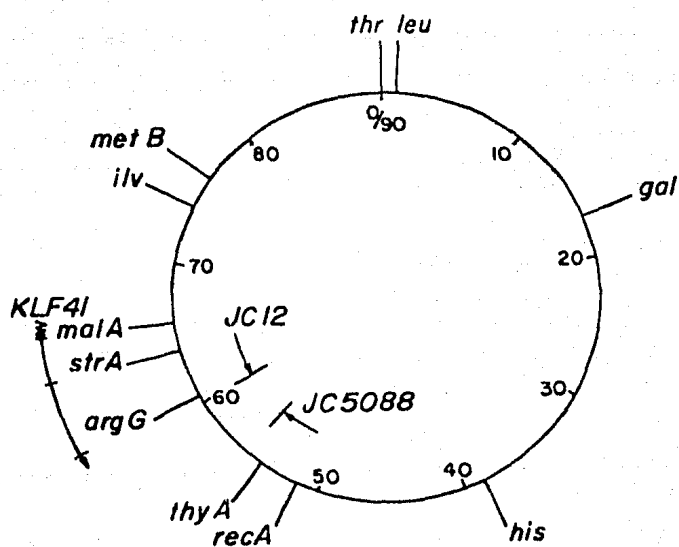


Figura 2

Mapa genético de Escherichia coli. Muestra la localización de algunos genes pertinentes a este trabajo, el tamaño aproximado del F-merogenote - KLF41 y con puntas de flecha interiores el origen de las cepas Hfr utilizadas. (de Taylor y Trotter, 1967 y Low, 1968).

Se han descrito ocho genes estructurales dispersos en el genoma cuyos productos están involucrados en la síntesis de arginina; éstos han sido denominados con letras sucesivas de la A a la H (Taylor y Trotter, 1967) según esto, es de esperarse que varias cepas incapaces de sintetizar arginina puedan estar mutadas en diferentes cistrones, pero ser fenotípicamente idénticas. Como se necesitaba una cepa que fuera argG⁻ ésta se seleccionó de entre todas las Arg⁻ aisladas por su capacidad para producir progenie merodiploide Arg⁺ al cruzarla con la cepa F' portadora de KLF41 (MX2).

En 1964 Gorini y Kataja describieron un tipo de mutantes auxótrofos que podrían crecer en medios que contuvieran estreptomycin, aún cuando no se agregara el metabolito en cuya síntesis eran deficientes. A estas mutantes se les denominó "condicionalmente dependientes a la estreptomycin" (CSD).

Se necesitó comprobar que la mutación argG⁻ que portaba MX30 no fuera CSD ya que entonces hubiera sido imposible la caracterización de la progenie merodiploide recuperada en medios con estreptomycin producto de cruza con MX30 o con alguna cepa derivada de ésta. Se encontró que la mutación argG31 no era CSD ya que todas las cepas dependientes y resistentes crecidas con estreptomycin seguían requiriendo arginina.

Las mutantes estreptomycin dependientes usadas como receptoras en las cruza con machos portadores de KLF41 se obtuvieron tratando a MX30 con el mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (Adelberg et. al., 1965).

CONSTRUCCION DE MX55.

La cepa dependiente a la estreptomycin MX32 usada como receptora en nuestros experimentos es Rec⁺. Para construir merodiploides esta

bles se construyó una cepa isogénica a MX32 pero Rec⁻. Esta cepa se obtuvo utilizando el procedimiento de selección con trimetoprima (Stacey y Simpson, 1965). A la mutante F⁻ argG31 leu26 strA(d)900 thyA⁻ se le denominó MX54. En la cepa JC5088 los marcadores (thyA y rec) se transfieren juntos y entran a la cepa receptora aproximadamente 5 minutos después de iniciada la conjugación.

Se cruzó la mutante MX54 con la cepa Hfr JC5088 y de la proge-
nie obtenida de esta cruce se purificó una recombinante Thy⁺ Rec⁻
(recA56) a la que se denominó MX55.

NOMENCLATURA.

Los símbolos usados para denominar los genotipos y fenotipos -
siguen las recomendaciones de Demerec et al. (1966).

Cada gene se designa con un símbolo formado por tres letras mi-
núsculas que se subrayan o imprimen en letra cursiva. Cuando se hace
referencia al alelo silvestre de un gene, se agrega a las tres letras
que abrevian dicho gene el signo + y cuando se hable de un alelo mu-
tado el signo - ; por ejemplo: arg⁺ ó arg⁻.

Cuando existen varios loci que al mutar producen el mismo -
cambio fenotípico se agrega una letra mayúscula después de las tres
letras minúsculas que sirve para distinguir el locus específicamen-
te mutado; por ejemplo: argA, argB, argC.

Los diferentes sitios mutados en el mismo gene se designan con
números colocados después del símbolo genotípico; por ejemplo: argG31.

Los episomas se designan con símbolos convencionales que difie-
ren mucho de los símbolos genotípicos. En nuestro caso todos los epi-
somas descritos se denominan KLF41.

Solamente nos apartamos de esta nomenclatura al utilizar los -
símbolos (s), (r) y (d) para definir la designación genotípica en -

relación al comportamiento de las cepas en presencia de estreptomycin. La denominación genotípica usada para las diferentes mutantes en el gene strA fue strA⁺ para el gene silvestre, que determina sensible a la estreptomycin, strA(r) para estreptomycin-resistencia y strA(d) para estreptomycin-dependencia.

La abreviatura del se utiliza en este trabajo para denominar a las deleciones.

MEDIOS Y CONDICIONES UTILIZADAS EN LOS EXPERIMENTOS DE CONJUGACION.

Medios.- Las cantidades de los diferentes componentes de los medios líquidos se dan siempre para 1 litro de agua.

Los cultivos líquidos se prepararon en caldo Luria conteniendo: triptona 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 10g, glucosa 1g, se ajustó a un pH de 7. El medio Luria sólido contiene además 15g de agar. El medio mínimo contiene KH_2PO_4 6.8g, $(\text{NF}_4)_2\text{PO}_4$ 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, CaCl_2 5mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, se ajustó a un pH de 7.2. Se le agregan diferentes azúcares como fuente de carbono y energía a una concentración final de 0.2g/100 ml y diferentes aminoácidos a las concentraciones previamente descritas (Burns y Adelberg, 1960) de acuerdo con el tipo de progenie que se desee seleccionar. La estreptomycin se añadió a concentraciones finales de 100 ug/ml.

El caldo Luria y el medio mínimo se esterilizaron en el autoclave y la estreptomycin y los diferentes aminoácidos se esterilizaron utilizando filtros Miliporo. Los azúcares se esterilizaron por separado.

Métodos de cultivo.- Las cepas se conservaron en tubos inclinados con agar Luria. Para cruces en medio líquido, la cepa MX2 se cultivó durante 18 horas sin agitación en medio mínimo líquido sin ar-

ginina, y las MX32 y MX55 en medio mínimo con estreptomycin. Posteriormente estos cultivos se diluyeron 1:50 en caldo Luria y se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial. Los cultivos crecieron en matraces Erlenmeyer provistos de un tubo lateral, que permitía hacer lecturas a 660 nm en un fotocolorímetro Klett-Summerson.

Condiciones de conjugación.- Los cultivos en fase exponencial se mezclaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml en la siguiente proporción: 1 ml de células macho por cada 9 ml de células hembra (aproximadamente 1 célula "macho" por cada 10 células "hembras"). Las mezclas de conjugación se incubaron sin agitación a 37°C durante 1 y 2 horas.

Interrupción de la conjugación.- La interrupción de las conjugaciones se llevó al cabo por medio de un vibrador eléctrico semejante al descrito por Low y Wood (1965).

PURIFICACION DE LAS CEPAS.

Las cepas se purificaron aislando colonias solitarias durante dos ciclos en el mismo medio en el que se obtuvieron. Las cepas haploides se conservaron en tubos con agar Luria inclinado con o sin estreptomycin. Todos los merodiploides se conservaron en tubos del medio mínimo adecuado sin arginina.

DETERMINACION DEL FENOTIPO EN RELACION A ESTREPTOMICINA.

Las células de la progenie resultante de las diferentes cruces se tomaron con palillos estériles y se sembraron en forma de parches (50 a 100 parches por caja), en cajas de Petri conteniendo el mismo medio en el que se aislaron. Las cajas inoculadas se incubaron a 37°C y después de haberse obtenido un buen crecimiento se transfiríe

ron a cajas del mismo medio mínimo con y sin estreptomycin, siguiendo el método de replicación de cajas desarrollado por Lederberg (1952). Este método permite transportar parte de las bacterias de una caja inicial a sitios correspondientes en cajas sucesivas. Esta transferencia se lleva al cabo con la ayuda de un terciopelo que se coloca sobre un soporte de metal de forma cilíndrica que posee un diámetro ligeramente menor que el de una caja de Petri. El terciopelo se mantiene fijo al cilindro por medio de un cinturón metálico. Los parches presentes en la caja inicial se transfieren al terciopelo invirtiendo la caja sobre éste. La tela ya impresa sirve como molde para colocar sobre ésta, cajas con diferentes medios en los que se quieran probar los parches.

