

185  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS GENOMAS  
MITOCONDRIALES DE LEVADURAS  
PERTENECIENTES AL GENERO  
Kluyveromyces

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :

EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA

MEXICO, D.F.

1991

**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.

## INDICE.

Resumen	.....	1
I. INTRODUCCION	.....	2
II. OBJETIVOS	.....	20
III. METODOLOGIA	.....	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	.....	43
V. CONCLUSIONES	.....	86
VI. BIBLIOGRAFIA	.....	91

## ABREVIATURAS.

DNA	Acido Desoxiribonucleico.
RNA	Acido Ribonucleico.
mtDNA	Acido Desoxiribonucleico mitocondrial.
tRNA	Acido Ribonucleico de Transferencia.
rRNA	Acido Ribonucleico Ribosomal.
G	Desoxiguanosina.
C	Desoxicitosina.
A	Desoxiadenina.
T	Desoxitimidina.
ATPasa	Adenosin trifosfato sintetasa
RNAasa	ribonucleasa
Tris	Tris Hidroximetilaminometano.
EDTA	Acido etilendiaminotetracético.
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio.
BSA	Albúmina de suero de bovino.
Sarcosil N-	Lauroil sarcosinato de sodio.
Kb,	kilobases.

## RESUMEN.

En los estudios taxonómicos de las levaduras del género Kluyveromyces han surgido controversias en la determinación de especies. Para resolver éstas discrepancias, se han tomado en cuenta características fenotípicas, reasociación y contenido de G y C del DNA nuclear, interfertilidad, zimogramas y más recientemente patrones electroforéticos de DNA cromosómico. Consideramos que el estudio de la estructura y organización del DNA mitocondrial podría aportar nuevos datos de utilidad taxonómica.

Kluyveromyces lactis que algunos autores consideran una especie independiente, ha sido reclasificada por estudios de interfertilidad como una variedad de K. marxianus, junto con las variedades fragilis y bulgaricus. Otros autores agrupan a K. lactis con K. vanudenii y K. drosophilarum.

En este trabajo se estudiaron los DNAs mitocondriales de 2 cepas de K. fragilis, 2 de K. bulgaricus, 1 de K. vanudenii y 1 de K. lactis. Se construyeron los mapas de restricción del DNA mitocondrial y se localizaron los genes que codifican para las subunidades 6 y 9 de la ATPasa mitocondrial, apocitocromo b y los RNAs ribosomales 15S y 21S.

Los resultados obtenidos indican la presencia de dos grupos principales que comprenden por un lado: K. lactis y K. vanudenii y por otra parte K. fragilis y K. bulgaricus. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por zimogramas, contenido de G y C, valores de reasociación de DNA nuclear y cariotipos electroforéticos.

## I. INTRODUCCION

### 1. Aspectos generales de las levaduras.

Las levaduras son definidas como hongos unicelulares que se reproducen por gemación o por fisión y que representan estados ontogenéticos unicelulares de los ascomicetos y basidiomicetos (Kreger-van Rij, 1984; van der Walt, 1984). Un tercer grupo, las levaduras imperfectas, tienen afinidades con ambos grupos.

Las levaduras ascosporógenas se dividen en 2 familias: Spermophthoraceae y Saccharomycetaceae. Este último grupo se divide en 4 subfamilias: Schizosaccharomycetoideae cuyo representante es el género Schizosaccharomyces; las subfamilias Nadsoidae, encabezada por Nadsonia; Lypomycetoideae representada por Lypomyces y por último la subfamilia Saccharomycetoideae, de la cual algunos de sus representantes son los géneros Dekkera, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces y Torulaspota.

Las levaduras ascógenas pueden reproducirse vegetativamente por gemación, fisión o una combinación de ambas. En cuanto a la reproducción sexual, éstas pueden ser homotálicas, en las cuales la reproducción sexual se lleva a cabo sin interacción previo de tipos de compatibilidad complementarios, o heterotálicas cuya reproducción sexual se lleva a cabo sólo cuando hay interacción de tipos de compatibilidad complementarios (van der Walt y Yarrow, 1984). Estos estados pueden ser vegetativamente estabilizados en fases diploide o haploide. Dos células haploides se conjugan para formar un cigoto, el cual dará origen a una

clona diploide y posteriormente, por un proceso de meiosis, producir una tétrada de ascosporas haploides.

## 2. Desarrollo de las levaduras como modelos biológicos de células eucariotes.

El contacto primero que existió entre levaduras y el hombre, provino del gran interés en su cultivo para la elaboración del pan y en la producción de bebidas alcohólicas.

Los primeros estudios sobre las levaduras se iniciaron cuando, en la segunda mitad del siglo XIX, Pasteur demostró la participación esencial de estos organismos en los procesos fermentativos (Rose y Harrison, 1987). Es a principios de este siglo, con el descubrimiento de que la fermentación alcohólica podía llevarse a cabo por un extracto de levadura, que éstas empiezan a estudiarse con un enfoque bioquímico; el objetivo era la identificación de enzimas y coenzimas involucradas en el proceso fermentativo (glucólisis), de hecho el término enzima significa "dentro de las levaduras". Es así como las levaduras tuvieron una función clave en el desarrollo de algunos conceptos bioquímicos importantes.

El estudio genético de estos organismos se inició a mediados de la década de los 30s, con los estudios realizados por O. Winge sobre el tipo de segregación Mendeliana (Roman, 1981). Posteriormente, en la década de los 60s, surgió un gran interés en determinar el número de cromosomas y la distribución de los genes. El hecho de que las levaduras posean cromosomas pequeños,

las convirtió en modelos adecuados para el estudio de la replicación y estructura del DNA. Todos estos análisis se realizaron inicialmente en Saccharomyces cerevisiae, la levadura de cerveza o de panadería.

La facultad de estos organismos de crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, permitió el estudio de la herencia mitocondrial. Ephrussi en 1949 describió la formación de mutantes citoplásmicas inducidas por acridina y caracterizadas por la formación de colonias de tamaño pequeño (colonias petite). Este tipo de crecimiento se debe a la incapacidad de utilizar sustratos oxidables (glicerol, lactato, etanol) causado por la pérdida de algunos componentes de la cadena respiratoria (Ephrussi, 1953 en Roman, 1981). Se sugirió que en la mitocondria se llevaban a cabo estas mutaciones, por la observación de irregularidades morfológicas y fisiológicas en las mitocondrias. El desarrollo de la genética de este organelo fué impulsado por el descubrimiento de que algunos tipos de resistencia a antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas en bacterias, residen en el DNA mitocondrial, aspecto que ha sido y sigue siendo de valiosa ayuda para los estudios de transmisión y recombinación en la herencia citoplásmica, iniciados por Slonimski y colaboradores en la década de los setentas (Roman, 1981; Ragnini y Fukuhara, 1989).

En la actualidad, se han descrito y caracterizado numerosas mutaciones petite tanto nucleares como mitocondriales (Tzagoloff y Dieckmann, 1990).

