



212
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Ciencias.

ANALISIS DEL POLIMORFISMO DEL DNA MITOCONDRIAL
Y COMPARACION FISIOLÓGICA DE DISTINTOS AISLADOS
DE *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*

TESIS

que para obtener el título de

BIOLOGO.

Presenta

Rosalinda Tapia López.

México, D.F. Abril 1992.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCION	1
1.1 GENERALIDADES SOBRE LAS LEVADURAS.	1
1.2 Mitocondria	2
1.3 DNA mitocondrial	4
1.4 DNAmT de levaduras.	11
1.5 Recombinación del DNAmT	15
1.6 Taxonomía de levaduras.	16
2. OBJETIVOS.	20
3. MATERIALES Y METODOS.	21
3.1 Cepas.	21
3.3 Análisis morfológico de las ascosporas.	22
3.4 Curvas de Crecimiento y Tiempos Medios Generacionales.	23
3.5 Espectros de Citocromos	23
3.6 Purificación del DNA mitocondrial.	23
3.7 Obtención del DNAmT en gradiente de cloruro de cesio.	24
3.8 Análisis de restricción de los DNAs mitocondriales.	25
3.9 Hibridación.	27
3.9.1 Purificación y marcaje del monitor o sonda.	28
3.9.2 Transferencia del DNA a una membrana de nylon.	31

3.9.3. Hibridación.	32
3.9.4. Revelado de la hibridación	34
4. RESULTADOS Y DISCUSION.	36
4.1 Análisis morfológico de las ascosporas	36
4.2 Curvas de crecimiento	40
4.3. Citocromos. Espectros de absorción .	42
4.4 Análisis de los patrones de restricción del DNAm.	46
4.5 Tamaño y forma de las moléculas de DNAm.	51
4.6 Mapas de restricción	53
4.7 Mapeo genético	55
5. CONCLUSIONES.	71
6. REFERENCIAS.	73

Portada y contaportada: Micrografía electrónica de una molécula de DNA mitocondrial de mamífero.

ABREVIATURAS.

DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
DNAtt	ácido desoxirribonucleico de timo de ternera
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	ácido ribonucleico mensajero
RNAr	ácido ribonucleico ribosómico
RNAt	ácido ribonucleico de transferencia
DNAasa	desoxirribonucleasa
RNAasa	ribonucleasa
A	base púrica adenina
G	base púrica guanina
T	base pirimídica timina
C	base pirimídica citosina
U	base pirimídica uracilo
Kpb	kilo pares de bases
pb	pares de bases
Tf	temperatura de fusión
EDTA	ácido etilén diamino tetracético
SDS	dodecil sulfato de sodio
BSA	albúmina sérica bovina
PEG	polietilenglicol
Tris	tris hidroximetil aminometano
KH_2PO_4	fosfato de potasio monobásico
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	ditionita de sodio

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES SOBRE LAS LEVADURAS.

Las levaduras se definen como organismos unicelulares eucariontes que se encuentran agrupados en el Reino Fungi, que de acuerdo a su morfología se consideran como un "estado" en el ciclo de vida de los hongos hifales. (Kreger-van Rij, 1987). Las levaduras son taxonómicamente diversas por lo que se han clasificado en tres grupos: (1) Levaduras ascosporógenas, (2) Levaduras basidiosporógenas y (3) Levaduras imperfectas. (Van der Walt, 1987, a).

Las levaduras pueden crecer como células haploides o diploides y normalmente se reproducen asexualmente por gemación (mitosis asimétrica) o por fisión binaria como es el caso de *Schizosaccharomyces pombe* (Munz et al., 1989), aunque algunas también pueden reproducirse sexualmente; en este caso, dos células haploides de factor sexual o de compatibilidad contrarios a vs o h^- vs h^+ , se conjugan para así formar un cigoto diploide el cual puede multiplicarse mitóticamente o experimentar meiosis y originar una tétrada de ascosporas haploides. (Arnold, 1981).

Las levaduras ocupan un lugar único en la larga historia de la humanidad, en el mundo de los microorganismos han sido utilizadas como una especie de ganado, habiendo sido cultivadas por el hombre, y utilizadas inadvertidamente hasta el último siglo en la fermentación del pan y la producción de bebidas, las cuales contenían alcohol etílico, probablemente el primer anestésico y soporífero. Su importancia no fue reconocida sino hasta el siglo pasado. Hace aproximadamente 100 años (1866, 1876) cuando Luis Pasteur demostró la participación esencial de levaduras vivas en los procesos de fermentación, y comenzaron estudios más precisos acerca de las funciones realizadas por las levaduras, y a partir de este hallazgo se incrementó la producción en la industria de algunas especies de *Saccharomyces* que comenzaron a ser producidas en enormes cantidades del orden de toneladas. Recientemente han sido utilizadas para la manufactura de productos químicos, combustible y proteínas comestibles. (Rose, 1987)

Estos microorganismos han ocupado un papel central en diversos estudios como modelo de organismos eucariontes, debido a que poseen ciertas características, como son las siguientes:

-Presentan un crecimiento fácil y rápido, por lo que proveen una biomasa microbiana adecuada para su estudio

-Algunas tienen alternancia de reproducción sexual y asexual.

-Otras son anaeróbicas facultativas, por lo cual pueden derivar su energía de la glucólisis únicamente, con una menor producción de moléculas de ATP, por cada molécula de glucosa utilizada;

-Presentan organelos con material genético propio, tales como la mitocondria;

-Crecen en colonias, lo que facilita el aislamiento y caracterización de mutantes.

Las levaduras pertenecientes al género *Kluyveromyces* son levaduras ascosporógenas, del grupo de los Hemiascomicetos, que a su vez pertenecen a los Ascomycotina porque carecen de ascocarpos (cuerpos fructíferos) e hifas ascógenas (Ainsworth, 1973). El género *Kluyveromyces* pertenece al Subphylum Ascomycotina, Clase de los Hemiascomycetes, Orden de los Endomycetales, Familia Saccharomycetaceae, Subfamilia Saccharomycetoideae. En esta última se agrupan organismos que han sido ampliamente estudiados tanto genética como bioquímicamente como *Saccharomyces*, *Pichia*, *Torulaspóra*, *Dekkera*, además del género anteriormente mencionado (Kreger- van Rij, 1987; Van der Walt y Johannsen, 1984).

En nuestro laboratorio estamos interesados en tratar de entender las ambiguas relaciones filéticas de las levaduras, siendo *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* nuestro modelo experimental y el polimorfismo del DNAm_t en esta levadura nuestro principal sistema de estudio.

1.2 MITOCONDRIA

Las mitocondrias son organelos presentes en la mayoría de las células eucariontes. En dichos organelos pueden definirse tres clases principales de funciones. Primero están las funciones bien conocidas de acoplamiento de energía tales como la conservación de la misma por fosforilación de ADP a ATP (fosforilación oxidativa), transhidrogenación entre los piridín nucleótidos, y la translocación de iones y solutos. Una segunda propiedad es la que lleva a cabo reacciones importantes en el catabolismo y el anabolismo tales como la oxidación de ácidos grasos y la síntesis de porfirinas, aminoácidos, fosfolípidos, coenzimas como el folato, hemo, urea, citrulina y muchos otros metabolitos. La tercera se refiere a la perpetuación o biogénesis del propio organelo, ya que éste contiene su propio DNA, RNAt y RNAr, existiendo por lo tanto para la biogénesis de este organelo tanto contribución nuclear como mitocondrial. Esto también involucra la operación de complejos mecanismos para el importe y clasificación intramitocondrial de proteínas sintetizadas dentro y fuera de la mitocondria, fosfolípidos y probablemente algunos RNAs. (Tzagoloff et al., 1979, 1982; Whittaker y Danks, 1982; Evans, 1983).

La mitocondria es un organelo de suma importancia como se mencionó anteriormente, y está formado por diferentes membranas y compartimentos. (FIG. 1) La membrana externa, la cual presenta un número sustancial de enzimas, tales como

la monoamina oxidasa, la NADH-citocromo c reductasa insensible a rotenona; el complejo flavoproteína-citocromo b₅. La membrana externa también tiene un número de enzimas concernientes a la biosíntesis de fosfolípidos (glicerofosfato acil transferasas, sistema de elongación de ácidos grasos). (Tzagoloff, 1982).

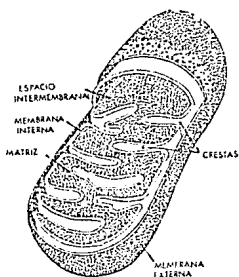


Fig 1.1 Esquema tridimensional de una mitocondria.

La membrana interna es una de las membranas más importantes dentro de las células eucariotes. La fosforilación oxidativa es la función más relevante de la mitocondria y es realizada en esta membrana. Este proceso es catalizado por cuatro complejos respiratorios, NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I), succinato-ubiquinona oxidoreductasa (complejo II), ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa (complejo III) y citocromo c oxidasa (complejo IV). Siguiendo esta nomenclatura la ATPsintetasa ATPasa sensible a oligomicina es denominada en ocasiones complejo V (González-Halphen, 1990). Estas cinco enzimas están localizadas en la membrana interna y representan la mayoría de la masa de la membrana. Además de los complejos respiratorios y la ATPasa, la membrana interna alberga a la piridín nucleótido transhidrogenasa, β -hidroxibutirato deshidrogenasa, y sistemas de enzimas responsables del transporte de iones, sustratos y nucleótidos. (Attardi y Schatz, 1988).

El espacio intermembranal se encuentra localizado entre las membranas externa e interna. Pocas actividades han sido encontradas aquí, pero la más importante es la de la adenilato cinasa la cual probablemente funcione en el mantenimiento del balance de nucleótidos de adenina en el organelo.

La mayoría de las enzimas solubles de la mitocondria están presentes en la matriz mitocondrial, que se localiza en el espacio interno de la membrana interna. La lista de actividades es muy grande, pero de particular importancia son los ciclos de los ácidos tricarboxílicos y el de la oxidación de ácidos grasos. Entre las enzimas más importantes en la matriz se encuentran la glutamato deshidrogenasa, el complejo piruvato deshidrogenasa, fosfato carbamil sintetasa, y la ornitina transcarbamilasa. La matriz contiene además DNA, RNAt, varias aminoacil transferasas, DNA y RNA polimerasas, y otros componentes de la maquinaria de transcripción y traducción (Tzagoloff, 1982).

En muchos aspectos el sistema de síntesis de proteínas mitocondrial es mucho más parecido al sistema bacteriano que al citoplásmico de eucariontes, hecho que ha sido tomado en cuenta para proponer un origen endosimbiótico a la mitocondria. Una característica de los ribosomas mitocondriales además de su menor tamaño y coeficiente de sedimentación con respecto a su contraparte citoplásmica eucarionte, es su sensibilidad a antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas. Drogas antibacterianas tales como el cloramfenicol y eritromicina son potentes inhibidores de ribosomas mitocondriales, mientras que antibióticos que inhiben a ribosomas citoplásmicos como cicloheximida y emetina, no tienen efecto (Preble, 1981; Dujon, 1981).

Las proteínas que se encuentran en la mitocondria son productos de dos sistemas separados; mientras que la mayoría son sintetizadas en el citoplasma y exportadas hacia la mitocondria, algunas son sintetizadas en la matriz mitocondrial (Luzikov, 1985).

Las proteínas sintetizadas en la mitocondria se encuentran firmemente unidas a la membrana interna, de la misma manera se han observado unidos los ribosomas mitocondriales mientras que la mayoría de las proteínas solubles son sintetizadas extramitocondrialmente. El carácter hidrofóbico de las proteínas que se saben son sintetizadas por las mitocondrias puede proporcionar un indicio de las necesidades para la síntesis mitocondrial de proteínas. Su falta de solubilidad en un ambiente acuoso, podría requerir que su síntesis fuera muy cerca de su lugar de operación, en la membrana interna. (Tzagoloff, 1982; Schmidth, et al.; Popot y de Vitry, 1990).

1.3 DNA MITOCONDRIAL

Los fundamentos de la genética mitocondrial fueron establecidos a finales de los años 40's por Ephrussi y sus colaboradores, especialmente Slonimski, quienes descubrieron una mutación que abatía la capacidad de las levaduras para crecer en sustratos no fermentables tales como el etanol o glicerol cuya utilización depende de una cadena respiratoria funcional. Aún cuando tales cepas respiratorio-deficientes de levadura son capaces de crecer en glucosa y otros azúcares, forman pequeñas colonias y por esta razón fueron llamadas mutantes "petite". Los estudios de Ephrussi mostraron que las mutaciones resultantes en el

fenotipo "petite" son heredadas de una manera no-Mendeliana, y por lo tanto postuló que dichas lesiones estaban localizadas en un elemento extracromosómico o citoplasmico. Este elemento fué designado como el factor rho (ρ), y por lo tanto, las mutantes "petite" citoplásmicas son referidas como mutantes ρ^- . En el tiempo de su descubrimiento, se desconocía la naturaleza de dicho factor y no fue sino hasta algún tiempo después que se le relacionó con el DNAmT (Tzagoloff, 1982; Whittaker y Danks, 1982).

La evidencia crítica que asoció la mutación "petite" con el DNAmT estuvo basada en dos descubrimientos importantes: (1) que algunas "petites" contenían DNAmT alterado físicamente y (2) que las mutaciones "petite" podían alterar otros genes no-Mendelianos y ser de origen mitocondrial. La lesión genética está en el genoma mitocondrial pero se trata de una mutación poco común: un fragmento generalmente pequeño, del cromosoma organelar (DNAmT) llega a ser amplificado, aparentemente de cualquier parte de la molécula de DNA, por repetición en tandem hasta llegar a ser una nueva molécula circular comparable en tamaño a la normal, en este estado es transmitido a las células hijas durante el crecimiento vegetativo. La característica más extraordinaria de las mutantes "petite" es la elevada tasa espontánea con la cual surgen, aproximadamente el 1%, pero la mutación puede ser incrementada dramáticamente por agentes intercalantes, particularmente acriflavina y bromuro de etidio (Kurtzman et al., 1983).

El estudio de las mutantes "petite" ha permitido dilucidar muchos de los aspectos relacionados con la herencia no-Mendeliana (no cromosómica) además de ayudar al entendimiento de la síntesis de los diferentes complejos proteicos de las mitocondrias, ya sea citoplásmico o mitocondrial a partir de inhibidores. Como generalmente las mutantes "petite" retienen sólo un segmento del genoma mitocondrial, éste es invariablemente insuficiente para codificar todos los RNAr y RNAt para la síntesis de proteínas mitocondriales. En consecuencia, cualquier proteína mitocondrial encontrada en las mutantes "petite" debe ser codificada por el DNA nuclear y sintetizada en los ribosomas citoplásmicos, explicando esto también por que la mutación "petite" es pleiotrópica. (Whittaker, 1982).

La herencia mitocondrial en levaduras es biparental; durante la fusión de células haploides, ambos progenitores contribuyen de igual manera a la formación del citoplasma del diploide. En mamíferos y otros animales, los espermas contribuyen muy poco (si es que lo hacen) al citoplasma del cigoto, y la mayoría (si no es que todas) las mitocondrias del embrión son derivadas del óvulo, no del espermatozoide. (Darnell et al., 1990)

La existencia de genes citoplásmicos fue sugerida desde 1909, cuando los primeros ejemplos de herencia no-Mendeliana fueron descritos por Correns y por Bauer. Históricamente, la idea de que cloroplastos y mitocondrias podrían ser organelos autónomos viene de principios de siglo. Sin embargo, la evidencia genética de genes no Mendelianos se acumuló muy lentamente entre 1910 y 1960,

un período cuando los grandes avances en genética Mendeliana y genética molecular fueron hechos y consolidados. (Sager, 1972).

El interés en la posible presencia de DNA en la mitocondria fue estimulado por la demostración de DNA en cloroplastos a partir de 1960. La existencia de DNA en las preparaciones mitocondriales fué negada por mucho tiempo debido a la contaminación por núcleos. Evidencias más convincentes llegaron a partir de los trabajos de Nass y Nass (1963), quienes mostraron la presencia de inclusiones semejantes a fibras en la matriz mitocondrial de embriones de pollo al realizar tinciones con acetato de uranilo; estas inclusiones eran destruidas específicamente por DNAasa y se conservaban cuando se utilizaba RNAasa, considerándose por lo tanto, como DNA. Schatz y colaboradores (1964), usando preparaciones de mitocondrias purificadas, mostraron la presencia de una cantidad pequeña y constante de DNA asociado a la mitocondria. En el mismo año Luck y Reich (1964) aislaron DNA de las mitocondrias de *Neurospora*. En 1965, Nass y colaboradores concluyeron que "el DNA es una parte integral, probablemente de todas las mitocondrias". (Prebble, 1981).

En ese mismo año (1965), se tuvo una demostración más clara, cuando Mahler y otros investigadores extrajeron DNA de células de levadura y lo sometieron a ultracentrifugación analítica en un gradiente de cloruro de cesio. En el equilibrio, el DNA se separó en dos bandas distintas con densidades de 1.683 y 1.699 g/cm⁻³. La banda de 1.683 g/cm⁻³ representó cerca del 15 % del DNA total. El aislamiento de una fracción mitocondrial de levadura, seguido de la extracción del DNA, dio por resultado una disminución considerable del componente de 1.699 g/cm⁻³, en tanto que el componente de 1.683 g/cm⁻³ se conservó. Quedó claro que el componente mayor de alta densidad era el DNA nuclear y el componente minoritario era el DNAm_t. A partir de entoces, el DNAm_t se ha identificado en una amplia variedad de organismos. (Whittaker y Danks, 1982; Darnell et al. 1990).

El DNAm_t es ahora conocido como el centro de un sistema genético semiautónomo empleando su propio código genético y que es expresado a través de una maquinaria de transcripción y traducción bastante distinta de la existente en núcleo y citoplasma de eucariotes, pero muy semejante a la que prevalece en procariontes (Grivell, 1989).

En la mayoría de los casos el DNAm_t es una molécula duplex circular unida covalentemente con giros superhelicoidales. (Whittaker y Danks, 1982; Tzagoloff, 1982), aunque existen excepciones, como en el caso de *Solanum tuberosum*, *Parthenocissus tricuspidata*, *Oenothera berteriana*. Algunas levaduras como *Hansenula mrakii* y *Pichia* spp. tienen un DNAm_t lineal, ciliados como *Paramecium* spp. y *Tetrahymena* spp. también presentan una molécula lineal de DNA, pero además éste puede encontrarse como minicírculos y/o maxicírculos (Wallace, 1982; Jayarama-Bhat et al., 1990). Al parecer la prevalencia de formas circulares sugiere que éstas son de importancia biológica fundamental (Prebble, 1981).

Las células parecen poseer varias moléculas de DNAm_t, siendo mayor la cantidad de las mismas en levaduras aerobias (Wilkie, 1983). En la levadura de panadería, *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, hay generalmente de 50 a 100 moléculas por célula. El número preciso de moléculas está relacionado con el nivel de ploidía (número de series completas de cromosomas por célula), siendo en las células diploides aproximadamente el doble del de las células haploides, manteniéndose así una proporción constante entre el DNAm_t y el DNA nuclear. (Sazer y Sherwood, 1990)

El DNAm_t presenta grandes variaciones a diferentes niveles, con respecto al tamaño y forma (Wallace, 1982). En *S. cerevisiae* el peso molecular de este genoma es aproximadamente de 50×10^6 , correspondiendo a un círculo de 25 m. El tamaño del DNAm_t en otras levaduras y hongos multicelulares es algo más pequeño. En general, los genomas mayores han sido encontrados en plantas (200-2500 Kpb) (Bailey-Serres, 1987) y los más pequeños en las mitocondrias de animales 18 Kpb (Cavalier-Smith, 1985). Ver Tabla No. 1.

El DNAm_t además de la diversidad observada en cuanto a forma y tamaño en los diferentes grupos, también presenta una gran diversidad en lo que respecta a la información genética contenida (Wallace, 1982; Jones, 1990), ya que la información encontrada en los diferentes grupos de organismos estudiados hasta la fecha, varía en algunos casos. Así por ejemplo el genoma mitocondrial de mamíferos codifica para varias subunidades de la NADH deshidrogenasa, no así el DNAm_t de levaduras, el cual no lleva información para la síntesis de las mismas (Anderson, 1981; Attardi, 1988). En el caso del DNAm_t de plantas, este contiene algunos genes no encontrados en otros DNAm_t, tal como el del RNAr mitocondrial 5S (no encontrado en otros ribosomas mitocondriales), una subunidad de la F¹-ATPasa, y la subunidad 9 de la F⁰-ATPasa. (Clark-Walker, 1985).