Las colonias sensibles se identificaron porque sólo crecen en medios sin estreptomycin. Para determinar si el fenotipo de las colonias recuperadas en medio con estreptomycin era resistente o dependiente, las cajas se replicaron a cajas de medios con y sin estreptomycin. Las colonias dependientes presentaron un mayor crecimiento en medios con estreptomycin, mientras que las resistentes crecieron igual en ambos medios.

También se utilizó otra técnica para investigar el fenotipo a estreptomycin. Se sembraron inóculos de entre 10^4 y 10^5 células en tubos con caldo Luria con y sin estreptomycin. Las células sensibles sólo crecieron en medios sin estreptomycin, las resistentes crecieron igual en ambos medios y las dependientes solamente crecieron en medios con estreptomycin.

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA GENETICA DE LOS MERO-DIPLOIDES.

Para probar la capacidad de donación del F-merogenote de estas cepas se esparció una capa de células receptoras F⁻ argG⁻ sobre -

cajas de medio mínimo sin arginina (con y sin estreptomycin). Sobre estas cajas se replicaron nuestros merodiploides. El crecimiento en estas cajas de conjugación indicó transferencia del F-merogenote KLF41 portador del gene argG⁺.

ELIMINACION DEL F-MEROGENOTE (CURACION) CON NARANJA DE ACRIDINA.

Estos experimentos se efectuaron siguiendo la técnica de Hirota (1960). Para preparar los inóculos, las cepas merodiploides crecieron durante 18 horas en el medio mínimo líquido apropiado sin arginina. Estos cultivos se diluyeron 100 veces y con ellos se inocularon matraces con 10⁴ células/ml con caldo Luria con y sin naranja de acridina y con y sin estreptomycin. Estos matraces se incubaron a 37°C hasta observar crecimiento o hasta por 96 hs. El colorante - naranja de acridina se utilizó a concentraciones finales de 25 ug/ml para curación de los merodiploides Rec⁺ y a una concentración de - 10 ug/ml para curar merodiploides Rec⁻ (Bastarrachea y Willets (1969)). La estreptomycin se utilizó a concentraciones finales de 100 ug/ml. Al terminar el periodo de incubación, los cultivos se diluyeron y se sembraron en cajas de medio mínimo apropiado con y sin arginina y - con y sin estreptomycin. Las colonias resultantes se parcharon en - cajas del mismo medio en el que se aislaron y se replicaron en series de cajas de diferentes medios para probar su respuesta en presencia y ausencia de arginina y estreptomycin y su capacidad de - transferencia.

SENSIBILIDAD A MS2.

El bacteriófago MS2, específico para machos, se propagó sobre la cepa doble macho JC182 (Clark, 1963). Se probó la virilidad de las cepas Sm^S y Sm^R mezclando en agar blando licuado 0.1 ml de una

suspensión de MS2 (1000 unidades formadoras de placas) con 0.1 ml de un cultivo bacteriano con 10^9 células/ml. Esta suspensión se vació sobre cajas de medio MS, mismas que se incubaron durante 18 horas para permitir el desarrollo de las placas debidas a la lisis bacteriana causada por MS2.

Concentraciones de estreptomycin de 50 ug/ml inhiben fuertemente la infección por MS2 de las cepas Sm^R y Sm^D (Broock, 1962). Por consiguiente, después de 18 horas de crecimiento en medio con estreptomycin, las células Sm^D se mezclaron con el fago y se sembraron sobre placas de medio MS sin estreptomycin.

Medios utilizados.- El medio MS contiene 10.0 de triptona, 2.5 g de NaCl, 2.5g de KCl y $CaCl_2$ (1M).

PRUEBAS DE TRANSDUCCION.

Estas pruebas se efectuaron utilizando el bacteriófago Pl vir a y la técnica descrita por Willets et al. (1969).

Las cepas sobre las que se propagó Pl crecieron durante 18 horas a $37^{\circ}C$ sin agitación en medio mínimo líquido con estreptomycin las dependientes y sin estreptomycin las resistentes. Estos cultivos se diluyeron 1:50 y se incubaron a $37^{\circ}C$ hasta alcanzar una densidad de aproximadamente 2×10^8 células/ml. Posteriormente los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron en el mismo volumen de medio de adsorción. Se sembraron 0.2 ml de la suspensión de bacterias y 0.1 ml del fago Pl vir a en tubos de agar blando LC licuado y a $45^{\circ}C$. Esta suspensión se vació sobre cajas de LC para las cepas Sm^R y en cajas de LC adicionadas con estreptomycin (100 ug/ml) para las cepas Sm^D . Estas placas se incubaron durante 18 horas, subsecuentemente se agregaron a cada placa 2 ml de caldo Luria, se enfriaron a $4^{\circ}C$ durante 90 minutos y después se cosechó

el fago, utilizando una espátula de vidrio en forma de L con la que se desprendió la capa superficial de las cajas, donde se encuentran partículas fágicas, partículas transductantes y bacterias. Esta suspensión se centrifugó a 3000Xg durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante con las partículas fágicas y transductantes y se le añadió 1.5 ml de cloroformo por cada 100 ml de suspensión.

Medios utilizados.-

Medio de adsorción. 10 mM de $MgSO_4$ + 5mM de $CaCl_2$.

Agar blando LC: 10.0 g de triptona, 5.0 g de extracto de levadura, 10.0 g de NaCl, 1.0 g de glucosa, 10 mM $CaCl_2$ y 7g de agar. A las cajas de LC estreptomycin, se les añadió el antibiótico a una concentración final de 100 ug/ml.

Método de transducción.-

Se utilizó la técnica de Hashimoto (1960). La cepa receptora se cultiva a 37°C durante 18 horas sin agitación en medio mínimo se diluye 1:50 y se incuba a 37°C con agitación hasta obtener una densidad aproximada de 10^8 cels/ml de cultivo se centrifuga y resuspende en 1 ml de medio con triptona al 1%. Se mezclan 0.5 ml de bacterias, 0.5 ml del lisado de Pl y 0.5 ml de medio de adsorción, para obtener una multiplicidad de infección de 0.5 (1 fago por cada 20 bacterias).

Selección de transductantes.-

Se tomaron 0.5 ml. de la mezcla transductante antes obtenida y se inocularon matraces conteniendo 100 ml de medio mínimo líquido - sin estreptomycin, esto se vacía en cajas de Petri, las que se incuban a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se vacía sobre las cajas una mezcla de 2.5 ml de agar blando conteniendo 0.15 ml de estreptomycin al 1% y las cajas se incuban a nuevamente a 37°C.

Medio de adsorción. 0.3M de MgSO_4 + 0.015M de CaCl_2 .

OTROS METODOS.

Las cepas Rec^- se identificaron por su incapacidad para producir recombinantes Arg^+ cuando se cruzaban con la cepa Hfr JCl2 - (Fig. 2), y por su sensibilidad a la luz ultravioleta. Estas pruebas fueron realizadas por medio de las técnicas de réplica en placas descritas por Clark y Margulies (1965).

BIBLIOTECA GENERAL
U. N. A. M.

RESULTADOS

Se efectuaron cruza entre la cepa merodiploide MX2 portadora del episoma KLF41 y dos cepas $F^- Sm^D$ derivadas de la MX30, la MX32 y la MX55, (Tabla 2).

Siendo la cepa MX2 un merodiploide strA⁺/str(r)309, se utilizó como donadora, ya que presenta el genotipo recA1, que confiere a la cepa una deficiencia en la capacidad para formar recombinantes. En este merodiploide la recombinación mitótica entre el episoma y el cromosoma es muy baja o no existe (Clowes y Moody, 1966) impidiéndose de esta manera que durante la conjugación el episoma lleve al cabo movilización de genes cromosomales (Scaife y Gros, 1963) asegurándose así, que el único material genético transferible sea el ligado al F-merogenote.

CRUZA MX2 X MX32.

El F-merogenote KLF41, strA⁺ argG⁺, presente en la cepa MX2, se transfirió a la cepa F^- recA1 strA(d)900 argG31 MX32, en las condiciones de conjugación descritas en Material y Métodos; después de 2 - horas de conjugación, ésta se interrumpió, haciéndose diluciones que después se sembraron sobre medios selectivos.