Estos son sólo algunos de los aspectos que han convertido a las levaduras en herramientas potenciales para el estudio de algunos fenómenos biológicos. Con el advenimiento de las técnicas del DNA recombinante y de la transformación de levaduras (Hinnen et al., 1978; Bianchi et al., 1987 ; Fabiani et al., 1990 ), se ha incrementado el conocimiento de algunos procesos biológicos como la regulación y transcripción génicas (Sazer y Sherwood, 1990). El descubrimiento de plásmidos, han permitido la construcción de vectores con marcadores de selección útiles en la expresión heteróloga de genes (Macreadie et al. 1991, Hadfield et al., 1990, Tanguy-Rougeau et al., 1990) , además de que sigue patente el interés en descubrir las interrelaciones núcleo-mitocondria en la biogénesis mitocondrial (Grivell,1989).

### 3. Características de las mitocondrias.

Las mitocondrias son organelos de células eucariontes, en los cuales se llevan a cabo numerosas funciones tales como la respiración, fosforilación oxidativa y  $\beta$ -oxidación; poseen material genético y sistemas replicativo y traduccional (Tzagoloff, 1982).

Estos organelos son ovalados, de 1-2  $\mu$  m de largo y 0.5 - 1 $\mu$  m de ancho. Están constituidos por dos membranas separadas que definen dos compartimentos. La membrana externa engloba el contenido entero de la mitocondria. La membrana interna forma una serie de plegamientos o invaginaciones que se proyectan al espacio interno, constituyendo lo que se denominan crestas

mitocondriales, lugar en donde se realiza el proceso de fosforilación oxidativa. Este mecanismo de transducción de energía está catalizado por cuatro complejos respiratorios y por la ATPasa sensible a oligomicina. Importantes componentes de la cadena respiratoria son los citocromos, hemoproteínas que presentan estados reducidos y oxidados que permiten el transporte de electrones hasta el oxígeno.

Entre la membrana externa e interna se encuentra el espacio intermembranal. La matriz mitocondrial está englobada por la membrana interna y en ella se encuentran la mayoría de las enzimas solubles involucradas en vías metabólicas tales como el ciclo de Krebs y los sistemas enzimáticos de la oxidación de ácidos grasos. Además contiene el material genético, RNAs de transferencia, aminoacil transferasas, DNA y RNA polimerasas y otros componentes de la maquinaria transcripcional y traduccional (Tzagoloff, 1982). Aunque la mitocondria tiene su propio material genético, no es genéticamente autosuficiente, ya que la mayoría de las proteínas que definen la estructura y función de la misma, están codificadas por el genoma nuclear. Es por esto que existe un enorme interés en descubrir las interrelaciones que hay entre el núcleo y mitocondria para dar como resultado un organelo funcional (Grivell, 1983).

#### 4. Organización del DNA mitocondrial.

El DNA mitocondrial es una doble hélice de forma circular o lineal. Por su bajo contenido en las bases nucleotídicas

guanina y citosina, posee una densidad de flotación menor que la del DNA nuclear, característica que ha permitido su separación en gradientes de cloruro de cesio.

Se han logrado enormes progresos en definir la naturaleza de la información genética codificada en el genoma mitocondrial (Tzagoloff, 1982). Los genes que posee se han dividido en dos clases principales; la primera corresponde a genes necesarios para la biogénesis de la maquinaria de síntesis de proteínas (genes *syn*) que incluye a los RNAs ribosomales grande y pequeño y a los diferentes RNAs de transferencia. La segunda clase consiste de genes que codifican para proteínas necesarias en el proceso de fosforilación oxidativa (genes *mit*) e incluyen a las subunidades I, II y III de la citocromo oxidasa, al apocitocromo b que pertenece al complejo Coenzima Q- citocromo c reductasa y las subunidades 6, 8 y 9 de la ATPasa sensible a oligomicina. Otros genes que están presentes en el mtDNA de levaduras y que no tienen contraparte en el mtDNA de metazoarios son una endonucleasa involucrada en la transposición de intrones, proteínas (madurasas) requeridas para el procesamiento de intrones (*splicing*), una proteína asociada con la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial y un RNA que forma parte de una enzima procesadora de tRNA semejante a la RNAasa P. Además hay tres marcos de lectura abierta, que no han sido asignados a productos proteicos conocidos (Grivelli, 1989). La tabla I.1 resume los genes mitocondriales identificados en levaduras y mamíferos. La figura 1 muestra la organización del mtDNA humano y el de Saccharomyces cerevisiae.

Tabla I.1 Genes mitocondriales en levaduras y mamíferos. \*

Componente mitocondrial	Producto génico mitocondrial.	
	levaduras	mamíferos
Citocromo c oxidasa subunidades I,II y III	+	+
QH <sub>2</sub> - citocromo c reductasa citocromo b	+	+
ATP sintetasa subunidades 6,8 subunidad 9	+ +	+ -
NADH deshidrogenasa subunidades ND 1-6	-	+
RNA maduradas	+	-
Endonucleasa involucrada en la transposición de intrones	+	-
Componente (RNA) de la enzima semejante a la RNAsa P	+	-
Ribosoma L-rRNA, S-rRNA proteína asociada al ribosoma	+ +	+ -
tRNAs	24	22
Marcos de lectura abiertos	3	-

\* Tomado de Grivell, 1989.

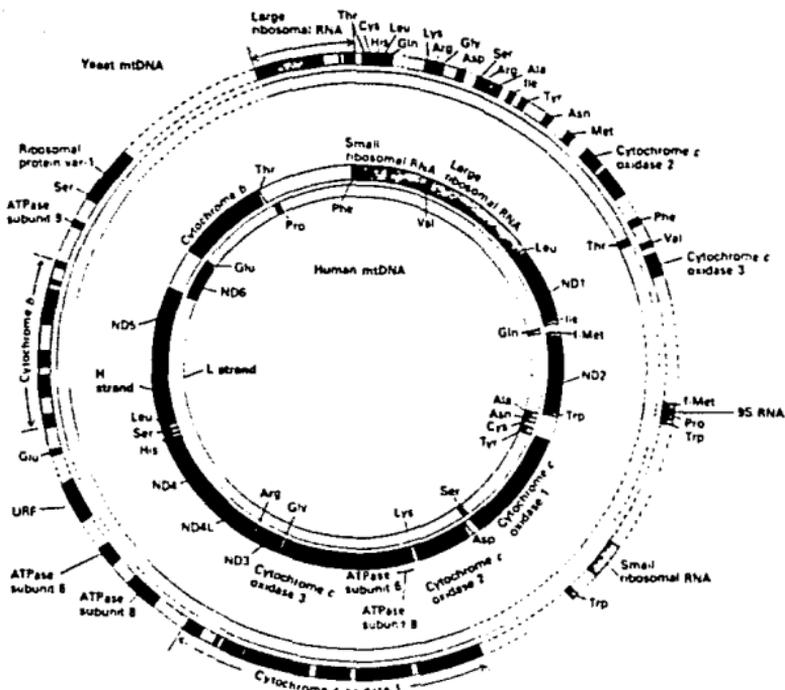


Fig. 1. Organización del DNA mitocondrial humano y de levaduras. (tomado de Darnell *et al.*, 1990).