Cabe destacar dentro de la gran diversidad presentada por el genoma mitocondrial, un hallazgo sorprendente, la presencia de "pseudogenes" (o copias silenciosas), como en el caso del proteolípido de la subunidad 9 de la ATPasa mitocondrial de *N. crassa*, que también se encuentra codificado en el DNA nuclear, siendo sólo funcional el producto proteico nuclear (Tzagoloff, 1982; Schmidt et al., 1983; Attardi y Schatz, 1988 y Payne et al., 1991). Este fenómeno podría ejemplificar la divergencia entre levaduras y hongos filamentosos. La diferencia de síntesis de una proteína relacionada funcional y estructuralmente en dos organismos representa un cambio evolutivo notable (Macino y Tzagoloff, 1979; Tzagoloff, 1982).

Sin embargo, a pesar de las notables variaciones en forma y tamaño presentadas por estas macromoléculas, en todas aquellas estudiadas hasta la fecha se ha encontrado una sorprendente constancia, en la información genética pues todas ellas codifican para las subunidades ribosómicas grande y pequeña, la mayoría de los RNAt, así como la de algunas subunidades proteicas de enzimas de la membrana interna mitocondrial, tales como la subunidad 1 de la citocromo

oxidasa y al apocitocromo b del complejo III mitocondrial (Preble, 1981; Mueller y Getz, 1986; Attardi y Schatz, 1988).

En la tabla No. 2 se representan los genes mitocondriales y sus productos en diferentes organismos.

Estudios de marcaje de células completas de levaduras en presencia de diferentes antibióticos han hecho posible catalogar todas las subunidades de la citocromo oxidasa, coenzima QH₂-citocromo c reductasa, y la ATPasa, así como la asignación de cada uno como producto de traducción ya sea mitocondrial o citoplasmico. De las siete subunidades de la citocromo oxidasa, 3 son sintetizadas en la mitocondria (1-3) y 4 en ribosomas citoplasmicos (4-7). En el caso del complejo III, sólo un constituyente es hecho en la mitocondria, el apocitocromo b. La ATPasa sensible a oligomicina también está compuesta de dos grupos biosintéticamente diferentes de proteínas. Las subunidades de la F₁ OSCP son sintetizadas en presencia de cloranfenicol y son por lo tanto productos de traducción citorribosómico. Los componentes de los complejos, sin embargo, no son incorporados en la membrana interna cuando el sistema mitocondrial es inhibido, sugiriendo que la biosíntesis del complejo de la ATPasa requiere de productos tradicionales de la mitocondria (Morimoto et al., 1979 a; Tzagoloff, 1982).

El código genético usado en la mitocondria es diferente del código estándar utilizado en todos los genes procarióticos y nucleares eucarióticos; aún más notable es el hecho de que el código mitocondrial presenta diferencias en distintas especies de organismos. (Hawkins, 1991). Normalmente un codón de terminación UGA, es leído por los sistemas de traducción mitocondriales como triptofano; mientras que en mitocondrias de plantas UGA se conserva como codón de terminación. Los codones estándar AGA y AGG para arginina codifican para el mismo aminoácido en mitocondrias de hongos y plantas, pero son codones de terminación para mitocondrias de mamíferos y codones de serina en *Drosophila*. En el DNAm_t de plantas CGG puede codificar ya sea para triptofano o para arginina. En transcritos de RNA del DNAm_t ciertas secuencias CGG son "editadas" (transformadas químicamente) a UGG, codón que especifica para triptofano. Codones CGG codifican normalmente para arginina. La edición del RNA así como la similitud pero no universalidad del código genético tiene profundas implicaciones para la evolución de células eucariotes y sus organelos (Darnell et al., 1990; Binder, et al., 1990; Izuchi et al., 1990).

TABLA No. 1 GENOMA MITOCONDRIAL DE DIFERENTES ORGANISMOS

ENTIDADES TAXONOMICAS	ESTRUCTURA	TAMAÑO (μm)
Protozoa		
<u>Tetrahymena</u>	lineal	15
<u>Acanthamoeba</u>	circular	13
<u>Plasmodium</u>	circular	10.3
<u>Paramecium</u>	lineal	14
Algas		
<u>Chlamydomonas</u>	circular	4-5.4
Hongos		
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	circular	25
<u>Schizosaccharomyces pombe</u>	circular	19
<u>Kluyveromyces</u>	circular	11
<u>Neurospora</u>	circular	19-26
<u>Aspergillus</u>	circular	11
Plantas		
<u>Pisum</u> (chícharo)	circular	30
<u>Phaseolus</u> (frijol)	circular	20
Platelmintos		
<u>Hymenolepis</u>	circular	4.8
Nemátodos		
<u>Ascaris</u>	circular	4.8
Anélidos		
<u>Urechis</u>	circular	5.9
Artrópodos		
<u>Musca</u>	circular	5.2
<u>Drosophila</u>	circular	6.2
Equinodermos		
<u>Echinoidea</u>	circular	4.6-4.9
Cordados		
Peces	circular	5.4
Anfibios	circular	4.9-5.8
Aves	circular	5.1-5.4
Mamíferos	circular	4.7-5.6
Humanos	circular	4.7

* Tomada de Prebble, 1981; Grivell, 1983.

Tabla No. 2 Productos Genéticos Mitocondriales

	Animales	Levaduras	Mohos	
			(Neurospora)	Plantas
RNAr				
subunidad grande	16S	21S	21S	26S
subunidad pequeña	12S	15S	15S	18S
RNA 5S	-	-	-	+
No. de RNAr	22	23-25	23-25	30
Prot. rib (var-1)	-	+	+	?
Citocromo oxidasa subunidades 1,2,3.	+	+	+	+
CoQ-citocromo c reductasa apocit. b	+	+	+	+
Complejo F0-ATPasa				
subunidad 6	+	+	+	+
subunidad 8	+	+	+	+
subunidad 9	-	+	-	+
Complejo F1-ATPasa subunidad	-	-	-	-
Subunidades de la NADH-CoQ reductasa	7	0	6	6?

* Tomada de Darnell et al., 1990.

1.4 DNAmT DE LEVADURAS.

Bernardi demostró que la muy baja densidad del DNAmT de levaduras (1.863 g/cm^{-3}) se debe, en parte, a la presencia de espaciadores sin significado genético, que contienen exclusivamente adenina y timina en la molécula mitocondrial de levaduras. La mayor parte del genoma mitocondrial (hasta un 95%) de levaduras está compuesto por estos espaciadores génicos. Estas regiones al parecer son incapaces de codificar proteínas, así que representan presumiblemente DNA sin sentido o "egoísta", aunque múltiples orígenes de replicación del DNA ocurren en las mismas. (Whittaker y Danks, 1982). En la levadura de panadería, estas secciones de A + T pueden localizarse entre los genes, otros están localizados dentro de genes divididos como parte de intrones.

El DNAmT de levaduras (*S. cerevisiae*) presenta uno de los contenidos más bajos de guanina + citosina (G + C) (18%) de cualquier DNA funcional. (Dujon, 1981). Estas secuencias ricas en G + C han sido encontradas dentro de los genes. Los agrupamientos de G + C contienen la mayoría de los sitios para las endonucleasas Hpa II y Hae III. Bernardi y colaboradores (1972, 1977) han estimado que en levaduras existen de 150-200 sitios en estos agrupamientos. De aquellos secuenciados, un número significativo parece ser palindrómico, y otros son homólogos o tienen secuencias repetidas invertidas de otros agrupamientos. La presencia de secuencias características repetitivas representa indicios de relaciones entre genomas. La función de estas secuencias no ha sido totalmente esclarecida, pero se proponen como sitios de recombinación intramolecular, duplicación de orígenes de replicación, sitios de escisión en rho-, vestigios de elementos transponibles, etc. (Coson y Tzagoloff, 1979; Ragnini y Fukuhara, 1988).

Al igual que en mamíferos y en la mayoría de los eucariontes el DNAmT de *S. cerevisiae* codifica para pocos componentes mitocondriales esenciales: (1) los genes denominados Syn, codifican para componentes de la maquinaria de síntesis proteica (Douglas y Takeda, 1985). Esta clase incluye a los genes de los RNA ribosómicos mitocondriales y un juego completo de genes de RNAt. Así mismo se ha encontrado en este grupo al gen de una proteína denominada var-1, que al parecer esta relacionada con la subunidad pequeña del RNAr. (2) los genes mit, codifican para proteínas requeridas para el desarrollo de la cadena respiratoria terminal, la mayoría consistente en genes estructurales pertenecientes a los complejos de transporte de electrones y fosforilación oxidativa de la membrana interna mitocondrial. (ver tabla No. 2).

De manera semejante al caso de los mamíferos, la secuenciación del genoma mitocondrial de levaduras ha revelado un número de marcos de lectura abierta para los cuales no se ha encontrado un producto proteico conocido (marcos de lectura no asignados, URFs); con un codón de iniciación AUG hacia el extremo 5' (Hardy y Clark-Walker, 1990).

No existe evidencia lógica para el arreglo de los genes. La posición de los genes que codifican los polipéptidos de la membrana interna difieren del genoma de mamíferos, pero en ambos casos no existen agrupamientos de genes que determinen funciones relacionadas. Los genes para las dos especies de RNAr están más ampliamente separados en levaduras que en cualquier otro genoma mitocondrial (Figura 1.2), estos genes en mamíferos se encuentran muy cercanos. Por otra parte, a diferencia del genoma mitocondrial de mamíferos no hay una dispersión regular del RNAr y los genes de los RNAr se encuentran por lo general agrupados en un cuadrante del genoma, cosa contraria a lo que ocurre en el genoma mitocondrial de mamíferos en que los RNAr se localizan entre los diferentes genes (Cavalier-Smith, 1985; Darnell et al., 1990).

En la Fig. 1.2 puede observarse la organización de los genomas mitocondriales de levadura y humano. En esta figura pueden distinguirse la discrepancia en cuanto a tamaño y complejidad de estas dos moléculas. A pesar de estas diferencias también se observa la sorprendente conservación para varias secuencias codificadoras, tales como citocromo b, RNAr, RNAr y algunas subunidades de los complejos respiratorios.

Los genes mitocondriales de levaduras difieren de los de mamíferos en que algunos de los primeros están divididos o se encuentran en "mosaico" y contienen una o más secuencias de intervención o intrones. Ninguno de tales insertos se ha reportado estar presente en los compactos genomas mitocondriales de mamíferos, en especial de humanos. Algunos de estos intrones mitocondriales de levadura están ausentes en algunas cepas de *S. cerevisiae* y no parecen ser esenciales, es decir, son opcionales. Los intrones opcionales no se encuentran desplazados en todo el genoma, sino que se presentan en sitios fijos. A este respecto y en la carencia de secuencias repetidas terminales en por lo menos un caso (Dujón, 1981), los intrones mitocondriales de levaduras difieren de los elementos translocables o transposones de procaríotes (Evans, 1983).

El polimorfismo en este tipo de genomas se encuentra bien representado en el caso del gen para el apocitocromo b, que en *S. cerevisiae* presenta cepas que pueden contener 3 o 5 intrones, según la cepa de que se trate (Dujón, 1981). De entre estos intrones por lo menos dos son opcionales y los restantes son indispensables para la síntesis de esta proteína. En otras levaduras y hongos existen también variaciones para este gen. En *Schizosaccharomyces pombe* en donde se han identificado tanto cepas con un intrón como cepas sin intrones (Zimmer et al., 1987). Lo mismo ocurre en *Torulopsis glabrata*, *Kloeckera africana* y *Kluyveromyces lactis* (Clark-Walker y Sprinprakash, 1981; Brunner y Coria, 1989). Aunque hay una gran variabilidad en la estructura del gen del apocitocromo b, la proteína para la que codifica tiene una gran similitud en los organismos en los que se ha estudiado hasta la fecha. Este polimorfismo basado en diferencias en los intrones también han sido reportado en la subunidad ribosómica grande 21S, y al parecer están asociados con el fenómeno de polaridad de recombinación. El gen

oxi-3 que codifica COI puede contener hasta 9 intrones de los cuales por lo menos cuatro son opcionales. (Dujon, 1981; Tian et al., 1991 a).

Como la existencia de genes en mosaico implica o divididos por intrones un extenso procesamiento, además de que en algunos intrones se han observado marcos de lectura abiertos, existen evidencias de que por lo menos una proteína es parcialmente codificada por intrones (del citocromo b) -"una madurasa" o factor de transactivación- tiene un papel en el procesamiento de su RNAm y cataliza el siguiente paso en la maduración (Slonimski et al., 1982; Wallace, 1982; Grivell, 1983; Clark-Walker, 1985). Las proteínas codificadas por intrones tienen diferentes papeles además del mencionado anteriormente en las mitocondrias de levadura. Mientras algunas son necesarias para promover el procesamiento de intrones de RNA pre-mensajeros, algunas son necesarias para la delección *in vivo* de secuencias de intervención en el DNAm y otras, tales como *w* ó *I*⁴, están involucrados en la transposición duplicativa de su propio intrón (Dujon, 1981; Asher et al., 1989). Una cuarta función descubierta por Kotylak et al. (1985); es que una proteína codificada por un intrón, la madurasa *bl*¹ del gen COB, induce recombinación homóloga en los exones del gen COX1 (Boulet, 1990). Las moléculas de RNA unidas circularmente son generadas durante el procesamiento del RNA por escisión de algunas secuencias de intrones de transcritos. (Kurtzman et al., 1983).

La presencia de intrones opcionales y los grandes segmentos ricos en A + T, así como la alta tasa de recombinación entre las mitocondrias dan lugar al polimorfismo mitocondrial entre organismos del mismo género y especie. (Grivell, 1983; Clark-Walker, 1985; Dujon, 1981).

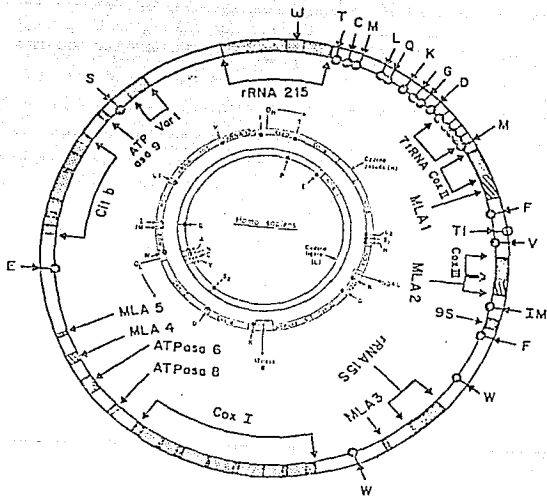


Fig. 1.2 Esquema de los DNAm de levadura y humano. El de levadura es aproximadamente cinco veces más grande que el de humano, aunque aquí se encuentra representado sólo dos y media veces más grande. Las proteínas y RNAs se muestran en color negro. Los RNAs se representan por Ω junto con la letra del aminoácido con la que está cargado. OL y OH representan los orígenes de replicación de las cadenas ligera y pesada respectivamente, en el genoma humano

1.5 RECOMBINACION DEL DNAmT

Existen evidencias concluyentes basadas en estudios físicos y genéticos, de que el genoma mitocondrial se recombina en cruza de levaduras. Esto se demostró primeramente en cruza entre cepas que llevaban marcadores mitocondriales de resistencia a drogas tales como oligomicina, paromomicina y cloramfenicol (Thomas y Wilkie, 1968). Durante estos estudios se llevaron a cabo análisis de transmisión y recombinación en diploides resultantes de la cruza de cepas haploides, los cuales inicialmente poseían mitocondrias de ambos progenitores. El surgimiento de nuevas combinaciones de marcadores indicaban la presencia de eventos de recombinación; dichos eventos también se pusieron de manifiesto a partir de la formación de DNA de una diferente densidad de flotación que la que presentaban los progenitores (Preble, 1981; Dujon, 1981; Wilkie, 1983; Butow, 1985). Posteriormente la demostración física de recombinación entre moléculas de DNAmT *in vitro* fue realizada por estudios de microcopía electrónica (Sena et al., 1986).

Una aproximación diferente fue usada por Fonty et al. (1978) en sus estudios de recombinación mitocondrial en levaduras. Utilizando cepas progenitoras con patrones de restricción diferentes obtuvieron diploides recombinantes, esto es, se obtuvieron distintos patrones electroforéticos a los de los progenitores. Nuevos fragmentos fueron originados a partir de fragmentos del DNAmT de ambas cepas progenitoras debido a la recombinación de sitios de corte. Al parecer ocurrió un entrecruzamiento desigual en grandes regiones espaciadoras (ricas en A + T). (Prebble, 1981; Wilkie, 1983).

Existen evidencias de que en los agrupamientos G + C corresponden a sitios de recombinación intramolecular, como se mencionó anteriormente, y que junto con las diferentes secuencias interventoras o intrones, contribuyen en gran parte a los polimorfismos encontrados en levaduras aún en cepas de una misma especie (Dieckmann y Gandy, 1987).

1.6 TAXONOMIA DE LEVADURAS.

La taxonomía de las levaduras, contrariamente a la sistemática de los hongos "superiores", tiene un origen práctico, pues surgió en las industrias de la fermentación a finales del siglo XIX y principios del XX. Los primeros sistemáticos en levaduras, como una regla al servicio de estas industrias, seleccionaron propiedades fisiológicas más que características morfológicas, con el propósito de diferenciación e identificación de taxa, una práctica que en aquellos tiempos estuvo muy arraigada dentro de la bacteriología (Van der Walt, 1987).

Las levaduras son un grupo diverso de hongos cuyos teleomorfos (estados sexuales) están divididos entre los Ascomycotina y Basidiomycotina. La agrupación de las levaduras comparándolas con los hongos superiores es una conveniencia, que deriva de las características de crecimiento unicelular, así como de un estado sexual fuera de un cuerpo fructífero.

Los primeros usos de pruebas fisiológicas en la taxonomía de levaduras, fueron la fermentación de ciertos azúcares, tales como glucosa, sacarosa, maltosa y rafinosa junto con las características morfológicas. Stelling-Dekker (1931) introdujo la asimilación de sulfato de amonio, asparagina, urea, peptona y nitrato, como fuente de nitrógeno, Lodder (1934) la asimilación de ciertos azúcares, Wickerham y Burton (1948) la asimilación de otros compuestos de carbono, la proteólisis de la gelatina (licuefacción) también fue usada como un criterio más tomado en cuenta para la clasificación. (Kurtzman et al., 1983; Kreger-van Rij, 1987).

Algunas características de las levaduras no mencionadas en la descripción estándar son de importancia taxonómica. Estos son la composición química de la pared celular, similitud entre secuencia de bases del DNA y patrones enzimáticos, distribución física, geográfica, etología, entre otros (Lachance, 1985).

La investigación en la composición química de la pared y de compuestos extracelulares ha sido revisada por Phaff (1971, 1977 y 1984). La glucana, manana y quitina son componentes de la pared celular. Encontrándose en levaduras ascomicetas principalmente, β -glucana y quitina, y en las levaduras basidiomicetas β -glucana, quitina y en algunos casos glucana (Kreger-van Rij, 1987).

El criterio aceptado para el uso en especiación, ha ido avanzando paralelamente en el tiempo con muchas otras áreas de la microbiología, tomando en cuenta primero la morfología de los estados sexuales y vegetativos, seguido después por la definición de taxa a través de pruebas genéticas y bioquímicas, y finalmente debido a fallas parciales en estos criterios para producir resultados definitivos, se ha utilizado como apoyo las relaciones a partir de secuencias de ácidos nucleicos. (Kurtzman et al., 1983). Algunos de estos criterios han llegado a ser devaluados, por ejemplo la distinción entre fermentación y fermentación ligera, y producción de pseudomicelio y formación de periciclo con formas lisas o rugosas. Debido a fallas parciales en los criterios anteriormente utilizados para producir

resultados definitivos, en la actualidad ensayos a nivel de macromoléculas comparando ácidos nucleicos y proteínas han abierto una nueva perspectiva para la manera en la cual los taxa y aún especies de levaduras son reconocidos. (Kurtzman y Robnett, 1991; Steensma et al., 1988).

Un criterio molecular empleado en la actualidad en la clasificación de levaduras es el análisis de la coenzima Q o ubiquinona (Yamada y Kondo, 1972; 1973; Yamada et al., 1980, 1981) estos estudios han revelado que el número de unidades isoprenoides en las cadenas laterales varían de 5 a 10 (Q-5 a Q-10) entre taxa de levaduras. En muchos géneros, todas las especies tienen el mismo número Q pero la heterogenidad existe en géneros tales como *Pichia*, *Hansenula* y *Saccharomycopsis*. Esto podría indicar que las especies atípicas están incorrectamente asignadas, y una comparación de estas especies por otras técnicas moleculares tienen interesantes implicaciones filogenéticas (Kurtzman et al., 1983).