Siendo la cepa MX32 $Arg^- His^+ Met^+$ y la MX2 $Arg^+ His^- Met^-$, de entre la progenie se seleccionó aquella que fuera $Arg^+ [His^+ Met^+]$ ó $Arg^+ [His^+ Met^+ Sm^R]$. De las colonias Arg^+ que crecieron en las cajas, se sembraron parches en cajas conteniendo el mismo medio en el que fueron aisladas, y después de 48 horas de incubación a 37°C se replicaron sobre cajas de medio mínimo:

- a) con y sin arginina,
- b) con y sin estreptomicina y

c) en cajas de medio mínimo sobre las que sembró una capa de la cepa MX17 ($F^- Sm^R Rec^- Gal^+ Arg^- His^- Met^-$) seleccionándose de entre la progenie las colonias $Arg^+ [Gal^+ Leu^+]$ y las $Arg^+ [Sm^R \delta Sm^D Gal^+ Leu^+]$. Esta selección permitió comprobar el fenotipo de la progenie de la cruce MX2 X MX32 con respecto a estreptomicina y arginina y a su capacidad de donar a una cepa F^- el episoma que portaban. Era de esperarse que los merodiploides que portasen el alelo stra⁺ en el episoma, donarían su F-merogenote a cepas receptoras Sm^R únicamente en medios selectivos sin estreptomicina, ya que en presencia de estreptomicina la progenie resultante sería sensible-resistente y por lo tanto no viable en medios conteniendo estreptomicina debido a la dominancia del alelo sensible (stra⁺) sobre el resistente (stra(r)309) (Apirion y Schlessinger, 1968; Sparling et al, 1968).

El número de colonias aisladas en cajas con estreptomicina identificadas como Sm^D resultó 103 veces mayor que el aislado en cajas sin estreptomicina (Tabla 3). De acuerdo con estos datos, inicialmente se supuso que las células de la progenie predominante, de la clase $Arg^+ Sm^D$, que donaban estreptomicina sensibilidad a la cepa resistente MX17, eran merodiploides stra⁺/stra(d) y que la dependencia a estreptomicina era dominante sobre la sensibilidad. Como se verá más adelante, esta conclusión resultó estar equivocada.

ANÁLISIS DE LA PROGENIE FENOTÍPICAMENTE $SM^D ARG^+$.

Se analizaron 1697 colonias de la clase $Arg^+ Sm^D$ aisladas en cajas de medio mínimo con estreptomicina.

ANÁLISIS DE DONACIÓN.

El 89.4% de las colonias resultaron no donadoras y se supuso que

probablemente eran recombinantes haploides $\text{Arg}^+ \text{Sm}^D$. El 10.6% restante estaba compuesto por clones que donaban Arg^+ a la receptora Sm^R en las cajas de selección con y sin estreptomicina; de estas donadoras se purificó una que se denominó MX52.

Posteriormente se efectuó la cruce entre la cepa MX52 y la MX17; la progenie merodiploide obtenida resultó ser Sm^R y a su vez donadora, cuando se cruzaba con la cepa receptora Sm^S MX30, en medios selectivos para progenie $\text{Arg}^+ \text{His}^+ \text{Met}^+$. Si las células de la cepa MX52 portaran en su F-merogenote el gene strA^+ , la transferencia a MX17 se realizaría únicamente en medios sin estreptomicina y la progenie sería susceptible debido a la dominancia del alelo strA^+ sobre el alelo $\text{str}(r)309$; por lo tanto, las colonias $\text{Arg}^+ \text{Sm}^D$ que donaban Arg^+ a MX17 debían ser:

- a) $\text{KLF41 } \text{argG}^+ \text{ strAde1 / argG31 strA}(r)309 \text{ ó}$
- b) $\text{KLF41 } \text{argG}^+ \text{ strA}(d)900 / \text{argG31 strA}(d)900$

en cuyo caso, la resistencia a estreptomicina sería dominante sobre la dependencia, explicándose así porqué la progenie resultante de la cruce MX52 X MX17 era fenotípicamente resistente.

Para decidir cual de las dos suposiciones era la correcta, se purificaron dos colonias $\text{Arg}^+ \text{Sm}^R$ de la cruce MX52 X MX17 a las que se denominó MX60 y MX61 y éstas se usaron como donadoras en experimentos de transducción utilizándose la cepa MX38 ($\text{argG31 strA}^+ \text{recA}^+$) como receptora. Si la cepa MX52 fuera merodiploide $\text{strA}(d)900 / \text{strA}(d)900$, MX60 y MX61 serían heterócigos del tipo $\text{strA}(d)900 / \text{strA}(r)309$ y en los lisados de Pl se encontrarían partículas transductantes tanto para el alelo $\text{strA}(d)900$ como para el $\text{strA}(r)309$. Si MX52 fuera haploide -

para strA(d)900 con una delección en la región strA de su F-merogenote, MX60 y MX61 deberían ser haploides strA^{del} / strA(r)309 y en los lisados del fago Pl sólo encontraríamos partículas transductantes para el gene strA(r)309. Los resultados obtenidos demostraron que en los lisados de Pl de las cepas MX60 y MX61 sólo se encontraron partículas transductantes para strA(r)309. Estas pruebas nos dan la evidencia necesaria para suponer que el genotipo de la cepa MX52 es: KLF41 argG⁺ strA^{del} / argG31 strA(d)900.

ANÁLISIS DE LA PROGENIE FENOTÍPICAMENTE ARG⁺ SM^S.

Se probaron 850 colonias Arg⁺ aisladas en medio mínimo sin estreptomicina y todas resultaron ser fenotípicamente Sm^S.

ANÁLISIS DE DONACION.

El 23% de estas colonias donaron el fenotipo Arg⁺ a la cepa receptora MX17 sólo en medios sin estreptomicina. Esto implica la presencia del alelo strA⁺ en el F-merogenote de las donadoras, ya que siendo el alelo strA⁺ dominante sobre el str(r)309, los merodiploides resultantes solo podrían crecer en medios sin Sm.

SEGREGACIÓN DE COLONIAS SM^D.

Para demostrar la existencia del estado diploide sensible/dependiente en las clonas Arg⁺Sm^S se probó la segregación de 20 colonias donadoras. Si estas clonas fueran merodiploides sensibles/dependientes, al ser cultivadas en medios con estreptomicina, deberíamos observar una frecuencia de segregación de la progenie en la que se habría perdido el F-merogenote conteniendo el gene strA⁺ y crecimiento de colonias haploides Sm^D. De las 20 colonias probadas,

18 segregaron la progenie Sm^D esperada con una frecuencia de entre 10^{-4} y 10^{-5} . Estas frecuencias son bastante mayores que las que se obtendrían si se tratara de una mutación espontánea de $strA^+$ a $strA^-$, la cual se presenta con una frecuencia aproximada de 10^{-9} . Por lo tanto, estas 18 colonias fenotípicamente Sm^S que segregaban células Sm^D representaban merodiploides heterócigos del tipo KLF41 $strA^+ / strA(d)900$. Una de estas colonias se purificó y se denominó MX50.

El resto de las colonias $Arg^+ Sm^S$ donadoras que no segregaron colonias Sm^D en las condiciones de nuestros experimentos, se catalogaron como merodiploides homócigos $strA^+ / strA^+$.

La baja frecuencia de progenie Sm^S recuperada, probablemente pueda estar relacionada con la falta de proporcionalidad en el número de colonias Arg^+ observada en medio mínimo selectivo sin estreptomycin; es decir, a medida que las diluciones se hacían 10 - veces mayores, el número de colonias no era 10 veces menor, sino - casi 1000 veces menor. Esto nos inclina a suponer que los cigotes $strA^+ / strA(d)900$ formados, no originan colonias fácilmente. Se hicieron varias pruebas para tratar de entender a qué se debía este fenómeno:

- a) La cepa receptora MX32 Sm^D se puso a dieta de Sm antes de realizar la conjugación, mediante incubación a 37° en agitación en medio L.
- b) Las cajas de selección de la progenie se incubaron en condiciones de anaerobiósis.
- c) Se sembraron muestras de la mezcla de conjugación a intervalos entre 0 y 4 horas después de iniciada la conjugación, y
- d) Sobre las cajas de selección se extendió una capa de 2ml de

agar conteniendo medio rico (L).

Ninguna de estas variaciones nos permitió alcanzar la proporcionalidad buscada.

Una posible explicación de este fenómeno sería que la dominancia del fenotipo Sm^S no se manifiesta inmediatamente después de formado el cigoto, sino después de efectuadas algunas divisiones celulares, cuando las moléculas de estreptomicina que quedaron unidas a las células Sm^D de la cepa MX32 que creció en medio conteniendo 100 ug/ml de estreptomicina ya se hubieran diluido. Debido a esto, muchos de los cigotos formados inicialmente pudieron resultar no viables, y sólo se logra recuperar una pequeña proporción de la progenie.

