

00381

lej. 5

OBTENCION, CARACTERIZACION GENETICA Y ESTUDIO DEL
PATRON DE COMPLEMENTACION GENICA DE LOS MUTANTES
AUXOTROFICOS PARA TRIPTOFANO DE Schizophyllum
commune.

Tesis presentada por el M en C Alfredo Mauro
Muñoz Rivas a la Facultad de Ciencias como
requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias (Biología).

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

00381
1983

Mayo de 1983

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.

Contenido

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Capítulo I: Introducción	1
Antecedentes de este estudio	11
Glosario	14
Capítulo II: Materiales y Métodos	16
Cepas utilizadas	16
Medios de cultivo	16
Mutagénesis	18
Recombinación	20
a) distancia <u>trip⁻</u> — <u>dom-2</u>	20
b) distancia <u>trip⁻</u> — <u>trip⁻</u>	22
Complementación de las mutaciones <u>trip⁻</u> en el dicarion	23
Germinación de las basidiosporas en diferentes condiciones fisiológicas	24
Cálculos estadísticos	24
Capítulo III: Resultados	25
Mutagénesis	25
Recombinación y mapeo de genes <u>trip⁻</u>	33
Patrón de complementación de las mutantes <u>trip⁻</u> en el dicarion	48
Capítulo IV: Discusión	54
Capítulo V: Literatura Citada	65

Capítulo I: Introducción

Schizophyllum commune es un hongo de la Clase de los Basidiomycetes, heterotálico tetrapolar, cuyo ciclo de vida se resume en la figura 1.

La mayor parte de los estudios en este hongo corresponden a la regulación genética de los procesos de desarrollo y diferenciación celular en el ciclo sexual, habiéndose entendido ampliamente cada uno de los eventos regidos por el factor A y por el factor B (Raper, 1966; Niederpruem y Wessels, 1969; Raper y Hoffman, 1974) (ver figura 2).

Sin embargo hay una gran carencia de conocimiento genético y fisiológico de otros procesos metabólicos celulares importantes susceptibles de ser estudiados, que se dan en los hongos superiores, especialmente en los Basidiomycetes, como son el metabolismo del ADN y su reparación, el estudio de vías metabólicas secundarias, que son las principales productoras de antibióticos, toxinas, pigmentos, hormonas, etc.; y el metabolismo primario con su vasta gama de tópicos de estudio, como en otros organismos eucariontes.

Debido a la facilidad de trabajo en el laboratorio con S. commune que es un eucarionte inferior, pero asimismo capaz de aportar información valiosa extrapolable a la biología de los organismos superiores, resulta ser una herramienta útil para conocer procesos de regulación genética y fisiológica fina. En el presente trabajo, que se refiere a la "Obtención, caracterización genética y estudio del patrón de complementación génica de los mutantes auxotróficos para triptofano de Schizophyllum commune", se usaron como agentes mutagénicos la

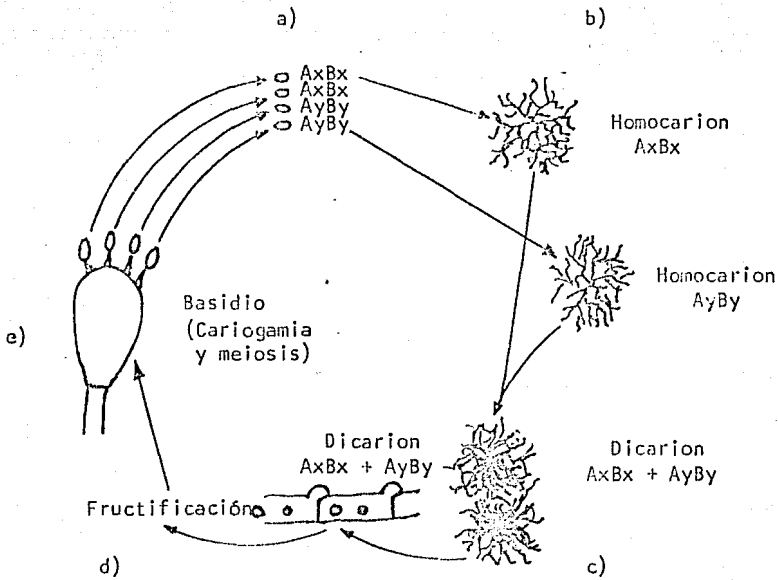


Figura 1.

El ciclo de vida de *Schizophyllum commune* se resume en los siguientes pasos (Raper, 1966): a) basidiospora homocariótica binucleada haploide \longrightarrow b) micelio homocariótico haploide \longrightarrow c) formación del dicarión por fusión de dos micelios homocarióticos compatibles \longrightarrow d) formación del basidio carpo (fructificación) \longrightarrow e) formación del basidio (célula especializada para la cariogamia y la meiosis).

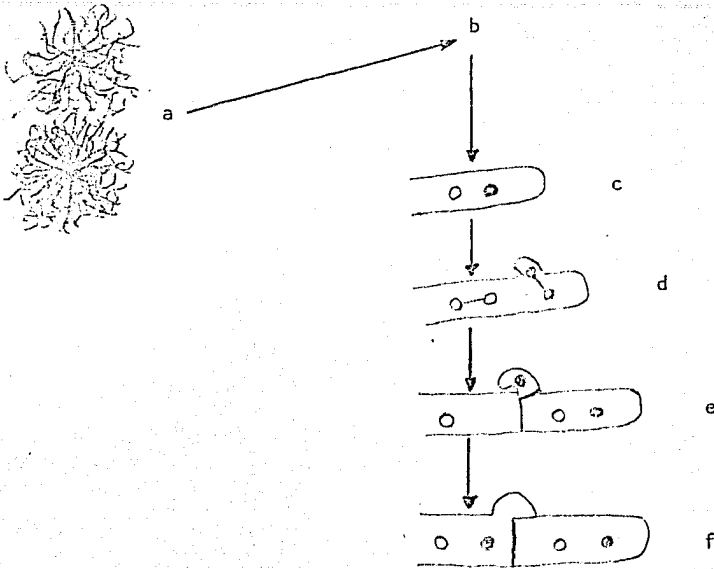


Figura 2.

La diferenciación durante la reproducción sexual de *S. commune* está regulada por los factores de compatibilidad A y B (Raper y Hoffman, 1974):

- a) la fusión hifal (plasmogamia) está regulada por ambos factores A y B
- b) la migración nuclear está regulada por el factor B
- c) la formación de pares de núcleos,
- d) la división conjugada y
- e) la formación de la fibula, están reguladas por el factor A
- f) la fusión de la fibula está regida por A y B.

luz ultravioleta y la caféina.

La luz ultravioleta (UV) es un agente mutagénico que induce principalmente la formación de dímeros de pirimidina (timina-timina, timina-citosina y citosina-citosina), que dan como resultado mutaciones puntuales, cuando la reparación de la lesión (dímero) no se lleva a cabo adecuadamente (Witkin, 1976).

Se conoce que la replicación del ADN puede ser alterada o suspendida en cualquier punto intrarreplicón de la doble hélice en donde se encuentre por lo menos un dímero, pues se ve afectada la acción enzimática replicativa y consiguientemente la formación de las horquetas de replicación (replicones) produciendo letalidad a la célula (Hanawalt et al., 1979). Por este motivo, las células tanto eucariontes como procariontes poseen sistemas de reparación de su ADN que detectan los daños causados por diferentes mutágenos físicos y químicos (no solamente repara dímeros, sino también otros tipos diversos de daños causados al ADN (Lindahl, 1982)), o sea, en donde se forme un heterodúplice con nucleótidos no complementarios mal apareados (Eckardt et al., 1980). Sin embargo, los procesos de reparación pueden reconstituir exactamente las bases modificadas por la luz UV o producir una alta incidencia de errores en la polimerización del segmento de ADN en la región en donde se encontraba el dímero, produciendo de esta manera la mutación. Así, los mecanismos de reparación, que fueron primeramente estudiados en Escherichia coli, en donde se les conoce profundamente, y en menor grado en eucariontes como los hongos, Drosophila, Vicia y células de mamíferos, se encuentran todavía en proceso de análisis (Hanawalt, 1975).

Para las bacterias se reconocen tres mecanismos de reparación principales (Witkin, 1966; 1969; 1976; Howard-Flanders, 1968; 1973; Hanawalt, 1975; Hanawalt et al., 1979):

Fotorreparación. Es un evento de detección enzimática de la doble ligadura del ciclo-butano formado por las pirimidinas vecinas en estado de "cis" en la doble cadena del ADN (dúplice), cuya acción se lleva a cabo cortando esta doble ligadura para restablecer exactamente las dos pirimidinas vecinas, tal como se encontraban antes de la acción de la luz UV. En este caso es necesaria la presencia de la luz azul para que el proceso de incisión se lleve a cabo mediante la formación de un fotoproducto enzima-dímero. En este mecanismo no hay inducción de errores en el ADN y su reparación se puede considerar como "libre de errores", y no conduce a mutaciones, generalmente.

Reparación oscura por escisión de dímeros. En este caso, la reparación se lleva a cabo sin necesidad de la luz azul; existe un mecanismo enzimático capaz de detectar los dímeros, dando como resultado el reconocimiento de la lesión, el corte de la región del filamento sencillo de ADN donde se encuentra el dímero (se corta el dímero con algunas otras bases vecinas, que alcanzan hasta cerca de 100 nucleótidos), restitución con las polimerasas de la secuencia original del segmento, usando como molde el filamento sencillo complementario del dúplice, y finalmente la unión e integración del oligonucleótido al ADN; en donde se reconocen nucleasas, polimerasas y ligasas que llevan a cabo el proceso completo (Rothman et al., 1975; Lindahl, 1982). Este mecanismo suple preferentemente al anterior en condiciones de oscuridad, y es casi igualmente efectivo en la reparación

de lesiones causadas por la luz UV y también se conoce su eficacia reparadora de daños al ADN, como "libre de errores", pues la incidencia de mutaciones es muy baja.

Reparación oscura durante la postreplicación. Esta reparación es tal vez la más importante en la inducción de mutaciones; parece ser que este sistema repara a los dímeros (diaductos), que se encontraban en sitios intrarreplicón, que no fueron detectados mediante la reparación por escisión, de la manera siguiente: la reparación de la lesión que no pudo sintetizar durante la acción del sistema de replicación y que ha dejado el segmento hijo del filamento sencillo del ADN con una eliminación de bases en el sitio correspondiente a las bases complementarias del dímero, es reparada usando como molde el ADN complementario previamente recombinado para sintetizar las bases eliminadas durante la replicación.

En este caso hay una inducción de mutaciones muy alta (comparativamente con los otros dos sistemas de reparación), pues las bases unidas a la cadena de ADN en la región de la eliminación de bases tienen susceptibilidad de equivocación al ser insertadas por una polimerasa de baja especificidad y, por consiguiente, la información del gene fácilmente queda alterada. Este mecanismo de reparación postreplicación puede llevarse a cabo con o sin recombinación de los filamentos del ADN después de su replicación, y se le denomina comúnmente "mecanismo inductor de errores".

En este proceso postreplicativo se encuentra también el sistema de reparación inducible "SOS", que se caracteriza por ser una variante muy especial de la reparación postreplicación, que es dependiente de la sín-

tesis de proteínas, detiene el ciclo celular, induce la lisogenia y mutagénesis de los fagos de E. coli y tiene una duración aproximada de dos horas, que es el tiempo en el que las enzimas reparadoras inducidas actúan, quedando la bacteria protegida contra daños en su ADN durante ese intervalo de tiempo, obteniéndose así baja letalidad e inducción de mutaciones en tratamientos subsecuentes, si las enzimas aún no han sido reprimidas.

Por otro lado, el caso de los hongos parece tener variantes en los mecanismos de escisión y postreplicación, aparentemente haciéndolos mucho más complejos, y de los cuales se sabe menos que de los mecanismos de reparación bacteriana; la fotorreparación es igualmente efectiva y también se considera como mecanismo "sin errores" durante la reparación del ADN, actuando de manera similar al sistema bacteriano.

Por otro lado, en los mecanismos de reparación oscura (escisión y postreplicación), no parece haber gran similitud con la reparación oscura bacteriana, distinguiéndose preferentemente dos tipos generales de sistemas: el sistema de reparación "sin errores" (que podría ser tal vez el de escisión, solamente) y el sistema de reparación "inductor de errores" (que asimismo podría coincidir tal vez con el de postreplicación). En la actualidad se prefiere esta nomenclatura de mecanismo "sin errores" y mecanismo "inductor de errores", en los sistemas de reparación de hongos, principalmente Neurospora y Saccharomyces, pues parece haber un mayor número de vías de reparación, o tal vez hay vías más complejas que las hasta ahora encontradas en las bacterias. Así, la reparación oscura por escisión en los hongos, plantas y animales superiores, generalmente no es sensible a la inhibición

por la cafeína, contrario a lo que sucede en las bacterias, en donde se ve inhibida la acción de la nucleasa durante la escisión del dímero de pirimidina (Roulland-Dussoix, 1967), y más bien este alcaloide es capaz de inhibir la reparación postreplicación en los eucariontes (Timson, 1977). Esta actividad de la cafeína en las células todavía no está bien entendida, pues además de inhibir la reparación del ADN, tiene otros efectos tóxicos metabólicos complejos, como la inhibición de la replicación celular, de la síntesis de las proteínas y de la fosfodiesterasa (esta última provocando un aumento en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc)), entre los efectos más conocidos. Y así la cafeína ha sido utilizada para obtener con buenos resultados sinergismo con la luz UV en la producción de mutaciones en bacterias y hongos (Timson, 1977).