La composición de bases del DNA, expresada como porcentajes molares de guanina + citosina (G + C), es uno de los criterios moleculares tomados en cuenta también para la clasificación, ésta puede ser determinada a partir de perfiles de desnaturalización térmica, densidad de flotación en gradientes de sales de cesio, generados por cromatografía líquida de alta presión de nucleótidos o bases libres. Este criterio puede ser utilizado en algunos casos en los que se ha encontrado que da información importante como en *Debaryomyces hansenii* y *D. maramba* que tiene un contenido de G + C de 39.0 y 39.1 molar % respectivamente, sin embargo muestran sólo un 8.4 % de complementariedad en secuencias de bases (Price et al., 1978). Esto parece indicar que un contenido molar similar de G + C, no implica necesariamente una similitud en la secuencia de bases en el DNA, y que por lo tanto la delimitación de especies involucra un conjunto de características con igual importancia en la sistemática de las levaduras (Kurtzman et al., 1983).

El problema de especies ha sido abordado con diferentes criterios en la clasificación de las levaduras del género *Kluyveromyces*, tal es el caso de Van der Walt y Johannsen (1979) y Johannsen (1980) que estudiaron el problema de clasificación tomando en cuenta las propiedades de hibridación entre distintos miembros de este género, esencialmente homotálico. Ellos compararon sus resultados con datos de relaciones de reasociación de DNAs obtenidos anteriormente por Vaughan-Martini (1973) y Martini y Phaff (1973). Van der Walt y Johannsen cruzaron cepas de levaduras auxotróficas obtenidas por mutagénesis con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, en medios que promueven el crecimiento de clones recombinantes prototróficos. Utilizando este método, observaron a partir de varias combinaciones, colonias prototróficas con una frecuencia de 10^{-10} a 10^{-8} . Taxa con relaciones de DNA altas mostraron una frecuencia de recombinación mayor, los que fueron considerados como coespecies, pero en algunos casos taxa con complementariedad de DNA baja también dieron un número considerable de recombinantes. La falta de cruces en generaciones sucesivas de la progenie ha

hecho difícil la interpretación de estos datos. (Johannsen, 1979, 1980; Kurtzman, 1983; Vaughan-Martini et al., 1987).

A través de diferentes estudios de comparaciones de similitud en la secuencia del DNA entre diferentes especies analizadas se ha logrado demostrar que especies de algunas levaduras ascospóroenas son sinónimos de otras especies, o representan estados imperfectos de hongos hifales (Kurtzman et al., 1983).

Análisis de relaciones de otras macromoléculas, tales como las de DNA-DNA o RNAr-DNA, han provisto sin embargo, un medio para determinar relaciones filogenéticas distantes. Algunos genes divergen más lentamente y la proporción de DNA genómico que codifica para el RNAr está altamente conservado. (Lachance, 1989; Sor y Fukuhara, 1989 Kurtzman y Robnett, 1991). Sin embargo, se ha reportado que el DNA que codifica para ciertas enzimas tales como la glutamina sintetasa y la superóxido dismutasa, aunque menos conservado que el que codifica para el RNAr, presenta una tasa es aún menos divergente de lo que aparenta a partir de comparaciones del DNA del genoma completo (Baumann y Baumann, 1978). Los estudios inmunológicos de similitud de proteínas para levaduras son muy dispersos y la información resultante es altamente dependiente de la clase de proteínas estudiadas. Lachance y Phaff (1979) utilizaron exo- β -glucanasas para especies de *Kluyveromyces* pero encontraron que la enzima está pobremente conservada y las distancias inmunológicas entre la mayoría de las especies fue muy grande para ser tomada en cuenta para determinar relaciones evolutivas en este género. (Fuson, 1987; Kurtzman et al., 1983).

La electroforesis de aloenzimas representa otro medio de estimación de la diversidad molecular, y como en el caso de estudios inmunológicos de la presencia y composición de mananas, la resolución depende del grado de conservación de la secuencia (Sidenberg y Lachance, 1986). La proporción de mutaciones puntuales que son electroforéticamente detectables es aproximadamente de 0.27 debido a la redundancia del código genético y la gran proporción de aminoácidos que son eléctricamente neutros Vaughan-Martini et al., 1987). Lachance et al. emplearon esta tecnología para establecer relaciones taxonómicas en el género *Kluyveromyces* (Lachance, 1987; Vaughan-Martini, 1987).

El análisis del DNAm en la clarificación de la situación taxonómica de organismos tales como hongos, levaduras y algunos grupos humanos, así como el estudio de su polimorfismo ha sido recientemente utilizado. La comparación de los DNAm de levaduras, por análisis de restricción para propósitos taxonómicos ha sido demostrado repetidamente (Reilly y Thomas, 1980; Faugeton y Goyon, 1985; Coria et al, 1990; Cosson, 1979; Morimoto y Rabinowitz, 1979; Picard-Pasquier et al et al., 1990; Takano et al. 1990), así como su utilización con fines evolutivos (Cann et al, 1987; Hasegawa y Horai, 1991).

Los análisis del DNAm que tienen lugar en la sistemática de las levaduras nos proporcionan información acerca del tamaño, orden y localización genética, así como también información a "grosso modo" de la conservación de determinadas secuencias, todo esto basado principalmente en la utilización de endonucleasas de restricción. Esta técnica sólo es aplicable a organismos estrechamente relacionados. Sólo moléculas de DNA con baja complejidad en cuanto a tamaño, tales como plásmidos, genomas de virus, DNAm, DNAr, DNA de cloroplastos o DNA nuclear repetidos de baja complejidad (Clark-Walker, 1983 a; Coria et al., 1990).

McArthur y Clark Walker (1983) correlacionaron teleomorfos y anamorfos de las levaduras *Dekkera v.d. Walt* y *Brettanomyces* Kuff. & V. Laer. Estos análisis son suficientemente sensibles para detectar divergencia en las secuencias aún en genomas de individuos de la misma especie. Este polimorfismo substancial ha sido reportado además de en levaduras en individuos humanos y ratas; con la elaboración de mapas físicos de los genomas mitocondriales además de similitudes encontradas en los genomas hasta la fecha estudiados, se han encontrado marcadas diferencias en ciertas regiones del DNA (Brown, 1980; Tzagoloff, 1982). Kozlowski y Stepień (1982) investigaron las similitudes del DNAm de diferentes especies de *Aspergillus* y construyeron un árbol filético hipotético a partir de los datos de restricción.

Estos estudios no representan un criterio único a tomar en cuenta para la sistemática de las levaduras, como ya se ha mencionado con anterioridad existen varios puntos de apoyo en esta área del conocimiento, y que deben ser cuidadosamente utilizados en el momento de clasificar a estos organismos. Los criterios anteriormente mencionados, contribuyen en gran manera a conocer diversos aspectos dentro de los ciclos de vida, morfología, bioquímica y perpetuación de las levaduras, es decir, aumentan el acervo de conocimientos de organismos eucariontes, y donde muchos de estos aspectos pueden ser útiles para entender algunos procesos llevados a cabo en otros organismos.

2. OBJETIVOS.

En base a resultados encontrados en el laboratorio sobre polimorfismo del DNAm_t en cepas de *Kluyveromyces lactis* y estudios de otros investigadores sobre el DNAm_t de levaduras, el presente trabajo se enfocó a abordar el estudio del polimorfismo del DNAm_t y algunos otros aspectos relacionados con la fisiología de cepas aisladas independientemente de la levadura *K. marxianus* var. *marxianus*, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

2.1 Analizar morfológicamente las cepas comprendidas en este estudio.

2.2 Estudiar los espectros diferenciales de absorción de citocromos tanto de las cepas analizadas como de sus mitocondrias purificadas.

2.3 Extraer y purificar el DNAm_t de los cinco aislados de *K. marxianus* var. *marxianus*, para realizar análisis de restricción.

2.4 Elaborar mapas físicos de restricción de los genomas mitocondriales analizados.

2.5 Realizar pruebas de hibridación con sondas heterólogas para localizar probables secuencias genómicas que codifiquen para el apocitocromo b, los RNAs ribosómicos 15S y 21S y las subunidades 6 y 9 de la ATPasa mitocondrial, secuencias que se sabe están conservadas en todos los DNAm_t estudiados hasta la fecha .

2.6 Comparar los resultados obtenidos en el presente estudio con los logrados en estudios realizados en el laboratorio con otras especies de *Kluyveromyces* para ayudar a establecer relaciones taxonómicas entre las cepas estudiadas.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Cepas.

Las cepas de *Kluyveromyces* utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

CEPA	No. CLASIFICACION	ORIGEN
<u>K. marxianus</u> var. <u>marxianus</u>	I.B.	Fermentado de masa de maíz con búlgaros
<u>K. marxianus</u> var. <u>marxianus</u>	L-836** NRRL-1195	Aislado de yogurt
<u>K. marxianus</u> var. <u>marxianus</u>	L-837 NRRL Y1109 ATCC-8554 CBS-5795 UCD-5561	Desconocido
<u>K. marxianus</u> var. <u>marxianus</u>	L-670	Desconocido
<u>K. marxianus</u> var. <u>marxianus</u>	NRRL Y-8281 CBS-712	
<u>K. lactis</u>	L-668	Mutante auxótrofa His ⁻ de NRRL Y-1140

* Cepa donada por la Dra. Patricia Lappe. Colección del Instituto de Biología, UNAM, México.

** Cepas donadas por la Dra. Jovita Martínez. Colección del CINVESTAV, Unidad Zacatenco. México.

*** Cepa donada por el Dr. C.P. Kurtzman. Colección Northern Regional Research Center (NRRL), Illinois, USA.

**** Cepa donada por el Prof. James R. Matton

3.2 Medios de Cultivo

Los medios de cultivo fueron los siguientes:

Medio Luria Bertani (LB):

Cloruro de Sodio 1 %

Extracto de levadura 0.5 %

Bactotripton 1 %

Medio LB con ampicilina:

Lleva lo mismo que el medio anterior más Ampicilina 70 g/ml

Medio YPD:

Extracto de levadura 1 %

Peptona de gelatina 1 %

Dextrosa 2 %

Medio de Extracto de Malta:

Extracto de malta 5 %

Agar 3 %

En los casos en que se utilizó medio sólido como YPD y LB se añadió agar al 2 % a cada uno de los mismos.

3.3 Análisis morfológico de las ascosporas.

Las cepas frescas se purificaron por estricción en medio YPD sólido para aislar colonias individuales.

Una vez purificadas, las cepas fueron sembradas en medio de extracto de malta, el cual favorece la esporulación. Diariamente se realizaron observaciones al microscopio en el sistema de iluminación de contraste de fases, para registrar la formación y morfología de las ascosporas.

3.4 Curvas de Crecimiento y Tiempos Medios Generacionales.

Una vez crecidas y purificadas las cepas en medio sólido de YPD, se prepararon diluciones en agua destilada estéril de cada cepa, para posteriormente inocular 1×10^6 células en matraces nefelométricos conteniendo medio YPD. Se incubaron a 30°C con agitación constante, y para determinar el crecimiento celular se midió la turbidez cada 30 minutos en Fotocolorimétero de Klett utilizando el filtro rojo (600 nm). Los registros se realizaron hasta alcanzar la fase exponencial. El tiempo medio generacional se calculó a partir de los datos obtenidos con las curvas de crecimiento.

3.5 Espectros de Citocromos

Para analizar las posibles diferencias espectrales entre las cepas estudiadas se realizaron espectros diferenciales de absorción de los citocromos a temperatura ambiente.

Para esto se analizaron los espectros absolutos (reducido menos oxidado) tanto de mitocondrias como de células completas crecidas hasta la fase exponencial temprana (aproximadamente 18 h.). Para el análisis de células completas se utilizaron aproximadamente 0.75×10^7 células/ml por cepa, resuspendidas en KH_2PO_4 -glicerol al 30%, se utilizó como blanco para igualar la base y obtener los espectros absolutos leche descremada al 10%, reduciendo con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ en exceso. Los espectros se realizaron en un espectrofotómetro de doble rayo U.V.-Vis. SLM-Aminco DW-2000.

Para obtener los espectros mitocondriales, primero se cuantificaron las proteínas mitocondriales totales por un método modificado de Lowry (Well, 1978). Se utilizaron 4mg/ml de proteína mitocondrial resuspendida en KH_2PO_4 oxidándose totalmente con 1mM de ferricianuro de potasio, y posteriormente se redujo con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ para obtener los espectros diferenciales absolutos. El análisis espectral se realizó en un espectrofotómetro de doble rayo.

3.6 Purificación del DNA mitocondrial.

El método de purificación utilizado en el presente trabajo se detalla a continuación, como una modificación al descrito por Hudspeth et al., 1980.

Se crecieron las cepas en medio YPD a 30°C con agitación constante, hasta la fase estacionaria temprana de crecimiento (aproximadamente 18 hs.). Las células se colectaron por centrifugación a $1240 \times g$ durante 5 min. en rotor GSA en centrifuga refrigerada Sorvall RC-5R, se lavaron dos veces con agua destilada y una vez más con Sorbitol 1.2M frío.

Posteriormente las células fueron resuspendidas en 3 volúmenes equivalentes a su peso de una solución amortiguadora de digestión, que contenía sorbitol 1.2 M, EDTA 1mM, NaH_2PO_4 75 mM, β -Mercaptoetanol 0.35M, más 1-2 mg de zimoliasa/g de células y se incubó a 35°C con agitación lenta. Cada 15 min. se hacían observaciones al microscopio en contraste de fases de muestras diluidas en agua destilada para observar la formación de protoplastos (células en las que se ha digerido parcialmente la pared celular). La aparición del 80 a 90% de células rotas fue a los 45-50 min. dependiendo de la cepa. Los protoplastos fueron lavados con dos volúmenes de Sorbitol 1.2 M con centrifugaciones a 1240 x g por 5 min. Posteriormente se procedió a homogeneizar en 75 ml de una solución amortiguadora de Tris-HCl 0.06 M pH 7.5, Sorbitol 0.6 M, EDTA 1mM y BSA 0.1% por un min en licuadora a la máxima velocidad, manteniéndose después a -20°C por 3 min., este procedimiento se repitió dos veces más, constatando al microscopio en contraste de fases la ruptura de las células. El homogenado se centrifugó a 770 x g por 10 min, se guardó en frío el sobrenadante y el precipitado fue nuevamente homogenado y centrifugado.

De los sobrenadantes obtenidos se purificaron las mitocondrias realizando centrifugaciones alternadas a baja y alta velocidad 770 y 30 900 x g respectivamente, en rotor SS34. En las centrifugaciones de baja velocidad se eliminaban principalmente restos de pared celular y células completas quedando en el sobrenadante las mitocondrias y otros organelos. En las centrifugaciones de alta velocidad se recuperaban las mitocondrias, eliminando en el sobrenadante microsomas y otros contaminantes; la pastilla obtenida en las centrifugaciones de alta velocidad era resuspendida en una solución de Sorbitol 0.9 M, Tris-HCl 10mM pH 8.0 y EDTA 1mM.

3.7 Obtención del DNAm_t en gradiente de cloruro de cesio.

El DNAm_t puede ser purificado convenientemente en gradientes de densidad de CsCl en donde forma una banda aparte del DNA nuclear. La luz ultravioleta incrementa la fluorescencia de colorantes tales como la bisbenzimidida y el bromuro de etidio (EtBr), cuando se intercalan entre las bases del DNA de doble cadena, haciéndolo visible en el gradiente; por lo que se procedió a obtener el DNA en base a lo anterior.

Las mitocondrias obtenidas fueron lisadas en una solución amortiguadora que contenía Sarcosil al 2%, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, NaCl 0.1 M y EDTA 10mM, posteriormente se disolvieron 5.91 g de CsCl/ en 5 ml de esta solución y se mantuvieron a 4°C toda la noche. Esta solución se centrifugó a 27 000 x g por 30 min para eliminar la nata proteica formada; se ajustó el índice de refracción a 1.3945-1.3965 dependiendo de la cepa y se añadió bisbenzimidida (200g/ml) como colorante.

Las muestras fueron centrifugadas a 144 793 x g durante 16 hs. en el rotor vertical 65.1 VTi en una ultracentrifuga preparativa Beckman L-60. Al terminar de

correr el gradiente las bandas del DNA fueron visualizadas iluminando con luz UV de onda larga (312nm), se extrajo la banda correspondiente al DNAm_t (banda superior, en caso de que se hubieran formado más bandas correspondientes a DNA nuclear, RNA etc.) y el colorante fue eliminado con alcohol isoamílico saturado con TE 1X (Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1 mM) y CsCl. Posteriormente la muestra se diluyó con dos volúmenes de la solución TE 1X y este volumen final se diluyó con tres volúmenes de etanol absoluto y se mantuvo a -20°C durante 2 hs. Se centrifugó a 20 200 x g durante 20 min. El precipitado fue resuspendido en 300 l de TE 1X, el DNA se precipitó añadiendo 3 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M e incubando 30 min. a -70°C.

El DNA se recuperó centrifugando en frío 10 min en microfuga y el precipitado se lavó con etanol al 70% para eliminar el exceso de acetato de sodio. Se secó la muestra en una microfuga "Speed vac Concentrator" Savant y se resuspendió en la solución TE 1X.

Para verificar que el DNA estaba en buenas condiciones, una alícuota de la muestra era sometida a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% a 80 volts. Si el DNA estaba contaminado con RNA se daba un tratamiento con 5-10 ul (10mg/ml) de RNAasa A y se incubaba a 37°C durante 30 min. La RNAasa era extraída posteriormente con un tratamiento de fenol-cloroformo. El DNA se recuperó como ya se ha indicado anteriormente.

3.8 Análisis de restricción de los DNAs mitocondriales.

Los DNAs mitocondriales fueron cortados con endonucleasas de restricción de tipo II, las cuales reconocen secuencias palindrómicas de 4 a 8 pares de bases. Las enzimas utilizadas en este trabajo se enlistan a continuación.

ENZIMA	SOLUCION AMORTIGUADORA DE RESTRICCION 10 X
Cla I	Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM MgCl ₂ 10 mM
Hap II	Tris-HCl (pH 7.6) 25 mM MgCl ₂ 10 mM BSA 100 g/ml DTT 1 mM
Eco RV, Hae III, Hha I, Hind III, Pst I, Sst II, Xba I.	Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM MgCl ₂ 10 mM NaCl 50 mM
Bgl II, Eco RI, Nsi I, Mlu I.	Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM MgCl ₂ 10 mM NaCl 100 mM
Hinc II, Kpn I, Spe I.	Tris-HCl (pH 7.4) 20 mM MgCl ₂ 5 mM KCl 50 mM
Pvu II, Sca I.	Tris-HCl (pH 7.4) 50 mM MgCl ₂ 6 mM KCl 50 mM NaCl 50 mM
Sal I.	Tris-HCl (pH 7.6) 100 mM MgCl ₂ 10 mM

Para realizar las digestiones se siguieron las recomendaciones de las casas comerciales (BRL o IBI) dependiendo de la enzima de que se tratara. Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 ul, esto es,

- 1 ul de DNAm*
- 1 ul de Amortiguador de restricción
- 0.5 ul de Enzima
- 7.5 ul de Agua desionizada estéril

* El volumen fue variable dependiendo de la concentración del DNA.

Para las digestiones con la enzima Eco RI se agregó 1 μ l de espermidina (4 mg/ml), ya que los patrones de digestión con esta enzima eran poco definidos. En todos los casos la temperatura de reacción fue de 37°C. Las digestiones se detuvieron agregando una solución que contenía Ficoll al 35 %, SDS 0.5%, azul de bromofenol 0.1 % y xilencianol 0.1 %.

Se realizaron digestiones sencillas, dobles y triples, para lo cual primero se incubaba durante 2 hs el DNA con la enzima que tuviera un menor requerimiento de sales, y las siguientes enzimas eran adicionadas dependiendo de la concentración de sales recomendada, así mismo se agregaba la sal requerida para cada enzima y nuevamente se incubaba a la temperatura señalada durante el mismo tiempo.

Los fragmentos generados al digerir el DNA mt se separaron por electroforesis en geles de agarosa en base a su tamaño; si se trataba de fragmentos de 1 a 8 Kb, la concentración del gel era de 0.8% , en agarosa al 1 % si los fragmentos a resolver eran menores de 1 Kb y en agarosa al 0.4 % en el caso de fragmentos mayores de 10 Kb. Las electroforesis eran llevadas a cabo en geles horizontales sumergidos en la solución amortiguadora TBE 1X (Tris-HCl 0.089 M pH8, Ac. bórico 0.089 M y EDTA 0.002 M) a 80 volts. Los geles se tiñeron en una solución de EtBr (0.5 μ g/ml) y en la mayoría de los casos fueron tomadas fotografías de los geles con película xxx con cámara Polaroid, utilizando filtro color naranja.

El análisis de los fragmentos se realizó por el método de los algoritmos propuesto por Fitch (1985), el cual concuerda con lo que propone Lewin, (1988).