CRUZA MX2 X MX55. (Tabla 3)

Los cultivos de cepas merodiploides del tipo MX50, obtenidos en la craza MX2 X MX32, segregan continuamente progenie haploide - del tipo de MX32. Además, siendo MX50 una cepa Rec^+ , continuamente da lugar a recombinantes, obteniéndose progenie de los siguientes tipos:

- a) Homócigos $strA^+$ / $strA^+$ ó $strA(d)900$ / $strA(d)900$; formados por recombinación no-recíproca.
- b) Segregantes del tipo $Arg^+ Sm^S$ haploides que resultan de segregación del F-merogenote después de una recombinación entre el cromosoma y el F-merogenote,
- c) Merodiploides Hfr formados por la integración del episoma al cromosoma bacteriano, formándose así duplicaciones cromosomales en tandem y
- d) Cepas con deleciones en genes episómicos o cromosómicos -

mediadas por otros genes diferentes de recA (Franklin, 1967; Inselburg, 1967).

El objeto de este estudio era obtener merodiploides del tipo de MX50 (KLF41 strA⁺ / strA(d)900) que fueran estables. Sabemos - que la mutación recA⁻ impide que sucedan eventos de recombinación como los mencionados para MX50 (Low, 1968). Una forma de mantener los merodiploides estables sería utilizando como receptora una cepa igual a MX32 pero mutada en el gene recA . La cepa derivada de MX32 casi isogénica pero recA⁻, se denominó MX55.

ANALISIS DE LA PROGENIE FENOTIPICAMENTE ARG⁺ SM^S.

Debido a la presencia de la mutación recA⁻ en la cepa MX55, en las cajas de selección para la progenie del tipo Arg⁺ His⁺ Met⁺ de la crua MX2 X MX55 solamente esperabamos encontrar colonias - argG⁺ strA⁺ / argG31 strA(d)900 , ya que la progenie esperada debía de ser fenotipicamente sensible debido a la dominancia del alelo sensible sobre el dependiente. La progenie obtenida resultó precisamente la del tipo esperado.

ANALISIS DE DONACION.

El 100% de la progenie Arg⁺ resultó ser Sm^S y donadora de Arg⁺ y Sm^S a la cepa receptora F⁻ Sm^R Rec⁻ MX17 en medios sin Sm, pero no en medios con el antibiótico. Se purificó uno de los merodiploides de esta crua y se denominó MX56. Al cruzar MX56 X MX17, la progenie resulta fenotipicamente Sm^S ; ésto confirmó la presencia del alelo strA⁺ en el F-merogenote de merodiploides del tipo de - MX56.

En la crua MX2 X MX55, de igual modo que en la anterior - MX2 X MX32, se encontró una falta de proporcionalidad en el número

de colonias obtenidas en placas selectivas para progenie Arg⁺ His⁺ Met⁺.

ANALISIS DE LA PROGENIE FENOTIPICAMENTE ARG⁺ SM^D.

Si en la cruza MX2 X MX32, la mayoría de la progenie recuperada en medios con estreptomycinina eran recombinantes, en la cruza MX2 X MX55, la cantidad de colonias esperadas debería ser pequeña y sólo se encontraría una clase de progenie: Arg⁺ Sm^D donadoras de Arg⁺ a MX17 tanto en medios con como sin estreptomycinina y con el siguiente probable genotipo: KLF41 argG⁺ strA^d / argG31 strA(d)900. Los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con lo esperado. Se encontró una frecuencia de $2.4 \times 10^{-2}\%$ en comparación con la frecuencia de 17.5% obtenida para la progenie Arg⁺ Sm^D obtenida de la cruza MX2 X MX55.

Una colonia con las características antes mencionadas, se purificó y se denominó MX57.

Las anteriores observaciones sobre la aparición de deleciones en el F-merogenote KLF41 durante y después de la cruza MX2 X MX55, apoyan las observaciones de otros investigadores (Franklin, 1967; Inselburg, 1967) respecto a que en la producción de deleciones no intervienen los productos del gene recA.

ELIMINACION DEL EPISOMA KLF41 CON NARANJA DE ACRIDINA. (Tabla 4 y 5)

Se analizó la respuesta a tratamientos con naranja de acridina de las cepas merodiploides aisladas de las cruza MX2 X MX32 y MX2 X MX55 y como control se estudió el comportamiento de la cepa MX2.

Para esta prueba se utilizaron cuatro diferentes medios de cultivos: Caldo Luria, Caldo Luria + naranja de acridina, Caldo Luria + estreptomycinina, y Caldo Luria + estreptomycinina + naranja de acri-

dina.

RESPUESTA DE MX2.

Se obtuvo crecimiento en los cuatro medios de cultivo inoculados con la cepa MX2, como era de esperarse:

- 1) En caldo Luria + naranja de acridina se obtuvo eliminación de KLF41, a diferencia de cultivos en Luria en que las células mantienen su estado merodiploide,
- 2) En caldo Luria + estreptomicina se seleccionaron aquellas - células resistentes que habían perdido el episoma y
- 3) En caldo Luria + Sm + naranja de acridina el 100% de las sobrevivientes perdieron KLF41. Todas estas observaciones son estrictamente compatibles con el genotipo KLF41 argG⁺ strA⁺ / argG31 - strA(r)309 para la cepa MX2.

RESPUESTA DE MX50 Y MX56.

Los cultivos inoculados con estos dos heterocigotos Sm^S / Sm^D se caracterizaron por producir tanto un mejor crecimiento en medio mínimo que en Luria como en condiciones de anaerobiosis parcial que en aerobiosis. Esto puede deberse a que estas dos cepas al crecer en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo muy ricos pierdan fácilmente su F-merogenote quedando fenotípicamente como Sm^D.

Los cultivos de la cepa MX50 en caldo Luria adicionado de naranja de acridina dieron lugar a selección de organismos haploides que debido quizás a recombinación mitótica entre el cromosoma y el episoma y posterior segregación del F-merogenote presentan el gene strA⁺ en su cromosoma. En el mismo medio no se recuperó ningún sobreviviente de la cepa MX56, ya que siendo ésta cepa Rec⁻ la posibilidad de que ocurran eventos recombinacionales entre cromosoma y episoma es mínima o

nula.

Al crecer la cepa MX50 en caldo Luria + estreptomycinina se recuperaron solamente segregantes haploides Sm^D ; el mismo tipo de sobrevivientes se recuperó al crecer la cepa MX56 en las mismas condiciones.

No logró observarse la "curación" de estas cepas en caldo Luria adicionado de estreptomycinina y de naranja de acridina, ya que la sola presencia de estreptomycinina dió lugar a la formación de segregantes haploides Sm^D .

Es probable que en la cepa Rec^+ , MX50, la naranja de acridina estimule la recombinación entre el cromosoma y el episoma. Esta observación ya ha sido registrada anteriormente (Bastarrachea y Willets, 1968). Todas estas observaciones apoyan las conclusiones anteriores en el sentido de que ambas cepas, la Rec^+ MX50 y la Rec^- MX56, poseen el genotipo $KLF41 \text{ } \underline{argG^+} \text{ } \underline{strA^+} / \underline{argG31} \text{ } \underline{strA(d)900}$. Por consiguiente, la sensibilidad a estreptomycinina es dominante sobre estreptomycinina dependencia.

RESPUESTA DE MX52 Y MX57.

Estas dos cepas solamente crecen en medio con Sm , encontrándose del 2 al 9% de segregantes haploides. Al añadir naranja de acridina a este medio (25 $\mu g/ml$. para la cepa MX52 y 10 $\mu g/ml$. para la cepa MX57) no se obtuvo eliminación de $KLF41$. Tampoco se obtuvo curación al aumentarse la concentración de naranja de acridina a 100 $\mu g/ml$. para MX52 y a 25 $\mu g/ml$. para MX57 en medios conteniendo 100 $\mu g/ml$. de estreptomycinina. Estos datos parecen indicar que el antibiótico interfiere con los sitios en los cuales la naranja de acridina ejerce su efecto "curativo", sin alterar la sensibilidad de la

cepa al colorante. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de Bastarrachea y Willets, 1968, de que los efectos que produce la naranja de acridina:

- a) Eliminación de F-merogenotes y
- b) Inhibición del crecimiento celular; se ejercen en diferentes sitios celulares.

SENSIBILIDAD DE LOS MERODIPLOIDES AL BACTERIOFAGO MS 2. (Tabla 5)

La "virilidad" de las cepas MX50, MX52, MX57 y MX56 se comprobó sometiendo las cepas a una prueba de sensibilidad al bacteriófago MS 2, específico para bacterias E. coli machos, es decir, que solo son sensibles a este fago aquellas cepas portadoras de el factor F. Para esta prueba se utiliza como control cepas hembras resistentes al bacteriófago MS 2.

CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS

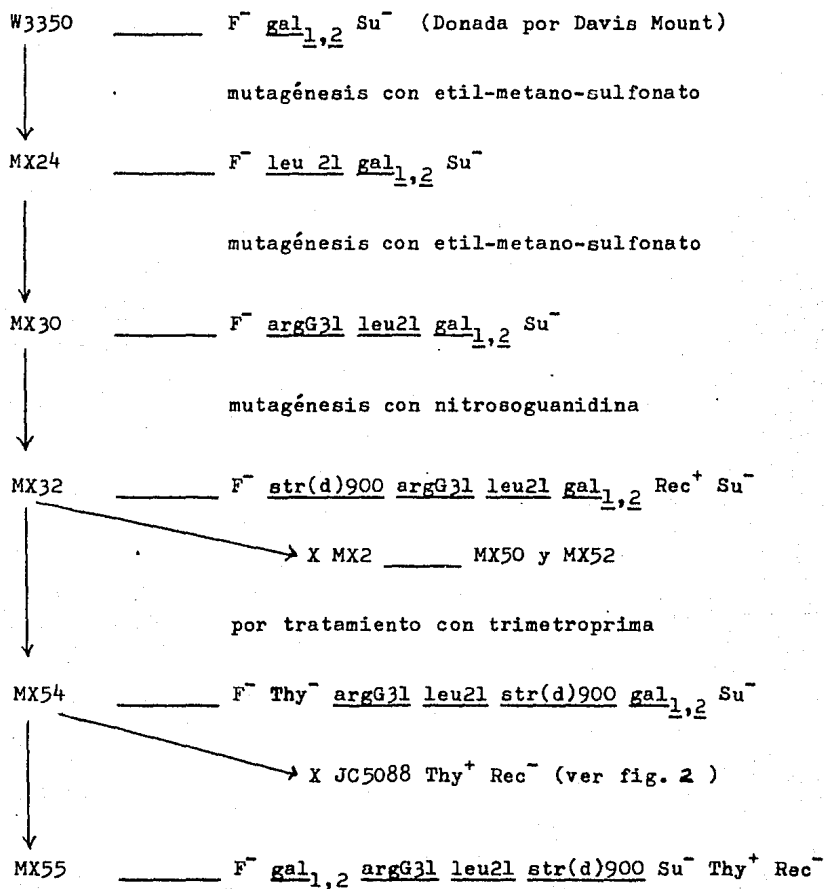
(Tabla 1)

Cepa	Características genotípicas importantes											Fenotipo para estreptomycin	Tipo sexual
	KLF41		Cromosoma										
	<u>arg G</u>	<u>str A</u>	<u>arg G</u>	<u>strA</u>	<u>metB</u>	<u>ilv</u>	<u>thr</u>	<u>Leu</u>	<u>gal</u>	<u>his</u>	<u>recA</u>		
MX2	+	+	<u>6</u>	<u>309</u>	<u>I</u>	+	+	<u>2</u>	<u>6</u>	<u>I</u>	<u>I</u>	Sm ^S	F-prima
MX17			<u>6</u>	<u>309</u>	<u>I</u>	+	+	+	+	<u>I</u>	<u>I</u>	Sm ^R	F ⁻
W3350			+	+	+	+	+	+	<u>I,2</u>	+	+	Sm ^S	F ⁻
MX30			<u>3I</u>	+	+	+	+	<u>26</u>	<u>I,2</u>	+	+	Sm ^S	F ⁻
MX32			<u>3I</u>	<u>900</u>	+	+	+	<u>26</u>	<u>I,2</u>	+	+	Sm ^D	F ⁻
MX50	+	+	<u>3I</u>	<u>900</u>	+	+	+	<u>26</u>	<u>I,2</u>	+	+	Sm ^S	F-prima
MX52	+	<u>del</u>	<u>3I</u>	<u>900</u>	+	+	+	<u>26</u>	<u>I,2</u>	+	+	Sm ^D	F-prima
MX55			<u>3I</u>	<u>900</u>	+	+	+	<u>26</u>	<u>I,2</u>	+	<u>56</u>	Sm ^D	F ⁻
MX56	+	+	<u>3I</u>	<u>900</u>	+	+	+	<u>26</u>	<u>I,2</u>	+	<u>56</u>	Sm ^S	F-prima
MX57	+	<u>del</u>	<u>3I</u>	<u>900</u>	+	+	+	<u>26</u>	<u>I,2</u>	+	<u>56</u>	Sm ^D	F-prima
JCI2			+	+	<u>I</u>	+	+	+	<u>6</u>	+	+	Sm ^S	Hfr
JC5088			+	+	+	<u>3I8</u>	<u>300</u>	+	+	+	<u>56</u>	Sm ^S	Hfr

Los símbolos genotípicos usados son los recomendados por Taylor y Trotter (1967).

El alelo strA309 confiere a las células haploides la capacidad para resistir 1000 ug/ml de estreptomina. Las cepas Sm^D que llevan el alelo strA900 crecen bien en la presencia de 50-1000 ug/ml de estreptomina; no siendo suficientes 10 ug/ml para permitirles un crecimiento completo.

GENEALOGIA DE LAS CEPAS MX32 Y MX55 (Tabla 2)



ANALISIS GENETICO DE LAS CRUZAS MX2 X MX32 Y MX2 X MX55 (Tabla 3)

Cruza	Selección	Frecuencia por centual de con- jugantes	Número de cols. probadas para marcadores no seleccionados	Frecuencia porcentual de marca- dores no seleccionados			
				Sm ^S	Sm ^D	Donadoras de argG ⁺ a MX17	
						-Sm	+ Sm
MX2 X MX32	Arg ⁺ <u>His⁺Met⁺</u>	1.7×10^{-1}	850	100		23	0
MX2 X MX32	Arg ⁺ <u>His⁺Met⁺Sm^R</u>	17.5	1697		100	10.6	10.6
MX2 X MX55	Arg ⁺ <u>His⁺Met⁺</u>	1.2×10^{-1}	400	100		100	0
MX2 X MX55	Arg ⁺ <u>His⁺Met⁺Sm^R</u>	2.4×10^{-2}	400		100	100	100

MX2 se creció en caldo Luria durante 10 generaciones, antes de conjugarla. La frecuencia de segregantes haploides espontáneos en estos cultivos fue siempre de alrededor de 0.02%.

MX32 y MX55 se crecieron en caldo Luria adicionado de estreptomycin. Cuando estos cultivos alcanzaron una densidad de 2×10^8 células/ml se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en el mismo volumen inicial de caldo Luria precalentado a 37°. Inmediatamente se mezclaron con los cultivos de las cepas machos en proporciones adecuadas y se conjugaron durante 2 horas.

En las cruza en placa, para asegurar la capacidad de transferir argG⁺ a MX17, se empleó la contra selección para Gal⁺Leu⁺.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS MERODIPLOIDES EN MEDIOS CON Y SIN NARANJA DE ACRIDINA (Tabla 4)

cepa	Medios de cultivo			
	Luria 70	Luria + AO 40	Luria + Sm 40	Luria + AO + Sm 70
MX50	96	—	48	72
MX56	—	—	23	26
MX52	—	—	48	48
MX57	20	48	22	48

El colorante naranja de acridina (AO) se añadió a concentraciones finales de 25 ug/ml para las cepas MX50 y MX52, y a una concentración de 10 ug/ml para las cepas MX2, MX56 y MX57. La estreptomicina (Sm) se añadió a concentraciones finales de 100 ug/ml.

Los números indican las horas a las cuales se alcanzó una densidad de crecimiento de $\sim 10^9$ células/ml.

(Tabla 5) Caracterización de las poblaciones obtenidas después de tratar a los merodiploides con naranja de acridina.

Cepa	Poblaciones de los experimentos de la Tabla 3	Porcentajes de los grupos más probables	Porcentaje de curación
MX2	L	100 KLF41 <u>argG⁺ str⁺/argG6 str(r)309</u>	
	L+AO	4 KLF41 <u>argG⁺ str⁺/argG6 str(r)309</u>	
		96 haploides <u>argG6 str(r)309</u>	96
	L+Sm	42 KLF41 <u>argG⁺ str del/argG6 str(r)309</u>	
		58 haploides <u>argG6 str(r)309</u>	
	L+Sm+AO	100 haploides <u>argG6 str(r)309</u>	a
MX50	L	76 KLF41 <u>argG⁺ str⁺/argG31 str(d)900</u>	
		24 haploides <u>argG⁺ str⁺</u>	
	L+AO	100 haploides <u>argG31 str⁺</u>	b
	L+Sm	12 KLF41 <u>argG⁺ str(d)900 (o str del)/argG31 str(d)900</u>	
		88 haploides <u>argG31 str(d)900</u>	
		28 KLF41 <u>argG⁺ str(d)900 (o str del)/argG31 str(d)900</u>	
	L+Sm+AO	54 haploides <u>argG31 str(d)900</u>	
		18 haploides <u>argG⁺str(d)900</u>	c
MX52	L+Sm	97 KLF41 <u>argG⁺ str del/argG31 str(d)900</u>	
		3 haploides <u>argG31 str(d)900</u>	
	L+Sm+AO	91 KLF41 <u>argG⁺ str del/argG31 str(d)900</u>	
		9 haploides <u>argG31 str(d)900</u>	6
MX56	L	100 KLF41 <u>argG⁺ str⁺/argG31 str(d)900</u>	
	L+Sm	100 haploides <u>argG31 str(d)900</u>	a
	L+Sm+AO	100 haploides <u>argG31 str(d)900</u>	a
MX57	L+Sm	98 KLF41 <u>argG⁺ str del/argG31 str(d)900</u>	
		2 haploides <u>argG31 str(d)900</u>	
	L+Sm+AO	99 KLF41 <u>argG⁺ str del/argG31 str(d)900</u>	
		1 haploides <u>argG31 str(d)900</u>	0