Por otro lado es bien conocida la relación que pueden llegar a tener los procesos de reparación del ADN y los de recombinación génica, pues en ambos está implicado el metabolismo del ADN y varios de los mutantes en reparación o en recombinación obtenidos, presentan efectos pleiotrópicos en ambos procesos, interpretándose como puntos en común convergentes en el proceso general de metabolismo del ADN (Baker *et al.*, 1976). Aunque un análisis más detallado de los mutantes establece diferencias claras entre los procesos de reparación, recombinación y sus puntos en común.

Así, en la recombinación génica en los hongos, se pueden distinguir varios tipos: recombinación meiótica heterogénica, recombinación mitótica heterogénica, y recombinación intragénica (recombinación alélica, conversión génica o recombinación alélica no recíproca), tanto mitótica como

meiótica (Kushev, 1974; Catchside, 1977; Radding, 1978; Fincham et al., 1979). En los dos primeros casos, la recombinación es generalizada a lo largo de los cromosomas y es recíproca generalmente; en cambio en la recombinación intragénica (los dos tipos de recombinación restantes) es región-específica y presenta polaridad de conversión (polarón), dependiente del tipo de alelos que intervienen en la cruce; por consiguiente, esta clase de recombinación es alelo-específica.

En ambos grupos de mecanismos de recombinación parece haber estrecha homología estructural cromosómica, a diferencia de la recombinación del ADN de fagos y otras secuencias de ADN insertables en el ADN bacteriano, de manera heteróloga ya sea sitio-específica o sitio-inespecífica (Radding, 1978).

Es interesante hacer notar que la recombinación inducida por agentes externos como la luz UV, los rayos X, la hidroxilurea, entre otros, es distinta de los procesos naturales de recombinación, pues en estos casos es consecuencia del daño al ADN, provocando rupturas en la doble hélice, en donde se sospecha que dichas rupturas sean utilizadas para iniciar la recombinación en lugar de la reparación, debido al estado metabólico del ADN y de la célula en general; así, el mecanismo de recombinación mitótica es fuertemente aumentado por la luz UV, mientras que el de recombinación meiótica no se ve alterado de ninguna manera por la acción recombinógena de la luz UV.

Entre las recombinaciones meiótica y mitótica se han mostrado diferencias finas importantes; por ejemplo, que la meiótica es generalmente así-

métrica durante la formación del heterodúplice de ADN, y de alta frecuencia; mientras que la mitótica es generalmente simétrica y de baja frecuencia; o sea, mecanismos distintos con un mismo resultado general: la recombinación de las hebras del ADN.

En el caso de la conversión génica, el tipo más estudiado es el de la meiótica, y se ha llegado a definir elocuentemente a esta recombinación, como el sitio de iniciación de la recombinación genética, o el sitio de iniciación de la acción de las recombinasas, o región de formación del heterodúplice para el proceso de recombinación en general, siendo los organismos más estudiados Ascobolus y Saccharomyces, que en forma natural alcanzan un alto índice, hasta un 10 % de conversión génica en las ascosporas durante la meiosis.

Como consecuencia, los mecanismos de recombinación, ahora mejor entendidos, permiten afinar y comprender mejor la recombinación como un buen método de localización y mapeo de los genes en su sitio dentro del genoma.

Aunada a la recombinación, la complementación génica ha sido una herramienta magnífica para el estudio y caracterización de los genes (Fincham, 1966). La complementación génica tiene dos aspectos importantes:

a) Ayuda a la caracterización de genes mediante pruebas de alelismo en diploides, dicariones o heterocariones.

b) En el caso de la complementación alélica (intragénica) ayuda a interpretar la regulación génica de los polipéptidos o proteínas, producto de la información del gene en estudio, y en algunos casos hasta para interpretar la configuración cuaternaria si se hace uso de heteroalelos su-

ficientes, inclusive en sistemas poliploides (Gillie, 1966; 1968; Fincham, 1966; Inge-Vechtomov y Pavlenko, 1969; Catcheside, 1977).

En el caso de este trabajo, la recombinación meiótica y la complementación en el estado dicariótico, fueron fundamentales en la caracterización genética de las mutaciones de los genes que intervienen en la biosíntesis del triptofano, obtenidas con la luz UV y cafeína como parte inicial de un proyecto de regulación genética de metabolitos secundarios (antibióticos) originados muy posiblemente en la vía de síntesis del triptofano (Muñoz y Dubovoy, 1979), al igual que otros metabolitos fúngicos secundarios (psilocibina, ácido lisérgico, etc.) reconocidos en otros hongos superiores (Smith y Berry, 1974).

Antecedentes de este estudio.

La biosíntesis del triptofano está bien reconocida genética y bioquímicamente en E. coli y otras bacterias (Crawford, 1975; Platt, 1978; Crawford y Stauffer, 1980) y su información está codificada en un sistema de operón constituido por un número de siete genes en Bacillus y de cinco en E. coli.

En los hongos, se conoce que la biosíntesis del triptofano está dada por genes separados (cinco en levaduras y cuatro en Neurospora, Aspergillus y Basidiomycetes) aunque en algunos casos de la vía aromática general se encuentran grupos de genes cercanos semejan-do operones, por el tipo de regulación génica polar pero sin ARN mensajeros policistrónicos (Strauss, 1979; Alton et al., 1982) para la síntesis de enzimas formadas por ensamble de varios oligopéptidos codificados por genes estructurales.

Abreviaturas

AS; Antranilato sintetasa

CDRF; 1-(o-carboxifenilamino)-1-desoxirribulosa fosfato

FRA; N-fosforribosilantranilato

FRAI; Fosforribosilantranilato isomerasa

FRPF; 5-fosforribosil pirofosfato

FRT; Antranilato fosforribosiltransferasa

InGF; Indolglycerol fosfato

InGFS; Indolglycerol fosfato sintetasa

Gli-3-F; D-gliceraldehido 3 fosfato

PF; pirofosfato

TS; Triptofano sintetasa

TSA; Triptofano sintetasa A

TSB; Triptofano sintetasa B

Glosario

Auxótrofo: microorganismo mutante que solo puede crecer en medio mínimo si éste ha sido suplementado con factores de crecimiento que no son requeridos por las cepas silvestres.

cog (reconocimiento): gene de reconocimiento del producto de rec, que altera la recombinación.

Dicarion: micelio que consiste de células que contienen cada una dos núcleos, generalmente, de distinto factor de compatibilidad.

Dímero: estructura formada por dos subunidades.

dom (domo): mutación que confiere la morfología de crecimiento compacto de la colonia del hongo.

Genoma: todo el material genético haploide que lleva una célula.

his (histidina deficiente): mutación de auxotrofia para la biosíntesis de la histidina.

Homocarion: célula o micelio que contiene solamente un tipo de núcleo (genéticamente).

Loci: plural de locus.

nit (nitrato reductasa deficiente): mutación que afecta la función de la enzima nitrato reductasa.

Protótrofo: cepa de un microorganismo que no tiene requerimientos nutricionales adicionales a los de la cepa silvestre de la cual se originó.

Recombinación Heterogénica: se refiere a la recombinación llevada a cabo entre dos genes distintos.

rad (sensible a la radiación): mutación que confiere sensibilidad a la radiación.

rec (recombinación): gene que regula la recombinación.

ss (secuencia sináptica): genes que afectan la recombinación por una posible alteración estructural durante la sinapsis de los cromosomas.

Subloci: plural de sublocus.

Sublocus: subunidad de un gene aparentemente grande.

trp (triptofano deficiente): mutación de auxotrofia para la biosíntesis del triptofano.

uvs (sensible a la luz UV): mutación que confiere sensibilidad a la luz UV.

Capítulo II: Materiales y Métodos

Las cepas de Schizophyllum commune usadas en este estudio proceden originalmente del banco de cepas del laboratorio del Dr. John Raper en la Universidad de Harvard y fueron donadas por la Dra. Carlene Raper para trabajos a desarrollar en el grupo de investigación de la Dra. Celia Dubovoy en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Cepas utilizadas:

Homocariotes:

- a) 9-4 A \times 3 / B 5 B \times 2 / B 2 dom-2
b) 1-86 A \times 2 / B 23 B \times 4 / B 1 +

La cepa 9-4 fue usada para el desarrollo de experimentos de obtención de los mutantes trip⁻ dado su crecimiento compacto (proporcionado por la mutación dom-2, que mapea cercana al factor B (Chang y Wai, 1971)), que permitió obtener y analizar un mayor número de posibles mutantes por placa de agar. La cepa 1-86 fue utilizada para llevar a cabo el análisis de recombinación y obtención de recombinantes trip⁻ con factores de compatibilidad A y B apropiados.

Medios de cultivo:

Los medios de cultivo en donde se sembró Schizophyllum commune fueron los siguientes: Medio Completo (MC), que estuvo constituido por: 20 g de glucosa, 2 g de extracto de levadura, 2 g de peptona, 0.5 g de MgSO₄, amortiguador de fosfatos 0.01M (0.46 g KH₂PO₄ y

1 g de K_2HPO_4 , para proporcionar un pH de 7.0) y 20 g de agar en en 1,000 ml de H_2O destilada. En el caso del Medio Completo li- quido, no se adicionó el agar. El Medio Mínimo (MM), estuvo forma- do por: 20 g de glucosa, 2 g de asparagina, 0.5 g de $MgSO_4$, 120 ug de tiamina, y con la misma concentración de amortiguador de fosfa- tos y de agar por litro de H_2O destilada, que el medio anterior.

Cuando fue necesario, se agregaron a estos medios las siguien- tes sustancias:

Cafeína	droga	0.5 g/litro (0.5 mg/ml)*
Triptofano (trip)	suplemento	0.25 g/litro
Fenilalanina (fala)	suplemento	0.16 g/litro
Tirosina (tiro)	suplemento	0.18 g/litro
Acido Para-amino benzoico (pab)	suplemento	1.37 mg/litro

* Esta concentración de cafeína se estableció como óptima, de- bido a que concentraciones de 1mg/ml y superiores a éstas causaron letalidad del 100% en la cepa 9-4 dom-2.

Con el fin de obtener un cambio en el pH de 7.0 a 5.0 y de 7.0 a 8.0 sin introducir nuevos compuestos químicos en el medio de cultivo, se alteraron las concentraciones de los fosfatos para pro- vocar una disminución hasta $pH\ 5.0 \pm 0.1$ ó un aumento hasta 8.0 ± 0.1 , los medios quedaron con las siguientes concentraciones de fosfatos por litro:

	pH 5.0 ± 0.1	pH 8.0 ± 0.1
Medio Completo	14 g KH_2PO_4	4.35 g K_2HPO_4
Medio Mínimo	17.6 g KH_2PO_4 + 0.3 g K_2HPO_4	5.15 g K_2HPO_4

El pH fue ajustado antes de la esterilización en autoclave.

Mutagénesis:

La cepa 9-4 fue sembrada en matraces de 100 ml de MC líquido, manteniéndose en agitación constante por periodos de 4-6 días a temperatura constante de 30 C; de ahí fueron separados los micelios del medio líquido y lavados en agua destilada estéril, llevándose a maceración en licuadora (con motor comercial) durante 3.5 min en alta velocidad para obtener fragmentos hifales en una suspensión con agua destilada.

Se seleccionaron fragmentos hifales, que preferentemente fueran unicelulares (esto se logró dejando reposar la suspensión de fragmentos, aproximadamente durante una hora y tomando la fracción superior que los contenía), y se diluyeron hasta obtener una concentración de aproximadamente 5 U Klett de turbidez medida en un colorímetro Klett Summerson con filtro azul de 400 a 465 nm de rango espectral.

De la suspensión final de fragmentos, se tomaron alícuotas de 5 ml y se llevaron en caja de Petri de vidrio a irradiación con luz ultravioleta (luz UV), utilizando una lámpara de luz UV germicida con emisión de 2537 Å, a 30 cm de distancia, lo que daba una intensidad de 19 ergios/mm²/seg, calculada con un dosímetro Latarget. El material irradiado se mezcló con MM o MM + 0.5 mg/ml cafeína (MM + caf), según el caso, tibio con el fin de obtener una acción selectiva de las colonias que crecieran como sobrevivientes silves-

tres, eliminando la posibilidad de crecimiento de todos los fragmentos auxótrofos, empleando un promedio de 40 cajas de Petri por cada 500 ml de MM o MM + caf; dichas cajas se incubaron a 30 C por 3 días para el MM y 6 días para el MM + caf (pues la cafeína retarda la replicación celular (Timson, 1977)), y luego se procedió a cuantificar y marcar a cada una de las colonias visibles (protótrofos). Posteriormente se añadió sobre las mismas cajas de Petri una segunda capa de MM + trip tibio (40 C), y se llevaron a incubación de nuevo por un período de 3 días para hacer evidentes las nuevas colonias posibles mutantes auxótrofas para el triptofano. Estos posibles mutantes trip⁻ fueron seleccionados y analizados en MC, MM y MM + trip para confirmar su auxotrofia, sembrándose 50 micelios por caja de Petri. Este método de enriquecimiento en la selección de mutantes trip⁻ permitió ahorrar tiempo y medios de cultivo en forma considerable (ver tabla 1).