3.9 Hibridación.

La hibridación en este caso se realiza tomando en cuenta algunas características reportadas, tales como que en levaduras incluso de especies poco emparentadas, parece haber un alto grado de similitud en la secuencia de genes mitocondriales. Por lo tanto genes específicos aislados del DNA mt *Saccharomyces cerevisiae* proveniente por lo general de mutantes mitocondriales (petite), son usados como monitores de hibridación para detectar y localizar los genes equivalentes en otros genomas mitocondriales. Estas sondas son también de utilidad en la elaboración de los mapas de restricción.

Los experimentos de hibridación constan de 4 etapas principales:

- Purificación y marcaje del monitor.
- Transferencia del DNA a una membrana de nylon.
- Prehibridación e Hibridación.
- Desarrollo de color para la visualización de la hibridación.

3.9.1 Purificación y marcaje del monitor o sonda.

Los fragmentos utilizados como sondas, los plásmidos de donde se obtuvieron, y los organismos de los cual derivan se muestran en la Tabla I.

A partir de los plásmidos recombinantes que contenían las secuencias que se utilizaron como sondas, se obtuvieron estas de la siguiente manera:

- Se cortó el plásmido con las endonucleasas que generaran el fragmento que contiene la secuencia requerida .

- El fragmento se separó por electroforesis en agarosa, para posteriormente electroeluirlo* y precipitarlo para poder recuperarlo.

- El fragmento fue marcado por el método de "Nick-Translation" con derivados biotinilados, con un sistema de detección de ácidos nucleicos no radioactivo "BluGene" de Bethesda Research Laboratories (BRL), en el cual se utilizó como desoxinucleótido biotinilado dUTP y posteriormente dATP. El procedimiento de marcaje se indica a continuación :

* El método de electroelución se detallará más adelante.

Se mezclaron aproximadamente 1ug del DNA del fragmento, 1 ul de NaCl 0.5 M, 5 l de una mezcla de nucleótidos la cual no contenía uridina, 2.5 l de dUTP biotinilado (200 pg/ml), y 31.5 ul de agua destilada estéril, se mezcló todo perfectamente.

Posteriormente se añadieron 5 ul de una solución que contenía DNA polimerasa y DNAasa, se mezcló suavemente y se incubó la mezcla a 15C durante 90 min. La reacción se detuvo agragando 5 ul de una solución de EDTA 300 mM. El fragmento marcado fue precipitado con etanol, secado y resuspendido en la solución TE 1X.

TABLA I Sondas moleculares

Locus	Plásmido	Origen	Tamaño de la sonda obtenida del plásmido (Kb)	Descripción
oli1	pMZ-oli1	S.c.DS400-A3 (,met',p',OIR)	1.0	Fragmento Pal I clonado en el sitio EccRV de pBR329, obtenido por digestión
oli2	pLO-4	S.c.DS14 (,met', OIR)	1.0	Fragmento Hap II clo- nado en los sitios Hind III-Nhe I de pBR322.
citb	pWM37-10H	K.I.WM37 (a, his')	1.0	Fragmento Hae III- Hae III clonado en pTZ18-R
S-rRNA	pES-15s	S.c.DS80 (,met',P ^h)	1.2	Fragmento HapII clo- nado en el sitioEco RV de pBR322.
L-rRNA	pKLM-15/4	K.I.WM37 (a, his')	3.5	Fragmento Hind III- Hpa I clonado en los sitios Hind III-Sma I de pTZ18R.

Abreviaturas usadas: S.c. *S.cerevisiae*; K.I. *K.lactis*

Las cepas mutantes DS 400-A3, DS14 y DS80 de *S.cerevisiae* fueron donadas por el Dr. A. Tzagoloff. El plásmido recombinante pKLM- 15/4 fue donado por el Dr. H. Fukuhara.

Los plásmidos a partir de los cuales se obtuvieron las sondas, se verificaron primero mediante una minipreparación (STET), que se describe a continuación.

Se crece la cepa en medio de LB más ampicilina por 24 h a 37C. Se colectan las células con un palillo y se resuspenden en 350ul de STET (Sacarosa 8.0 %, tritón X 100 al 5.0 %, EDTA 50 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8.0) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml utilizando vortex. Se añaden 30 ul de STET lisozima (10 mg/ml de lisozima en la sol. STET) y se mantienen en baño de ebullición por 5 min. Se centrifugó en una microfuga en frío por 10 min, el precipitado es eliminado con un palillo estéril. Se adiciona al sobrenadante 350 ul de isopropanol, se mezcla lentamente por inversión y se congeló a -70°C por 15 min. Posteriormente, se centrifuga en frío durante 10 min a 15 400 x g desechando en esta ocasión cuidadosamente el sobrenadante, se

añaden entonces 200 μ l de TE 1X para resuspender el precipitado. Se agregan 600 μ l de una solución etanol-acetato de sodio (50 ml de etanol absoluto y 8 ml de acetato de sodio 3 M), mezclando perfectamente y manteniendo a -70°C durante 15 min. Se centrifugó nuevamente en frío por 10 min, eliminándose posteriormente el etanol. Se lava con etanol al 70 %, se seca y se resuspende finalmente en TE 1X.

En un gel de agarosa al 1 % se corren alcuotas del plásmido digerido y sin digerir, constatando de esta manera, que el plásmido lleva el fragmento de interés.

Una vez que se comprueba la existencia del plásmido, se procede a realizar una preparación de DNA a mayor escala. La Melton DNA midiprep, constituyó una buena opción, ya que proporciona una buena cantidad de DNA y con muy poca contaminación de RNA.

La Melton prep consiste en lo siguiente: Se promueve el crecimiento de las células en medio sólido de LB con ampicilina durante 24 h a 37°C . Se inoculan matraces nefelométricos con 25 ml de medio de LB con ampicilina y se crecen toda la noche con aereación vigorosa a 37°C .

Las células se colectan por centrifugación por 10 min a $3\ 020 \times g$, se decanta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 5 ml de NaCl 10 mM. Se centrifuga nuevamente a $3\ 020 \times g$ durante 10 min.

El precipitado se resuspende en 0.6 ml de una solución Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, sacarosa al 15 % y lisozima 2 mg/ml, y se incuba en hielo por 20 min. Después se añaden 1.2 ml de una solución NaOH 0.2 M y SDS 1 %, se mezcla e incuba en hielo por 10 min. Se añaden 0.75 ml de una solución acetato de sodio 3 M pH 4.8 y nuevamente se incuba en hielo por 10 min. Se centrifuga a $27\ 000 \times g$ durante 15 min y al precipitado se le agregan 10 μ l de RNAasa A (10 mg/ml), incubándose a 37°C durante 20 min. Se extraen las proteínas con una mezcla a partes iguales de tratamiento fenol:cloroformo; se centrifuga durante 5 min a $3\ 020 \times g$ para separar fases. El DNA recuperado se precipita con dos volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente por lo menos durante 2 min. El precipitado se colecta por centrifugación a $8\ 700 \times g$ por 10 min, se lava con etanol al 70 % y se seca en vacío.

El DNA se resuspende en 160 μ l de agua y se transfiere a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, donde se le agrega 40 μ l de NaCl 4 M. Se mezcla por inversión añadiéndose posteriormente 200 μ l de PEG.8 000 al 13 %, se mezcla nuevamente dejándose en hielo 1 h. Se colectó el DNA por centrifugación en microfuga a $15\ 400 \times g$ por 10 min. Se elimina totalmente el PEG ya que éste puede inhibir posteriormente algunas de las enzimas a utilizar.

El DNA precipitado se lava nuevamente con etanol al 70 %, se seca al vacío y se resuspende en 50 μ l de TE 1X.

El DNA obtenido de esta preparación fue cortado con las respectivas endonucleasas de restricción dependiendo del plásmido de que se tratara, para posteriormente electroeluir el fragmento que se utilizaría como sonda.

La electroelución consistió en lo siguiente:

En un gel de agarosa al 1 % teñido con EtBr, se corría el DNA del plásmido (según el fragmento de la sonda que se quería obtener) digerido previamente, junto con un marcador de peso molecular. En casi todos los casos se utilizó el DNA del fago lambda cortado con Hind III y Eco RI.

Una vez separadas suficientemente las bandas generadas por la digestión, se detuvo la corrida por unos min para realizar un corte delante de la banda que nos interesaba, y en esa ranura se introduce una tira de papel filtro 3 MM junto con una tira de bolsa de diálisis de 6 mm, se inició nuevamente la corrida hasta que la banda o fragmento de interés quedara absorbida en el papel filtro, esto se verifica iluminando con luz U.V. al gel y al filtro.

El filtro que contenía el DNA se coloca dentro de un tubo Eppendorf de 0.5 ml agujerado en el fondo, el cual a su vez se encontraba dentro de otro tubo Eppendorf de 1.5 ml; se centrifuga por 30 segundos y se conserva el sobrenadante en otro tubo Eppendorf. Se lava el filtro con 100 l de TE 1X y se centrifuga nuevamente por 30 seg., guardándose el sobrenadante con el anterior, finalmente se lava el filtro con 50 ul de TE centrifugándose ahora en frío por 2 min. Se toma el resto del sobrenadante, para ahora todo junto precipitarlo con 3 volúmenes de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, y de esta manera obtener el DNA como ya se ha mencionado anteriormente.

3.9.2 Transferencia del DNA a una membrana de nylon.

El DNA fue digerido con una o más enzimas, y los fragmentos fueron separados por electroforesis en agarosa, el gel fue fotografiado. Posteriormente el DNA fue desnaturalizado "in situ" manteniéndolo por una hora en una solución de NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M con agitación constante y suave a temperatura ambiente. Inmediatamente se neutralizó con una solución de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y NaCl 1.5 M con agitación constante y suave a temperatura ambiente, durante una hora. El dispositivo de transferencia se muestra en la Fig. 3.1

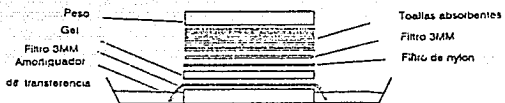


Fig. 3.1 Dispositivo de transferencia tipo "Southern".

El gel se colocó sobre el puente de papel filtro 3 MM, tiras de parafilm fueron colocadas rodeando el gel para evitar un corto circuito por contacto de la membrana de nylon, los filtros 3 MM y/o las toallitas absorbente (Maniatis et al., 1982).

La transferencia se llevaba a cabo toda la noche. Después de la transferencia, el filtro se lavaba en una solución SSC 6X (preparada como una dilución a partir de una solución SSC 20X, NaCl 3 M y citrato de sodio 0.3 M) durante 5 min, se dejaba secar a temperatura ambiente y se horneaba a 80C por dos horas para fijar el DNA a la membrana de nylon.

3.9.3. Hibridación.

La hibridación esencialmente se realizó en tres etapas, pre-hibridación, hibridación y lavados posthibridacionales.

La prehibridación consistió en la incubación de la membrana de nylon dentro de una bolsa de plástico sellada con una solución llamada de prehibridación, la cual esta compuesta de lo siguiente:

Solución: SSC 6X

- Denhardt 5X *
- SDS 0.2 %
- Tris-HCl 20 mM pH 8.0
- EDTA 2 mM
- H₂O desionizada estéril
- DNatt **

* Esta solución se preparó como dilución a partir de una solución Denhardt 50X : Ficoll 1 %, Polivinilpirrolidona 1 %, Albumina sérica bovina 1 % .

** El DNatt , es el bloqueador de la membrana de nylon, evitando así hibridación inespecífica. Se preparó una solución de DNatt (DNA de timo de ternera) de 10mg/ml, se disolvió por agitación en un vortex y se mantuvo toda la noche en frío para terminar de disolver. La solución se sonicó en frío hasta que disminuyera su viscosidad. Se extrajo con un volumen igual de fenol neutralizado con amortiguador de tetraborato de sodio 20 mM agitando y centrifugando a 12 100 x g por 10 min. El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto, se lavó con etanol al 70 %, se secó y se resuspendió en la mitad del volumen original. (Dillon, et al., 1985; Howley et al., 1979).

Posteriormente se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a 260 nm, para ajustar su concentración final a 10mg/ml. Antes de agregar el DNatt a la solución de hibridación se mantuvo en baño de ebullición por 10 min y se enfrió inmediatamente 5 min en hielo.

La prehibridación se llevó a cabo incubando a 65°C durante 4 hs, al término de las cuales fué drenada la solución de prehibridación de la bolsa e intercambiada por la solución de hibridación, la cual contenía además de la solución de prehibridación la sonda biotinilada, diluida 1:200, calentada a ebullición 10 min y enfriada inmediatamente 5 min en hielo. La hibridación se realizó durante toda la noche incubando a 65°C con agitación suave.

Un punto muy importante durante la hibridación son los lavados posthibridacionales, con los cuales se elimina la marca no unida al DNA y se asegura que sólo haya quedado unida la sonda utilizada (Howley et al., 1979; Freifelder, 1985).

Los lavados posthibridacionales se realizan tomando en cuenta las características fisicoquímicas del DNA, esto es, al someter a altas temperaturas al DNA este tiende a desnaturalizarse, separándose las cadenas, y permitiéndose de esta manera el reconocimiento entre DNatt y sonda, la cual está también como DNA de cadena sencilla. Cuando se utilizan altas concentraciones de NaCl (mayores de 0.5 M) aumenta la fuerza iónica, estabilizando la doble cadena y por consiguiente aumentando la temperatura de fusión (T_m), y favoreciendo la unión de los DNAs heterólogos (Freifelder, 1985; Lewin, 1987).

Para las sondas utilizadas en este trabajo se tomaron dos condiciones de lavado, una llamada de "alta astringencia" o "muy estricta", la cual se utilizó con bastante eficiencia para las sondas de apocitocromo b, subunidades ribosomales grande (21 S) y pequeña (15 S), así como también para la subunidad 9 de la ATPasa (oli 1). Las condiciones de lavado en este caso fueron las siguientes:

El filtro era lavado por 30 min en una solución de SSC 6X y SDS al 0.1 %, con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente se drenaba la solución de lavado, y se lavaba nuevamente, sólo que ahora se incubaba el filtro a 57°C por una hora con agitación lenta en la misma solución.

La segunda condición utilizada fue una de "regular astringencia", en la que las condiciones de lavado fueron menos drásticas, y fué utilizada para la sonda de la subunidad 6 de la ATPasa (olí 2), la cual no mostraba hibridación con las condiciones anteriores de lavado. En este caso se realizaron tres lavados, cada uno de 10 min a temperatura ambiente en la misma solución mencionada SSC 6X y SDS 0.1 %.

Después de los lavados el procedimiento a seguir fué el mismo en ambos casos.

3.9.4. Revelado de la hibridación

Para el revelado del filtro se usaron los reactivos del equipo de BluGene de BRL mencionado anteriormente:

- Conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP) 1 mg/ml en NaCl 3 M, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0.1 mM, Trietanolamina 30 mM pH 7.6.

- Nitroazul de tetrazolio (NBT) 75 mg/ml en dimetilformamida al 70 %.

- 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) 50 mg/ml en dimetilformamida.

Antes de comenzar con el revelado se prepararon los amortiguadores recomendados para este sistema de detección:

Sol. 1 : Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 y NaCl 0.15 M

Sol. 2 : BSA al 3 % en la solución 1.

Sol. 3 : Tris-HCl 0.1 M pH 9.5, NaCl 0.1 M y MgCl₂ 50 mM

Sol. SSC 20X : NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M.

Sol. SDS 5 %.

Al terminar los lavados, el filtro se mantuvo en la solución 1 por un min a temperatura ambiente. Se decantó la solución y el filtro se incubó con la solución 2 en una bolsa de hibridación por 1 h a 65°C. Antes de terminar el tiempo de incubación con la solución 2, se preparó una solución del conjugado SA-AP diluido 1:100 en la solución 1. Al terminar la incubación el filtro se incubó 10 min con agitación lenta a temperatura ambiente con la solución del conjugado; se decantó la solución y se lavó el filtro en la solución 1 en un volumen 20 a 40 veces mayor que el usada en la dilución de SA-AP, con agitación lenta durante 15 min. Se repitió el lavado y se lavó por último por 10 min en la solución 3 a temperatura ambiente.

En el momento de terminar los lavados, se preparó la solución de coloración. A 7.5 ml de la solución 3 contenida en un tubo de polipropileno se le añadieron 331 de NBT y 25 l de BCIP, se mezcló por inversión lentamente. El filtro se incubó en la solución anterior manteniéndose en obscuridad hasta que se diera la reacción de color, esto sucedía entre 30 min a 3 h.

Una vez dada la reacción de color, ésta se interrumpía lavando el filtro en una solución de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y EDTA 0.5 mM por un par de min, se dejaba secar a temperatura ambiente y finalmente se horneaba dos min a 80°C. En la Fig. 3.2 se presenta un esquema que representa los diferentes pasos llevados a cabo durante el Southern blot y la hibridación

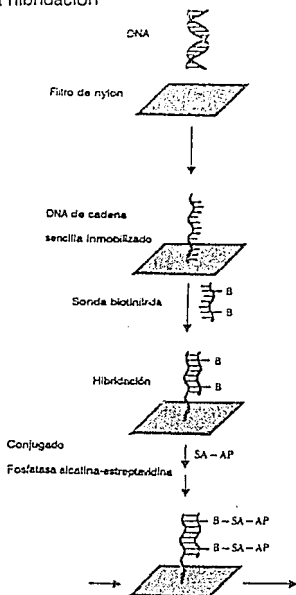


Fig. 3.2 Esquema general de las técnicas de Transferencia e Hibridación, utilizando derivados biotinilados.

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 Análisis morfológico de las ascosporas

Como punto de partida para establecer las diferencias y similitudes entre las cepas estudiadas, fue necesario conocer aspectos relacionados con su morfología, como lo fue en este caso el análisis de las esporas.

La clasificación de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* está basada inicialmente en la clasificación del género, a través de descripciones morfológicas tanto de las células como de las esporas, así como de los patrones de fermentación y asimilación de azúcares; también son tomadas en cuenta la no utilización de nitrato como fuente de nitrógeno, los requerimientos vitamínicos y el sistema de coenzima Q-6 presente, entre otras (Lachance, 1989, Sidenberg, 1987).

Kluyveromyces marxianus var. *marxianus* se caracteriza por presentar: células vegetativas esferoidales, ovoides, de cilíndricas a elongadas que se reproducen por gemación. Presentan ascas conjugadas, tetraesporadas. Las ascosporas muestran forma reniforme, y tienden a aglutinarse después de la liberación (Van der Waals et al., 1984).

Los patrones de fermentación y asimilación de azúcares de esta levadura se presentan a continuación:

Fermentación:

Glucosa	+	Lactosa	v
Galactosa	+	Rafinosa	+
Sacarosa	+	Inulina	+
Maltosa	-		

Asimilación de componentes de carbono:

Galactosa	+	Rafinosa	+	Eritriol	-
Sacarosa	+	Almidón soluble	-	Ribitol	+
Maltosa	-	D-Xilosa	+	D-Manitol	+
Celobiosa	+	L-Arabinosa	+	Ac. succínico	+
Trehalosa	-	D-Ribosa	v	Ac. cítrico	v
Lactosa	+ ó l	L-Rhamnosa	-	Inositol	-

l = ligera; v = variable.

La esporulación constituye uno de los procesos que son llevados a cabo durante la fase meiótica del ciclo de vida de una levadura. La esporulación generalmente requiere la presencia de ambos alelos de los factores de compatibilidad MATa- y Mat-. (Esposito, 1981)

Este fenómeno ocurre con la privación de fuentes de nitrógeno o carbono, o en presencia de fuentes de carbono no fermentables, así como también con cambios notables en la temperatura óptima de crecimiento para cada cepa. Las condiciones para la esporulación en levaduras son similares a las requeridas para la formación de esporas en bacterias (Esposito, 1981).

Estudios sobre la meiosis y formación de esporas constituyen un punto de apoyo para diversos tipos de análisis, como: 1) La determinación de eventos genéticos, bioquímicos y morfogenéticos que ocurren en células silvestres durante la esporulación; (2) identificación de genes que son indispensables para la esporulación y los papeles de las funciones meióticas en otros procesos celulares; (3) distinción entre los eventos que son necesarios tanto para la esporulación como para la no esporulación, entre otros. (Roman, 1981).

Durante el crecimiento de las cepas en extracto de malta se registró lo siguiente:

las cepas I.B. y L-836 presentaron células elipsoidales de tamaño bastante similar (ver fig.4.4.1), y a partir de las 24 h se observó la formación de pseudomicelio. La esporulación se observó al cabo de las 48 h, observándose ascas con tétradas de esporas reniformes aún dentro de la célula, así como también se observaron esporas liberadas.