El mtDNA de levaduras es cinco veces más grande que el de humano y aquí está representado sólo dos veces y media más grande. Las proteínas y RNAs codificados por cada cadena se muestran separadamente. Líneas discontinuas representan regiones no secuenciadas. Regiones oscuras representan los exones de los genes estructurales y los URFs (Open Reading Frames o Unidentified Reading Frames). Los genes que codifican para los RNAs y tRNAs se muestran en gris

En el estudio de los genes mitocondriales es de fundamental importancia mapearlos físicamente. Para cubrir tal aspecto se han utilizado endonucleasas de restricción, proteínas extraídas principalmente de procariontes, que reconocen secuencias específicas dentro de la doble cadena de DNA e introducen un corte. Las enzimas del tipo II, las más utilizadas, introducen un corte en el DNA dentro o cerca de su secuencia de reconocimiento, la cual consiste generalmente de 4 o 6 nucleótidos (Maniatis et al.,1982).

Los mapas físicos muestran la distribución de los sitios de restricción y en ellos se pueden localizar los fragmentos de restricción mínimos que hibridan con sondas que portan alguno de los genes mitocondriales y que han sido marcadas, ya sea con isotopos radioactivos, derivados biotinilados o luminiscencia.

Con los nuevos avances en el análisis genético y secuenciación del DNA, se han localizado los genes mitocondriales en una gran variedad de organismos. Se han encontrado prácticamente los mismos genes en la mayoría de los organismos cuyos genomas mitocondriales han sido estudiados, aunque el arreglo de los mismos dentro de la molécula es muy diferente a lo largo de la escala evolutiva (Clark-Walker,1985).

##### 5. Diversidad en el DNA mitocondrial.

El genoma mitocondrial varía en tamaño, en el número de secuencias no codificadoras (intrones, secuencias intergénicas), en el número y arreglo de los genes que codifican para proteínas,

en el número de moléculas de DNA por genoma, en la presencia o ausencia de intrones y en el código genético (Suyama y Miura, 1968; Clark-Walker, 1985).

En cuanto al tamaño, éste varía ampliamente; desde 16-19 Kb. en el mtDNA de animales, con prácticamente ningún tipo de secuencia intergénica, hasta las 2400 Kb en el mtDNA de algunas especies de melón (Ward et al., 1981). Aún dentro de representantes de una misma especie, hay grandes variaciones, como en el caso del género de levadura Dekkers (cuyo estado asexual corresponde a Brettanomyces), que muestran variaciones de 28-100 Kb (McArthur y Clark-Walker, 1983; Hoeben y Clark-Walker, 1986). Ya que se han encontrado prácticamente los mismos genes mitocondriales, esta variabilidad depende principalmente de las regiones intergénicas e intrones (Clark-Walker et al., 1983a).

#### 6. Aspectos sistemáticos de las levaduras.

Además de ser vistas las levaduras como modelos de estudio de células eucariotas, sigue patente el interés por parte de taxónomos, en construir árboles filogenéticos y clasificar a las mismas.

La descripción general de una especie proporciona las características por las que puede ser definida, las cuales son morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, ecológicas. Se han diseñado numerosos tipos de pruebas para determinar las especies dentro de las levaduras. Aparte de las características morfológicas, las más comunes son los patrones de asimilación y

fermentación de diversos compuestos de carbono y la interfertilidad entre las cepas.

Una levadura que crece en una fuente de carbono puede ser capaz de fermentarla o utilizarla para la respiración; es común que cuando una cepa utiliza un carbohidrato fermentativamente, también es capaz de oxidarlo. Las levaduras varían en su capacidad de fermentar azúcares, la fermentación es indicada por la producción de bióxido de carbono bajo condiciones que permiten la utilización del azúcar.

La delimitación de las especies con base en su interfertilidad acepta que si dos cepas son capaces de cruzarse y formar progenie híbrida viable (viabilidad de las ascosporas), aquéllas pertenecen a la misma especie.

El uso de criterios de entrecruzamientos para la delimitación de especies de levaduras perfectas fué implementada a raíz de los estudios de Wickherman y Burton en 1954, quienes demostraron que algunas especies imperfectas constituyen los factores sexuales complementarios de especies ascógenas heterotálicas (van der Walt y Yarrow, 1984). Estos estudios tuvieron un gran impacto en la sistemática de las levaduras, ya que permitieron la separación o la unificación de los diversos grupos taxonómicos.

Otro tipo de estudios fisiológicos realizados para la identificación de las levaduras comprenden: requerimientos de factores de crecimiento, crecimiento a temperaturas elevadas y en

medios con altos contenidos de azúcares (glucosa) o sales (NaCl), formación de metabolitos y la susceptibilidad a antibióticos (van der Walt y Yarrow, 1984).

En años recientes se han considerado, además de los criterios convencionales, las semejanzas y diferencias que se presentan en las macromoléculas, ya sean proteínas o ácidos nucleicos, e incluyen homologías en el DNA nuclear, homologías rRNA-DNA (Kurtzman y Robnett, 1991), patrones de aloenzimas, comparaciones inmunológicas de proteínas, análisis serológicos de paredes celulares y comparaciones en el sistema de coenzima Q.

Estos estudios han aportado importantes datos para la sistemática, aunque cada uno se ha limitado a ciertos niveles de la organización taxonómica.

Las comparaciones de ácidos nucleicos inicialmente se restringieron a la composición de bases, reportado como porcentaje medio molar de guanina + citosina. Este valor se determina por procedimientos de desnaturalización térmica o por determinaciones de densidad de flotación en gradientes de CsCl (Phaff, 1984). Aunque estos valores pueden ser índices de parentesco entre grupos de levaduras más o menos alejados, su utilización se dificulta en grupos de levaduras más cercanos debido a su composición de bases más similar.

Posteriormente se realizaron experimentos de reasociación DNA-DNA, los cuales han sido de utilidad en la determinación de las especies (Vaughan Martini, 1991); los valores de reasociación mayores del 80% indican coespecificidad, valores entre 65-80%, los más comúnmente observados, se considera que representan cepas

más diferenciadas dentro de una especie y aquellos valores menores del 20% indican que las cepas están lejanamente relacionadas. Los valores comprendidos entre 20 y 35% son difíciles de interpretar (Phaff, 1984).

Los estudios taxonómicos que utilizan proteínas son de dos tipos principales: el análisis del sistema de Coenzima Q, el cual se basa en la variación en el número de unidades isoprenoides por molécula. Este criterio está restringido a la separación entre ascomicetos y basidiomicetos (Yamada y Kondo, 1972 en van der Walt y Yarrow, 1984).

El otro tipo de estudio analiza las variaciones en las isoenzimas, que considera que la diversificación es una función del tiempo, por lo tanto, aquellos organismos que se hayan separado recientemente deben mostrar un alto grado de semejanza entre sus moléculas. Este tipo de estudios ha sido de más utilidad en el establecimiento de relaciones intraespecíficas (Lachance, 1985).

#### 7. Estudios taxonómicos de levaduras pertenecientes al género Kluyveromyces.

El género Kluyveromyces ha sido sujeto de algunas investigaciones taxonómicas, principalmente a raíz de la reclasificación propuesta por van der Walt y Johannsen (van der Walt y Johannsen, 1984). La tabla I.2, resume la clasificación realizada por varios investigadores, cuya descripción se hace a continuación.