La dosis de luz UV para la obtención de estos mutantes se estableció en 2 000 ergios/mm², después de analizar las colonias sobrevivientes de varios tratamientos de dosis de 1,000; 2,000; 3,000; 4,000; 5,000 ergios/mm² y control, y encontrar que en 2,000 ergios/mm² (que corresponde al 22-30% de sobrevivencia en MM), se encontró el primer mutante trip⁻.

Por otro lado se llevó a cabo el mismo procedimiento mutagénico, pero en lugar de suplementar la segunda capa de MM únicamente con triptofano, se agregaron los suplementos de triptofano + fenilalanina + tirosina + ácido para-amino benzoico, con el fin de conocer

si por este método era más sencillo obtener los mutantes trip⁻, pues tales metabolitos proceden de un mismo precursor (ácido cofsmico).

Es importante hacer notar que la mutagénesis y el manejo del material fúngico irradiado, incluyendo la incubación, se llevaron a cabo bajo condiciones de ausencia de luz blanca para evitar el proceso fotorreparador.

Recombinación:

Los mutantes trip⁻ obtenidos por el método anterior fueron cruzados con la cepa 1-86 (que tiene fácil inducción de formación de basidiocarpos) y la progenie obtenida fue analizada para mapear la distancia entre el marcador dom-2 (que está ligado al factor de compatibilidad B (Chang y Wai, 1971; Raper y Hoffman, 1974)) y las distintas mutaciones trip⁻. Por otro lado, esta misma progenie fue utilizada para recuperar recombinantes trip⁻ con los factores de compatibilidad contrarios para poder mapear las distancias entre las distintas mutaciones trip⁻ encontradas y finalmente también emplear a estos recombinantes para establecer las pruebas de complementación.

Distancia trip⁻---dom-2.

La progenie de la cruz 1-86 + + X 9-4 dom-2 trip⁻ se analizó haciendo cultivos monospóricos de las basidiosporas (según una modificación del método de Raper, 1963), por análisis de esporas al azar (Burnett, 1975; Fincham et al., 1979). Este método consistió

en dejar esporular el basidiocarpo sobre una placa de agar de MM + trip, esparcir la esporada e incubar por 12 horas a 30 C para permitir la germinación. La cosecha de las esporas se llevó a cabo con un microcortador, bajo el microscopio estereoscópico, y cada una de las esporas fue tomada y sembrada por separado (9 por placa). Por último cada uno de los micelios resultantes fue analizado para sus marcadores genéticos de auxotrofia (trip⁻) y morfológico (dom-2) en MC, MM y MM + trip y calculada la distancia por medio de la frecuencia de recombinación, básicamente mediante la fórmula

$$\text{Distancia} = \frac{\text{E. R.}}{\text{E. T.}} \times 100 \quad (\text{distancia} = d = \mu)$$

donde E.R. = esporas recombinantes (dom-2 + ; + trip⁻)

E.T. = esporas totales (dom-2 + ; + trip⁻; dom-2 trip⁻; + +)

Dada la baja viabilidad de las esporas trip⁻, se procedió a calcular la distancia utilizando los recíprocos silvestres trip⁺ tanto recombinantes (dom-2 +) como tipo progenitor (+ +) y multiplicando ambos valores por un factor de 2 para deducir los valores de la progenie trip⁻, pues se conoce la reciprocidad de la recombinación meiótica heterogénica (Fincham et al., 1979), quedando así:

$$\text{Distancia} = \frac{(\text{Esporas Recombinantes dom-2 +}) (2)}{(\text{Esporas + +}) (2)} \times 100$$

(Distancia = d = μ).

Distancia trip --- trip.

Los recombinantes 1-86 trip⁻ fueron cruzados con 9-4 dom-2 trip⁻ y la esporada obtenida fue sometida a dos tipos de selección de esporas recombinantes:

1) Las basidiosporas se sembraron mediante el método anterior de cosecha de esporas para obtener micelios monospóricos; pero como la baja viabilidad de las esporas auxótrofas trip⁻ no permitía observar la cantidad de fenotipos recombinantes, ni de fenotipos progenitores, se tomó la recombinación por medio de la cuantificación de recombinantes protótrofos; quedando el cálculo de la distancia trip⁻ --- trip⁻ así:

$$\frac{E + + (2)}{T. E. C.} \times 100 = d = u$$

donde : E + + = esporas recombinantes protótrofas

T. E. C. = total de esporas cosechadas

2) El segundo método consistió en hacer una suspensión en agua destilada de las basidiosporas (de concentración conocida por cálculo en cámara de Neubauer) y por recuperación de protótrofos obtener el porcentaje de recombinación, quedando la fórmula así:

$$\frac{\text{Esporas } + + (2)}{\text{Total de esporas sembradas}} \times 100 = d = u$$

En todas las modalidades de esta fórmula, se trató de establecer la relación más estrecha entre la fórmula general y la fórmula modificada, debido a imposibilidad técnica de la selección de la

progenie trip⁻.

Los mutantes originales (9-4 dom-2 trip⁻) fueron cruzados con los recombinantes obtenidos en la progenie del análisis recombinatorio (1-86 trip⁻) y se procedió a establecer la fase dicariótica en MM + trip y posteriormente, una vez formado el dicarion estable, se sometió a la prueba de complementación en MM, sembrando un inóculo muy pequeño en placas de MM y en placas de MM + trip como control. La lectura de la complementación en MM fue hecha con base en el crecimiento de la colonia en MM + trip, pues se observó que en algunas ocasiones el Medio Completo influye negativamente en el crecimiento de los mutantes trip⁻.

La nomenclatura usada para reconocer la capacidad de complementación fue la siguiente:

- + = complementación (crecimiento del dicarion en MM similar al encontrado cuando se sembró en MM + trip).
- ± = complementación parcial (crecimiento mas o menos parecido al encontrado en el dicarion sembrado en MM + trip).
- = no complementación (nulo crecimiento del dicarion en MM, comparado con el crecimiento del dicarion en MM + trip)

El criterio de formación del dicarion estuvo basado en la morfología macroscópica del micelio y en la formación de las fibulas (Raper, 1966;

Raper y Hoffman, 1974); y éste se aplicó durante la selección de recombinantes trip⁻ con factores A y B provenientes de la cepa 1-86 que formaron un verdadero estado dicariótico con la cepa 9-4 original. Por otro lado, también los dicariones utilizados en las pruebas de complementación génica, fueron confirmados mediante estos dos criterios morfológicos importantes, antes de proceder a hacer las pruebas de complementación ya indicadas.

Germinación de las Basidiosporas en Diferentes Condiciones Fisiológicas.

Puesto que las basidiosporas trip⁻ presentaron un alto porcentaje de letalidad, se procedió a estudiar si la germinación de ellas estaba influida por acción de la luz, de la temperatura, del pH y de la composición del medio de cultivo, así que las basidiosporas provenientes de las cinco cruces trip⁻ X trip⁻ se usaron para hacer una suspensión de concentración conocida en agua destilada (calculada en una cámara de Neubauer) y alícuotas de esta suspensión fueron sembradas en placas de MM, MM + trip, MC + trip, con pHs de 5.0 ± 0.1 , 7.0 ± 0.1 y 8.0 ± 0.1 ; a temperaturas de 20, 30 y 37 C, tanto en presencia de luz como en oscuridad.

Cálculos estadísticos.

Las significancias de los valores de las pruebas de χ^2 y "t" empleadas en este trabajo, fueron comparadas con las tablas de Arkin y Colton (1967).

Capítulo III: Resultados

Mutagénesis:

La respuesta de la cepa 9-4 a la acción letal de la luz UV es mostrada en la figura 3, en donde se observa la forma típica de las curvas de dos impactos producidas por la luz UV, que podría representar tal vez a los dos mecanismos reparadores principales en la sobrevivencia y reparación: la reparación "libre de errores" y la "inductora de errores"; o simplemente más de un blanco de acción de la UV en la complejidad estructural del genoma. Asimismo se observa que las curvas de sobrevivencia en MC y MM son similares en su respuesta a la luz UV.

La dosis de 2,000 ergios/mm², que fue seleccionada por el criterio antes descrito (Materiales y Métodos), corresponde al rango de 22 - 30% de sobrevivencia en la curva de MM, que fue en el medio de cultivo en el que se obtuvieron los primeros mutantes trip.

En la tabla 1 se presenta la frecuencia de obtención de los mutantes en esta dosis de luz UV, con postratamiento de cafeína y sin él. Comparando los dos métodos de enriquecimiento (MM + trip y MM + trip + Øala + tiro + pab) sin cafeína, hay diferencias notorias en la frecuencia de obtención de mutantes a partir de los fragmentos totales sobrevivientes, pues los mutantes escurridizos y auxótrofos estrictos, tienen menor frecuencia de obtención en el tratamiento polisuplementado (1.8 veces menor). Asimismo es interesante notar que el mejor método aparente de obtención de mutantes trip a partir de la cepa 9-4 fue utilizando el método de radiación con luz UV sin posttratamiento

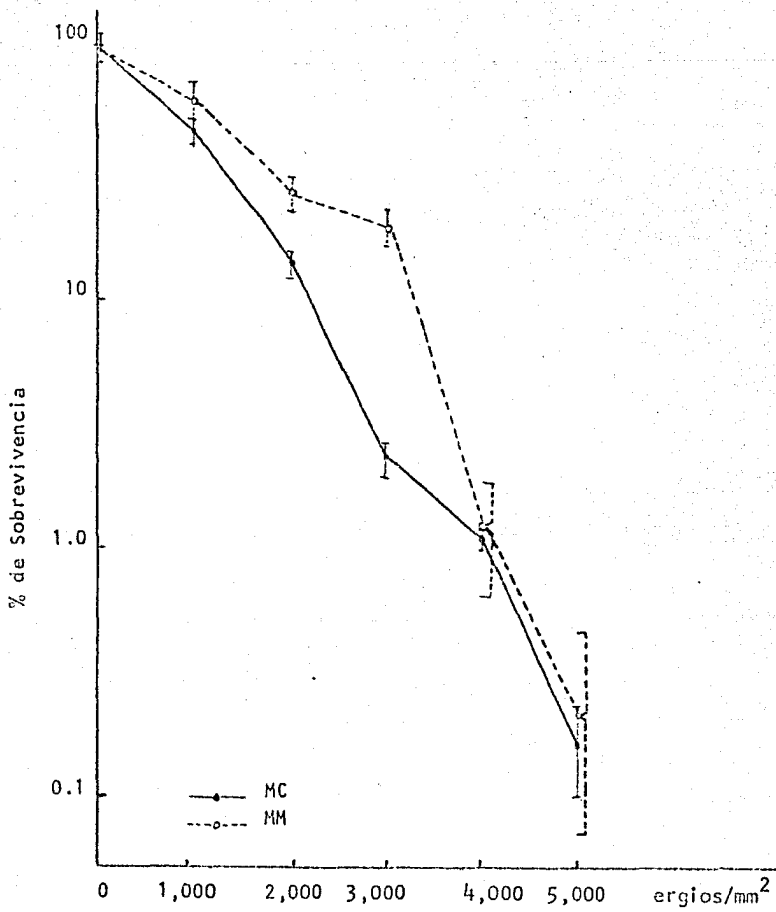


Figura 3.

Sobrevivencia de la cepa 9-4 dom-2 bajo la acción de la luz ultravioleta (UV), en Medio Completo (MC) y en Medio Mínimo (MM).

(cada punto es el valor promedio \pm 1 E. S.)

Tabla. 1. Frecuencia promedio de obtención de mutantes trip con luz UV (2000 ergios/mm²). Los fragmentos hifales unicelulares, fueron irradiados con luz UV y sembrados en MM a 30 C en oscuridad; posteriormente se agregó la segunda capa de agar enriquecido volviéndose a incubar a 30 C, para permitir el crecimiento de los posibles mutantes trip.

Agregando la 2^a capa de agar de MM + trip

Con 0.5mg/ml. de cafeína como postratamiento				Sin cafeína			
Frecuencia de mutantes encontrados entre los:				Frecuencia de mutantes encontrados entre los:			
Fragmentos totales sobrevivientes		Fragmentos enriquecidos		Fragmentos totales sobrevivientes		Fragmentos enriquecidos	
Escurridizos	Auxótrofos estrictos	Escurridizos	Auxótrofos estrictos	Escurridizos	Auxótrofos estrictos	Escurridizos	Auxótrofos estrictos
$\frac{1}{5,716.34}$	$\frac{1}{18,887.83}$	$\frac{1}{1,445.72}$	$\frac{1}{5,516}$	$\frac{1}{7,247.62}$	$\frac{1}{7,746.75}$	$\frac{1}{988}$	$\frac{1}{3,369.25}$

Agregando la 2^a capa de agar de MM + trip +
Ø ala + tiro + pab

Escurridizos	Auxótrofos estrictos	Escurridizos	Auxótrofos estrictos	Escurridizos	Auxótrofos estrictos	Escurridizos	Auxótrofos estrictos
$\frac{1}{8,042}$	$\frac{1}{16,084}$	$\frac{1}{3,418}$	$\frac{1}{3,418}$	$\frac{1}{12,847.5}$	$\frac{0}{25,695}$	$\frac{1}{840.5}$	$\frac{0}{1,681}$

con cafeína, mediante el enriquecimiento de la selección de mutantes con MM + trip , observándose un ligero "efecto antimutagénico" de la cafeína, que puede deberse a la inducción de letalidad por su toxicidad. Los mutantes obtenidos con y sin postratamiento de cafeína, se presentan en la tabla 2, en donde se encuentra la nomenclatura y características de cada uno de los mutantes obtenidos en este trabajo. La alta tasa de reversión e inestabilidad de las cepas obtenidas sin cafeína hace sospechar que se trata de mutantes con lesiones puntuales. Comparando la estabilidad (tabla 2) de las cepas mutantes con su frecuencia de obtención, se puede concluir que el mejor procedimiento real de obtención de mutantes trip fue el de postratamiento con cafeína y enriqueciendo con una segunda capa de agár selectivo con triptofano solamente. De estos mutantes se seleccionaron los mas estables para continuar con el estudio de la recombinación y complementación, y se desecharon los que tenían fuerte tendencia a la reversión (ver tabla 2).