Los cultivos de los experimentos presentados en la Tabla 3 se diluyeron y sembraron en cajas de agar Luria con o sin estreptomicina. En cada caso se - parcharon 200 colonias en cajas del mismo medio en que se aislaron, después de - obtenido un buen crecimiento, se replicaron sobre cajas de medio mínimo para determinar su respuesta ante la presencia y ausencia de arginina o estreptomicina. También se cruzaron con células de MX17 en cajas con medio selectivo para proge-
nie Arg⁺ [Gal⁺ Leu⁺] o Arg⁺ [Gal⁺Leu⁺ Sm^R]

- a Selección de segregantes haploides, no curación.
- b Curación y ó selección precedida de recombinación.
- c Segregación precedida por recombinación (Ver texto).

SENSIBILIDAD AL BACTERIOFAGO MS2 DE CEPAS MERODIPLOIDES DE ESCHERICHIA COLI

(Tabla 6)

Cepa	Sexo	Respuesta a MS2
MX50	F'	sensible
MX52	F'	sensible
MX56	F'	sensible
MX57	F'	sensible
MX30	F ⁻	resistente
MX26	F ⁻	resistente

Las cepas MX50 y MX56 se cultivaron durante 18 horas en caldo Luria, y las cepas MX57 y MX52 se cultivaron en caldo Luria adicionado de estreptomycinina durante 18 horas. Cuando estos cultivos alcanzaron una densidad de 2×10^8 células/ml, se mezclaron con el fago en proporciones adecuadas y se sembraron en medio MS sin estreptomycinina. La presencia o ausencia de placas - formadas por el fago se registró después de incubar las cajas de cultivo durante 16 horas a - 37°C.

DISCUSION

Los resultados que hemos descrito, demuestran que después de efectuar cruizas entre ciertas cepas "machos" y "hembras" de E. coli K12, se pueden aislar cepas merodiploides F' o heterocigotos estables en medios de cultivo sin estreptomycinina. Estos portan en su F-merogenote el alelo del gene strA que les confiere sensibilidad a la estreptomycinina y en el cromosoma el alelo que les confiere dependencia al antibiótico. Estos merodiploides se construyeron tanto en cepas receptoras recA⁺ como recA⁻, aún cuando solamente aquellos que portan la mutación recA⁻ mantiene obligatoriamente su estado diploide en medio mínimo o rico sin estreptomycinina. Las pruebas efectuadas apoyan la conclusión de que la sensibilidad a la estreptomycinina es dominante sobre la dependencia.

El criterio utilizado en estos estudios para establecer la dominancia de la sensibilidad a la estreptomycinina sobre la dependencia, fue el de que estos merodiploides no crecen en medios que contengan estreptomycinina (100 ug/ml). Sin embargo, Breckenridge y Gorini (1969) han demostrado recientemente que la dominancia de la sensibilidad a la estreptomycinina sobre resistencia a la estreptomycinina se manifiesta como una inhibición reversible del crecimiento cuando estos heterodiploides se cultivan en medios conteniendo estreptomycinina. En cepas haploides strA⁺/ strA⁺, la estreptomycinina ocasiona una rápida muerte celular. En los heterodiploides sensibles/dependientes no se pueden llevar al cabo experimentos para dilucidar el efecto primario de la estreptomycinina sobre la viabilidad celular; debido al lento crecimiento de estas cepas.

El análisis genético del gene strA en E. coli llevado al cabo por Newcombe y Nyholm (1950) y por Hashimoto (1960) demostró que en

experimentos de conjugación y transducción entre cepas altamente resistentes a estreptomycin y cepas dependientes, se obtuvieron escasas recombinantes sensibles a la estreptomycin. Estos datos sugieren que las dos mutaciones se presentan en el mismo locus genético, ya que los eventos recombinacionales que ocurren entre regiones homólogas del F-merogenote y el cromosoma conteniendo cada uno de ellos mutaciones ligadas, quizás dentro del mismo gene, son de muy baja frecuencia.

Se han encontrado mutantes Sm^D , que pueden revertir a los fenotipos Sm^S ó Sm^R , y se ha visto que estas reversiones no se deben a cambios en el gene strA, sino a la presencia de mutaciones supresoras que se localizan cerca de la región strA (Hashimoto, 1960; Brownstein y Lewandowski, 1967; Apirion y Schlessinger, 1967 a). Por lo tanto, estas revertantes llevan, además de la mutación strA(d) original, una mutación supresora que posiblemente afecta a otra proteína ribosomal. (Apirion et al., 1969). Existe la posibilidad de que en nuestros diploides la dominancia de la sensibilidad sobre la dependencia tan solo sea aparente y de que la sensibilidad de nuestras cepas al antibiótico se deba a la presencia gratuita de un gene supresor en el F-merogenote KLF41 además del gene strA⁺, que suprima a la mutación strA(d)900 en los merodiploides strA⁺ / strA(d)900, provocando que el fenotipo de estos sea sensible. No se puede comprobar que KLF41 porte este supresor, ya que sabemos que las mutaciones supresoras son eficaces para suprimir mutaciones strA(d) pero desconocemos el efecto que puedan tener sobre mutaciones strA(r) y sobre el alelo strA⁺ presente en KLF41. Además, la aparición de una mutación supresora en una cepa Sm^D es un evento raro que sucede con una frecuencia de 10^{-8} y se considera poco pro-

bable que dicho evento se haya presentado en condiciones no selectivas, en la cepa JC12 de la cual se aisló KLF41 (Low 1968).

Luzatto et al. (1968) encontraron que al transducir una mutación Sm^R de una cepa de E. coli K12 a una cepa de E. coli C, las transductantes obtenidas no eran resistentes como sería de esperar sino dependientes. Según estos resultados, se propuso la existencia de un "gene modificador" que cuando está presente en células de E. coli C interacciona de tal manera con la mutación Sm^R de E. coli K12, que las células transductantes presentan un fenotipo Sm^D . Este fenómeno no se ha encontrado cuando las transducciones se efectúan entre subcepas del mismo tipo. Nosotros pensamos que este efecto se debe a interacciones genéticas, que solamente se presentan entre subcepas diferentes. Esta idea está basada en el hecho de que las diferentes subcepas poseen algunos genes diferentes tales como el llamado carácter K que codifica una proteína ribosomal de la partícula ribosomal 30S presente en la subcepa E. coli K12 pero ausente en E. coli B o en E. coli C (Leboy et al., 1964).

Gorini y Kataja (1965) han descrito mutaciones para diversas reacciones metabólicas que se manifiestan por conferir a las cepas que las poseen la capacidad de crecer solamente en presencia del metabolito requerido o bien en su ausencia, siempre y cuando la estreptomycin esté en el medio de cultivo. Esta "supresión fenotípica" - causada por la estreptomycin, se observa en cepas Sm^S utilizando concentraciones subletales de estreptomycin (~ 0.5 ug/ml) y en algunas cepas resistentes o dependientes denominadas "permisibles", en las cuales las concentraciones de estreptomycin que se añaden a los medios de cultivo para obtener la óptima supresión fenotípica es mucho mayor (~ 100 ug/ml) de acuerdo con la mayor concentración del -

antibiótico tolerada por estas cepas. A estas mutantes se les denominó CSD (condicionalmente dependientes de estreptomicina).

Si la mutación CSD fuera en un gene que cifrara productos indispensables, tales como la polimerasa del ADN, ARN de transferencia, etc. cuya función no pudiera ser reemplazada por cualquiera de los componentes presentes en los medios de cultivo, esta mutación en unión de una mutación Sm^R permisible se comportaría como Sm^D ya que la presencia de estreptomicina sería obligada para suprimir la mutación CSD de un gene que codificara un producto indispensable para la vida. Este tipo de mutantes se pueden aislar a partir de cepas Sm^R buscando derivadas dependientes (Murgola y Adelberg, 1969). Para obtener estas mutantes a partir de células Sm^S tendrían que ocurrir dos eventos mutacionales simultáneos, cuya probabilidad de aparición tendría una frecuencia del orden de 10^{-15} .