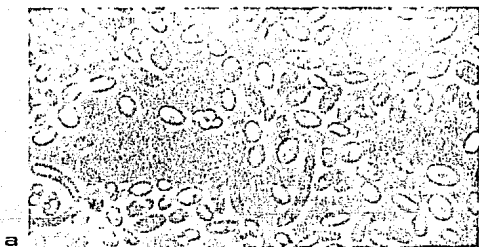
En la cepa L-670 se notó inicialmente que se trataba de células más pequeñas, con gemación múltiple en los extremos de la célula (gemación polar). En este caso también se registró la formación de pseudomicelio, y la esporulación también se observó a partir de las 48 h. Las esporas en esta cepa, se encontraron totalmente liberadas, es decir, no pudieron observarse esporas dentro de las ascas, sólo en algunos casos dentro del pseudomicelio se encontraron agrupamientos lineales de cuatro esporas (ver Fig.4.4.1).

Por lo que respecta a la cepa L-837, encontramos también diferencias marcadas con respecto a las cepas anteriores, en este caso las células eran de mucho mayor tamaño, además de presentar vacuolas muy grandes. La formación de pseudomicelio no fue tan abundante como en los casos anteriores. En esta cepa no se registró esporulación en un período de una semana, tiempo más que suficiente para que ocurriera este proceso en el medio de cultivo utilizado, por lo que nos hace pensar que se trata de una cepa heterotática, es decir, con un sólo factor de compatibilidad o factor sexual "a" o "α", por lo que requeriría fusionarse con una cepa con factor de compatibilidad opuesto para obtener producción de esporas. En este trabajo no se utilizaron otros medios como inductores de esporulación, ni se

realizaron cruzas con otras cepas que pudieran ser compatibles para asegurar la naturaleza heterotálica de esta cepa.

Por lo que respecta a la cepa Y-8281, se observó la formación de pseudomicelio también a partir de las 24 h y la esporulación a las 48 h. Las células son de tamaño muy similar al observado en las cepas I.B. y L-836. Se trataba de células elipsoidales, y las esporas se encontraron dispuestas en tétradas ya sea dentro de las células y ascas liberadas.

Los aspectos mencionados anteriormente, son de gran utilidad para la clasificación de levaduras, pero no constituyen los únicos puntos que actualmente son tomados en cuenta para la taxonomía de las mismas. Entre otros aspectos se incluyen el contenido de G + C, que para estas cepas va de 41.2-41.3 % mol (Phaff, 1978), estudios de hibridación e interfertilidad (E. Johannsen, 1980), características ecológicas, pruebas de reasociación de DNA-DNA, análisis de aloenzimas, composición química de la pared, análisis del DNA mitocondrial etc. (Martini, 1987)



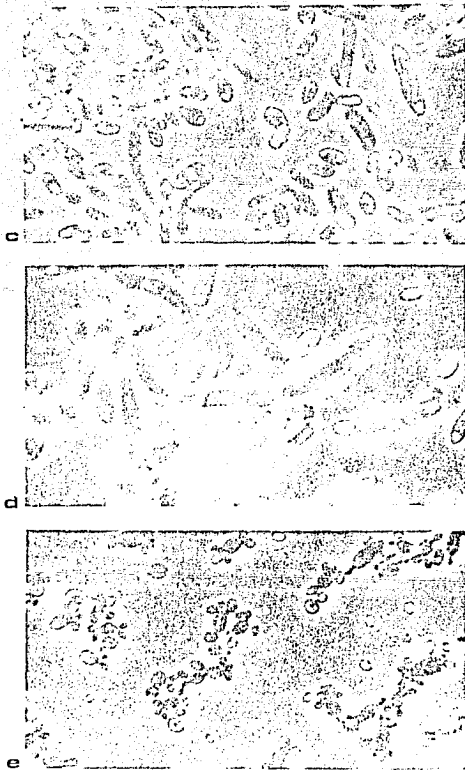


Figura 4.4.1 Fotomicrografías de las cepas de *Kluveromyces marxianus* var. *marxianus* utilizadas en el presente trabajo; a) L-836; b) I.B.; c) Y-8281; d) L-837 y e) L-670. Muestran la formación de pseudomicelio (células alargadas) y esporas, crecidas en medio de extracto de malta al 5% a temperatura ambiente.

4.2 Curvas de crecimiento

El crecimiento de las cepas analizadas en medio de YPD, puede observarse en la Fig. 4.2.1 . En ella vemos que no existe algún cambio significativo en la velocidad de crecimiento de las cinco cepas y por lo tanto en la forma de la curva.

A partir de esta gráfica se obtuvieron los tiempos medios generacionales (TMG) para cada una de las cepas y se enlistan en la siguiente tabla:

CEPA	TMG (hs.)
I.B.	1:20
L-670	1:30
L-836	1:40
Y-8281	1:40
L-837	1:40

De primera instancia los datos obtenidos en esta parte del estudio son bastante uniformes, y no se muestran grandes diferencias parecen entre las cepas estudiadas. Estos análisis son importantes ya que algunos estudios sobre especiación y posibles cambios por mutación, pueden ser detectados a partir de estos niveles de análisis. Estos resultados constituyen además otro punto utilizado dentro de la clasificación de levaduras.

La cepa Y-8281 fue solamente utilizada en los análisis de esporas, patrones de restricción y en el presente.

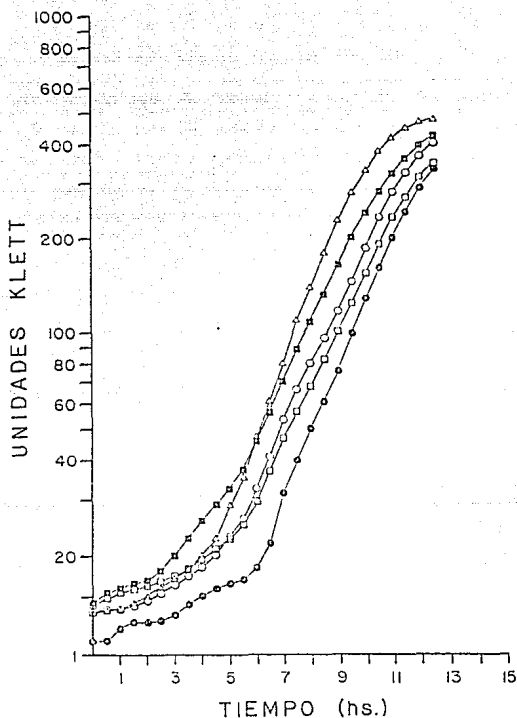


Figura 4.2.1. Curvas de crecimiento en YPD de las diferentes cepas de *K. marxianus* var. *marxianus* estudiadas a 30°C. (a). L-837; (L). L-670; (c). L-836; (o). Y-8281, y (e). I.B.

4.3. Citocromos. Espectros de absorción .

Recordando que las mitocondrias son organelos complejos, y que tienen un origen bigenómico, nuclear y mitocondrial, en el cual algunos componentes de la cadena respiratoria son codificados mitocondrialmente como el apocitocromo b, las subunidades I, II y III de la citocromo oxidasa, se realizaron análisis espectrales de las diferentes cepas para tratar de localizar posibles diferencias en cuanto a este aspecto.

Los citocromos son proteínas las cuales tienen como grupo prostético a un átomo de Hierro contenido en una porfirina, que consta de cuatro anillos pirrólicos unidos en forma cíclica por puentes de diferente origen (Whittaker, 1982). Los citocromos son portadores de electrones en la cadena respiratoria y están involucrados en la reducción del O_2 , (la citocromo oxidasa directamente).

Los citocromos requieren de la adición o pérdida de un electrón para reducirse u oxidarse. El potencial de oxido-reducción depende de las estructuras que rodean al átomo de Hierro, no sólo la porfirina sino también el resto de la proteína. (Prebble, 1981). Las formas oxidadas de la mayoría de los citocromos tienen dos bandas de absorción en la longitud de onda visible, mientras que las reducidas presentan tres, (α 550-605 nm), β (520-530nm) y (400-450nm) o región Soret (González, 1990).

En los espectros absolutos obtenidos a partir de células fig 4.3.1, encontramos patrones muy similares para las diferentes cepas; en estos espectros diferenciales sólo se muestran las regiones α y β , y sólo esta última fue tomada en cuenta para el análisis, ya que es la que presenta una mayor resolución para analizar los citocromos individualmente (Keilin, 1925). Se encontró el máximo pico de absorción (549-550nm) para el citocromo c, así como también fué el que se presentó con una mayor proporción con respecto a los otros dos citocromos. Para el citocromo b el máximo pico de absorción se registró en una longitud de onda de 560 nm y en una menor proporción que el citocromo c. Con respecto a la citocromo oxidasa el máximo pico de absorción fué registrado en longitudes de onda de 606-607 nm. Los espectros obtenidos concuerdan con el espectro reportado para células de *K. lactis* (Whittaker, 1982), por lo que se concluye que en las cepas aquí estudiadas se encuentran presentes los tres citocromos.

La proporción de los citocromos observados presenta variaciones de cepa a cepa, encontrándose mayor proporción de los mismos en la cepa L-670, una cantidad intermedia en las cepas I.B. y L-836 y una menor concentración de los mismos en la cepa L-837, estos datos nos resultaron interesantes, aunque como es sabido la concentración de citocromos varía no sólo de especie a especie, sino también en diferentes tejidos de un mismo organismo (Keilin, 1925).

En la figura 4.3.2 se muestra los espectros diferenciales obtenidos a partir de mitocondrias aisladas. Se encontraron espectros muy similares para todas las cepas y se observó una reducción en la concentración del citocromo c con respecto a los

espectros de células completas, esto era de esperarse, ya que como se sabe es una proteína soluble, unida menos firmemente a la membrana mitocondrial que los citocromos b, c₁ o a + a₃ y por lo tanto puede ser parcialmente perdido durante la purificación de mitocondrias.

En la figura 4.3.2 se muestran igualmente sólo las regiones α y β del espectro visible. El pico de mayor absorción para el citocromo c fué de 553-554 nm, para el citocromo b fué de 563 nm y finalmente para la citocromo oxidasa fue de 606-607 nm.

En la figura 4.3.2 también puede observarse que la cepa L-670 presenta una mayor proporción de citocromos mientras que la cepa L-837 presenta la menor concentración de los mismos. lo que concuerda con los espectros obtenidos a partir de células, esto nos hace pensar que realmente existe una diferencia en la concentración de citocromos para estas dos cepas, y no es un resultado debido a la estandarización de las concentraciones utilizadas en ambos casos. Pero como ya se mencionó anteriormente estas variaciones parecen ser normales dentro de una misma especie.

La utilización de los métodos espectrofotométricos ha permitido la caracterización detallada de los citocromos que participan en la cadena respiratoria y ha abierto la posibilidad de establecer potenciales medios de oxidorreducción de los diversos componentes que intervienen en la transferencia de electrones, así como también han sido de gran apoyo para la identificación de mutantes deficientes respiratorias, y rearrreglos y defeciones en el DNAm de levaduras (Dutton y Wilson, 1974; Walz, 1979; González-Halphen, 1990 ; Hardy et al., 1989.

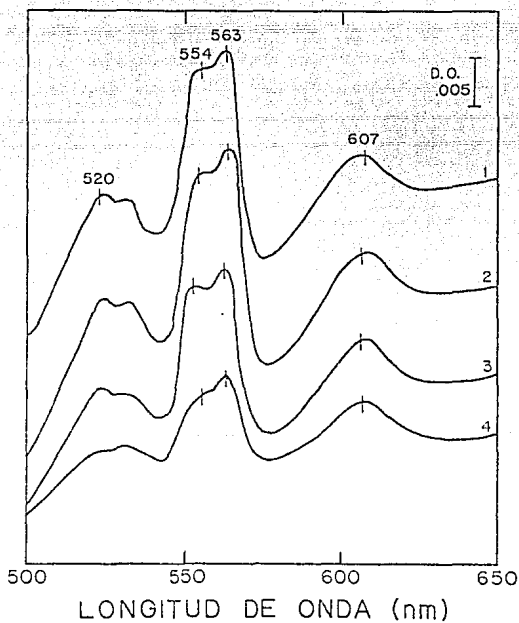


Figura 4.3.1. Espectros de absorción absolutos de las células. 1) L-670; 2) L.B.;
3) L-836 y 4) L-837.

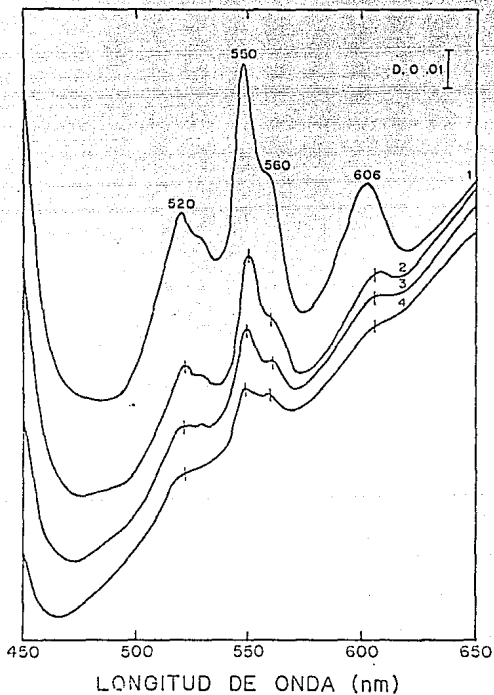


Figura 4.3.2. Espectros diferenciales de mitocondrias purificadas. 1) L-670; 2) I.B.
3) L-836, y 4) L-837.

4.4 Análisis de los patrones de restricción del DNAm_t.

El análisis de los DNAm_t empleando endonucleasas de restricción, permitió detectar un posible polimorfismo así como también algunas similitudes en este genoma, además de también poder determinar su forma y tamaño lo que constituyó una de las partes medulares del presente trabajo (Bernardi et al., 1975; Sanders et al., 1977; Prunell et al., 1977; Fonty et al., 1978).

Una aproximación diferente para la caracterización física del DNA está basada en las propiedades únicas de las enzimas de restricción para conocer ciertas secuencias cortas de bases del DNA y cortar esta molécula en una posición definida. (Maniatis et al., 1982). Esta técnica sólo es aplicable a organismos estrechamente relacionados. Además no todos los tipos de moléculas de DNA presentan la misma complejidad. Sólo moléculas de DNA con baja complejidad en cuanto a tamaño, tales como plásmidos, genomas de virus, DNAm_t, DNAr, DNA de cloroplastos son apropiados y producen patrones de corte de restricción claros. (Clark-Walker, 1983; Coria et al., 1990).

Una vez purificado el DNAm_t, fué digerido con las endonucleasas citadas anteriormente. Se escogieron principalmente endonucleasas que reconocieran seis y cuatro pares de bases y palíndromos con un número mayor de A-T, ya que como se ha reportado estos genomas presentan regiones ricas en A-T, por lo que se pensó que se obtendrían varios fragmentos al cortar con estas enzimas el DNA. Efectivamente con enzimas que reconocen secuencias con más de un par de A + T se generaron un mayor número de fragmentos como se muestra en la Tabla 4.4.1, en la cual se incluye a la cepa *K. lactis* WM37 que se utilizó como punto de comparación.

Las enzimas utilizadas en este análisis, su secuencia nucleotídica y el número de fragmentos generados por las mismas en las diferentes cepas estudiadas se presentan en la Tabla 4.1.

A primera instancia puede observarse que, las cepas Y-8281 y L-670 presentaron en general mayor número de sitios de restricción que el resto de las cepas. También puede observarse que no se encontraron sitios de corte para las enzimas Bam HI y Nhe I, cosa contraria a la reportada para la cepa de *K. lactis* WM37.

Al analizar los fragmentos generados al cortar con enzimas que reconocen palíndromos con un alto contenido de G-C, encontramos que éstos eran pocos, teniendo por lo general uno o dos sitios de reconocimiento. Encontramos que para todas las cepas de *K. marxianus* existían sitios únicos para enzimas que tenían diferentes combinaciones en su secuencia de dos pares de G + C como es el caso de Pst I, Kpn I, Cla I, Bgl II y Mlu I. Como se verá más adelante al parecer la localización de dichos sitios en los diferentes genomas utilizados permanece constante.

Una característica notable de llamar la atención fué el hecho de que para los DNAmT de las cepas Y-8281 y L-670 se encontraran numerosos sitios para las endonucleasas Hae III y Hap II, lo cual se ha reportado estar asociado con algunas variedades de *K. marxianus* (Ragnini y Fukuhara, 1988), así como también en *K. lactis*; lo que nos indicó la posible existencia de agrupamientos ricos en G + C en estas cepas, los cuales no pudieron ser totalmente mapeados en algunos casos debido a sus pequeños tamaños, la mayoría menores a 1000 pb (Hardy, 1987). La función de estas secuencias en particular no es muy clara aún, pero existen hipótesis que proponen que se trata de sitios de recombinación intramolecular, duplicación de orígenes de replicación, sitios de escisión rho-, vestigios de elementos transponibles, etc. (Dieckman, 1987), aunque frecuentemente se han encontrado estas secuencias en regiones espaciadoras intergénicas. En *S. cerevisiae* existen evidencias de que los agrupamientos de G + C juegan un papel en el procesamiento del RNA. (Ragnini y Fukuhara, 1988).

En las figuras 4.4.1 y 4.4.2 se muestran los patrones de restricción obtenidos a partir de los DNAmT de las cinco cepas analizadas con diferentes enzimas en donde puede notarse claramente las diferencias y similitudes halladas durante el transcurso del estudio. Encontramos que las cepas I.B. y L-836 presentaron igual número de fragmentos para las 18 enzimas utilizadas, el tamaño de los fragmentos fué el mismo también, éste fué calculado a partir de marcadores de peso molecular.

Así mismo en las figuras 4.4.1 y 4.4.2 puede observarse los numerosos sitios para Hae III y Hap II para los DNA de las cepas anteriormente mencionadas.

La existencia de agrupamientos de G-C es una característica tomada en cuenta para la clasificación de levaduras, ya que la presencia de las mismas constituye un indicio de relaciones evolutivas entre genomas. (Ragnini y Fukuhara 1988; Fuson, 1967). A partir de dichos agrupamientos y numerosos sitios de restricción se han encontrado dos grupos principales, uno constituido por *K. lactis*, *K. drosophilae*, y *K. vanudenii* y otro constituido por *K. marxianus*, *K. fragilis* y *K. bulgaricus*. Esto también parece estar de acuerdo con nuestros resultados y con los encontrados en el laboratorio para diferentes especies de *Kluyveromyces*.

Tabla 4.4.1. Número de fragmentos generados en los DNAMt de las cepas de distintos aislados de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* con diferentes endonucleasas de restricción.

End. de restric.	Secuencia reconocida (5' - 3')	CEPAS ANALIZADAS					
		I.B.	836	837	670	8281	WM37
Hae III	GGCC	3	3	5	14	9	12
Hap II	CCGG	3	3	4	12	9	24
Hha I	GCCG	4	4	5	5	5	10
Sma I	CCCGGG	0	0	0	0	0	5
Sst II	CCGCGG	2	2	1	2	2	14
Bam HI	GGATCC	0	0	0	0	0	2
Kpn I	GGTACC	1	1	1	1	1	2
Mlu I	ACGCGT	1	1	1	1	1	1
Nhe I	GCTAGC	0	0	0	0	0	1
Pst I	CTGCAG	1	1	1	1	1	1
Pvu II	CAGCTG	2	2	2	2	2	3
Sal I	GTCGAC	2	2	2	2	2	2
Sst I	GAGCTC	0	0	0	0	0	1
Bgl II	AGATCT	1	1	1	1	1	7
Cla I	ATCGAT	1	1	1	1	1	3
Eco RI	GAATTC	5	5	5	6	6	4
Eco RV	GATATC	2	2	3	4	2	6
Hind III	AAGCTT	5	5	5	6	6	3
Nsi I	ATGCAT	9	9	7	8	7	X
Sca I	AGTACT	3	3	3	2	2	0
Xba I	TCTAGA	2	2	2	2	2	3
Hinc II	GTpAC	5	5	4	7	4	7

P = A o G

p = C o T

X = no determinado.

* Tomada de Ragnini, 1988 y Coria, 1989.

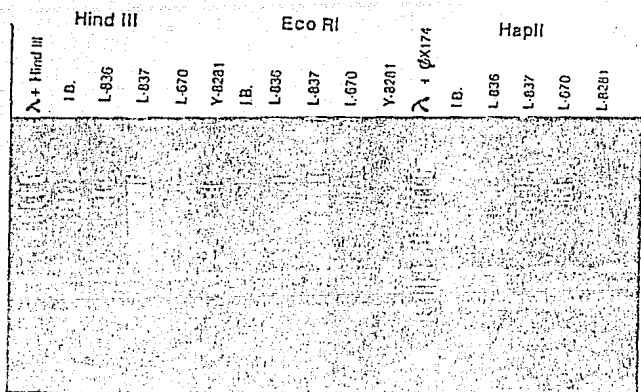


Figura 4.4.1. Patrones de restricción de las distintas cepas analizadas, digeridas con diferentes endonucleasas de restricción, Hind III, Eco RI y Hap II.