Puesto que hay sospechas que la sobrevivencia y la mutagénesis pueden ser eventos distintos (Mc Millan y Fox, 1979), se analizó la influencia en la sobrevivencia durante la mutagénesis con luz UV $2,000 \text{ ergios/mm}^2$, cuando la cafeína era usada como postratamiento, así que las tablas 3 a y b presentan los valores de sobrevivencia y valores de "t" con postratamiento de 0.5 mg/ml cafeína en MM y MC, y en presencia de triptofano. Comparando los distintos postratamientos, se nota una mayor letalidad de aproximadamente 50%, cuando se

Tabla 2. Mutantes trip obtenidos a partir de la cepa 9-4 dom-2 con luz UV (2000 ergios/mm²) solamente y con luz UV (2000 ergios/mm²) + postratamiento con 0.5 mg/ml de cafeína

Cepa Mutante	Postratamiento s/c = sin cafeína c/c = con cafeína	Variación Fenotípica aux. estricto = auxótrofo estricto	Estabilidad de la mutación *	
1	25	s/c	escurridizo ----> silvestre	inestable
2	22	s/c	" ----> escurridizo	estable
3	31	s/c	" ----> silvestre	inestable
4	52b	s/c	" ----> "	inestable
5	53a	s/c	" ----> "	inestable
6	57	s/c	" ----> "	inestable
7	60	s/c	aux. estricto ----> "	inestable
8	62b	s/c	escurridizo ----> "	inestable
9	78b	s/c	" ----> "	inestable
10	81c	s/c	" ----> "	inestable
11	91	s/c	aux. estricto ----> "	inestable
12	107	s/c	escurridizo ----> "	inestable
13	111a	s/c	aux. estricto ----> "	inestable
14	122	s/c	" " ----> aux. estricto	estable
15	153	s/c	escurridizo ----> silvestre	inestable
16	154a	s/c	" ----> "	inestable
17	159	s/c	" ----> escurridizo?	estable?
18	161	s/c	" ----> silvestre	inestable
19	162b	s/c	" ----> "	inestable
20	164a	s/c	aux. estricto ----> aux. estricto	estable
21	166	s/c	escurridizo ----> silvestre	inestable
22	179c	s/c	" ----> "	inestable
23	181c	s/c	" ----> escurridizo	estable
24	183a	s/c	" ----> letal	inestable
25	226	s/c	" ----> silvestre	inestable
26	230	s/c	" ----> escurridizo	estable
27	232b	s/c	" ----> silvestre	inestable
28	232c	s/c	" ----> escurridizo	estable
29	233a	s/c	" ----> silvestre	inestable
30	233c	s/c	aux. estricto ----> "	inestable
31	1	c/c	escurridizo ----> "	inestable
32	2d	c/c	" ----> "	inestable
33	3a	c/c	" ----> "	inestable
34	3b	c/c	" ----> "	inestable
35	4a	c/c	" ----> "	inestable
36	4b	c/c	" ----> "	inestable
37	5a	c/c	" ----> "	inestable
38	8a	c/c	aux. estricto ----> escurridizo?	inestable?
39	10	c/c	escurridizo ----> escurridizo	estable
40	11a	c/c	" ----> "	estable

Continuación Tabla 2.

Cepa Mutante	Postratamiento	Variación Fenotípica	Estabilidad de la mutación *	
41	11b	c/c	aux. estricto ----> silvestre	inestable
42	12b	c/c	escurridizo ----> "	inestable
43	15b	c/c	" ----> "	inestable
44	23b	c/c	aux. estricto ----> aux. estricto	estable
45	30a	c/c	" " ----> " "	estable
46	30b	c/c	" " ----> " "	estable
47	50	c/c	escurridizo ----> silvestre	inestable
48	52b	c/c	aux. estricto ----> aux. estricto	estable
49	53	c/c	" " ----> " "	estable
50	61	c/c	escurridizo ----> silvestre	inestable
51	64	c/c	" ----> "	inestable
52	72	c/c	aux. estricto ----> aux. estricto	estable
53	76a	c/c	escurridizo ----> escurridizo	estable
54	76b	c/c	" ----> silvestre	inestable
55	77a	c/c	aux. estricto ----> "	inestable
56	78	c/c	" " ----> " "	inestable
57	82c	c/c	escurridizo ----> "	inestable
58	84b	c/c	aux. estricto ----> aux. estricto	estable
59	85	c/c	" " ----> " "	estable
60	88a	c/c	" " ----> escurridizo?	inestable?
61	91	c/c	" " ----> silvestre	inestable
62	93	c/c	" " ----> aux. estricti	estable
63	97a	c/c	escurridizo ----> silvestre	inestable
64	98	c/c	aux. estricto ----> aux. estricto	estable
65	100	c/c	" " ----> silvestre	inestable
66	107	c/c	" " ----> " "	inestable
67	179	c/c	escurridizo? ----> silvestre	inestable

* La inestabilidad o estabilidad de las mutaciones se refiere a cualquier cambio o ausencia de él, respectivamente, en el fenotipo, que hayan mostrado los micelios mutantes a partir de su aislamiento y durante su mantenimiento. Aquí se consideró a una cepa estable si no sufrió ningún cambio en su conducta auxotrófica para triptofano. Por otro lado, la inestabilidad se expresó en las diferentes cepas en periodos distintos dentro del desarrollo de este trabajo, y así, en algunos casos, hubo oportunidad de emplearse en algunas pruebas genéticas.

Tabla 3 a) Número promedio de sobrevivientes por placa de medio de cultivo* con tratamientos de UV (2 000 ergios/mm²) con y sin postratamientos de cafeína (0.5 mg/ml) y triptofano.

	MM	MM+trip	MM+Caf	MM+trip+Caf
\bar{X}	41.76	44.74	20.12	7.18
\pm ES	9.37	10.44	5.40	7.30
	MC	MC+trip	MC+Caf	MC+trip+Caf
\bar{X}	42	41.31	21.71	22.94
\pm ES	10.41	6.89	5.60	7.62

* Promedio de 15 a 17 repeticiones

Después de irradiados los fragmentos hifales con luz UV, se sembraron inmediatamente en los diferentes medios, en condiciones de oscuridad, y la sobrevivencia fue cuantificada después de tres o seis días, cuando no se encontraba o estaba presente la cafeína, respectivamente.

Tabla 3b. Valores de "t" encontrados entre los distintos tratamientos de la tabla 3a.

	MM	MM+trip	MM+caf	MM+trip+caf	MC	MC+trip	MC+caf	MC+trip+caf
MM	0.78 29gl p > 0.1	8.09 32gl p < 0.01	11.69 30gl p < 0.01	0.9 28gl p > 0.1	0.12 29gl p > 0.5	7.42 30gl p < 0.01	6.12 29gl p < 0.01	
MM+trip		8.48 31gl p < 0.01	11.94 31gl p < 0.01	0.65 29gl p > 0.5	1.0 30gl p > 0.1	7.86 31gl p < 0.01	6.66 30gl p < 0.01	
MM+caf			5.88 31gl p < 0.01	7.60 29gl p < 0.01	9.87 31gl p < 0.01	0.84 32gl p > 0.1	1.23 31gl p > 0.1	
MM+trip+caf				11.06 30gl p < 0.01	13.80 31gl p < 0.01	6.51 32gl p < 0.01	6.07 31gl p < 0.01	
MC					0.22 29gl p > 0.5	6.98 30gl p < 0.01	5.84 29gl p < 0.01	
MC+trip						9.0 31gl p < 0.01	7.16 30gl p < 0.01	
MC+caf							0.53 31gl p < 0.05	
MC+trip+caf								

encuentra presente la cafeína, y de más del 80% cuando es utilizado el MM en lugar del MC en el postratamiento con triptofano y cafeína. Por consiguiente, se puede inferir que durante la obtención de mutantes trip⁻, la cafeína causó un 50% de letalidad aumentada a los fragmentos sobrevivientes a la dosis de luz UV de 2,000 ergios/mm². Sin embargo, durante la mutagénesis no se puede considerar que la combinación del triptofano y la cafeína presentes en el Medio Mínimo (como lo mostró esta prueba) haya afectado considerablemente (mas del 80% de letalidad), la viabilidad de los posibles mutantes, trip⁻, pues esta combinación se logró después de seis días de incubación de los fragmentos irradiados, durante el método de enriquecimiento de obtención de mutantes (ver Materiales y Métodos).

Todas las mutaciones trip⁻ obtenidas aquí, se presentaron como recesivas cuando formaron el estado dicariótico con la cepa silvestre 1-86.

Recombinación y Mapeo de Genes trip⁻.

La tabla 4 muestra la segregación meiótica y las distancias obtenidas entre las mutaciones trip⁻ de las distintas cepas mutantes auxotróficas para triptofano, con respecto a la mutación dom-2, donde se observa que la segregación de marcadores trip⁻ y dom-2, tuvo un alto porcentaje de recombinación, cercano a las 50 unidades, lo que muestra que las mutaciones trip⁻ mapean desligadas de dom-2 y por consiguiente del factor B.

Tabla.4. Distancias de los diferentes genes trip con relación a dom-2
Cruzas trip x 1-86

Cruza	Proporción 1:1 dom-2: +	cociente	X ²	p	Total de segregantes				Otros	Promedio de sobrevivencia de las esporas germinadas recolectadas	Distancia promedio dom-2- <u>trip</u>
					Recombinantes		Progenitores				
					dom-2 +	+ trip	dom-2 trip	++			
1-86 X 9-4 (control)	151:174	0.87	1.49	<0.30	151	0	0	174	0	90.28%	
1-86 X 179c	175:142	1.23	3.23	<0.05	111	6	64	136	16	81.98%	45.74u
1-86 X 93	126:145	0.87	1.20	<0.30	118	11	8	134	6	61.32%	46.75u
1-86 X 72	106:137	0.77	3.70	<0.10	78	14	28	123	38	61.46%	39.81u
1-86 X 53	118:185	0.64	14.38	<0.001	84	32	34	153	23	75.14%	35.44u
1-86 X 122	148:204	0.73	8.60	<0.01	90	63	58	83	27	89.17%	52.02u
1-86 X 85	196:204	0.96	0.12	>0.70	125	80	71	124	9	75.00%	49.91u
1-86 X 111a	244:120	2.03	1.14	<0.30	244	0	0	120	10	83.56%	?
1-86 X 100	153:147	1.04	0.08	>0.70	153	0	0	147	7	85.28%	?
1-86 X 164a	125:139	0.90	0.64	<0.50	97	13	28	126	7	60.62%	53.53u
1-86 X 183	85:107	0.79	2.30	<0.20	85	0	0	107	2	53.89%	?
1-86 X 52b	120:114	1.05	0.11	>0.70	105	4	15	110	11	60.74%	50.30u
1-86 X 23b	147:120	1.23	2.53	<0.20	78	42	69	78	3	81.08%	50.00u
1-86 X 181c	201:177	1.14	1.40	<0.30	178	39	23	138	10	72.11%	56.34u
1-86 X 84b	123:158	0.78	4.11	<0.05	109	13	14	145	2	81.94%	40.20u
1-86 X 88a	138:23	6.0	80.72	<0.001	129	8	9	15	7	60.84%	60.06u
1-86 X 98	203:181	1.12	1.15	<0.30	142	66	61	115	12	88.22%	54.78u
1-86 X 232c	115:162	0.71	7.63	<0.01	78	57	37	105	6	78.89%	42.62u
1-86 X 82	59:93	0.63	7.16	<0.01	58	2	1	91	54	59.63%	39.12u
1-86 X 233c	83:59	1.41	3.73	<0.10	83	2	0	57	5	61.67%	59.89u
1-86 X 1	71:65	1.09	0.18	>0.50	70	0	1	65	7	57.26%	59.10u
1-86 X 107	83:78	1.06	0.10	>0.70	83	0	0	78	9	69.03%	?
1-86 X 91	26:29	0.90	0.07	>0.70	26	0	0	29	0	61.11%	?
1-86 X 30a	29:36	0.81	0.55	<0.02	24	5	5	31	3	76.67%	43.64u
1-86 X 78	32:36	0.89	0.13	>0.90	24	12	8	24	1	76.67%	50.00u
1-86 X 230	59:82	0.72	3.43	<0.10	57	4	2	78	11	54.72%	41.30u
1-86 X 233a	65:68	0.96	0.03	>0.80	62	6	3	62	27	61.12%	50.74u

Continuación tabla 4

1-86	X	11a	16:25	0.64	1.56	<0.30	16	1	0	24	3	48.89%	40.00u
1-86	X	11b	30:24	1.25	0.46	>0.30	30	0	0	24	15	77.78%	?
1-86	X	10	23:37	0.62	2.82	<0.10	22	6	1	31	9	76.67%	41.51u
1-86	X	30b	49:42	1.17	0.40	>0.50	34	4	15	38	20	68.52%	47.22u
1-86	X	159	36:56	0.64	3.92	<0.05	36	0	0	56	22	63.33%	?
1-86	X	76a	51:53	0.96	0.01	>0.90	51	0	0	53	48	84.44%	?
1-86	X	22	50:59	0.85	0.59	>0.30	48	5	2	54	13	67.78%	47.06u
1-86	X	53a	57:79	0.72	3.24	<0.10	47	18	10	61	17	85.00%	43.52u
1-86	X	60	34:49	0.69	2.36	<0.20	34	3	0	46	5	54.32%	41.98u
1-86	X	8a	55:48	1.15	0.35	>0.50	41	14	14	34	24	78.40%	54.67u

Estas pruebas se efectuaron obteniendo las basidiosporas previamente germinadas en placas de MM + Trip y seleccionándolas en cultivos monospóricos para determinar el fenotipo de cada una de las esporas recolectadas en MM, MM+Trip y MC.