Tabla 1.2 Nomenclatura y clasificaciones propuestas para cepas tipo del género Kluyveromyces\*

Designación taxonómica	Clasificación por:		
	Fenotipo	Reasociación de DNA	Interfertilidad nuclear
<u>K. aestuarii</u>	B2	<u>K. aestuarii</u>	<u>K. aestuarii</u>
<u>K. vanudenii</u>	B2	<u>K. lactis</u>	<u>K. marxianus</u>
<u>K. phaseolosporus</u>	B1-B2	<u>K. lactis</u>	<u>K. marxianus</u>
<u>K. lactis</u>	B2	<u>K. lactis</u>	<u>K. marxianus</u>
<u>K. drosophilaram</u>	B2	<u>K. lactis</u>	<u>K. marxianus</u>
<u>K. dobzhanskii</u>	B2	<u>K. dobzhanskii</u>	<u>K. marxianus</u>
<u>K. wikenii</u>	B1	<u>K. marxianus</u>	<u>K. marxianus</u>
<u>K. fragilis</u>	B1	<u>K. marxianus</u>	<u>K. marxianus</u>
<u>K. marxianus</u>		<u>K. marxianus</u>	<u>K. marxianus</u>
<u>K. cicerisporus</u>		<u>K. marxianus</u>	<u>K. marxianus</u>
<u>K. bulgaricus</u>		<u>K. marxianus</u>	<u>K. marxianus</u>
<u>K. waltii</u>	---	---	( <u>K. marxianus</u> )
<u>K. wickerhamii</u>	B1-B2	<u>K. wickerhamii</u>	( <u>K. marxianus</u> )
<u>K. thermotolerans</u>	N	<u>K. thermotolerans</u>	( <u>K. marxianus</u> )
<u>K. phaffi</u>	A	( <u>K. phaffi</u> )	<u>K. phaffi</u>
<u>K. polysporus</u>	A	<u>K. polysporus</u>	<u>K. polysporus</u>
<u>K. delphensis</u>	A	( <u>K. delphensis</u> )	<u>K. delphensis</u>
<u>K. lodderi</u>	A	<u>K. lodderi</u>	<u>K. lodderi</u>
<u>K. blattae</u>	---	---	<u>K. blattae</u>
<u>K. africanus</u>	A	( <u>K. africanus</u> )	<u>K. africanus</u>

A Taxa aislados principalmente de suelos

B Taxa aislados de varios habitats

El subgrupo B2 utiliza los  $\alpha$ -glucósidos más activamente que el subgrupo B1

N No miembro del género

( ) Paréntesis indican bajos niveles de hibridación

- Cepas no disponibles cuando se realizaron los estudios

\* Tomado de Sidenberg & Lachance, 1983

La clasificación del género Kluyveromyces se inició con la creación del mismo, que incluía una especie, K. polysporus (van der Walt, 1956). Posteriormente van der Walt en 1970 reconoció 18 especies .

Poncet en 1973 (Poncet, 1973 ), dividió el género en dos grupos principales (primera columna): el grupo A comprende taxa que fueron aislados principalmente de suelos y el grupo B comprende taxa aislados de varios sustratos. Este grupo lo subdividió en dos subgrupos dependiendo de su crecimiento en  $\alpha$ -glucósidos. El B2 utiliza estos carbohidratos más activamente que los del grupo B1. Además hay dos especies intermedias entre estos grupos.

Estudios de reasociación de DNA (Phaff,1980; Vaughan Martini,1987), y composición de bases de DNA nuclear (Martini et al., 1972 ; Martini y Phaff,1973), llegaron a conclusiones similares (segunda columna) .Estos autores separan las especies en tres grupos principales: 4 especies agrupadas como K. lactis (K. lactis, K. vanudenii, K. phaseolusporus y K. drosophilorum), 5 especies como K. marxianus (K. wikenii, K. fragilis, K. marxianus , K. cicerisporus y K. bulgaricus) y el resto consideradas especies aisladas.

Johannsen (Johannsen,1980), basándose en estudios de entrecruzamiento entre varias especies del género reordenó este taxón (tercera columna),agrupando diez especies como variedades de la especie única K. marxianus, tres especies (paréntesis) separadas pero muy relacionadas y 7 especies independientes. Este

estudio se basó en experimentos de entrecruzamiento que involucraron el uso de mutantes auxotróficas de todas las especies aceptadas dentro del género; las mutantes fueron obtenidas por tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina ( mutágeno que realiza mutaciones puntuales) y se consideraron frecuencias de recombinación significativas de  $10^3$  o más, por  $10^8$  células de la población inicial ( Johannsen y van der Walt, 1978; Johannsen,1980 ; van der Walt y Johannsen, 1984 ).

Otros investigadores han realizado estudios sobre la clasificación de este género. El grupo de Lachance, examinó los patrones electroforéticos de 11 isoenzimas, algunas de ellas son: alcohol, lactato y malato deshidrogenasas; catalasas,  $\alpha$ -glucosidasas,  $\beta$ -glucosidasas. Este autor considera que los subgrupos K. lactis y K. marxianus deben considerarse como poblaciones distintas evolutivamente (especies biológicas), a pesar de su capacidad de formar híbridos en condiciones de laboratorio. En términos de nomenclatura, se deben de retener las especies K. lactis (con 4 variedades) y K. marxianus con 5 variedades (Sidenberg y Lachance, 1983; Lachance,1985; Sidenberg y Lachance, 1986).

Otro tipo de estudios taxonómicos realizados con este género se basan en el análisis de patrones electroforéticos de DNA cromosómico (Steensma et al.,1988; Sor y Fukuhara,1989). En este estudio se utiliza la técnica de separación de cromosomas

por electroforesis en campo ortogonal (OFAGE : Orthogonal field alternation gel electrophoresis).

Estos investigadores analizaron la segregación de marcadores y los patrones de DNA cromosómico de cepas del género, tanto parentales como los híbridos producto de cruza entre K. marxianus y K. lactis.

Observaron que a pesar de que en las cruza se formaron híbridos y que éstos tuvieron descendientes viables, no hubo intercambio de información genética. En Saccharomyces cerevisiae, la recombinación entre cromosomas homólogos de diferentes tamaños es detectado por la formación de bandas de tamaño intermedio en los cariotipos de los híbridos y de su progenie así como la segregación de marcadores.

La ausencia de estos patrones en las cruza realizadas dentro del género Kluyveromyces sugiere una barrera que previene el intercambio de material genético entre cepas de K. marxianus y K. lactis.

En cuanto al DNA mitocondrial de cepas pertenecientes al género, el grupo de Fukuhara ( Ragnini y Fukuhara, 1988), describió la presencia de agrupamientos ricos en las bases guanina y citosina, caracterizados por numerosos sitios de restricción para las endonucleasas Hap II y Sac II , los cuales, al ser secuenciados demostraron formar parte de estructuras palindrómicas. Estos agrupamientos están presentes en las variedades de K. lactis (considerando la clasificación por reasociación de DNA), mientras que en las variedades de K. marxianus están ausentes.

La presencia de estas estructuras se considera que es una característica que distingue cepas de K. lactis de cepas de K. marxianus.

Tomando en consideración éstos estudios, los autores proponen dividir al género en 3 especies distintas, i.e., K. marxianus, K. lactis y K. dobzhanskii.