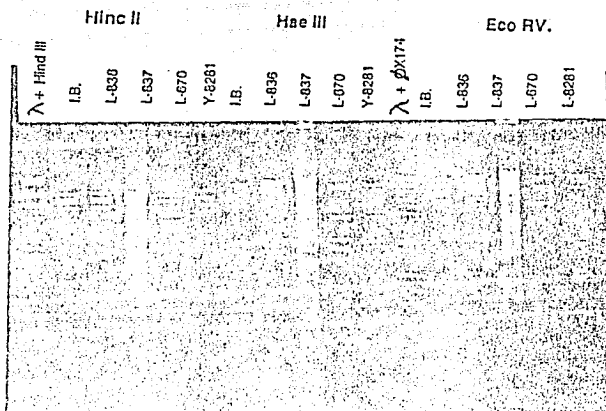


Figura 4.4.2. Patrones de restricción de las distintas cepas analizadas, digeridas con diferentes endonucleasas de restricción, Hinc II, Hae III, y Eco RV.

4.5 Tamaño y forma de las moléculas de DNAm_t.

A partir de los patrones de restricción de digestiones dobles y sencillas, tamaño y número de fragmentos obtenidos con las diferentes enzimas utilizadas se determinó el tamaño y forma de los genomas mitocondriales analizados en el presente estudio.

Se encontró que se trataba de moléculas circulares en todos los casos ya que, al realizar digestiones dobles la suma de los fragmentos era igual a la suma de los fragmentos obtenidos por las digestiones sencillas para las mismas enzimas utilizadas. Esto era de esperarse, ya que en casi todos los DNAm_t de levaduras reportados se han encontrado poblaciones de moléculas circulares. (Tabla 1.1) (Clark-Waiker, 1983).

El tamaño de las moléculas fué deducido a partir de los fragmentos generados al cortar el DNA con las endonucleasas y al ser separados en geles de agarosa de diferente concentración, como se indico anteriormente en la metodología. El tamaño de los fragmentos se obtuvo a partir de la comparación de los mismos con la comigración de diferentes marcadores de peso molecular tales como el DNA del bacteriófago lambda cortado con Hind III, el DNA del fago X 174 digerido con Hae III y marcadores de alto peso molecular. En la figura 4.5.1 se muestra el DNAm_t de la cepa L- 837 cortado con Eco RI y las enzimas de sitio único en un gel de agarosa al (0.8 %), en los carriles de los extremos se encuentran los marcadores de peso molecular, en la izquierda lambda + Hind III mezclado con X 174 + Hae III y en el extremo derecho Lambda + Hind III + Eco RI. En la figura 4.5.2 se muestran los DNAm_t de las cepas I.B. y L-836 cortados con Hind III y Hind III + Bgl II en un gel de agarosa al 0.4 %; en el carril izquierdo se observa a lambda + Hind III y en el derecho un marcador de alto peso molecular. (BRL).

Los tamaños del DNAm_t para las diferentes cepas fueron los siguientes:

- I.B.	40	Kpb
- L-836	40	Kpb
- L-837	40.5	Kpb
- L-670	42.5	Kpb
- Y-8281	39	Kpb

Como puede verse el tamaño de estos genomas presenta variaciones en un intervalo muy pequeño, de 40 a 42.5 Kpb. Estos datos sugieren cierta homogeneidad en las cepas de esta especie. En el género *Kluyveromyces* se ha reportado muy poca diversidad en cuanto al tamaño del genoma. En otros géneros de levaduras se han reportado grandes variaciones como es el caso de *Saccharomyces* que varía

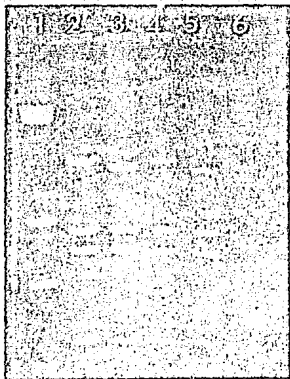


Figura 4.5.2. Digestiones de las cepas I.B. y L-836 con Hind III y Hind III + Bgl II. Gel de agarosa al 0.4%.

4.6 Mapas de restricción

La construcción de los mapas físicos de restricción fue llevada a cabo a partir de diferentes digestiones sencillas, dobles y triples de los DNAs de cuatro de las cepas analizadas: I.B., L-836, L-837 y L-670. Estos mapas se hallan representados esquemáticamente en las figuras 4.7.1. a 4.7.14 en los que los mapas están linearizados y Fig. 4.7.15 donde se presentan los mapas físicos condensados, en los cuales se pueden comparar mucho mejor los sitios de restricción para las diferentes cepas.

de 23-82 kpb y Dekkera/Bretanomyces que va de 28-101 Kpb (Clark-Walker, 1985; Hoeben, 1986).

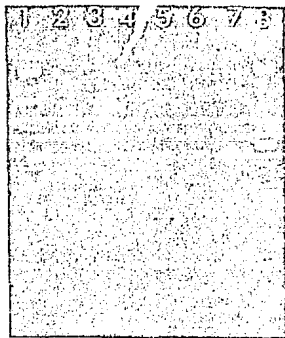


Figura 4.5.1. Digestiones de la cepa L-837 con Hind III y las diferentes endonucleasas de sitio único. Gel de agarosa al 0.8%.

los cuales se pueden comparar mucho mejor los sitios de restricción para las diferentes cepas.

Para la elaboración de los mapas se tomó como punto cero de referencia el sitio único de Pst I. El mapa de *K. lactis* WM37 fué tomado de Ragnini et al, 1988 y Coria et al, 1990.

Se encontró que para las cepas I.B. y L-836 los mapas de restricción fueron idénticos en cuanto a número de fragmentos generados por una misma enzima, tamaño de los mismos y localización dentro del genoma. En estas cepas se encuentran conservadas las distancias de los sitios únicos de restricción, las cuales se presenta a continuación: De Pst I a Cla I 14.7 Kpb; entre Cla I y Mlu I 0.5 Kpb; de Mlu I a Bgl II la distancia fué de 12.8 Kpb; de Bgl II a Kpn I 10.6 Kpb y finalmente de Kpn I a Pst I 1.4 Kpb. Esta gran similitud también ha sido encontrada en los DNAmT de las cepas *K. fragilis* 2415 y *K. bulgaricus* 4327 estudiadas en el laboratorio; a excepción de un fragmento más pequeño encontrado para la endonucleasa Xba I para la cepa *K. fragilis*.

En la cepa *K. lactis* WM37 se encontraron algunos de los sitios únicos observados en el resto de las cepas como Pst I y Mlu I, pero además presenta sitios únicos para Sst I y Nhe I, sitios estos ausentes en nuestras cepas.

En el mapa de la cepa L-837 (figs. 4.7.14 y 4.7.15) se encontraron mayor número de sitios de restricción que en los dos mapas anteriores; también se encontraron algunas diferencias en cuanto a las distancias que hay entre los diferentes sitios únicos. La distancia entre el sitio de Pst I y Cla I es un poco mayor (15.7 Kpb) con respecto a las dos cepas anteriormente mencionadas; así como también la distancia entre los sitios Bgl II y Kpn I (14.1 Kpb), pero, los sitios Mlu I y Bgl II (8.0 kpb) presentan una distancia menor; la distancia entre Cla I y Mlu I al parecer es más o menos equivalente (1.0 Kpb). Otra característica importante en este genoma lo constituyó la presencia de un sitio único para la endonucleasa Sst II, el cual se haya localizado cerca del sitio de Mlu I; en los tres mapas restantes esta enzima presenta dos sitios de corte (ver Tabla 4.4.1).

El mapa de la cepa L-670 (figuras 4.7.13 y 4.7.15) es el de mayor tamaño, además de presentar el mayor número de sitios de restricción para varias de las enzimas analizadas que generan más de un sitio de restricción, como por ejemplo, Eco RI, Hind III, Nsi I y Hind III. La excepción la constituye Sca I, la cual presenta sólo dos sitios de corte en lugar de tres (ver mapas y Tabla). Esta cepa presenta numerosos sitios para Hae III y Hap II como se mencionó con anterioridad, característica reportada para las cepas del grupo de *K. lactis*, y no encontrada en el resto de las cepas analizadas. Los sitios para Hae III y Hap II reportados en la Tabla 4.4.1, no se encuentran representados en este mapa debido a su gran número y su pequeño tamaño, la mayoría de menos de 800 pb. Para su localización se realizaron algunas clonaciones, pero con muy poco éxito, debido a problemas con el vehículo de clonación. Sin embargo, a lo largo de este trabajo pudimos darnos

cuenta que estos sitios se encuentran agrupados en dos áreas dentro del genoma, en la región que se encuentra entre los sitios de Pst I y Cla I, y entre Bgl II y Kpn I.

En este mapa (L-670) al parecer parece haber una inserción de aproximadamente 2.5 Kpb, que se encuentra representada por una mayor distancia entre los sitios de Pst I y Cla I (18.5 Kpb), y Bgl II y Kpn I (17.4 Kpb). Pensamos que este aumento en el tamaño es debido a la inserción de secuencias ricas en G + C, como se ha reportado con anterioridad, aunque no se descarta la posibilidad de cambios en las secuencias intrónicas; o que los fenómenos de recombinación producidos constantemente en las mitocondrias hubieran propiciado este arreglo.

4.7 Mapeo genético

La elaboración de los mapas genéticos de las diferentes cepas estudiadas se llevo a cabo a partir de los mapas físicos de restricción y de la valiosa utilización de sondas heterólogas marcadas con derivados biotinilados para la localización de secuencias similares a las subunidades pequeña y grande del RNAr (15S y 21S), las subunidades 9 y 6 de la ATPasa mitocondrial y el apocitocromo b.

Como ya se mencionó en la Tabla 3.2, las sondas utilizadas provienen de *K.lactis* y *S. cerevisiae*, levaduras muy relacionadas con nuestras cepas, por lo que se esperaba que las condiciones para los lavados posthibridacionales de alta astringencia (alta temperatura y baja concentración de sales) funcionara. Esto fué corroborado por la buena señal de hibridación obtenida para el apocitocromo b, subunidades ribosomales y subunidad 9 de la ATPasa.

En el caso de la subunidad 6 (oli 2) de la ATPasa, al utilizar las mismas condiciones de lavados que en el resto de las hibridaciones, no obtuvimos ninguna señal, lo que nos hizo suponer que la similitud de este gen en nuestras cepas era muy poca. Por lo que se hicieron distintas pruebas cambiando las condiciones de astringencia. Realizando los lavados posthibridacionales a temperatura ambiente obtuvimos finalmente señal de la existencia de este gen; aunque la señal observada nunca fué tan fuerte como para las demás sondas. Para verificar el grado de similitud de este gen en estas dos especies posteriormente se procederá a la secuenciación del mismo en *K. marxianus* var. *marxianus*, así como la realización de estudios de contenidos molares de G + C, los cuales también afectan las condiciones de hibridación.

En la Fig. 4.7.1 se presenta el resultado de la hibridación para la subunidad 6 de la cepa 837, con fragmentos generados por digestiones sencillas y dobles con las enzimas Nsi I, Hinc II, Hind III y Eco RI, cortadas todas estas con Mlu I para localizar con más exactitud al gen. Como puede observarse en el caso del carril 7 se obtuvo el fragmento más pequeño de hibridación aproximadamente de 3 Kpb, esta señal es de gran ayuda, ya que nos proporciona un indicio de la real ubicación

de dicha secuencia, debido a que las sondas utilizadas difícilmente sobrepasa 1.5 Kpb. Las flechas sobre la fotografía indican las bandas de hibridación en el filtro.

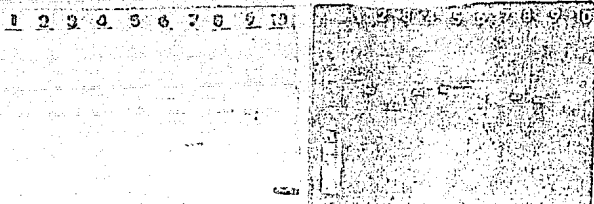


Figura 4.7.1. Hibridación con el gen de la subunidad 6 de la ATPasa mt de la cepa L-837. 1) λ + Hind III + X ϕ 174 + Hae III; 2) Nsi I; 3) Nci I + Mlu I; 4) Hinc II; 5) Hinc II + Mlu I; 6) Hind III; 7) Hind III + Mlu I; 8) Eco RI; 9) Eco RI + Mlu I, y 10) pLO-4.

1 2 3 4 5 6 7

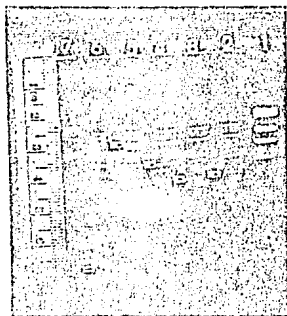


Figura 4.7.2. Hibridación con el gen de la subunidad 6 de la ATPasa mt de la cepa L-836. 1) λ + Hind III; 2) Hind III + Cla I + Mlu I; 3) Hind III + Cla I; 4) Hind III; 5) Hind III + Xba I; 6) Xba I, y 7) pLO-4.

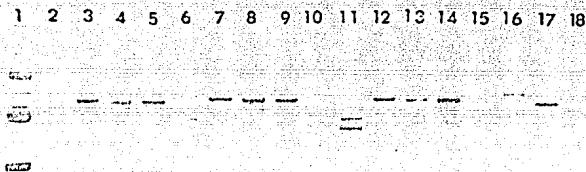


Figura 4.7.3. Hibridación con el gen del apocitocromo b para todas las copas analizadas.

- 1) pWM37-10H; 2) I.B. + Nsi I; 3) I.B. + Hind III; 4) I.B. + Hap II; 5) I.B. + Hap II + Cla I; 6) L-836 + Nsi I; 7) L-836 + Hind III; 8) L-836 + Hap II; 9) L-836 Hap II + Cla I; 10) λ +X174; 11) L-837 + Nsi I; 12) L-837 + Hind III; 13) L-837 + Hap II; 14) L-837 + Hap II + Cla I; 15) L-670 + Nsi I; 16) L-670 + Hind III; 17) L-670 + Hinc II, y 18) λ + X 174.

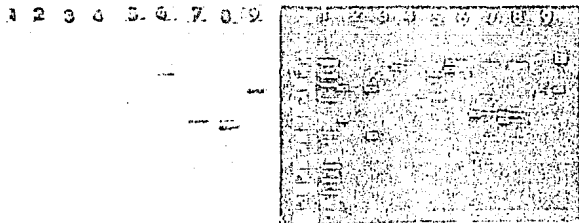


Figura 4.7.4. Hibridación con el gen de la subunidad ribosómica 21s de las copas L-836 (2,3 y 4) y L-670 (5,6,7 y 8). 1) λ +X 174; 2) Eco RI; 3) Sal I + Hha I; 4) Sal I; 5) Hinc II; 6) Sal I; 7) Hha I + Sal I; 8) Hha I, y 9) pKLM-15/4.

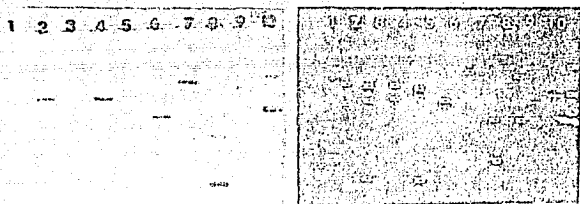


Figura 4.7.5. Hibridación con el gen de la subunidad ribosómica 15s de las cepas L-836 (2 y 3) y L-670 (4,5,6,7,8 y 9). 1) λ + X 174; 2) Eco RI; 3) Eco RI + Mlu I; 4) Eco RI; 5) Eco RI + Mlu I; 6) Hind III + Cla I; 7) Hind III; 8) Hind III + Cla I + Mlu I; 9) Hind III + Mlu I, y 10) pES-15s.

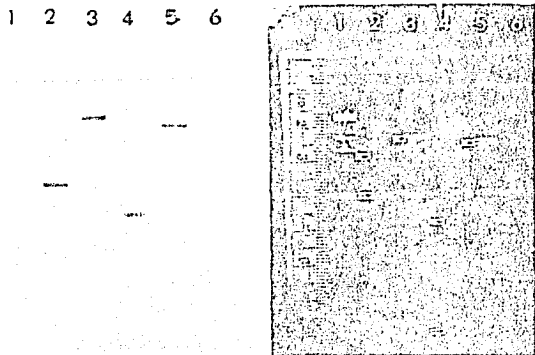


Figura 4.7.6. Hibridación con el gen de la subunidad ribosómica 21s de la cepa L-837. 1) λ + X 174; 2) Hha I; 3) Nsi I; 4) Hae III; 5) Hinc II y 6) pKLM-15/4.

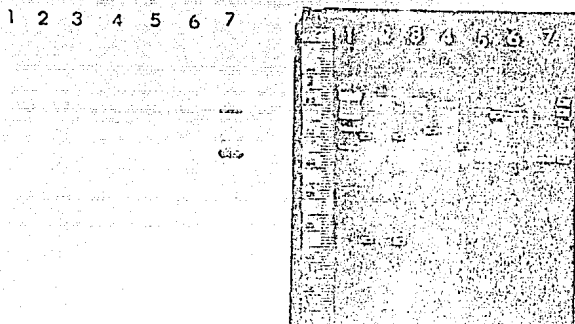


Figura 4.7.7. Hibridación con el gen de la subunidad 9 de la ATPasa mt de la cepa L-837. 1) λ + Hind III; 2) Sca I; 3) Sca I + Bgl II; 4) Xba I + Bgl II; 5) Hind III; 6) Hha I y 7) pMZ-oll I.

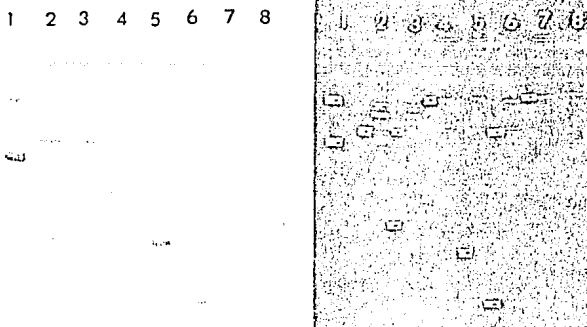


Figura 4.7.8. Hibridación con el gen de la subunidad 9 de la ATPasa mt de la cepa I.B. 1) pMZ-oll I; 2) Hind III; 3) Hind III + Sst II; 4) Sst II; 5) Sca I; 6) Hha I + Sca I; 7) Hha I, y 8) λ + Hind III.

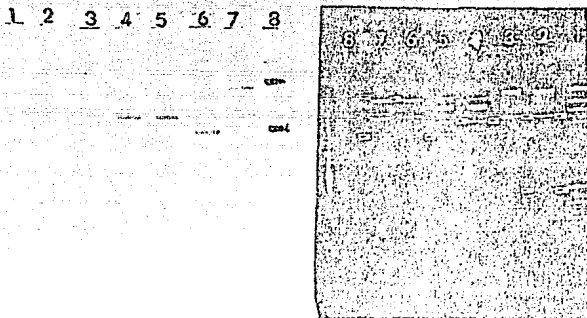


Figura 4.7.9. Hibridación con el gen de la subunidad 9 de la ATPasa mt de la cepa I.B. 1) pMZ-ori 1; 2) Eco RI; 3) Eco RI + Bgl II; 4) Hind III; 5) Hind III + Bgl II; 6) Sca I; 7) Sca I + Bgl II, y 8) λ + X 174.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Figura 4.7.10. Hibridación con el gen de la subunidad ribosómica 21s de todas las cepas estudiadas. I.B. (2,3 y 4), L-836 (5,6 y 7), L-837 (9,10,11 y 12) y L-670 (13,14 y 15). 1) pKML-15/4; 2) Hae III; 3) Hha I; 4) Hinc II; 5) Hae III; 6) Hha I; 7) Hinc II; 8) λ + X 174; 9) Hae III; 10) Sal I; 11) Hha I; 12) Hha I + Bgl II; 13) Hha I; 14) Spe I; 15) Eco RV, y 16) λ + X 174.

En la Fig. 4.7.2 se muestra la hibridación del gen de la subunidad 6 de la ATPasa con el DNAm_t de la cepa L-836 digerido con Hind III y Xba I más las endonucleasas de sitio único Mlu I y Cla I. En esta figura puede observarse para la digestión con Xba I la hibridación es con la banda de mayor tamaño obtenida al cortar el DNA con esta enzima, 29.9 Kpb, sin embargo, al realizar una doble digestión Xba I + Hind III se obtuvo hibridación en una banda de 0.9 Kpb, siendo esta la menor señal obtenida para esta sonda en este DNAm_t.