En algunas cruzas (1-86 X 111a; 1-86 X 100; 1-86 X 183; 1-86 X 107; 1-86 X 91; 1-86 X 116; 1-86 X 159; 1-86 X 76a), no se obtuvo ningún segregante trip⁻, por lo que no se estableció la distancia, pensando que la inestabilidad de la cepa trip⁻ progenitora de cada una de estas cruzas, podría haber perdido su capacidad de mutante o por lo menos quedar enmascarada por la baja viabilidad de los segregantes trip⁻, aumentando las posibilidades de error en el mapeo.

La viabilidad de los segregantes, afectada, está relacionada con la sobrevivencia de las esporas trip⁻, como se observa también en la tabla 4. Con algunas excepciones como las cruzas 1-86 X 53, 1-86 X 111a, 1-86 X 88a, 1-86 X 233c, 1-86 X 11a, 1-86 X 10, 1-86 X 59, 1-86 X 60, la proporción dom-2 : \pm se mantuvo cercano a 1 : 1, estableciendo que el marcador de referencia dom-2 segregó normalmente en la mayoría de las progenies analizadas.

Puesto que el marcador de referencia fue dom-2, no implica en estos resultados que las mutaciones trip⁻ estén desligadas entre sí, por lo que fue necesario probar las esporas segregantes de las pocas cruzas trip⁻ X trip⁻ que formaron cuerpos fructíferos y esporas; los resultados de estas cruzas se presentan en la tabla 5 y en la figura 5, en donde se observa que, mediante el método de selección de protótrofos de las 126 esporas germinadas recolectadas, mostraron también un alto porcentaje de recombinación, por lo cual se puede decir que las mutaciones 23b y 181c, 85 y 23b, 93 y 23b, 85 y 181c, 85 y 232c, 93 y 85, 122 y

Tabla.5.Mapeamiento de genes trip⁻ para determinación de la distancia trip⁻—trip⁻ por el método de recuperación de protótrofos.

Cruza	Grupos de complementación	Proporción de protótrofos	%de sobrevivencia enMM+ <u>trip</u> de las 126 esporas recolectadas germinadas	Distancia <u>trip</u> ⁻ — <u>trip</u> ⁻	Proporción dom/+	Otros
23b(265) X 181c	2 X 7	24/126	31.75	38.10u	18/20 =0.90	0
85(105) X 23b	2 X 5	39/126	37.30	61.90u	17/29 =0.59	1
93(25) X 23b	2 X 6	29/126	23.02	46.03u	15/14 =1.07	0
85(105) X 181c	5 X 7	28/126	33.33	44.00u	19/21 =0.90	2
85(105) X 232c	2 X 5	61/126	52.38	97.50u?	26/40 =0.65	0
93(25) X 85	5 X 6	40/126	61.90	63.49u	34/41 =0.83	3
122(68) X 232c	2 X 6	27/126	30.95	42.86u	18/17 =1.06	4
164a(80) X 232c	2 X 6	21/126	30.95	33.33u	15/22 =0.68	2

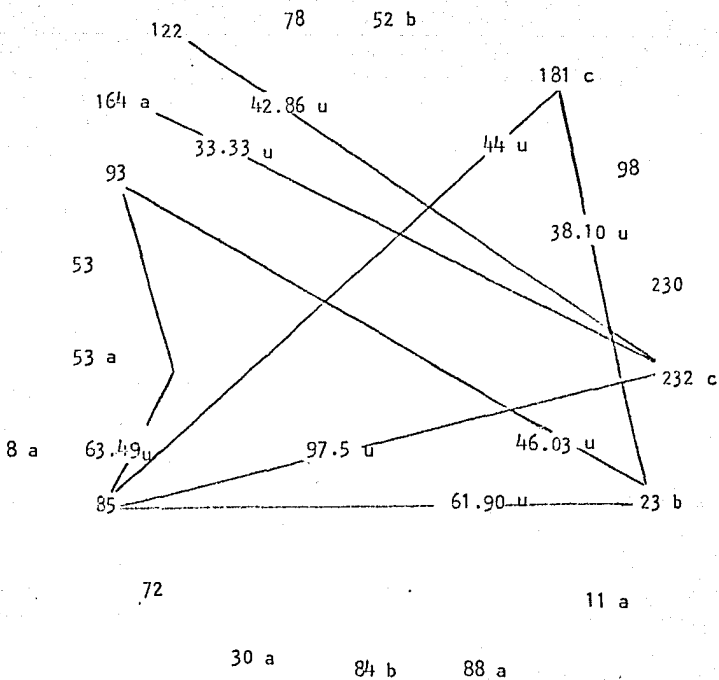


Figura 5.

Distancias entre las diferentes mutaciones trip⁻ basadas en los datos de la tabla 5.

u: unidades de recombinación

Las distintas cepas mutantes trip⁻ se encuentran en círculo, mientras que las líneas denotan las cruzas efectuadas y las unidades de recombinación encontradas.

Estas distancias fueron obtenidas seleccionando 126 esporas germinadas en MM + trip y resembradas en MM, MM + trip, con el fin de recuperar los recombinantes protótrofos (+ +).

232c, 164a y 232c, mapean desligadas entre sí. Este resultado no es determinante, pues existen factores genéticos que pueden alterar los procesos recombinatorios entre los marcadores (Catcheside, 1977) y no representar exactamente su posición física en el genoma. Sin embargo estos resultados parecen acomodarse bien en su carácter de genes individuales en las pruebas de complementación (ver figura 4c y tabla 8), y ser entidades genéticas separadas, como se observó en estos resultados.

El análisis de las otras cruzas faltantes no pudo llevarse a cabo, debido a la carencia de material apropiado, puesto que las cruzas no fructificaron a pesar de estar bien establecido el dicarion.

El método de recuperación de protótrofos usando la suspensión de esporas (tabla 6 y figura 6) no dio los resultados esperados, que presentaran similitud con el método anterior, pues, aparentemente en estas pruebas, si hay eslabonamiento entre varios genes (denotado por el bajo índice de recuperación de protótrofos), y más aún se evidencia que las cruzas en donde interviene la mutación 93 son poco confiables, pues la crusa control 93 x 93 (25) sí presentó recombinantes protótrofos, a diferencia de las otras cruzas control 85 (105) x 85, 181c (204) x 181c, 232c x 232c, 23b (265) x 23b .

Esta discrepancia metodológica puede deberse al bajo índice de germinación de las esporas, pues en este método que no es el usual, las esporas fueron tomadas en su totalidad directamente del carpóforo, sin

Tabla.6. Recuperación de protótrofos a partir de las cruzas de trip x trip mediante el método de dilución de la suspensión de basidiosporas para conocer el eslabonamiento entre los genes trip.

Cruzas de grupos de complementación			Esporas sembradas por placa	Grupo de complementación	MM+trip X (Placa)	Distancia <u>trip</u> — <u>trip</u> % recombinación	MM X(Placa)	
Mutantes equivalentes								
1	X	1	85(105) X 85	1,014	5 X 5	351	0	0
1	X	2	93(25) X 85	887	5 X 6	95	11.56u	51.33
1	X	3	85(105) X 181c	1,014	5 X 7	182	34.12	173.00
1	X	6	85(105) X 232c	949	5 X 2	115	0.28	1.33
1	X	7	85(105) X 23b	1,083	5 X 2	93	13.79	74.67
2	X	2	93(25) X 93	833	6 X 6	74	17.69	73.67
2	X	3	93(25) X 181c	1,000	6 X 7	1,251	214.00	1,070.00
2	X	6	164a(80) X 232c	1,050	6 X 2	98	9.97	52.33
2	X	7	93(25) X 23b	1,166	6 X 2	67	10.41	60.67
3	X	3	181c(204) X 181c	1,125	7 X 7	0	0	0
3	X	6	181c(204) X 232c	822	7 X 2	27	6.33	26.00
3	X	7	23b(265) X 181c	933	7 X 2	0	0	0.00
6	X	6	232c(223) X 232c	1,000	2 X 2	170	0	0.00
6	X	7	232c(223) X 23b	1,090	2 X 2	97	15.17	82.67
7	X	7	23b(265) X 23b	1,116	2 X 2	4	0	0.00

seleccionar las esporas que pueden germinar, como se lleva a cabo el método estándar (Raper, 1963).

Es interesante mostrar que las esporas de tres de los cinco tipos de cruzas llevadas a cabo presentaron valores de sobrevivencia de cero o cercanos a cero (181c (204) x 181c, 23b (265) x 181c, 23b (265) x 23b), a pesar de haber suplementado el medio con triptofano; esto indica que la letalidad de las esporas puede originarse desde el momento de su formación y maduración en el basidio, pensando que la doble carga presente en la basidiospora (pues la basidiospora de S. commune es homocariótica binucleada (Raper, 1966)), la hace ser más susceptible a la letalidad, en comparación con el micelio homocariótico. Este efecto puede representar la dificultad de captación del triptofano exógeno por las esporas mutantes, que es menos notorio en el micelio homocariótico, y puede deberse a la constitución misma de la basidiospora, distinta del estado homocariótico miceliano. Esta dificultad en la sobrevivencia de las basidiosporas trip⁻ concuerda con la encontrada en los mutantes trip⁻ de Coprinus (Tilby, 1976).

Dadas las alteraciones que causan las mutaciones trip⁻ en la viabilidad de las esporas, se llevaron a cabo las diferentes pruebas de inducción de su germinación, mediante las variables fisiológicas de luz, temperatura, pH y composición del medio de cultivo, de las cruzas: 85(105) X 85, 85(105) X 181c, 23b(265) X 181c, 232c(223) X 23b, 23b(265) X 23b (tablas 7 a, b, c, d, e).

En ninguna combinación de estas variables se logró aumentar signi-

Tabla.7a Germinación de basidiosporas en diferentes condiciones fisiológicas de temperatura, luz-obscuridad, pH y medio de cultivo.

cruza 85(105) x 85=(1x1)

1,014 esporas por placa.

		20 C				30 C				37 C			
		Luz		Osc		Luz		Osc		Luz		Osc	
		X	%	X	%	X	%	X	%	X	%	X	%
<u>pH 5.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		0		0		0		0	
	MC	0		0		0		0		0		0	
	MC+trip	0		0		0		0		30(2.96)		16.5(1.63)	
<u>pH 7.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		106(10.45)		57(5.62)	*	0		0	
	MC	0		0		0		0		2 (0.20)		0	
	MC+trip	0		0		17.5(1.73)		0		42.5(4.19)		55(5.42)	
<u>pH 8.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		0		0		0		0	
	MC	0		0		0		0		0		0	
	MC+trip	0		0		0		0		0		0	

* Los valores de los controles en el recuadro.

Tabla.7b. Germinación de basidiosporas en diferentes condiciones fisiológicas de temperatura, luz-obscuridad, pH y medio de cultivo

cruza 85(105) x 181c=(1x3)
1,041 esporas por placa

		20 C				30 C				37 C			
		Luz		Osc		Luz		Osc		Luz		Osc	
		X	%	X	%	X	%	X	%	X	%	X	%
<u>pH 5.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		0		0		0		0	
	MC	144	(14.20)	121	(11.93)	145.5	(14.35)	147	(14.50)	146	(14.40)	143.5	(14.15)
	MC+trip	153	(15.14)	163.5	(16.12)	180	(17.75)	163	(16.07)	137.5	(13.56)	131.5	(12.97)
<u>pH 7.0</u>	MM	0		8.5	(0.84)	0		3		0		0	
	MM+trip	81.50	(8.04)	44.5	(4.39)	95	(9.37)	101	(9.96)	11.5	(1.13)	0	
	MC	89.50	(8.83)	117.5	(11.59)	156	(15.38)	134	(13.2)	151.5	(14.94)	102	(10.6)
	MC+trip	128	(12.62)	125	(12.33)	126	(12.43)	121	(11.93)	170.5	(16.81)	137.5	(13.56)
<u>pH 8.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		0		0		0		0	
	MC	81	(7.99)	78.5	(7.74)	116	(11.44)	110.5	(10.90)	112.5	(11.09)	77	(7.59)
	MC+trip	129.5	(12.77)	103	(10.16)	146.5	(14.45)	141	(13.91)	130.5	(12.87)	0	

* Los valores de los controles en el recuadro.