Un análisis más profundo del DNA mitocondrial, patrones de restricción, localización de genes para los que codifica, (ya que se sabe que el orden y distancia entre gen y gen varía de especie a especie) y el análisis de su secuencia, podrá aportar nuevos datos para la clasificación de las especies del género, así como para determinar qué tanta información puede aportar el DNA mitocondrial para la taxonomía.

## II. OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo es comparar la composición y estructura del mtDNA de cepas de levaduras pertenecientes al género Kluyveromyces, para establecer su posición taxonómica, considerando también criterios de otra índole, como morfológicos y bioquímicos.

Con tal fin, se establecieron los siguientes objetivos particulares:

- Caracterizar morfológica y fisiológicamente las cinco cepas que comprendieron este estudio.
- Comparar los patrones de restricción de DNA mitocondrial purificado por gradientes de cloruro de cesio.
- Construir mapas de restricción para localizar variaciones en el número y tamaño de los fragmentos generados.
- Localizar secuencias putativas para los genes mitocondriales que codifican para las subunidades 6 (olí 2) y 9 (olí 1) de la ATPasa mitocondrial, apocitocromo b y las subunidades ribosomales pequeña y grande (rRNA 15S y rRNA 21S respectivamente).
- Determinar las variaciones en el arreglo y distribución de los genes arriba mencionados.
- Establecer el valor taxonómico de los estudios del DNA mitocondrial para la clasificación de las especies del género.

### III. METODOLOGIA

En la tabla III.1 se describen las cepas de levaduras del género Kluyveromyces estudiadas a lo largo de este trabajo.

Tabla III.1 . Cepas estudiadas de la levadura Kluyveromyces.

Designación taxonómica.	Cepa No.	Origen.
<u>K. fragilis</u>	L-278 (a)	Desconocido.
<u>K. fragilis</u> (T)	Y-2415 (b)	Aislado de yogurt.
<u>K. bulgaricus</u> (T)	YB-4327 (b)	Aislado de yogurt.
<u>K. bulgaricus</u>	I.B. (c)	Aislado de pulque.
<u>K. lactis</u> (WM37)*	L-668 (a)	Mutante auxótrofa His <sup>-</sup> de la cepa NRRL Y-1140
<u>K. vanudenii</u>	Y-6682 (b)	Desconocido.

(a) Cepas donadas por la Dra. Jovita Martínez. Colección Microbiana del CINVESTAV, Unidad Zacatenco. IPN. México.

(b) Cepas donadas por el Dr. C. P. Kurtzman. Northern Regional Research Center. Peoria, Illinois.

(c) Cepas donadas por la Dra. Patricia Lappe. Instituto de Biología. UNAM. México.

(T) Cepa tipo.

\* Cepa descrita en Biochem. Biophys. Res. Comm. 61:613-620, 1974.

Nota: En algunos de los trabajos realizados en ésta tesis, también se incluyeron como comparación las cepas K. marxianus I.B. de la colección del Inst. Biol. UNAM; K. drosophilae (NRRL Y-8279) y K. fragilis L-667 (NRRL Y-7571).

## 2. Medios de Cultivo

YPD	
Peptona de gelatina	1%
Extracto de levadura	1%
Glucosa	2%

YPD Sólido	
lo anterior mas agar	2%

Extracto de Malta Agar (medio para favorecer la esporulación).	
Extracto de Malta	5%
Agar	3%

LB		LB + Ampicilina 70 µg/ml
Cloruro de sodio	1%	
Extracto de levadura	0.5%	LB + Tetraciclina
Bactotripton	1.0%	15µg/ml
Agar	2 %	

SD	
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos.	0.67%
Glucosa	2%
Agar	2%

YPG		YPG + Paromomicina
Extracto de levadura	1%	2 mg/ml pH 6.5
Peptona de gelatina	1%	
Glicerol	3%	

### 3. Tiempos medios de duplicación.

Se determinaron las curvas de crecimiento de cada una de las cepas y a partir de ellas se calcularon los tiempos medios de duplicación.

Se emplearon matraces nefelométricos con 50 ml de YPD inoculados con  $1 \times 10^6$  células / ml. El crecimiento se determinó midiendo la absorbancia en un fotocolorímetro Klett con filtro rojo. Las lecturas se hicieron cada 30 min. por un período de 15 horas.

Se trazaron las gráficas correspondientes en papel semilogarítmico y se calcularon los tiempos medios de duplicación.

### 4. Espectros de citocromos.

Se determinaron los espectros diferenciales de absorción de citocromos de cada una de las cepas.

Se utilizaron tanto mitocondrias como células completas crecidas hasta la fase exponencial tardía.

Para las muestras mitocondriales se emplearon 5 mg/ml de protefna, glicerol al 30% y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 7.2 para completar a un volumen de 1 ml. Se utilizó, para la muestra oxidada,  $10^{-4}$  l de ferricianuro de potasio 100 mM y para la reducida ditionita (hidrosulfito de sodio) en exceso.

La absorción se midió a temperatura ambiente en un espectrofotómetro SLM-AMINCO de doble rayo modelo DW-2000 , en un rango de longitud de onda de 400 a 700 nm.

El contenido de citocromos en células completas se determinó en una dilución de  $0.35 \times 10^7$  células/ ml y como blanco se empleó leche descremada al 10%.

#### 5. Caracterización morfológica de esporas.

Las cepas se purificaron por colonias individuales en medio YPD.

Posteriormente se sembraron en medio de extracto de malta para favorecer la esporulación. Se realizaron observaciones diarias al microscopio con contraste de fases por un período de una semana y se registraron la forma y número de esporas por asca.

#### 6. Purificación de DNA mitocondrial.

El método utilizado es una modificación del descrito por Hudspeth (Hudspeth et al., 1980).

Cada una de las cepas se cultivó en medio YPD hasta la fase exponencial tardía (aproximadamente 18 hrs.). Después de este tiempo, se cosecharon las células por centrifugación a 3 000 rpm. durante 5 minutos , utilizando el rotor GSA de la centrífuga

Sorvall RC-50. Se lavaron 2 o 3 veces con agua destilada y una vez con sorbitol 1.2 M . Se resuspendieron en 3 veces su peso, en el siguiente amortiguador de digestión:

30.0 ml	Sorbitol 2M
0.1 ml	EDTA 0.5 M
7.5 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.5M pH 7.5
0.5 ml	$\beta$ -mercaptoetanol
1-2 mg	zimoliasa/ g de células.

Se incubaron a 35°C y cada 15 minutos se hicieron diluciones 1:50 ,para comprobar al microscopio la formación de protoplastos, que se manifiesta por la aparición de células negras en contraste de fases. Cuando la digestión de la pared celular fué completa (protoplastos), se lavaron dos veces en 2-3 volúmenes de sorbitol 1.2 M y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min. Posteriormente se homogenizaron durante 1 min. en licuadora en 75 ml de amortiguador de sorbitol 0.6 M, Tris-HCl 0.06 M pH 7.5, EDTA 1 mM, BSA 0.1% y se mantuvieron a -20°C durante 3 min.. Estos pasos se repitieron hasta observar al microscopio abundante contenido celular en suspensión. El homogenado se centrifugó a 2500 rpm recuperándose el sobrenadante (principalmente mitocondrias y restos de pared celular). El precipitado se homogenizó una vez más y se recuperó el sobrenadante.