Otra propiedad de estas dobles mutantes Sm^D sería que efectuando cruza adecuadas se podrían recuperar a partir de ellas recombinantes Sm^R . En las cruza MX2 X MX32 y MX2 X MX55 no hemos obtenido ninguna recombinante Sm^R . Este resultado, unido al hecho de que el bacteriófago P1 transdujo el marcador Sm^D de la cepa MX52 a receptoras Sm^S como la MX30, está en contra de que strA(d)900 sea una - doble mutante.

Likover y Kurland (1967) han demostrado que en sistemas "in vitro" para síntesis de polipéptidos en los que se encuentran ribosomas provenientes de cepas Sm^D , la adición de estreptomicina estimula la síntesis de polipéptidos. Por lo tanto, es probable que - las células Sm^D requieran el antibiótico para llevar al cabo la - síntesis de todas sus proteínas celulares. Aún cuando estos resultados "in vitro" sean objetables, nuestros datos apoyan la idea de

que la mutación strA(d)900 es una sola mutación y por consiguiente resulta difícil imaginar que el fenotipo Sm^D se debe a la presencia de una mutación en el gene strA que permite la supresión - fenotípica por estreptomomicina de otra mutación que codifica para un gene indispensable.

Los experimentos de reconstrucción de partículas ribosomales llevados al cabo por Ozaki et al. (1969) y por Birge y Kurland - (1969) indican que una sola proteína estructural de la partícula ribosomal 30S (la proteína P_{10} de Ozaki et al. equivale a la proteína 30S-15 de Birge y Kurland) es la responsable de los fenotipos Sm^S , Sm^R y Sm^D y que por lo tanto estos fenotipos se deben a diferentes expresiones alélicas del mismo gene.

En nuestro laboratorio también hemos construido otras cepas - merodiploides estables, con el alelo dependiente en el episoma y el alelo resistente en el cromosoma. En estos diploides no se presenta complementación dominando temporalmente la dependencia sobre la resistencia. Esta es otra evidencia de que las mutaciones strA(d)900 y strA(r)309 son alélicas.

Por consiguiente, toda la evidencia y los argumentos presentados hasta ahora favorecen la naturaleza alélica de strA⁺ y strA(d)900, la cual es una premisa indispensable para sentar las bases de la dominancia del alelo sensible sobre el dependiente demostrada en el presente trabajo.

Quedan aún varias preguntas cuyas respuestas no se conocen y - que ayudarían a entender las bases moleculares de la dominancia de la sensibilidad sobre la dependencia. Algunas de éstas son:

a) ¿Cuántas copias de F-merogenote hay por célula en relación al número de copias del cromosoma?, b) ¿tienen los dos alelos del -

gene strA que estudiamos la misma probabilidad de ser transcritos y luego traducidos en proteínas? y de ser así, c) ¿están los dos tipos de proteínas formando parte de los ribosomas? y más - aún, d) ¿están estos dos tipos de ribosomas involucrados activamente en la síntesis de proteínas?

Actualmente en nuestro laboratorio se están llevando al cabo estudios para tratar de responder algunas de estas preguntas. Aún no se puede proponer ninguna hipótesis que aclare la causa de la dominancia de la sensibilidad sobre la dependencia y la resistencia a la estreptomicina.

Sparling et al. (1968) han efectuado estudios utilizando ribosomas provenientes de merodiploides sensibles/resistentes; de acuerdo con sus resultados, suponen que los ribosomas se organizan a partir de una poza común de proteínas a cuya formación contribuyen los productos de los dos alelos strA. De acuerdo con esta proposición, es posible que nuestros merodiploides tengan la capacidad de sintetizar por lo menos dos diferentes especies de partículas 30S. Una de estas especies llevaría el producto del alelo sensible y la otra el producto del alelo dependiente. Esta posibilidad está de acuerdo con el hecho de que existe una sola copia de P_{10} por partícula ribosomal 30S (Kurland C.G. comunicación personal). Si los heterocigotos sintetizan los dos tipos de partículas 30S y si ambos tipos están involucrados en la síntesis de proteínas, es probable que la proteína producida por el gene strA efectúe más de un papel durante la síntesis de las cadenas polipeptídicas y que los ribosomas del tipo Sm^D necesiten la presencia de estreptomicina para efectuar alguna de ellas.

Los experimentos efectuados por Ozaki et al. (1969) indican -

que la proteína P_{10} (producto del gene strA) tiene un papel importante en la iniciación de la síntesis de proteínas, ya que en experimentos de incorporación de aminoácidos utilizando RNA mensajero natural y ribosomas carentes de la proteína P_{10} se observa muy poca actividad de iniciación de síntesis proteínica. Es probable que P_{10} también intervenga en el alargamiento de las cadenas polipeptídicas (Modolell y Davis, 1968).

Se han encontrado diferentes loci cuyos productos son proteínas de la partícula ribosomal 30S: el locus strA (Davies et al., 1964, Pestka et al., 1965) el locus ram (Rosset y Gorini, 1969) el locus nek (Apirion y Schlessinger, 1968 a) y el locus spc (Bollen et al., 1969). Alteraciones mutacionales en la mayoría de estos loci afectan la fidelidad de la traducción de la clave genética. Ejemplos de esto último son la supresión fenotípica ejercida por estreptomina sobre otras mutaciones (CSD) (Gorini y Davies, 1968).

Todos estos fenómenos deben ser estudiados "in vivo" e "in vitro" con ribosomas de los diferentes heterocigotos para poder llegar a tener una visión más clara de los mecanismos de acción de la estreptomina y del papel que la proteína P_{10} desempeña en la estructura y la función de los ribosomas.

Debemos mencionar que el análisis genético efectuado no se limitó al estudio de los diploides sensibles/dependientes. Entre la progenie de las cruza MX2 X MX32 y MX2 X MX55 encontramos, además, un gran número de merodiploides que aparentemente portaban delecciones en el locus strA de sus F-merogenotes. De hecho toda la progenie Sm^D obtenida de la cruza de MX2 con la receptora recA56 MX55 se ha considerado como portadora de delecciones (Tabla 2, renglón 4). La frecuencia con que se presentan estos eventos es del orden de $2.4 \times 10^{-2} \%$. La presencia en el F-merogenote de una fre-

cuencia tan alta de deleciones en el gene strA, que ocurren independientemente del gene recA, no implica que en el gene cromosomal strA se presenten eventos semejantes. Se han encontrado frecuencias similares (10-2%) para otras posibles deleciones de caracteres que confieren resistencia a drogas en factores-R portados por E. coli (Falkow et al., 1966); sin embargo, en este caso - las células eran haploides para los genes del factor-R y su relación con el gene recA no fue investigada. Franklin (1967) demostró la aparición de deleciones independientes del gene recA con frecuencias de 10^{-7} y 10^{-8} en regiones cromosomales como trp, tonB.

Las deleciones del locus strA de los F-merogenotes se pueden tomar como resultados de eventos recombinacionales que no requieren del gene recA para realizarse. Estos eventos pueden deberse a errores durante la replicación ó a ruptura y reunión de segmentos de ADN cuando éstos han formado asas.

Debido a que estos eventos suceden con mayor frecuencia en los F-merogenotes que en los cromosomas, se puede suponer que se deban a errores de replicación, ya que no se tienen pruebas que indiquen que la replicación mediada por el factor sexual y la replicación vegetativa del cromosoma bacteriano se efectúen por el mismo mecanismo. De ser diferentes los mecanismos, la replicación mediada por el factor sexual, pudiera ser susceptible a una mayor frecuencia de errores, lo cual explicaría la elevada frecuencia de deleciones en el gene strA portado por KLF41.

RESUMEN

La respuesta de Escherichia coli, ante la presencia de estreptomycin en los medios de cultivo está determinada por tres estados fenotípicos mutuamente exclusivos: estreptomycin-sensibilidad, -dependencia y resistencia.

Los estudios de recombinación genética sugieren que estos diferentes fenotipos están determinados por alelos múltiples de un solo locus genético, es decir, por estados alternos de una proteína específica.

La ausencia de complementación interalélica nos permite establecer definitivamente la existencia de multialelismo para el gene strA. Dicha demostración solo puede llevarse al cabo en E. coli mediante el uso de heterodiploides estables.

Cruzando la cepa F', MX2, cuya constitución genética es KLF41 argG⁺ strA⁺ / argG6 str(r)309 con la cepa F⁻ MX32, argG31 strA(d)900 recA⁺, se obtuvieron heterodiploides con el alelo sensible en el episoma y el alelo dependiente en el cromosoma y en los cuales la sensibilidad dominaba sobre la dependencia.

La caracterización de estas cepas se llevó al cabo por:

- a) capacidad de donar sus F-merogenotes a otras cepas,
- b) segregación de células con el fenotipo recesivo Sm^D,
- c) eliminación del F-merogenote con naranja de acridina y
- d) pruebas de sensibilidad al fago MS2 específico para bacterias "macho" portadoras del factor sexual.