Tabla.7c.Germinación de basidiosporas en diferentes condiciones fisiológicas de temperatura, luz-oscuridad, pH y medio de cultivo.

cruza 23b(2.65) x 181c=(3x7)

933 esporas por placa

		20 C				30 C				37 C			
		Luz		Osc		Luz		Osc		Luz		Osc	
		\bar{x}	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%
<u>pH 5.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		0		0		0		0	
	MC	0		0		0		0		0		0	
	MC+trip	0		0		0		0		0		0	
<u>pH 7.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		0		0		0		0	
	MC	1(0.11)		0		0		0		0		0	
	MC+trip	0		0		0		0.5(0.05)		0		0	
<u>pH 8.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		0		0		0		0	
	MC	0		0		0		0		0.5(0.5)		0	
	MC+trip	0		0		0		0		0		0	

* Los valores de los controles en el recuadro.

Tabla. 7d. Germinación de basidiosporas en diferentes condiciones fisiológicas de temperatura, luz-oscuridad, pH y medio de cultivo.

cruza 232c(223) x 23b=(6x7)
1,090 esporas por placa.

		20 C				30 C				37 C			
		Luz		Osc		Luz		Osc		Luz		Osc	
		\bar{x}	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%	\bar{x}	%
<u>pH 5.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		1(0.09)		1(0.09)		0		0	
	MC	30(2.75)		34(3.12)		38(3.49)		34.50(3.17)		30(2.75)		32.50(2.98)	
	MC+trip	21(1.93)		25.50(2.34)		34.50(3.17)		45.50(4.17)		24(2.20)		27(8.90)	
<u>pH 7.0</u>	MM	0		0		4(0.37)		2.5(0.23)	*	0		0	
	MM+trip	30(2.75)		22(2.02)		37(3.39)		42(3.85)		22(2.02)		33.50(3.07)	
	MC	36.50(3.35)		40(3.67)		48(4.40)		46(4.22)		38.50(3.53)		22.50(2.34)	
	MC+trip	46.50(4.27)		43(3.94)		41.50(3.81)		48(4.40)		36.50(3.35)		46(4.22)	
<u>pH 8.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		0		0		0		0	
	MC	36.50(3.35)		34.50(3.17)		40.50(3.72)		49.50(4.54)		28.50(2.61)		26(2.39)	
	MC+trip	33.50(3.07)		19(1.74)		20(1.90)		35.50(3.26)		16.50(1.51)		9.50(.87)	

* Los valores de los controles en el recuadro.

Tabla. 7e. Germinación de basidiosporas en diferentes condiciones fisiológicas de temperatura, luz-obcuridad, pH y medio de cultivo.

cruza 23b(265) x 23b=7x7
1,116 esporas por placa

	20 C				30 C				37 C				
	Luz		Osc		Luz		Osc		Luz		Osc		
	X	%	X	%	X	%	X	%	X	%	X	%	
<u>pH 5.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		0		0		0		0	
	MC	0		0		0		0		0		0	
	MC+trip	0		0		0		0		0		0	
<u>pH 7.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	2.50	(0.22)	0		0.50	(0.04)	0		0		0.50	(0.04)
	MC	0		0		0		0		0		0	
	MC+trip	0		0		0		0		0		0	
<u>pH 8.0</u>	MM	0		0		0		0		0		0	
	MM+trip	0		0		0		0		0		0	
	MC	0		0		0		0		0		0	
	MC+trip	0		0		0		0		0		0	

* Los valores de los controles en el recuadro.

ficativamente el porcentaje de germinación de las esporas, con referencia a las condiciones estándares de cultivo en el laboratorio (ver los controles en el recuadro), pues a pesar de usar medio rico (MC) y aún medio suplementado con triptofano, las esporas no fueron inducidas a germinar, mostrando su fuerte tendencia a la letalidad al igual que los controles.

Complementación.

Los resultados de las pruebas de complementación entre los genes trip₁, se encuentran representados en la matriz de la figura 4a. En ella se observa que de los veinte mutantes probados se puede obtener un reagrupamiento (por su conducta en la complementación) de ocho distintos "grupos de complementación", constituidos de la manera representada en la tabla 8, denotando que entre los mutantes probados existen varios posibles grupos de mutaciones, y que en casos como los de los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 están constituidos por mas de uno de los mutantes probados. Estas series de mutaciones complementan totalmente como grupos, entre ellas, con excepción de los grupos 6 y 3 que no complementan entre sí, considerando que pueden estar afectando un mismo sistema enzimático en un sitio determinado, como está representado en la matriz de la figura 4b. Basándose en estos resultados, se puede construir el mapa lineal de complementación de la figura 4c. En este mapa se nota que los grupos de mutantes: 1, 2, 4, 5, 7 y 8 complemen-

		52b	98	88a	84b	30a	85	93	53	230	8a	11a	181c	164a	122	232c	72	23b	22c	78	53a	
(47)	52b	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(78)	98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(3)	88a	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(4 dom)	84b	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(33)	30a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(105)	85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(25)	93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(163)	53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(11)	230	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(127)	8a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(33)	11a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(183)	181c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(80)	164a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(68)	122	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(223)	232c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(71)	72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(265)	23b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(5)	22c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(19)	78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(82)	53a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figura 4a.

Matriz de complementación de los diferentes mutantes trip⁻ (los recombinantes con factores A y B distintos a los de la cepa 9-4, están señalados mediante su número de segregante, entre paréntesis).

Estas pruebas de complementación trip⁻ + trip⁻ se llevaron a cabo formando micelios dicarióticos estables en MM + trip y posteriormente sembrados en MM.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	+	+	+	+	+	+	+
2		-	+	+	+	+	+	+
3			-	+	+	-	+	+
4				-	+	+	+	+
5					-	+	+	+
6						-	+	+
7							-	+
8								-

Figura 4b.

Matriz de complementación, tomada por grupos de mutantes con conducta de complementación semejante (grupos de complementación).

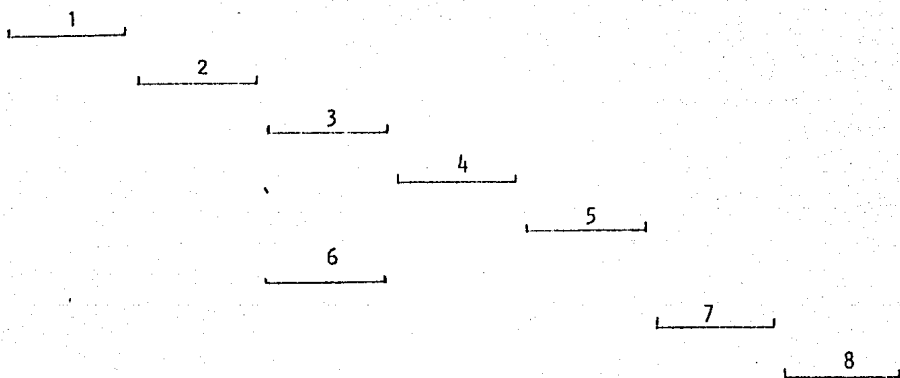


Figura 4c.

Mapa de complementación lineal obtenido con los datos de la figura 4b.

Tabla 8 Grupos de mutantes que forman los ocho grupos de complementación trip encontrados.

Grupo de complementación	Mutantes
1	52b
2	98, 230, 11a, 232c, 23b
3	88a, 84b
4	30a, 72
5	85, 8a, 53, 53a
6	93, 164a, 122, 78
7	181c
8	22c

tan bien, restableciendo la función silvestre en los dicariones, para las distintas mutaciones trip⁻. Esto no implica que se trate de siete distintas enzimas que intervienen en la síntesis de triptofano en S. commune, sino que su conducta en la complementación corresponde a ocho grupos bien definidos, considerándolos como ocho grupos de complementación genética, encontrados en este trabajo.

Las pruebas de complementación para los mutantes restantes no se llevaron a cabo pues no se pudieron obtener los recombinantes necesarios con factores de compatibilidad contrarios, dada la baja viabilidad de los segregantes trip⁻ (ver resultados de recombinación entre el marcador don-2 y las distintas mutaciones trip⁻).

Comparando la recombinación con el mapa de complementación de las mutaciones auxotróficas trip⁻, no se puede establecer un orden en los genes trip⁻ que corresponda al ordenamiento en la complementación, pues aparentemente la recombinación entre los genes trip⁻ ha dado resultados distintos, estableciendo distancias contradictorias entre estos genes en los dos métodos empleados (ver tablas 5 y 6, figuras 5 y 6), así que no se tiene la certeza suficiente para establecer si están o no estrechamente eslabonados y con un orden específico en el genoma.

Capítulo IV: Discusión

La mutagénesis inducida es propiamente una respuesta de sobrevivencia, cuando es dañada la estructura del ADN que evite su replicación, y que deje una modificación estructural que confiera algún cambio en la información hereditaria (Bresler, 1975; Fincham et al., 1979; Zimmerman, 1982). Así que la capacidad de formar mutantes inducidos en un organismo está dada por su estructura genética y su capacidad de recuperar la homeostasis en el ADN dañado, mediante los diferentes procesos reparadores y replicadores de la célula y la eficacia de estos (Slezárikova et al., 1975; Kimball, 1978). Sin embargo, es necesario hacer notar que la mutagénesis inducida y la sobrevivencia pueden ser procesos independientes como lo han mostrado Mc Millan y Fox (1979), que durante la inducción de mutantes resistentes a 8-azaguanina en células de hamster chino V79, lograron evidenciar que el posible aumento en la obtención de mutantes mediante la luz UV y la cafeína podría estar sujeto a la letalidad inducida por esta droga, y por consiguiente la relación entre la inducción de mutación y dosis de mutágeno es distinta de la encontrada entre la letalidad celular y la dosis de mutágeno empleada.

En este caso, es importante referirse a la mutagénesis inducida por la luz UV, en donde se encuentran perfectamente reconocidos los mecanismos principales de la reparación de los diaductos de pirimidina

e inducción de mutantes (Witkin, 1976; Hanawalt et al., 1979). Así como se mencionó anteriormente (Introducción), los mecanismos reparadores que intervienen después de la lesión del ADN con luz UV, son de dos tipos: "inductores de mutagénesis" (productores de errores) e inhibidores de mutagénesis ("libres de errores"). Pero la verdadera controversia se encuentra en que los mecanismos de reparación en los eucariontes no son equivalentes exactos a los de las bacterias y por consiguiente se encuentran diferencias notorias finas como la de que la reparación postreplicación es sensible a la cafeína en los eucariontes a diferencia de las bacterias que tienen la reparación por escisión, sensible a ella; y, por otro lado, los mecanismos de reparación por escisión de "parche corto" y "parche largo" son también distintos entre procariontes y eucariontes (Hanawalt et al., 1979), pues la doble cadena del ADN dañada por la luz UV presenta una reparación por escisión mediante "parches largos" (ca. 40 - 100 nucleótidos) y las lesiones con rayos X (eliminaciones de bases) son reparadas por medio de la síntesis de "parches cortos" (ca. 3 - 4 nucleótidos) en las células de mamífero; y de hecho, la reparación mediante formación de "parches largos" en mamíferos semeja a la de "parches cortos" en bacterias. Se duda si la reparación por escisión en eucariontes está completamente exenta de inducir errores como ha sido reconocida para E. coli (Witkin, 1966, 1976; Howard-Flanders, 1968; Witkin y Farquharson, 1969; Rothman et al., 1975), pues se conoce el papel del gene uvs3 de Neurospora, que participando como gene de la reparación por escisión tiene un papel de gene mutador. Este gene uvs3 requiere a su vez de la función de uvs6

para expresarse como tal (Inoue et al., 1981), pero el mecanismo bioquímico no es conocido. Además, de que la conducta genética de los mutantes uvs obtenidos, sobre todo en hongos y mamíferos, no parecen cumplir con el esquema de reparación de las bacterias. Así que los modelos de reparación en los hongos se han visto modificados constantemente sin lograr establecer uno definitivo. Y por consiguiente, los sistemas de reparación mejor estudiados, son los de Saccharomyces y Neurospora.

En Saccharomyces se tiene la serie de genes rad que son mutaciones que pertenecen a tres grupos (Game y Cox, 1972, 1973; Cox y Game, 1974):

1) incluye los genes rad-1, rad-2, rad-3, rad-4, rad-10 y rad-16, que son deficientes en la reparación por escisión (Unrau et al., 1971; Resnick y Setlow, 1972; Prakash, 1977; Prakash y Prakash, 1979).

2) incluye los genes rad-6, rad-9, rad-18, rev-1 y rev-3, y pertenecen a un mecanismo "inductor de errores" (Lemontt, 1971; Lawrence et al., 1974; Lawrence y Christensen, 1976).

3) incluye los genes rad-50, rad-51 y rad-52, que son altamente sensibles a los rayos X, pero resistentes a la luz UV (Resnick, 1969; Cox y Game, 1974).