Las mitocondrias se purificaron por centrifugaciones alternadas a 16,000 rpm durante 10 min. en el rotor SS34 (para recuperar las mitocondrias) y 2,500 rpm. 10 min. para eliminar núcleos, membranas y otros desechos celulares. Los precipitados mitocondriales, de cada una de las centrifugaciones de alta velocidad, se resuspendieron en amortiguador de sorbitol 0.9 M,

Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM. El último de estos precipitados se resuspendió en TEN-sarcosil:sarcosil (N-lauril sarcosina) 2%, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, NaCl 0.1 M, EDTA 10 mM), para lisar las mitocondrias. Se agregaron 5.91 g de cloruro de cesio (CsCl) / 5 ml de lisado mitocondrial y se incubó toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 15,000 rpm durante 30 min., para eliminar la capa de proteínas que se forma al mantener en refrigeración, y se ajustaron los índices de refracción a 1.3947-1.3960. Para visualizar los ácidos nucleicos, se agregaron 200 µl del colorante bis-benzimida (100 mg/ml).

Las muestras se centrifugaron a 40,000 rpm durante 16 hrs en el rotor Vti 65.1. Las bandas (mtDNA o DNA nuclear) se visualizaron con luz UV de onda larga (312 nm), y se extrajeron con una jeringa. El colorante se eliminó con isopropanol saturado con TE ( Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM) y CsCl. La muestra se diluyó con 2 volúmenes de TE y los ácidos nucleicos se precipitaron agregando 3 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato de sodio 3M pH 4.5, e incubando 30 min a -70°C en un baño de hielo seco-etanol. Después se centrifugó a 13,000 rpm., 20 min., rotor SS34. El precipitado se resuspendió en 200 µl de TE, se precipitó una segunda vez, centrifugando en ésta ocasión a 14,000 rpm. durante 10 min. El precipitado se lavó con etanol al 70%, para eliminar el exceso de sales y se quitó el alcohol con vacío. El liofilizado se resuspendió en TE.

Una alícuota de los ácidos nucleicos obtenidos se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% a 80 volts. Cuando

las muestras contenían RNA, se trataron con 5  $\mu$ l de RNAasa, 5 mg/ml y se incubaron 30 min. a 37°C. Las proteínas se extrajeron sucesivamente con fenol, fenol-cloroformo y cloroformo. El DNA contenido en el sobrenadante se recuperó como en los pasos anteriores.

## 7. Construcción de los mapas de restricción.

### 7a. Digestión del DNA mitocondrial.

El DNA mitocondrial se cortó con enzimas de restricción, de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial (Bethesda Research Laboratories, BRL).

Se hicieron digestiones sencillas, dobles o triples, a fin de resolver la disposición de los fragmentos en la molécula original. Cada mezcla de reacción se preparó en un volumen total de 10  $\mu$ l. Por ejemplo:

1.0  $\mu$ l muestra de DNA (los g fueron variables).

1.0  $\mu$ l amortiguador de digestión 10X.

0.5  $\mu$ l enzima de restricción (dependiendo de la actividad de la enzima).

7.0  $\mu$ l agua bidestilada estéril.

Se incubaron las mezclas durante 2-3 hrs a la temperatura de actividad óptima. Para el caso de digestiones dobles o triples, primero se incubó con la enzima que requería menor concentración de sales; después de la incubación, se agregó la segunda enzima, con la cantidad de sales óptima para dicha enzima y se incubó a la temperatura recomendada.

Para interrumpir la digestión, se agregaron 2  $\mu$ l de una mezcla que contiene ficol 35%, SDS 0.5%, azul de bromofenol 0.1% y xilen-cianol 0.1% .

#### 7b. Electroforesis.

Los fragmentos generados se separaron en geles de agarosa al 0.8% a 80-100 volts , utilizando como marcador de peso molecular DNA del fago  $\lambda$  cortado con HindIII + DNA del fago  $\phi$ X174 cortado con HaeIII.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio(0.5 $\mu$ g/ml) y se fotografiaron con una cámara Polaroid provista de un filtro anaranjado.

Para determinar el peso molecular de bandas mayores de 6 Kb, se hicieron electroforesis en geles de agarosa al 0.4%, utilizando marcadores de peso molecular alto, y aplicando una corriente de 10 volts/cm<sup>2</sup>.

#### 7c. Análisis de los fragmentos.

El mapeo de los fragmentos de restricción obtenidos, se realizó con una modificación al método de Fitch (Fitch et al., 1983) y consistió en lo siguiente:

Se eligió arbitrariamente la coordenada cero con la primera enzima usada (preferentemente aquella que tuviera sitio único de reconocimiento en la molécula de DNA). Posteriormente, se realizaron dobles digestiones, utilizando la primera enzima, con otra que tuviera más sitios de reconocimiento. Los productos se sometieron a electroforesis y se analizó qué banda se cortaba con

la enzima de sitio único. La suma del peso molecular de los fragmentos nuevos será igual al peso molecular de la banda que se cortó. Entonces se localiza en el mapa de restricción el corte de la banda. Para determinar la orientación de la banda y la disposición de los fragmentos restantes, se diseñaron digestiones con otras enzimas de restricción.

Del número de fragmentos de digestiones sencillas y dobles, se puede determinar la forma de la molécula de DNA. Si el DNA es circular, la suma de los fragmentos obtenidos en digestiones separadas, con una sola enzima, es igual a la suma de los fragmentos obtenidos en una digestión doble con las mismas enzimas. Si el DNA es lineal, la suma de los fragmentos de digestiones sencillas es igual a la suma menos uno, de los fragmentos en la doble digestión.

#### 8. Elaboración de una sonda para la localización de la subunidad ribosomal 15S.

El esquema general de este trabajo se presenta en la figura (1).

La sonda se preparó a partir de la mutante petite DS80 de S. cerevisiae, descrita por Li (Li et al., 1982).

Esta mutante posee un mrDNA de 2.6 kilobases, que contiene el gen que codifica para el rRNA 15S, adyacente al sitio que le confiere resistencia al antibiótico paromomicina. Se corroboraron las características fisiológicas de esta mutante, principalmente la resistencia a este antibiótico, realizando una cruce con la cepa D311-3A de S. cerevisiae.