Una de estas cepas se purificó y se denominó MX50. Merodiploides del tipo MX50 segregan continuamente cepas recombinantes o del tipo del padre MX32 (haploides con el alelo Sm^S o el Sm^D en el cro-

mosoma). Sin embargo, pueden mantenerse indefinidamente por crecimiento en medios desprovistos de arginina y por selección continua.

Al cruzar MX2 con MX55 que es una derivada Rec^- de la MX32, se obtuvieron merodiploides similares KLF41 argG⁺ strA⁺ / argG31 strA(d)900 pero con la característica Rec^- . Estos merodiploides mantuvieron su estado heterocigótico en medios mínimos completos o ricos desprovistos de estreptomycinina.

Consideramos que el estudio genético del gene strA reviste importancia en virtud de que ha sido demostrado que su producto - es una proteína de las que forman parte del ribosoma 30S de E. coli. Según los estudios realizados en diferentes laboratorios, dicha proteína intervenga probablemente en la iniciación y alargamiento de las cadenas polipeptídicas.

REFERENCIAS

Adelberg, E.A., Mandel, M. y Chen, G.C.C.:

Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Escherichia coli K12. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18:788 (1965).

Apirion, D., y Schlessinger, D.:

Reversion from streptomycin dependence in Escherichia coli by a further change in the ribosome. J. Bacteriol. 94:1275 (1967).

Corresistance to neomycin and kanamycin by mutations in an Escherichia coli locus that affects ribosomes. J. Bacteriol. 96:768 (1968 a).

Mapping and complementation of three genes specifying 30S ribosomal components in Escherichia coli. J. Bacteriol. 96:1431 (1968 b).

Apirion, D., Schlessinger, D., Phillips, S. y Sypherd, P.:

Reversion from Streptomycin dependence, a mutation in a specific 30S ribosomal protein. J. Mol. Biol. 43:427 (1969).

Bastarrachea, F., y Willets, N.S.:

The elimination by acridine orange of F30 from recombination-deficient strains of Escherichia coli K12. Genetics 59:153 (1968).

Birge, E.A. y Kurland, C.G.:

Identification of an altered ribosomal protein in streptomycin dependent Escherichia coli. Science 164:1285 (1969).

Bollen, A., Davies, J., Ozaki, M. y Mizushima, S.:

Ribosomal protein conferring sensitivity to the antibiotic spectinomycin in Escherichia coli. Science, 165:85 (1969).

Breckenridge, L. y Gorini, L.:

The dominance of streptomycin sensitivity re-examined.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 62:979 (1969).

Brock, T.D.:

The inhibition of an RNA bacteriophage by streptomycin,
using host bacteria resistant to the antibiotic. Biochem.

Biophys. Res. Commun. 9:184 (1962).

Brownstein, B., y Lewandowski, L.J.:

A mutation suppressing streptomycin dependence. I an ef-
fect on ribosome function. J. Mol. Biol. 25:99 (1967).

Clark, A.J.: Genetic analysis of a "double male" strain of

Escherichia coli K12. Genetics. 48:105 (1963).

The beginning of a genetic analysis of recombination pro-
ficiency in "Chromosome Mechanics at the Molecular Level",
p. 165, The Wistar Institute Press, Philadelphia, 1967.

Clowes, R.C., y Moody, E.E.M.:

Chromosomal transfer from "recombination-deficient" strain
of Escherichia coli K-12. Genetics 53:717 (1966).

Davies, J., Gilbert, W. y Gorini, L.:

Streptomycin, suppression, and the code. Proc. Natl. Acad.
Sci. U.S. 51:883 (1964).

Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J. y Hartman, P.E.:

A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics.
Genetics, 54:61 (1966).

Dubin, D.T., Hancock, R. y Davis, B.D.:

The sequence of some effects of streptomycin in Escherichia
coli. Biochem. Biophys. Acta, 74:476 (1963).

Falkow, S., Citarella, R.V., Wohlhieter, J.A. y Watanabe, T.:

The molecular nature of R-factors. J. Mol. Biol. 17:102
(1966).

Flaks, J.G., Cox, E.C. y White, J.R.:

Inhibition of polypeptide synthesis by streptomycin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7:385 (1962).

Franklin, N.C.:

Extraordinary recombinational events in Escherichia coli.
Their independence of the rec⁺ function. Genetics 55:699
(1967).

Gorini, L. y Davies, J.:

The effect of streptomycin on ribosomal function. Current
Topics Microbiol. Immunol. 44:100 (1968).

Gorini, L., y Kataja, E.:

Suppression activated by streptomycin and related antibiotics in drug sensitive strains. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18:656 (1965).

Hashimoto, K.:

Streptomycin resistance in Escherichia coli analyzed by
transduction. Genetics. 45:99 (1960).

Hayes, W.:

Observations on a transmissible agent determining sexual
differentiation in Bacterium coli. J. Gen. Microbiol.
8:72 (1953).

Hirota, Y.: The effect of acridine dyes in mating type factors
in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. 46:57 (1960).

Inselburg, J.:

Formation of deletion mutations in recombination-deficient

- mutants of Escherichia coli. J. Bacteriol. 94:1266 (1967).
- Jacob, F. y Wollman E.L.:
Les épisomes, éléments génétique ajoutés. C. R. Acad. Sci.
247:154 (1958).
- Lark, K. G., Eberle, H., Consigli, R.A., Minocha, H.C., Chai, N.
y Lark, C.:
Chromosome segregation and the regulation of DNA replication,
en H.J. Vogel, J.O. Lampen y V. Bryson (eds), "Organization-
al Biosynthesis", p. 63, Academic Press, Nueva York, 1967.
- Lederberg, J.:
Streptomycin resistance: a genetically recessive mutation.
J. Bacteriol. 61:549 (1951).
- Lederberg, J. y Lederberg, E. M.:
Replica plating and indirect selection of Bacterial mutants.
J. Bact. 63:399 (1952).
- Lederberg, J., Tatum, E.L.:
Gene Recombination in Escherichia coli. Nature. 158:558
(1946).
- Leboy, P.S., Cox, E.C., y Flaks, S.G.:
The chromosomal site specifying a ribosomal protein in Esche-
richia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 52:1367 (1964).
- Lennox, E.S.:
Transduction of linked genetic characters of the host by
bacteriophage P1. Virology 1:190 (1955).
- Likover, T.E., y Kurland, C.G.:
Ribosomes from a streptomycin-dependant strain of Escherichia
coli. J. Mol. Biol. 25:497 (1967).
- Low, B.:
Formation of merodiploids in matings with a class of ReC^-

recipient strains of Escherichia coli K12. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 60:160 (1968).

Low, B. y Wood, T.H.:

A quick and efficient method for interruption of bacterial conjugation. Genet. Res. 6:300 (1965).

Luzzatto, L., Schlessinger, D. y Apirion, D.:

Escherichia coli: high resistance or dependence on streptomycin produced by the same allele. Science 161:478 (1968).

Modellell, J. y Davis, B.D.:

Rapid inhibition of polypeptide chain extension by streptomycin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61:1279 (1968).

Murgola, E.J., y Adelberg, E.A.:

Streptomycin dependence as a new type of conditional lethal mutation in Escherichia coli. Bacteriol. Proc. p. 54 (1969).

Newcombe, H.B. y Nyholm M.H.:

The inheritance of streptomycin resistance and dependence in crosses of Escherichia coli. Genetics 35:603 (1950).

Ozaki, M., Mizushima, S. y Nomura, M.:

Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in Escherichia coli. Nature 222:333 (1969).

Pestka, S., Marshall, R. y Nirenberg, M.:

RNA codewords and protein synthesis, V. Effect of streptomycin on the formation of ribosome-SRNA complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58:639 (1965).

Rosset, R., y Gorini, L.:

A ribosomal ambiguity mutation. J. Mol. Biol. 39:95 (1969).

Scaife, J., y Gross, J.D.:

The mechanism of chromosome mobilisation by an F-prime factor in Escherichia coli K-12. Genet. Res. 4:328 (1963).

Sparling, P., Modolell, J., Takeda, Y. y Davis, B.D.:

Ribosomes from Escherichia coli merodiploids heterozygous for resistance to streptomycin and to spectromycin. J. Mol. Biol. 37:407 (1968).

Speyer, J.F., Lengyel, P. y Basilio, C.:

Ribosomal localization of streptomycin sensitivity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48:684 (1962).

Stacey, K.A. y Simson, E.:

Improved method for the isolation of thymine-requiring mutants of Escherichia coli. J. Bacteriol. 90:554 (1965).

Taylor, A.L. y Trotter, C.:

Revised linkage map of Escherichia coli. Bacteriol. Rev. 31:332 (1967).

Willets, N.S., Clark, A.J. y Low, B.:

Genetic location of certain mutations conferring recombination deficiency in Escherichia coli. J. Bacteriol. 97:244 (1969).