En Neurospora se conocen principalmente los genes (Worthy y Epler, 1973):

upr-1: actúa en la reparación por escisión.

uvs-2: actúa en la reparación por escisión.

uvs-3: actúa en la reparación por escisión y además en otro mecanismo inductor de errores.

uvs-6: actúa en otro mecanismo distinto de la reparación por escisión.

Estas características de los mecanismos reparadores de los hongos,

permiten sugerir que la obtención de mutantes trip en este trabajo se pudo llevar a cabo mediante la siguiente hipótesis:

Dado que está bien reconocida la acción inhibitoria de la cafeína en la postreplicación y mutagénesis de S. commune (Hundert et al., 1977; 1978; Dubovoy y Muñoz, en preparación), es muy probable que las proporciones semejantes de obtención de mutantes, entre el tratamiento de la luz UV sola y luz UV + caf se debieron a que una sola fuente de mutagénesis era operativa: la reparación por escisión, que al igual que en Neurospora puede haber por lo menos la injerencia de un gene mutador que le confiera a este mecanismo alguna posibilidad de inducir las mutaciones trip aunque sea en menor número que si se encontrara funcionando la postreplicación que es "inductora de errores" por excelencia.

Por otro lado, la acción tóxica amplia de la cafeína (como se observó en la tabla 3) en la célula, aunada a la carencia de conocimiento exacto de las vías reparadoras en los hongos, con la posible actividad epistática y pleiotrópica de los genes que intervienen y que aún no se conocen, especialmente de S. commune, no permiten asegurar que la vía de reparación por escisión no sea blanco de la actividad inhibitoria directa o indirecta de la cafeína. Pues como se observó en la tabla 2, existe una tendencia mayor a la estabilidad de las mutaciones cuando se usó el posttratamiento de cafeína, y este efecto se pudo haber obtenido por dos posibles caminos:

a) El bloqueo del ciclo celular en una fase que permitió mayor mutagénesis, o sea mayor disponibilidad del número de lesiones hacia la muta-

génesis, pues como ha sido calculado para levaduras, 1×10^2 ergios/mm² provova la formación de 24 dímeros en el genoma de una célula de levadura haploide (Unrau et al., 1973), que comparativamente con los 2000 ergios/mm² usados en este estudio, proporcionarían cantidades suficientes de aductos para obtener lesiones más grandes en el ADN (que darían a su vez mutaciones más estables). Con este razonamiento también se ha interpretado el aumento en las posibilidades de recombinación meiótica heterogénica y mutación, inducidas con hidroxiaurea (inhibidor de la síntesis de ADN), durante la fase S previa a la meiosis del basidio en Coprinus lagopus y S. commune (Raudaskoski y Lu, 1980; Sneyour y Koltin, 1981). Y por consiguiente este posible efecto retardador durante la reparación del ADN por escisión provocado por la cafeína, induciría de alguna manera un mayor grado de lesión del ADN (como ya ha sido propuesto (Dubovoy y Muñoz, en preparación)), después de que las nucleasas hayan degradado la región del ADN en donde se encontraba el dímero.

Por otro lado, también es interesante observar que la cafeína es capaz de unirse al ADN y perturbar su configuración, incrementando la desnaturalización de esta molécula (Ts'io y Lu, 1964; Chetsanga et al., 1976), y que después del tratamiento con luz UV la cafeína puede unirse a la cadena de ADN con cierta preferencia en la región próxima al dímero formado (Lang y Nuske, 1973). Así que en cualquiera de estos casos, la posibilidad de provocar un mayor índice de daño al ADN mediante la acción de este alcaloide es más probable.

b) Una modificación a la reparación por escisión inhibiendo el status de reparación "libre de errores" o activando el posible mecanismo "induc-

tor de errores" (dentro de la reparación por escisión) que tal vez exista también en este hongo, análogamente al gene uvs-3 de Neurospora.

Sin embargo, de por qué en el tratamiento de luz UV sin cafeína no se obtuvieron altos índices de mutación, teniendo acceso a la reparación post-replicación, seguramente se debe a que S. commune también cumple la regla general de hacer uso preferencial de la reparación por escisión dejando solo algunos dímeros que no pudieron ser detectados, y que podrían ser de una frecuencia tan reducida, que no fueron claramente evidentes en las frecuencias de mutación aquí trabajadas; y esto estaría de acuerdo con la idea de que la posibilidad de mutación durante la postreplicación se basa en la detección de lesiones intrarreplicón que impiden la síntesis completa del replicón durante la formación de los fragmentos de Okazaki (Doniger, 1978; Kauffman et al., 1980), y puesto que los cromosomas de eucariotes se caracterizan por tener una mayor variación en tamaño y distribución de los replicones (Hanawalt et al., 1979), por consiguiente sería mayor la posibilidad de obtener mutantes si no fuera preferencial la reparación por escisión.

La mutación y recombinación son mecanismos muy relacionados si se piensa que a niveles moleculares son procesos de metabolismo y estructuración del ADN, así que varios de los mutantes alterados en reparación pueden tener efectos primarios o secundarios en la recombinación meiótica o mitótica (Baker et al., 1976; Game et al., 1980; Prakash et al., 1980).

La recombinación genética es el proceso de intercambio de la información hereditaria entre dos genomas, y generalmente se cree que este proceso se lleva a cabo mediante la formación del heterodúplice de la cadena del ADN en recombinación (Hastings, 1975; Catchside, 1977).

Las teorías de recombinación actuales principales (Holliday, 1964; Fincham y Holliday, 1970; Meselson y Radding, 1975; Radding, 1978) basan sus modelos en la formación de las moléculas del ADN híbrido con bases mal apareadas, que pueden ser reparadas mediante sistemas de reparación capaces de reconocer la configuración de apareamiento equivocado de las cadenas sencillas del ADN cuando se forma la doble hélice híbrida, de manera similar a la reparación por escisión. Y por otro lado, existe también la posibilidad de que estos heterodúplexes no sean reparados para formar homodúplexes.

Existen varios modelos, pero los más importantes se pueden reunir en dos modelos básicos: la recombinación sin resíntesis de ADN, que aprovecha el desenrollamiento en la misma dirección ("difusión rotatoria") de dos dobles cadenas de ADN, en donde previamente se han roto y unido las cadenas sencillas homólogas de la misma polaridad; este mecanismo ha sido comprobado en fagos y plásmidos.

El otro conjunto de modelos implicaría una degradación y síntesis de ADN para establecer la hibridización del ADN.

Así que una vez formado el heterodúplex puede seguir dos caminos:

a) Ser modificado mediante el sistema de corrección de bases "mal apareadas", en forma similar a la reparación por escisión y provocar la conversión génica al utilizar como molde a la cadena sencilla del ADN complementario híbrido, explicando así la polaridad de conversión génica al tener preferencia estructural por una de las cadenas del heterodúplex. A su vez esta conversión (provocada por la reparación del heterodúplex) puede tomar dos caminos:

1) Inducir el entrecruzamiento (crossing-over) interviniendo dos cromátidas en el proceso (Stadler y Towe, 1971), que tendría efecto recombinatorio en los marcadores flanqueadores del sitio de conversión.

2) No formar entrecruzamiento (crossing-over) interviniendo solo una cromátida (Stadler y Towe, 1971), y mantenerse como conversión génica sin efecto recombinatorio de los marcadores flanqueadores, pero que también explicaría la polaridad de conversión al corregirse las bases mal apareadas usando como template una cadena del ADN híbrido preferencialmente.

b) No ser corregido el heterodúplex, y dar como resultado el proceso llamado "segregación postmeiótica", cuyos resultados sólo pueden ser interpretados si se toma como base la idea de no haberse corregido el heterodúplex con sus bases complementarias mal apareadas.

Con estos modelos también quedaría explicada la co-conversión como el efecto provocado por el largo del heterodúplex en reparación.

También existen otras teorías importantes menos aceptadas (Hastings, 1975; Stahel, 1979), que implican la degradación y síntesis del ADN, por medio de una replicación normal, con carencia de reparación por escisión, o por desplazamiento de las cadenas de nucleótidos durante la síntesis (Paszewski, 1970).

Normalmente, un proceso de recombinación heterogénica se lleva a cabo dando productos recombinantes recíprocos en las mismas proporciones, puesto que es el resultado de un entrecruzamiento (crossing-over), y como consecuencia se pueden establecer las distancias entre los marcadores para colocarlos en su posición (loci) en el cromosoma, pero existen diferentes procesos genéticos que regulan o alteran esta recombinación y dan como resulta

do distancias mayores o menores, dependiendo del efecto que tengan.

Así, en Neurospora se ha descrito el papel de los genes rec, cog, con y ss, que regulan la recombinación en sitios específicos del genoma. Se conocen tres loci rec (recombinación): rec-1, rec-2 y rec-3; en cada caso, el alelo rec⁺ reduce la recombinación en un orden de magnitud en los loci de la región específica del genoma que afectan, y están desligados de ella (mapean en otro sitio); el gene cog (reconocimiento) aumenta la recombinación intragénica de his-3 e intergénica (entre his-3 y ad-3) de los genes a los que están ligados y en presencia del alelo rec⁺, cog⁺ que es dominante aumenta esta recombinación hasta en 30 veces. Los genes con proporcionan la susceptibilidad al control ejercido por rec-3 y se encuentran cercanos a los genes am-1 e his-2, regulando la recombinación intragénica en presencia de rec^L. Hay tres genes ss (secuencia sináptica) alélicos que pueden suprimir la recombinación: los ss^E, ss^S y ss^C, que aparentemente están ligados al gene que regulan (nit-2). Este gene ss modula junto con rec-1 la cercanía durante el apareamiento de los dúplices del ADN para el locus nit-2, reduciendo la recombinación cuando se encuentra en heterocigosis (Thomas y Catcheside, 1969; Angel et al., 1970; Catcheside, 1970; 1974; Catcheside y Corcoran, 1973; Catcheside y Angel, 1974; Catcheside, 1975; Catcheside, 1981).

En Schizophyllum se han descrito también los genes rec que regulan la recombinación en zonas específicas del cromosoma, a semejanza de los rec de Neurospora. Simchen (1967) estudió la recombinación en el factor de compatibilidad A, y encontró que su frecuencia de recombinación estaba modulada por un gene rec ligado a este factor. Después Stenberg y Koltin (1973) determinaron que el control de la recombinación en la región comprendida en-

tre los subloci α y β del factor B, estaba regulado por un gene ligado (9 unidades) al mismo factor B.

Otros factores genéticos que pueden alterar las frecuencias de recombinación indirectamente en los hongos son aquellos que confieren esterilidad en mayor o menor grado y/o inviabilidad a los productos de la meiosis (Baker et al., 1976; De Lange y Griffiths, 1980).

Los resultados recombinatorios obtenidos aquí para las distancias dom-2 --- trip⁻ y trip⁻ --- trip⁻ pueden haber sufrido alguna distorsión, sobretodo por el efecto de la inviabilidad de las esporas; pero dada la carencia de conocimiento acerca de la existencia de genes que interfieran con la viabilidad en este hongo, la única posible explicación es que la recombinación se vio afectada por la inviabilidad intrínseca de las esporas incapaces de satisfacer su auxotrofia utilizando el triptofano exógeno.

Así también se explicaría que al utilizar los dos métodos, a) de las esporas germinadas y b) sin germinar, la proporción de recombinantes se modifica.

El dicarion, ha sido comprobado como un buen sistema de análisis de complementación (Day y Roberts, 1969), semejando ampliamente al estado di ploide, como había sido sugerido por Fincham (1966), pues como se sabe, los productos alterados se acoplan en el citoplasma, en donde verdaderamente se lleva a cabo la complementación, y su carácter de células con núcleos distintos en proporciones en equilibrio 1:1 sugieren una síntesis de polipéptidos también en proporción semejante.

Así que el patrón de complementación aquí obtenido, representa una condición de diploide con capacidad para restablecer el carácter silvestre de las mutaciones aparentemente heterogénicas (tablas 5 y 6).

Como anteriormente se mencionó, la biosíntesis del triptofano en basidiomicetos, posee cuatro loci con posibilidad de mutación, así que los ocho grupos de complementación encontrados en este trabajo, sugieren que más de uno de estos grupos puede participar en una enzima.

Por lo tanto se sugiere que para esclarecer este dilema, se recurra a la caracterización bioquímica de estos mutantes, analizando los productos de acumulación y suplementos intermedios de la vía de síntesis del triptofano que nos permitan definirlos más ampliamente en su carácter mutacional.