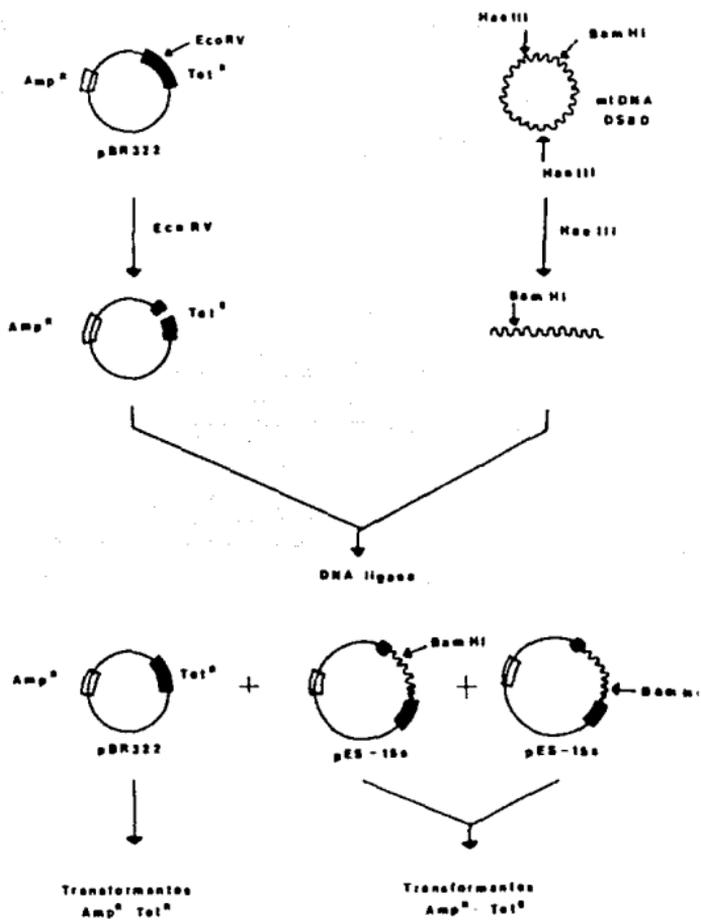


Fig. 1. Clonación de la subunidad ribosomal 15S de *S. cerevisiae*, para su utilización como sonda.

La cepa petite no crece en sustratos oxidables (glicerol, lactato o etanol) y es resistente a paromomicina; mientras que la cepa silvestre es sensible al antibiótico y presenta crecimiento normal en sustratos no fermentables. Las características de estas dos cepas son las siguientes:

DS80            \* ,met-, par<sup>R</sup>, crecimiento nulo en glicerol.  
D311-3A        a, try-, leu-, lys-, par<sup>S</sup>, crecimiento normal  
                  en glicerol.

Se cruzaron las cepas en medio líquido YPD, con agitación suave; se verificó al microscopio la formación de cigotos, y la muestra se plaqueó en medio mínimo (SD). Las colonias que crecieron en este medio, se replicaron en medio YPG y en medio YPG + paromomicina. Se incubaron a 30°C por 24 hrs. Las colonias que crecieron, fueron clonas diploides, ya que cada una complementó las mutaciones de la otra, por lo tanto tienen crecimiento normal en sustratos no fermentables (YPG), ningún marcador de auxotrofia (crecimiento en medio mínimo) y son resistentes a paromomicina. El número de colonias resistentes al antibiótico no es el 100%, ya que la resistencia se debe a una mutación mitocondrial y por lo tanto hay segregación mitótica de este carácter en las diploides. Con estas pruebas se comprobó que la DS80 contiene el gen del rRNA 15S.

Se obtuvo el mtDNA por el procedimiento anteriormente descrito (apartado 6) y se cortó con la enzima de restricción

HaeIII. Esta enzima produce dos fragmentos de 1.3 Kb, uno de los cuales posee un sitio para la enzima BamHI que se localiza dentro de la secuencia del gen. Se separaron los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio 5µg/ml.

#### 8a. Electroelución.

Se recuperó el fragmento que lleva el gen del rRNA 15S por electroelución. Una vez que los frsgmentos generados por digestión con la enzima Hae III se separaron suficientemente durante la electroforesis, se hizo una ranura inmediatamente por debajo de la banda de interés, en la cual se insertaron una tira de papel filtro 3MM (del lado de la banda) y una tira de membrana de diálisis. Se reanudó la electroforesis y se continuó hasta que la banda de DNA se absorbiera en el papel filtro, quedando el DNA retenido por la membrana de diálisis. Cuando la absorción se completó, el DNA se recuperó, centrifugando el papel en un tubo Eppendorf de 0.5 ml al cual se le había hecho un orificio en la parte inferior y se había insertado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugó el papel y se recuperó la muestra, lavando el papel varias veces con TE.

#### 8b. Preparación del vector de clonación.

Se cortó el plásmido pBR322 (Bolívar et al., 1977) con la enzima EcoRV, cuyo sitio único se localiza en el gen que confiere resistencia al antibiótico tetraciclina. Posteriormente se

desfosforiló con fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) en las condiciones que recomiendan los proveedores. Se incubó la mezcla a 37°C durante 90 min. La fosfatasa alcalina remueve los fosfatos 5' terminales del DNA para prevenir la recircularización. Terminada la reacción, se calentó 5 min a 70°C, para inactivar a la enzima y se agregó "stop mix". El plásmido linealizado y desfosforilado se electroeluyó como se describió anteriormente (inciso 8a.).

#### 8c. Ligación

Se determinó la concentración de plásmido y de inserto (fragmento HaeIII-HaeIII de 1.3 Kb del mtDNA de la cepa DS80).

La mezcla de ligación contenía una relación de concentración molar 1:1 de vector e inserto, amortiguador de ligación (Tris-HCl 25 mM pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 10mM, ditiotreitól (DTT) 2 mM, ATP 4 mM) y DNA ligasa del bacteriófago T4. Se incubó 2 hrs a 20°C. Cuando se observaron formas multiméricas del plásmido (plásmido recircularizado) se detuvo la reacción congelando a -20°C.

#### 8d. Preparación de células competentes de la cepa HB-101 de

E. coli con CaCl<sub>2</sub> .

Las células se hicieron competentes por tratamiento con cloruro de calcio de acuerdo al método descrito por Mandel y Higa (Mandel y Higa, 1970).

Se hizo un cultivo de la cepa HB-101 de E. coli en 100 ml de medio LB y se incubó a 37°C hasta llegar a 100 unidades Klett. Posteriormente, se incubó 10 min. en hielo. Se recuperaron las células por centrifugación a 4000 rpm. por 5 min., y se lavaron en una solución de CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Se resuspendieron en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se incubaron a 4° C durante 20 min., después de lo cual se centrifugaron y se resuspendieron en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Se dejaron toda la noche en hielo a 4°C.

#### 8e. Transformación

Se mezclaron 100 µl de células competentes, 49µl de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y 1 µl del DNA recombinante que se construyó. Se mantuvo la mezcla en hielo durante 20 min. y se dió un choque térmico de 2 min a 45°C. Se agregaron 1.35 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 90 min, se plaquearon las muestras en medio sólido de LB con ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche. Se replicaron las colonias que crecieron en medio sólido de LB con tetraciclina.

Las transformantes se seleccionaron por su resistencia a ampicilina y sensibilidad a tetraciclina ( el inserto se introdujo en el sitio de resistencia a tetraciclina, por lo tanto este gen quedó inactivado).

#### 8f. Selección de plásmidos recombinantes.

Se escogieron 30 clonas al azar para purificar el plásmido recombinante, siguiendo el método de lisis con detergente a pequeña escala (miniprep). Cada clona se creció

independientemente en placas de medio LB + Amp. durante una noche. Se resuspendieron las células en 350  $\mu$ l de amortiguador STET ( sacarosa 8%, tritón X-100 5%, EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0). y se agregaron 30  $\mu$ l de STET + lisozima (10mg/ml lisozima en STET). Se calentó la mezcla en un baño de agua hirviendo, durante 5 min. . Se centrifugó en frío por 15 min. Los ácidos nucleicos del sobrenadante se precipitaron con isopropanol a -70°C durante 15 min. Se recuperó el precipitado por centrifugación y se resuspendió en TE . Se realizó una segunda precipitación con una mezcla de etanol-acetato de sodio (50 ml de etanol- 8 ml de NaOAc 3M) a -70°C por 15 min. El precipitado se recuperó por centrifugación por 10 min, se lavó con etanol al 70% , se secó al vacío y se resuspendió en TE.