En la Fig. 4.7.3 se muestra la hibridación de la sonda para apocitocromo b con todos los DNAm_t usados en el presente trabajo. Como puede apreciarse la hibridación es sólo con una banda para los casos en el que el DNAm_t fué cortado con Hind III y Hap II, aún en digestiones dobles con Cla I; pero, notablemente las bandas de hibridación fueron tres para las digestiones con Nsi I, carriles 2, 6, 11 y 15. Registrándose una muy buena señal de hibridación con un fragmento de aproximadamente 0.6 Kpb en todos los casos. Esto nos indica que el gen del citocromo b está en este pequeño fragmento, y nos habla de una conservación de esta secuencia, tal como se ha reportado para el caso de *S. douglasii* (Tian et al., 1991, b). Este fragmento está también presente en *K. lactis* como puede deducirse a partir de su secuencia (Coria y Brunner, 1989). Otras cepas estudiadas en el laboratorio muestran igualmente este fragmento.

Una diferencia importante encontrada para la localización del apocitocromo b, comparando con el DNAm_t de *K. lactis* fue que en esta última dicho gen es cortado por un sitio único de Sst I, enzima que en nuestro caso no presenta ningún sitio de corte.

En las Fig. 4.7.4 a 4.7.10 se presentan algunas otras hibridaciones realizadas con las diferentes sondas y con los diferentes DNAm_t utilizados en este trabajo, las cuales nos permitieron realizar mapeos más precisos.

Cabe mencionar que no se realizó la localización de las subunidades de la citocromo oxidasa, ni los RNAt, lo cual es necesario para conocer el arreglo de los genes en estas moléculas. A pesar de ello puede observarse que las secuencias localizadas se encuentran distribuidas a lo largo de toda la molécula, tal como se ha reportado para *K. lactis* (Coria et al, 1990).

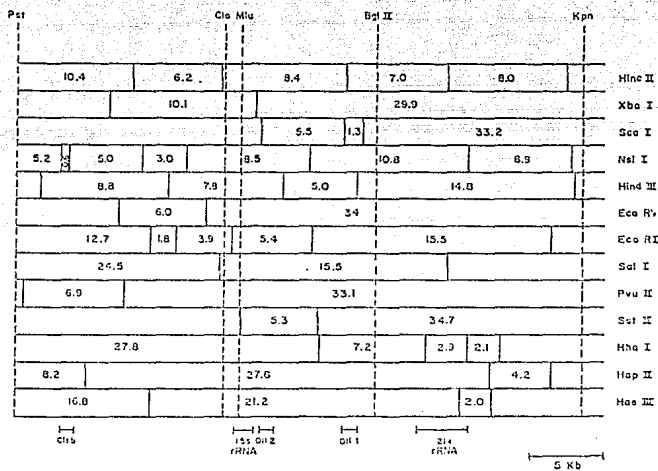


Figura 4.7.11. Mapa físico y localización de los genes rastreados, para la cepa *K. marxianus* var. *marxianus* L-636. los sitios únicos están indicados con líneas discontinuas que atraviesan el mapa. Las secuencias localizadas por hibridación se muestran en la parte inferior. Tamaño del genoma 40Kpb.

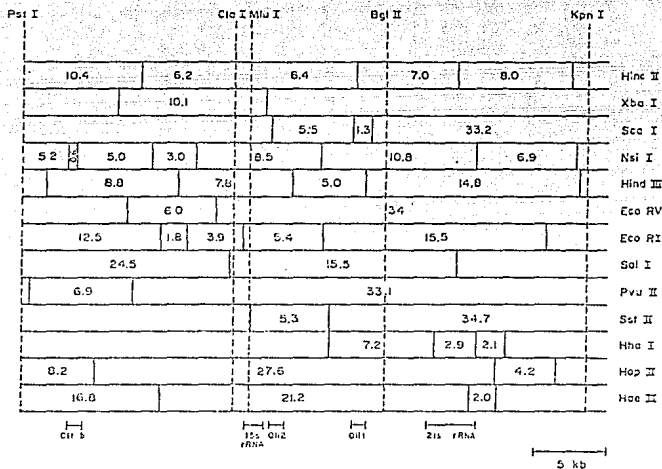


Figura 4.7.12. Mapa físico y genético de la cepa *K. marxianus* var. *marxianus* I.B. Tamaño del genoma 40 Kpb.

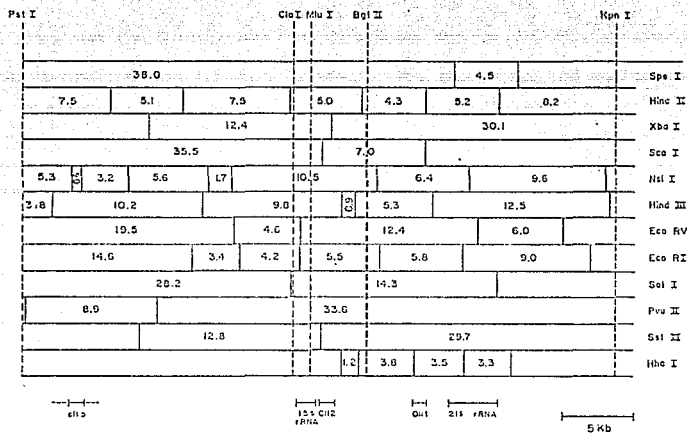
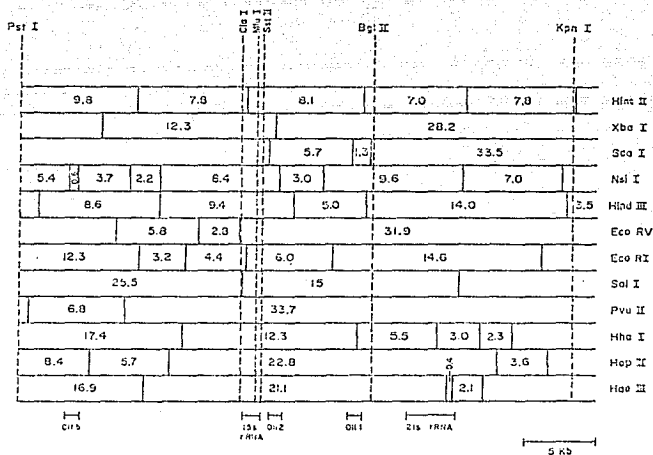


Figura 4.7.13. Mapa físico y genético de la cepa *K. marxianus* var. *marxianus* L-670. Tamaño del genoma 42.5 Kpb.



FFigura 4.7.14. Mapa físico y genético de la cepa *K. marxianus* var. *marxianus* L-837. Tamaño del genoma 40.5 Kpb.

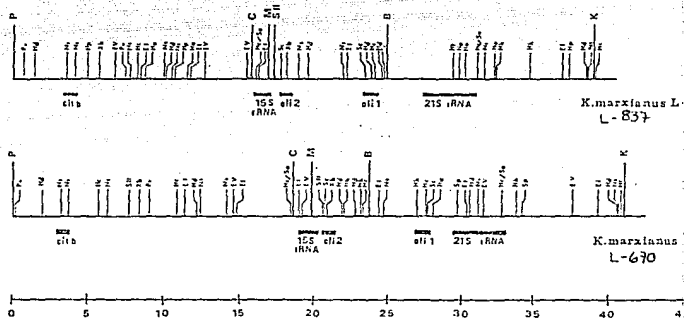
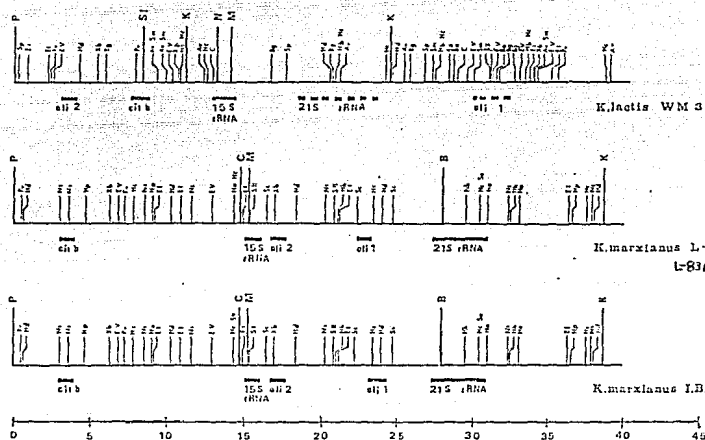
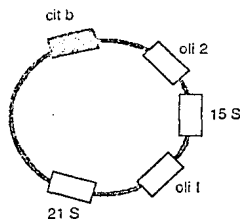


Figura 4.7.15. Mapas físicos condensados de las diferentes cepas de *K. marxianus* var. *marxianus* y *K. lactis* W137. Abreviaturas de las enzimas. Av: Ava I; Ba: Bam HI; Bg: Bgl II; C: Cla I; El: Eco RI; EV: Eco RV; Ha: Hae III; Hc: Hinc II; Hd: Hind III; Hp: Hap II; K: Kpn I; M: Mlu I; Nh: Nhe I; Ns: Nsi I; P: Pst I; Pv: Pvu II; Sa: Sal I; Sc: Sca I; Sm: sma I; Sl: Sst I; Sll: Sst II y Xb: Xba I.



El arreglo de los genes encontrado para todas las moléculas de DNAm aquí estudiadas fue el mismo; presentando sólo algunas ligeras variaciones en las distancias entre los mismos. Las cuales están mejor representadas en la cepa L-670, en la que la distancia del citocromo b a la subunidad ribosómica 15S es de 15.4 Kpb, mientras que en las cepas I.B. y L-836 es de 11 Kpb y en la cepa L-837 es de 11.6 Kpb. El arreglo encontrado fue el siguiente tomando como punto de referencia al citocromo b: Citocromo b, subunidad ribosómica 15S, subunidad 6 de la ATPasa

(oli 2), subunidad 9 de la ATPasa (oli 1) y subunidad ribosómica 21S. Este arreglo esta representado en la Fig. 4.7.16, y coincide con el encontrado para cepas de *K. bulgaricus* y *K. fragilis* estudiadas en el laboratorio. Lo cual era de esperarse ya que como se ha reportado estas cepas constituyen un grupo mucho más relacionado, que el grupo representado por *K. lactis*, *K. vanudenii*, y *K. drosophilum*, en los que además de presentar algunas de las enzimas de sitio único diferentes a las encontradas por nosotros presentan un arreglo genético diferente, i.e. Citocromo b, subunidad ribosomal 15S, subunidad ribosomal 21S, subunidad 9 de la ATPasa y subunidad 6 de la ATPasa.



GRUPO II

Figura 4. 7.16 Arreglo genético de las diferentes cepas de la levadura *K. marxianus* var. *marxianus*. El tamaño de los genes no se encuentra representado a escala.

A partir de los datos obtenidos de los mapas físicos y genéticos, se encontraron datos importantes acerca de la conservación de secuencias para los diferentes genes analizados así como para algunos sitios marcadores de los mismos. Tal es el caso mencionado anteriormente de los dos sitios de corte de Nsi I que generan un fragmento de aproximadamente 600 pares de bases encontrado a los largo de diferentes cepas estudiadas.

Para el caso de la subunidad ribosómica pequeña 15S, el sitio único de Mlu I es un marcador de este gen para las cuatro cepas analizadas, este sitio también se encuentra presente en *K. lactis*. Para la subunidad 6 de la ATPasa uno de los dos sitios de Xba I, (el que se encuentra más cercano a Mlu I) constituye también un marcador para este gen. En el caso de la subunidad ribosómica grande 21 S existen también sitios marcadores, como Hha I y el sitio Hinc II/Sal I en todos los casos. Finalmente para la subunidad 9 de la ATPasa tenemos a uno de los sitios de Hinc II y Sca I como marcadores de este gen.

Como podemos observar a partir de estos resultados a pesar de las diferencias encontradas en cuanto a número de sitios y fragmentos generados por las diferentes enzimas utilizadas, así como la baja similitud encontrada para la subunidad 6 de la ATPasa, encontramos una conservación del arreglo genético y de las secuencias identificadas como marcadores. Este último punto habrá de comprobarse cuando se realicen las clonaciones de estos segmentos para su posterior secuenciación.

A partir de los mapas físicos y genéticos también se observó que existen sitios conservados adyacentes a las posibles regiones detectadas por hibridación. Tal es el caso de Hha I para la subunidad ribosómica 21S; Eco RI y Sst II para la subunidad ribosómica 15S; los sitios conservados de Nsi I; El sitio de Sca I para oli 2 y Sca I y Hind III para oli 1.

5. CONCLUSIONES.

A lo largo de este trabajo se ha llegado a concluir algunos puntos importantes acerca del polimorfismo del DNAm_t de la levadura clasificada como *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* de diversos orígenes.

En los diferentes aislados estudiados se presentaron ligeras variaciones en cuanto a morfología y formación de esporas, para las cepas L-837 y L-670.

Para las mediciones de los tiempos medios generacionales no se observaron cambios significativos en las curvas obtenidas, lo que indica que se trata de cepas muy semejantes y que además no presentan ninguna alteración mutacional que pudiera impedir su crecimiento normal.

Los análisis espectrofotométricos realizados mostraron la existencia de los diferentes citocromos que intervienen en los procesos de oxidorreducción. La presencia de menores concentraciones de los mismos en la cepa L-837, al parecer puede ser normal ya que según se ha reportado estas puede variar aún en miembros de una misma especie (Whittaker, 1982; Clark-Walker, 1990), tomando en cuenta que los registros se realizaron en las mismos estadios fisiológicas.

A partir de los análisis de los patrones de restricción, se detectó que las cepas Y-8281 y L-670 presentaron numerosos sitios para las endonucleasas Hae III y Hap II, a diferencia de las otras cepas estudiadas. Esta característica ha sido reportada como índice de similitud entre algunas variedades de levaduras de la especie *Kluyveromyces marxianus*, además de ser también encontrada en cepas del grupo de *K. lactis*.

Al utilizar enzimas que reconocen secuencias con un gran contenido de A + T, se encontraron numerosos sitios para todas las cepas comprendidas en este estudio, como es el caso de Hind III, Nsi I y Eco RI.

Los tamaños de estos genomas presentaron un rango de variación muy pequeño de 39 a 42.5 Kpb, característica al parecer asociada con el género, contraria a la reportada en otras especies de levaduras y hongos.

Se encontró que en todos los casos se trataba de moléculas circulares de DNAm_t o de una población de éstas.

A partir de los análisis de restricción se pudieron construir los mapas de restricción de las cepas I.B., L-836, L-670 y L-837. Los sitios únicos de restricción Pst I, Cla I, Mlu I, Bgl II y Kpn I se encuentran conservados para los diferentes DNAm_t analizados.

A partir de los mapas de restricción se encontró que en general los genomas se encuentran bastante conservados para la mayoría de las enzimas utilizadas. Asimismo también se pudo observar lo que parece ser una posible inserción en la cepa L-670 de aproximadamente 2.5 Kpb que estaría representada por la aparición de numerosos sitios para Hae III y Hap II en la región comprendida entre los sitios únicos de Pst I y Cla I que se encuentran en el mapa respectivo.

Utilizando los mapas físicos de restricción se elaboraron los mapas genéticos utilizando diferentes sondas heterólogas marcadas con derivados biotinilados permitiendo suponer que los genes portados por dichas sondas se encuentran representados en estos genomas, lo que requeriría una comprobación ulterior al realizar la secuenciación de tales genes putativos.

Se encontraron sitios marcadores de las posibles secuencias codificadoras, así como también sitios adyacentes a las mismas bastante conservados.

El arreglo genético encontrado para los diferentes aislados fué básicamente el mismo a pesar de los pequeños cambios encontrados en el número y disposición de los fragmentos generados por las endonucleasas. El arreglo fue el siguiente:

Cit. b - 15S - oli 2 - oli 1 - 21S

Partiendo de todo lo anterior finalmente podemos concluir que, las diferencias a nivel molecular son mayores que las diferencias morfológicas o fisiológicas. Los criterios morfológicos/fisiológicos parecen ser suficientemente buenos para clasificar a distintas especies y variedades de levaduras, sin embargo, cuando se desea conocer las relaciones de similitud entre especies o variedades cercanas el criterio molecular puede ofrecer mayor resolución, ya que a partir de éste se ha llegado a la elaboración de arboles filogenéticos.

Las diferencias y similitudes encontradas en el presente trabajo, nos proporcionan una idea de la velocidad de cambio que presentan estas macromoléculas, y nos hablan de lo difícil que puede resultar el tratar de realizar estudios sistemáticos, los cuales en muchas ocasiones pueden representar muy bien a diversos grupos, pero en otras nos recuerdan que los criterios utilizados en las clasificaciones pueden ser un tanto arbitrarias y por lo tanto deben ser tomados con bastante cautela.

6. REFERENCIAS.

- *. Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. y Young, I.G. (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome". *Nature*. 290: 457-465 p.
- *. Akashi, A., Yoshida, Y., Nakagoshi, H., Kuroki, K., Hashimoto, T., Tagawa, K. y Imamoto, F. (1988). "Molecular cloning and expression of a gene for a factor which stabilizes formation of inhibitor-mitochondrial ATPase complex from *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biochem.* 104: 526-530 p.
- *. Arnold, W.N. (1981). *Yeast Cell Envelopes: Biochemistry, Biophysics and Ultrastructure*. CRC Press Inc. U.S.A. Vol. 1
- *. Attardi, G. (1988). "Biogenesis of mitochondria". *Ann Rev. Cell. Biol.* 4: 289-333.
- *. Asher, E.B., Groudinsky, O., Dujardin, G., Altamura, N., Kermorgant, M. y Slonimski, P. (1939). "Novel class of nuclear genes involved in both mRNA splicing and protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria". *Mol. Gen. Genet.* 215: 517-528.
- *. Bailey-Serres, J., Leroy, P., Jones, S.S., Wahleithner, J.A., y Wolstenholme, D.R. (1987). "Size distributions of circular molecules in plant mitochondrial DNAs". *Curr. Genet.* 12: 49-53.
- *. Binder, S., Schuster, W., Grienenberger, J.-M., Weil, J.H. y Brennicke, A. (1990). "Genes for tRNA^{His}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Ser} and tRNA^{Tyr} are encoded in *Oenothera* mitochondrial DNA". *Curr. Genet.* 17: 353-358.
- *. Biswas, T.K. y Getz G. (1986). "Nucleotides flanking the promoter sequence influence the transcription of the yeast mitochondrial gene coding for ATPase subunit 9". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 270-274.
- *. Boulet, A., Levra-Juillet, E., Perea, J. y Faye, G. (1990). "The absence of introns in yeast mitochondria does not abolish mitochondrial recombination". *Curr. Genet.* 17: 537-541.
- *. Brown, W.M. (1980). "Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 No.6: 3605-3609.

- *. Brunner, A. y Coria, R. (1989). "Cloning and sequencing of the gene for apocytochrome b of the yeast *Kluyveromyces lactis* strains WM27 (NRRL Y-170066) and WM37 (NRRL Y-1140)". *Yeast*. 5: 209-218.
- *. Butow, R.A. (1985). "Nonreciprocal exchanges in the yeast mitochondrial genome". *TIG*. 81-84
- *. Cann, R.L. Stoneking, M. y Wilson, A.C. (1987). "Mitochondrial DNA and human evolution". *Nature*. 325: 31-36.
- *. Cavalier-Smith, T. (1985). "Introduction: the evolutionary significance of genome size". En: The Evolution of Genome Size. (Cavalier-Smith, T.). John Wiley and Sons Ltd. cap. 1.
- *. Clark-Walker, G.D., McArthur, C.R., y Sriprakash, K.S. (1983). "Order and Orientation of Genic Sequences in Circular Mitochondrial DNA from *Saccharomyces exiguus*: Implications for Evolution of Yeast mtDNAs". *J. Mol. Evol.* 19: 333-341.
- *. Clark-Walker, G.D., y Sriprakash, K.S. (1983). "Analysis of a Five Cluster and Unique Orientation of Large Genic Sequence in *Torulopsis glabrata* Mitochondrial DNA". *J. Mol. Evol.* 19:342- 345.
- * Clark-Walker, G.D. (1985). "Basis of diversity in mitochondrial DNAs". En: The Evolution of Genome Size. (Cavalier- Smith, T.). John Wiley and Sons Ltd. Cap. 10
- *. Clark-Walker, G.D., Hoeben, P., Plazinska, A., Smith, D.K., y Wimmer, E.H. (1987). "Application of Mitochondrial DNA Analysis to Yeast Systematics". En: The Expanding Realm of Yeast-like Fungi. de Hoog, G.S., Smith, M.T., y Weijman, A.C.M. Eds. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- *. Clark-Walker, G.D. (1989). "In vivo rearrangement of mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 8847-8851.
- *. Cosson, J. y Tzagoloff, A. (1979). "Sequence homologies of (Guanosine + Cytidine)-rich regions of mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* 254 No.1, 42-43.
- *. Coria, R., García, M y Brunner, A. (1989). "Mitochondrial cytochrome b genes with a six-nucleotide deletion or single-nucleotide substitutions confer resistance to antimycin A in *Kluyveromyces lactis*". *Mol. Microbiol.* 3 No.11, 1599-1604.
- *. Coria, R., Zalce, M.E., Mendoza, V., Alvarez, G., Tuena de Cobos, A. y Brunner, A. (1990). "Restriction site variation, length polymorphism and changes in gene order in the mitochondrial DNA of the yeast *Kluyveromyces lactis*". *Antonie van Leeuwenhoek*. 58: 227-234 .