Capítulo V: Literatura Citada

- Alton, N.K., Buxton, F., Patel, V., Giles, N.H. y Vapnek, D. 1982. 5'-Un translated sequences of two structural genes in the ga gene cluster of Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1955-1959.
- Angel, T., Austin, B. y Catcheside D.G. 1970. Regulation of recombination at the his-3 locus in Neurospora crassa. Aust. J. Biol. Sci. 23: 1229-1240.
- Arkin, H. y Colton, R.R. 1967. Tables for Statisticians. Nueva York.
- Baker, B.S., Carpenter, A.T.C., Esposito, M.S., Esposito, R.E. y Sandler, L. 1976. The genetic control of meiosis. Ann. Rev. Genet. 10: 53-134.
- Bresler, S.E. 1975. Theory of misrepair mutagenesis. Mutation Res. 29: 467-472.
- Burnett, J.H. 1975. Mycogenetics. Willey. Nueva York.
- Catcheside, D.E.A. 1970. Control of recombination within the nitrate-2 locus of Neurospora crassa: an unlinked dominant gene which reduces prototroph yields. Aust. J. Biol. Sci. 23: 855-865.
- _____. 1974. A second locus subject to recombination control by the rec-1+ gene in Neurospora crassa. Aust. J. Biol. Sci. 27: 561-573.
- _____. 1981. Genes in Neurospora that suppress recombination when they are heterozygous. Genetics 98: 55-76.
- Catcheside, D.G. 1975. The occurrence in wild strains of Neurospora crassa of genes controlling genetic recombination. Aust. J. Biol. Sci. 28: 213-225.
- _____. 1977. The Genetics of Recombination. University Park Press. Canberra.
- _____ y Angel, T. 1974. A histidine-3 mutant, in Neurospora crassa, due to an interchange. Aust. J. Biol. Sci. 27: 219-229.

- Catcheside, D.G. y Corcoran, D. 1973. Control of nonallelic recombination in *Neurospora crassa*. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 1337-1353.
- Cox, B. y Game, J. 1974. Repair systems in *Saccharomyces*. *Mutation Res.* 26: 257-264.
- Crawford, I.P. 1975. Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. *Bacteriol. Rev.* 39 (2): 87-120.
- _____ y Stauffer, G.V. 1980. Regulation of tryptophan biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 163-195.
- Chang, S.T. y Wai, C.C. 1971. A dome morphological mutant linked to the B incompatibility factor of *Schizophyllum commune*. *Genetics* 68: 13-19.
- Chetsanga, C.J., Rushlow, K. y Boyd, V. 1976. Caffeine enhancement of digestion of DNA by nuclease S₁. *Mutation Res.* 34: 11-20.
- Day, P.R. y Roberts, C.F. 1969. Complementation in dikaryons and diploids of *Coprinus lagopus*. *Genetics* 62: 265-270.
- DeLange, A.M. y Griffiths, J.F. 1980. Meiosis in *Neurospora crassa*. I. The isolation of recessive mutants defective in the production of viable ascospores. *Genetics* 96: 367-378.
- Doniger, J. 1978. DNA replication in ultraviolet light irradiated Chinese hamster cells: the nature of replicon inhibition and postreplication repair. *J. Mol. Biol.* 120: 433-446.
- Dubovoy, C. y Muñoz, A. 1983. Influencia de la cafeína en mutación en *Schizophyllum commune*. En preparación.
- Eckardt, F., Teh, S.J. y Haynes, R.H. 1980. Heteroduplex repair as an intermediate step of UV mutagenesis in yeast. *Genetics* 95: 63-80.
- Fincham, J.R.S. 1966. Genetic Complementation. Benjamin. Nueva York.

- Fincham, J.R.S., Day, P.R. y Radford, A. 1979. Fungal Genetics. Blackwell. Londres.
- _____ y Holliday, R. 1970. An explanation of fine structure map expansion in terms of excision repair. Mol. Gen. Genet. 109: 309-322.
- Game, J.C. y Cox, B.S. 1972. Epistatic interactions between four rad loci in yeast. Mutation Res. 16: 353-362.
- _____. 1973. Synergistic interactions between rad mutations in yeast. Mutation Res. 20: 35-44.
- Game, J.C., Zamb, T.J., Braun, R.J., Resnick, M. y Roth R.M. 1980. The role of radiation (rad) genes in meiotic recombination in yeast. Genetics 94: 51-68.
- Gillie, O.J. 1966. The interpretation of complementation data. Genet. Res. Camb. 8: 9-31.
- _____. 1968. Interpretations of some large non-linear complementation maps. Genetics 58: 543-555.
- Hanawalt, P.C. 1975. Repair processes in diverse systems: overview, p. 503-506. In . Hanawalt, P. y Setlow, R.B. (ed). Molecular mechanisms for repair of DNA, part B. Plenum Press. Nueva York.
- _____, Cooper, P.K., Ganesan, A.K. y Smith, C.A. 1979. DNA repair in bacteria and mammalian cells. Ann. Rev. Biochem. 48: 783-836.
- Hastings, P.J. 1975. Some aspects of recombination in eukaryotic organisms. Ann. Rev. Genet. 9: 129-144.
- Henke, H., Guerdoux, J.L. y Hutter, R. 1973. Relations entre les gènes et les enzymes de la biosynthese du tryptophane chez le Coprinus radia-tus. Compt. Rend. Hebd. Sc. Acad. Sc. D. 276: 2001-2004.

- Howard-Flanders, P. 1968. DNA repair. *Ann. Rev. Biochem.* 37: 175-200.
- _____. 1973. DNA repair and recombination. *Br. Med. Bull.* 29: 226-235.
- Hundert, P., Koltin, Y. y Stamberg, J. 1977. Repair of UV-induced damage in *Schizophyllum commune*. Abstracts of papers presented at the 1977 meetings of the genetics Society of America. Austin, Texas, August 14-17, 1977. *Genetics* 86 (2 part 2).
- _____. y Wertzberger, R. 1978. Repair of UV-induced damage in wild-type and mutant strains of *Schizophyllum commune*. *Mutation Res.* 50: 157-162.
- Inge-Vechtomov, S.G. y Pavlenko, V.V. 1969. Triallelic complementation and the subunit structure of enzymes. *Nature* 222: 1078-1079.
- Inoue, H., Harvey, R.C., Callen, D.F. y de Serres, F.J. 1981. Mutagenesis at the ad-3A and ad-3B loci in haploid UV-sensitive strains of *Neurospora crassa*. V. Comparison of dose-response curves of single- and double-mutant strains with wild-type. *Mutation Res.* 84: 49-71.
- Kaufmann, W.K., Cleaver, J.E. y Painter, R.B. 1980. Ultraviolet radiation inhibits replicon initiation in S phase human cells. *Biochem. Biophys. Acta* 608: 191-195.
- Kimball, R.F. 1978. The relation of repair phenomena to mutation induction in bacteria. *Mutation Res.* 55: 85-120.
- Kushev, V.V. 1974. Mechanisms of Genetic Recombination. Academy of Sciences of the USSR. Leningrado.
- Lang, H. y Nuske, R. 1973. The influence of caffeine on DNA - polymerase using UV-irradiated DNA as template. *FEBS Lett.* 33: 256-258.

- Lawrence, C.W. y Christensen, R. 1976. UV mutagenesis in radiation-sensitive strains of yeast. *Genetics* 82: 207-232.
- _____, Stewart, J.W., Sherman, F. y Christensen, R. 1974. Specificity and frequency of ultraviolet-induced reversion of an iso-1-cytochrome C ochre mutant in radiation sensitive strains of yeast. *J. Mol. Biol.* 85: 137-162.
- Lemontt, J.F. 1971. Mutants of yeast defective in mutation induced by ultraviolet light. *Genetics* 68: 21-33.
- Lindahl, T. 1982. DNA repair enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 61-87.
- McMillan, S. y Fox, M. 1979. Failure of caffeine to influence induced mutation frequencies and the independence of cell killing and mutation induction in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Res.* 60: 91-107.
- Meselson, M.S. y Radding, C.M. 1975. A general model for genetic recombination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72 (1): 358-361.
- Muñoz, A. y Dubovoy, C. 1979. Estudio fisiológico de la antibiosis de Schizophyllum commune. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 13: 5-37.
- Niederpruem, D.J. y Wessels, J.G.H. 1969. Cytodifferentiation and morphogenesis in Schizophyllum commune. *Bacteriol. Rev.* 33 (4): 505-535.
- Paszewski, A. 1970. Gene conversion: observations on the DNA hybrid models. *Genet. Res.* 15: 55-64.
- Platt, T. 1980. Regulation of gene expression in the tryptophan operon of Escherichia coli. In The Operon, editado por Miller, J.H. y Reznikoff, W.S. Cold Spring Harbor. Nueva York. pp 263-302.
- Prakash, L. 1977. Defective thymine dimer excision in radiation-sensitive mutant rad 10 and rad 16 of Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Gen. Genet.* 152: 125-128.

- Prakash, L. y Prakash, S. 1979. Three additional genes involved in pyrimidine dimer removal in Saccharomyces cerevisiae, RAD7, RAD14, MMS19. Mol. Gen. Genet. 176: 351-359.
- Prakash, S., Prakash, L., Burke, W. y Montelone, B.A. 1980. Effects of the rad 52 gene on recombination in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 94: 31-50.
- Radding, C.M. 1978. Genetic recombination: strand transfer and mismatch re pair. Ann. Rev. Biochem. 47: 847-880.
- Raper, J.R. 1963. Device for the isolation of spores. J. Bacteriol. 86 (2): 342-344.
- _____. 1966. Genetics of Sexuality in Higher Fungi. Ronald. Nueva York.
- _____ y Hoffman, R.M. 1974. Schizophyllum commune. In Handbook of Genetics, vol. 1: Bacteria, Bacteriophages and Fungi, pp. 597-626. Editado por King, R.C. Plenum. Nueva York.
- Raudaskoski, M. y Lu, B.C. 1980. The effect of hydroxyurea on meiosis and genetic recombination in the fungus Coprinus lagopus. Can. J. Genet. Cytol. 22: 41-50.
- Resnick, M.A. 1969. Genetic control of radiation sensitivity in Saccharomyces cerevisiae. Genetics 62: 519-531.
- _____ y Setlow, J.K. 1972. Repair of pyrimidine dimer damage induced in yeast by ultraviolet light. J. Bacteriol. 109: 979-986.
- Rothman, R.H. y Kato, T. 1975. The beginning of an investigation of the role of recF in the pathways of metabolism of ultraviolet-irradiated DNA in Escherichia coli. In Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Vol. 5, part A, 283-291. Editado por Hanawalt, P.C. y Setlow, R.B. Plenum. Nueva York.

- Roulland-Dussoix, D. 1967. D egradation par la cellule h te du DNA du bact riophage lambda irradi  par le rayonnement ultraviolet. *Mutation Res.* 4: 241-252.
- Shneyour, Y. y Koltin, Y. 1981. Meiosis in Schizophyllum commune: the effect of hydroxyurea on the frequency of recombination and mutations. *Current Genetics* 4: 159-163.
- Simchen, G. 1967. Genetic control of recombination and the incompatibility system in Schizophyllum commune. *Genet. Res. Camb.* 9: 195-210.
- Slez rikov , V., Masek, F. y Sedliakov , M. 1975. Survival and ability to synthesize intact DNA molecules after ultraviolet irradiation in Escherichia coli cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 390: 28-32.
- Smith, J.E. y Berr, D.R. 1974. An Introduction to Biochemistry of Fungal Development. Academic Press. Nueva York.
- Stadler, D. y Towe, A. 1971. Evidence for meiotic recombination in Ascobolus involving only one member of a tetrad. *Genetics* 68: 401-443.
- Stahl, F.W. 1979. Special sites in generalized recombination. *Ann. Rev. Genet.* 13: 7-24.
- Stamberg, J. y Koltin, Y. 1973. Genetic control of recombination in Schizophyllum commune: evidence for a new type of regulatory site. *Genet. Res.* 22: 101-111.
- Strauss, A. 1979. The genetic fine structure of the complex locus aro3 involved in early aromatic amino acid biosynthesis in Saccharomyces pombe. *Molec. Gen. Genet.* 172: 233-241.
- Thomas, P.L. y Catcheside, D.G. 1969. Genetic control of flanking marker behavior in an allelic cross of Neurospora crassa. *Can. J. Genet. Cytol.* 11: 558-566.

- Tilby, M.J. 1976. Tryptophan biosynthesis in Coprinus lagopus: a genetic analysis of mutants. J. Gen. Microbiol. 93: 126-132.
- Timson, J. 1977. Caffeine. Mutation Res. 47: 1-52.
- Ts'lo, P.O.P. y Lu, P. 1964. Interaction of nucleic acids. I. Physical binding of thymine, adenine, steroids and aromatic hydrocarbons to nucleic acids. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 51: 17-24.
- Unrau, R., Wheatcroft, R. y Cox, B.S. 1971. The excision of pyrimidine dimers from DNA of ultraviolet irradiated yeast. Mol. Gen. Genet. 113: 359-362.
- _____ y Olive, T. 1973. The formation of pyrimidine dimers in the DNA of fungi and bacteria. Biochim. Biophys. Acta 312: 626-632.
- Witkin, E.M. 1966. Radiation-induced mutations and their repair. Science 152: 1345-1352.
- _____. 1969. The mutability toward ultraviolet light of recombination deficient strains of Escherichia coli. Mutation Res. 8: 9-14.
- _____. 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in Escherichia coli. Bacteriol. Rev. 40 (4): 869-907.
- _____ y Farquharson, E.L. 1969. Enhancement and diminution of ultraviolet light-initiated mutagenesis by posttreatment with caffeine in Escherichia coli, p. 36-49. In G.E.W. Wolstenholme y M.O'Connor (ed), Ciba Foundation Symposium on Mutation as Cellular Process. J. & A. Churchill, Ltd. Londres.
- Worthy, T.E. y Epler, J.L. 1973. Biochemical basis of radiation-sensitivity in mutants of Neurospora crassa. Mutation Res. 19: 167-173.

Zimmermann, F.K. 1982. Can we determine mutagenicity or only a mutagenic potential? Mutation Res. 92: 3-7.