- *. Darnell, J., Lodish, H. y Baltimore D. (1990). "Organelle biogenesis: the nucleus, chloroplast, and mitochondrion". En: Molecular Cell Biology. Scientific American Books. U.S.A. cap 18.
- *. Decoster, E., Somon, M., Hatat, D. y Faye, G. (1990). "The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria". Mol. Gen. Genet. 224: 111-118.
- *. Dieckman, C.L. y Gandy, B. (1987). "Preferential recombination between GC clusters in yeast mitochondrial DNA". EMBO J. 6: 4197-4203.
- *. Dillon, J.A.R., Bezanson, G.S., y Yeung K-H. (1985). "Basic Techniques". En: Recombinant DNA Methodology. Dillon, J.A.R., Nasim, A., y Nestman, E.R. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A.
- *. Douglas, M. y Takeda, M. (1985). "Nuclear genes encoding mitochondrial proteins in yeast". TIBS. Mayo, 192-194.
- *. Dujon, B. (1981). "Mitochondrial Genetics and Functions". En: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Life cycle and inheritance. Strathern, J.N., Jones, E.W., y Broach, J.R. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A.
- *. Dujon, B. (1983). "Mitochondrial Genes, Mutants and Maps: A Review". En: Mitochondria 1983. Nucleo-Mitochondrial Interactions. Schweyen, R.J., Wolf, K., y Kaudewitz, F. Eds. Walter de Gruyter & Co. Federal Republic of Germany.
- *. Esposito, R.E., y Klapholz S. (1981). "Meiosis and Ascospore Development". En: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Life cycle and inheritance. Strathern, J.N., Jones, E.W., y Broach, J.R. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A.
- *. Evans, I.H. (1983). "Molecular Genetic Aspects of Yeast Mitochondria". En: Yeast Genetics. Fundamental and Applied Aspects. Spencer, J.F.T., Spencer, D.M., y Smith, A.R.W. Eds. Springer-Verlag. Nueva York.
- *. Fangman, W.L., y Zakian, V.A. (1981). "Genome Structure and Replication". En: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Life cycle and inheritance. Strathern, J.N., Jones, E.W., y Broach, J.R. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A.
- *. Faugeron-Fonty, G. y Goyon, C. (1985). "Polimorphic variations in the ori sequences from the mitochondrial genomes of different wild-type yeast strains". Curr. Genet. 10: 269-282.
- *. Fitch, W.M., Smith, T.F. y Ralph, W. W. (1983). "Mapping the order of DNA restriction fragments". Gene. 22: 19-29.
- *. Freifelder, D. 1985. Essentials of Molecular Biology. Jones and Bartlett Publishers, Inc. U.S.A. pp 329.

- *. Fuson, G.B., Presley, H.L. y Phaff, H. (1987). "Deoxyribonucleic acid base sequence relatedness among members of the yeast genus *Kluyveromyces*". Int. J. Syst. Bact. 37 No. 4, 371-379.
- *. González-Halphen, D. (1990). "El complejo bc1 de la cadena respiratoria mitocondrial". Ciencia. 41: 133-152.
- *. Grivell, L.A. (1989). "Nucleo-mitocondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis". Can. J. Biochem. 182: 477-493.
- *. Grivell, L.A. (1983). "Mitochondrial DNA". Scientific American. 248: 60-73.
- *. Guat, B.O., Nagley, P. (1985). "The oli gene and flanking sequences in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: The complete nucleotide sequence of a 1.35 kilobase petite mitochondrial DNA genome covering the oli I gene". Curr. Genet. 10: 713-
- *. Hardy, C.M., y Clark-Walker, G.D. (1990). "Nucleotide Sequence of the Cytochrome Oxidase Subunit 2 and val-tRNA genes and Surrounding Sequences from *Kluyveromyces lactis* K8 Mitochondrial DNA". Yeast. 6: 403-410.
- *. Hardy, C.M., Galeotti, C.L., y Clark-Walker, G.D. (1989). "Deletions and rearrangements in *Kluyveromyces lactis* mitochondrial DNA". Curr. Genet. 15: 419-427.
- *. Hasegawa, M., y Horai, S. (1991). "Time of the Deepest Root for Polymorphism in Human Mitochondrial DNA". J. Mol. Evol. 32: 37-42.
- *. Hawkins, J.D. (1991). "Mitochondrial and chloroplast genomes" En: Gene structure and expression cap 12. 2nd ed. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 216pp.
- *. Hay, R., Böhm, P., y Gasser, S. (1984). "How Mitochondrial Import Proteins". Biochim. Biophys. Acta 779: 65-87.
- *. Hiesel, R., Wissinger, B., y Brennicke, A. (1990). "Cytochrome oxidase subunit II mRNAs in *Oenothera* mitochondria are edited at 24 sites". Curr. Genet. 18: 371-375.
- *. Hoeben, P., y Clark-Walker, G.D. (1986). "An approach to yeast classification by mapping mitochondrial DNA from *Dekkera/Brettanomyces* and *Einiella* genera. Curr. Genet. 10: 371-379 pp.
- *. Howley, P.M., Israel, M.A., Law, M-F., y Martin, M.A. (1979). "A Rapid Method for Detecting and Mapping Homology between Heterologous DNAs". J. Biol. Chem. 254 No. 11, 4876-4883.
- *. Hudspeth, M.E.S., Sumrad, D.S., Tatti, K.M., Grossman, L.T. (1980). "Rapid purification of yeast mitochondrial DNA in high yield". Bioch. Biophys. Acta. 60: 221-228.

*. Izuchi, S., Terachi, T., Sakamoto, M., Mikami, T., y Sugita, M. (1990). "Structure and expression of tomato mitochondrial genes coding for tRNA^{Cis} (GCA), tRNA^{asn} (GUU) and tRNA^{tyr} (GUA): A native tRNA^{Cys} gene is present in dicot plants but absent in monocot plants". *Curr. Genet.* **18**: 239-243.

*. Jacobs, H.T. (1991). "Structural Similarities between a Mitochondrial Encoded Polypeptide and a Family of Prokaryotic Toxins Involved in Plasmid Maintenance Suggest a Novel Mechanism for the Evolutionary maintenance of Mitochondrial DNA". *J. Mol. Evol.* **32**: 333-339.

*. Jahnke, K.D. (1937). "Assessing Natural Relationships by DNA Analysis-Techniques and Applications". En: The Expanding Realm of Yeast-like Fungi. de Hoog, G.S., Smith, M.T., y Weijman, A.C.M. Eds. Elsevier Science Publishers. Amsterdam

*. Jayarama-Ehat, G., Koslowsky, D.J., Feagin, J.E., Smiley, B.L., y Stuart, K. (1990). "An extensively Edited Mitochondrial Transcript in Kinetoplastids Encodes a Protein Homologous to ATPase Subunit 6". *Cell.* **61**: 885-894.

*. Johannsen, E. y Van der Walt (1979). "Interfertility as basis for delimitation of *Kluyveromyces marxianus*". *Arch. Microbiol.* **118**: 45-48.

*. Johannsen, E. (1980). "Hibridization studies within the genus *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt". *Antonie van Leeuwenhoek.* **46**: 177-189.

*. Jones, E.P., Mahendram, R., Spottswood, M.R., Yang, Y.C., y Miller, D. (1990). "Mitochondrial DNA of *Physarum polycephalum*: Physical mapping, cloning and transcription mapping". *Curr. Genet.* **17**: 331-337.

*. Keilin, D. (1925). "On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants". *Proc. Roy. Soc. B. London.* **98**: 312-324.

*. Kreger-van Rij, N.J.W. (1984). "General classification of the yeast". En: The yeast a taxonomic study. Kreger-van Rij, N.J.W. eds. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands.

*. Kreger-van Rij, N.J.W. (1987). "Classification of Yeast". En: The Yeast. Biology of Yeast. 2nd. Ed. Vol. 1. Rose, A.H., y Harrison, J.S. Eds. Academic Press. Gran Bretaña.

*. Kunze, G., Bode, R., Birnbaum, D. (1986). "Physical mapping and genome organization of mitochondrial DNA from *Candida maltosa*". *Curr. Genet.* **10**: 527-530.

*. Kurtzman, C.P., Phaff, H.J., y Meyer, S.A. (1980). "Nucleic Acid Related Among Yeast". En: Yeast Genetics. Fundamental and Applied Aspects. Spencer, J.F.T., Spencer, D.M., y Smith, A.R.W. Eds. Springer-Verlag. Nueva York, Nueva York.

- * Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. (1991). "Phylogenetic Relationships Among Species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Swanniomycetes* Determined from Partial Ribosomal RNA Sequences". *Yeast*. **7**: 61-72.
- * Lachance, M.A. (1985). "Current views on the yeast species". *Microbiological Sciences*. **2** No. 4, 122-126.
- * Lachance, M.A. (1989). "Restriction mapping of rDNA and the taxonomy of *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt". En: Seventh International Symposium on Yeast. John Wiley & Sons. pp. S379-S383.
- * Lang, B.F. y Wolf, K. (1984). "The mitochondrial genome of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*". *Mol. Gen. Genet.* **196**, 465-472
- * Lewin, B. 1987. Genes III. John Wiley & Sons. Singapore. 761 pp.
- * Luzikov, V.N. 1985. Mitochondrial Biogenesis and Breakdown. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: pp
- * Macino, G., Tzagoloff, A. (1979). "Assembly of the Mitochondrial Membrane System: The DNA Sequence of a Mitochondrial ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* **254**: 6617-6623.
- * Macino, G., y Tzagoloff, A. (1980). "Assembly of the Mitochondria Membrane System: Sequence Analysis of a Yeast Mitochondrial ATPase Gene Containing the oli-2 and oli-4 Loci" *Cell*. **20**: 507-517.
- * Maniatis, T., Fritsch, E.F., y Sanbrook, J. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. New York. pp 545.
- * Morimoto, R., y Rabinowitz, M. (1979). "Physical Mapping of the Yeast Mitochondrial Genome". *Molec. gen. Genet.* **170**: 25- 48.
- * Morimoto, R., Lewin, A., y Rabinowitz, M. (1979). "Physical Mapping and Characterization of the Mitochondrial DNA and RNA Sequences from mit' mutants Defective in Cytochrome Oxidase Peptide 1 (OXI 3)". *Molec. gen. Genet.* **170**: 1-9.
- * Morimoto, R., Rabinowitz, M. (1979). "Physical Mapping of the Xba I, Hinc II, Bgl II, Xho I, Sst I, and Pvu II Restriction Endonuclease Cleavage Fragments of Mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*". *Molec. gen. Genet.* **170**: 11-23.
- * Mueller, D.M., y Getz G. S. (1986). "Transcriptional Regulation of the Mitochondrial genome of Yeast *Saccharomyces cerevisiae*" *J. Biol. Chem.* **261** No.25, 11756-11764.
- * Munz, P., Wolf, K., Kohli, J., y Leupold, U. (1989). "Genetics Overview". En: A.Nasim, P. Young y B. F. Johnson (eds.) Molecular Biology of the Fission Yeast. Academic Press, Inc. U.S.A. 469pp.

- *. Murray, J.C., Demopoulos, C.M., Lawn, R.M., y Motulsky, A.G. (1983). "Molecular genetics of human serum albumin: Restriction enzyme fragment length polymorphism and anaalbuminemia". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**: 5951-5955.
- *. Payne, M.J., Schwelzer, E., y Lukins H.B. (1991). "Properties of two nuclear pet mutants affecting expression of the mitochondrial *oli1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*". *Curr. Genet.* **19**: 343-351.
- *. Pfanner, N., Söllner, T. y Neupert, W. (1991). "Mitochondrial import for precursor proteins". *TIBS*. **16**: 63-
- *. Picard-Pasquier, N., Picard, B., Heeralal, S., Krishnamoorthy, R. y Gouillet, P. (1990). "Correlation between ribosomal DNA and electrophoretic enzyme polymorphism in *Yersinia*". *J. Gen. Microb.* **136**: 1655-1666.
- *. Popot, J.L., de Vitry C. (1990). "On the microassembly of integral membrane proteins". *Annu. rev. Biophys. Biophys. Chem* **19**: 369-403.
- *. Prebble, J.N. 1981. Mitochondria, chloroplasts and bacterial membranes. Longman, Londres. 378 pp.
- *. Ragnini, A., y Fukuhara, H. (1988). "Mitochondrial DNA of the yeast *Kluyveromyces*: guanine-cytosine rich sequence clusters". *Nucleic Acids Research*. **16**, No.17, 8433-8442.
- *. Reilly, J.G., y Thomas, C.A. Jr. (1980). "Length Polymorphisms, Restriction Site Variation, and Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*". *Plasmid*. **3**: 109-115.
- *. Riley, L.K., Marshall, M.E., y Coleman, M.S. (1986). "A Method for Biotinylating Oligonucleotide Probes for Use in Molecular Hybridizations". *DNA*. **5**, No.4, 333-337.
- *. Roman, H. (1981). "Development of Yeast as an Experimental Organism". En: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Life cycle and inheritance. Strathern, J.N., Jones, E.W. y Breach, J.R. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A.
- *. Rose, H.A. y Harrison, J.S. (1987). "Introduction". En: *The Yeast. Biology of Yeast*. Cap 1. Eds. Rose, A.H. y Harrison, J.S. Academic Press.
- *. Sager, R. 1972. Cytoplasmic genes and organelles. Academic Press. Nueva York.
- *. Sazer, S., y Sherwood, S.W. (1990). "Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast". *J. Cell Sci.* **97**: 509-516.
- *. Scherer, P.E., Krieg, U.C., Hwang, S.T., Vestweber, D., y Schatz, G. (1990). "A precursor protein partly translocated into yeast mitochondria is bound to a 70 kd mitochondrial stress protein". *EMBO. J.* **9**, No. 13, 4315-4322.

- * Schmidt, B., Henning, B., Köhler, H., y Neupert, W. (1983). "Transport of the Precursor to *Neurospora* ATPase Subunit 9 into Yeast Mitochondria". *J. Biol. Chem.* **258**, No.8, 4687-4689.
- * Schmidt, B., Henning, B., Zimmermann, R., y Neupert, W. (1983). "Biosynthetic pathway of mitochondrial ATPase subunit 9 in *Neurospora crassa*". *J. Cell Biol.* **96**:248-255.
- * Sena, E.P., Revet, B., y Moustacchi, E. (1986). "In vivo homologous recombination intermediates of yeast mitochondrial DNA analyzed by electron microscopy". *Mol. Gen. Genet.* **202**: 421-428.
- * Sidenberg, D.G. y Lachance, M-A. (1986). "Electrophoretic isoenzyme variation in *Kluyveromyces* populations and revision of *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) van der Walt". *Int. J. Syst. Bact.* **36** No. 1, 94-102 .
- * Sidenberg, D.G. y Lachance, M.A. (1987). "Analysis of a hybrid between *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces thermotolerans* by physiological profile comparison, isoenzyme electrophoresis, DNA reassociation, and restriction mapping of ribosomal DNA". *Can. J. Microbiol.* **33**: 971-978.
- * Sipiczki, M. (1989). "Taxonomy and Phylogenesis". En: Molecular Biology of the Fission Yeast. cap 12. Academic Press, Inc. U.S.A. 469pp.
- * Southern, E. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J. Mol. Biol.* **98**: 503-
- * Sor, F., y Fukuhara, H. (1989). "Analysis of Chromosomal DNA Patterns of the Genus *Kluyveromyces*". *Yeast*. **5**: 1-10.
- * Steensma, H.Y., de Jongh, F.C.M., y Linnekamp, M. (1986). "The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeast: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*". *Curr. Genet.* **14**: 311-317.
- * Stevens, B. (1981). "Mitochondrial Structure". En: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Life cycle and inheritance. Strathern, J.N., Jones, E.W., y Broach, J.R. Cold Spring Harbor Laboratory. U.S.A.
- * Takano, H., Kawano, S., Suyama, Y., y Kuroiwa, T. (1990). "Restriction map of the mitochondrial DNA of the true slime mold, *Physarum polycephalum*: linear form and long tandem duplication". *Curr. Genet.* **19**: 125-131.
- * Takeda, M., Chen, W-J., Saltzgeber, J., y Douglas, M.G. (1986). "Nuclear Genes Encoding the Yeast Mitochondrial ATPase Complex". *J. Biol. Chem.* **261**, No.32, 15126-15133.

*. Tian, G-L., Macadre, C., Kruszevska, A., Szczesniak, B., Ragnini, A., Grisanti, P., Rinaldi, T., Pallechi, C., Frontali, L., Slonimski, P.P., y Lazowska, J. (1991). "Incipient Mitochondrial Evolution in Yeast. I. The Physical Map and Gene Order of *Saccharomyces douglasi* Mitochondrial DNA Discloses a Translocation of a Segment of 15,000 Base-pairs and the Presence of New Introns in Comparison with *Saccharomyces cerevisiae*". J. Mol. Biol. **218**: 735-746.

*. Tian, G-L., Michel, F., Macadre, C., Slonimski, P.P., y Lazowska, J. (1991). "Incipient Mitochondrial Evolution in Yeast. II. The Complete Sequence of the Gene Coding for Cytochrome b in *Saccharomyces douglasi* Reveals the Presence of Both and Conserved Introns and Discloses Major Differences in the Fixation of Mutations in Evolution". J. Mol. Biol. **218**: 747-760.

*. Tzagoloff, A., Macino, G., Sebald, W. (1979). "Mitochondrial Genes and Translation Products". Ann. Rev. Biochem. **48**: 419-441.

*. Tzagoloff, A. 1982. Mitochondria. Plenum Press. Nuova York. 342pp.

*. Tzagoloff, A., y Myers A.M. (1983). "Genetics of Mitochondrial Biogenesis". Ann. Rev. Biochem. **55**: 249-235.

*. Van der Walt, J.P., y Johannsen, E. (1984). "*Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt". En: The yeast a taxonomic study. Kregar-van Rij, N.J.W. eds. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands.

*. Van der Walt, J.P. (1987). "The Yeast- A Conspectus". En: The Expanding Realm of Yeast-like fungi. de Hoog, G.S., Smith, M.T., y Weijman, A.C.M. Eds. Eisevier Science Publishers B.V. The Netherlands.

*. Vaughan Martini, A., y Martini, A. (1987). "Taxonomic Revision of the Yeast Genus *Kluyveromyces* by Nuclear Deoxiribonucleic Acid Reassociation". Int. J. Syst. Bacteriol. **37**: 380-385.

*Vaughan Martini, A., Sidenberg, D.G. y Lachance, M.C. (1987). "Analysis of a hybrid between *Kluyveromyces marxianus* and *Kluyveromyces thermotolerans* by physiological profile comparasion, Isoenzyme electrophoresis, DNA reassociation, and restriction mapping of ribosomal DNA". Can. J. Microbiol. **33**: 971-978.

*. Vaughan Martini, A. (1991). "Evaluation of Phylogenetic Relationships among Fission Yeast by nDNA/nDNA Reassociation and Conventional Taxonomic Criteria". Yeast. **7**: 73-78.

*. Wallace, D.C. (1982). "Structure and Evolution of Organelle Genomes". Microbiol. Rev. **46**, No.2, 203-240.

*. Wésolowski, M., Algeri, A., y Fukuhara, H. (1981). "Gene Organization of the Mitochondrial DNA of Yeast: *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces lipolytica*". *Curr. Genet.* **3**: 157-162.

*. Whittaker, P.A., y Danks, P.A. 1982. Mitocondria: Estructura, Función y Formación. C.E.C.S.A. México.

*. Wilkie, D. (1983). "Genetic and Functional Aspects of Yeast Mitochondria". En: Yeast Genetic. Fundamental and Applied Aspects. Spencer, J.F.T., Spencer, D.M., y Smith, A.R.W. Eds. Springer-Verlag. Nueva York.

*. Zimmer, M., Welsch, F., Oraler, G., y Wolf, K. (1987). "Distribution of mitochondrial introns in the species *Schizosaccharomyces pombe* and the origin of the group II intron in the gene encoding apocitochrome b". *Curr. Genet.* **12**:329-336.