Los plásmidos de cada clona se digirieron con la enzima BamHI para escoger las clonas que llevaran el gen. De acuerdo al mapa de restricción del plásmido y del inserto; aquellas clonas que rindieran fragmentos de 4.4 y 1.2 kb o 5.2 y 0.4 kb son las que llevan el gen.

Se escogió una clona (clona 5) que presentó el primer patrón y de la cual se obtuvo la sonda.

**Sg. Purificación a mediana escala de plásmidos recombinantes.**

Se utilizó el método Melton-Prep, para la producción y purificación a mediana escala de los plásmidos recombinantes que llevan los genes que se desean localizar.

Se hizo un cultivo de una noche a 37°C de la clona que lleva el plásmido recombinante seleccionado, se colectaron las células por centrifugación y se lavaron una vez con NaCl 10 mM. Las células se lisaron incubando en hielo por 20 min. en 0.6 ml de Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, sacarosa al 15% y 2 mg/ml de lisozima. Se agregó 1.2 ml de NaOH 0.2 M, SDS al 1% y se prosiguió la incubación por 10 min. Posteriormente se agregaron 0.75 ml de NaOAc 3M pH 4.8 y se incubó en hielo por 20 min. Se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min. El sobrenadante, conteniendo el DNA de los plásmidos, se trató con 5µl de RNAasa A (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 20 min. Las proteínas se extrajeron dos veces con volúmenes iguales de fenol-cloroformo, centrifugando a 5000 rpm por 5 min. para separar las fases. De la fase superior se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol por 2 min a temperatura ambiente y se recuperó por centrifugación a 8500 rpm. por 10 min. , después se lavó con etanol al 70% y se secó con vacío. El DNA se disolvió en 160µl de agua destilada y se agregaron 40µl de NaCl 4M, se mezcló y se precipitó con 200µl de PEG 8000 al 13% por una hora en hielo. Se eliminó el polietilenglicol centrifugando por 10 min y el precipitado se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en TE.

9. Obtención y marcaje con derivados biotinilados de las sondas para hibridaciones.

Las sondas que se utilizaron fueron las siguientes:

Sonda	Origen
oli 1 (subunidad 9 de la ATPasa mitocondrial).	Mutante petite DS400 A3 de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> Donación Dr. A. Tzagoloff.
oli 2 (Subunidad 6 de la ATPasa mitocondrial).	Mutante petite DS14 de <u>S. cerevisiae</u> Donación Dr. A. Tzagoloff, (Macino & Tzagoloff, 1980)
cit b (Apocitocromo b)	<u>Kluyveromyces lactis</u> WM37.
Rib 15S (rRNA 15S)	Mutante petite DS80 de <u>S. cerevisiae</u> . Donación Dr.A. Tzagoloff.
Rib 21S (rRNA 21S)	<u>K. lactis</u> WM37 Plásmido pKLM 15/4 Donación Dr. H. Fukuhara.

Los plásmidos recombinantes se cortaron con diferentes enzimas de restricción, dependiendo del gen que se clonó. A continuación se describen las características de las sondas.

Sonda	Plásmido recombinante.	Enzima	Tamaño de la sonda (Kb)
oli 2	pLO-4 y pLO-11	HindIII+NheI	1
oli 1	pMZ-oli 1	HapII	1
cit b	pWM37-10H	KpnI+SstII	1
rRNA 15S	pES-15S	HapII	1.2
rRNA 21S	pKLM 15/4	NheI+Sall	3.5

Los plásmidos se digirieron con la enzima indicada y el fragmento correspondiente a la sonda se electroeluyó de la forma anteriormente descrita (inciso 8a.)

Los fragmentos se marcaron por el método de "Nick-Translation", utilizando derivados biotinilados ,conforme a las indicaciones de la casa comercial (BRL). Se usó dUTP marcado con biotina. En un tubo Eppendorf se mezclaron 20  $\mu$ l de la sonda, 5 $\mu$ l de solución A4 (mezcla de desoxiribonucleótidos excepto el biotinilado), 2.5  $\mu$ l dUTP biotinilado ,17.5  $\mu$ l de solución E (agua destilada). Se mezcló suavemente y se agregaron 5  $\mu$ l de solución C (DNA polimerasa I y DNAasa), se mezcló y se incubó a 15°C por 90 min. La reacción se detuvo con la solución D, (EDTA 300 mM). El DNA se precipitó de la forma anteriormente descrita.

10. Hibridación del mtDNA de las cepas de Kluyveromyces con las sondas marcadas con derivados biotinilados. -

El proceso de hibridación consiste de 4 pasos principales y se basa en la técnica descrita por Southern (Southern,1975) Fig.2

- a) Desnaturalización del DNA.
- b) Transferencia del mtDNA a membranas de nylon.
- c) Hibridación con la sonda y
- d) Revelado de las bandas que hibridaron.

10a. Desnaturalización del DNA.

El DNA mitocondrial cortado con enzimas de restricción se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, se tiñó con

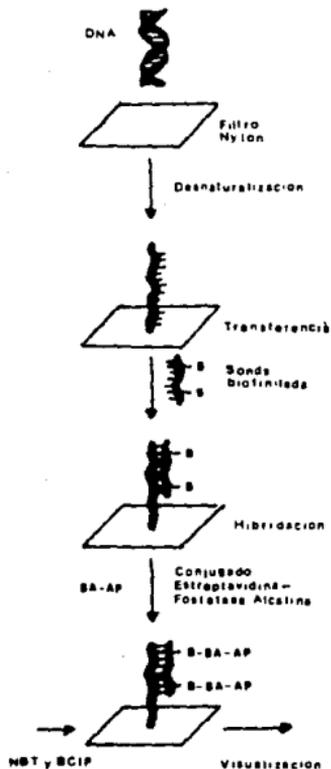


Fig. 2. Etapas principales en el proceso de localización de genes mitocondriales utilizando sondas marcadas con derivados biotinilados.



Fig. 3. Dispositivo empleado en la transferencia de ácidos nucleicos del gel a membranas de nylon (Southern, 1975).

bromuro de etidio ( 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se tomaron fotografias colocando una regla a lo largo del gel. El DNA se desnaturalizó por 60 min. a temperatura ambiente en una solución de NaCl 1.5M , NaOH 0.5M , con agitación suave y se neutralizó en una solución de Tris-HCl 1 M pH 8.0 , NaCl 1.5M por otros 60 min.

#### 10b. Transferencia a membranas de nylon.

El gel se colocó en un dispositivo como el que se muestra en la figura 3.

El amortiguador de transferencia fué SSC 10 X ( SSC 20 X: NaCl 3M, citrato de sodio 0.3M pH 7.0). Se dejó aproximadamente 16 hrs. durante las cuales el amortiguador fluyó por capilaridad a través de las toallas absorbentes, arrastrando al DNA del gel, el cual quedó retenido en el filtro de nylon. Cuando terminó la transferencia, se marcaron los pozos en el filtro y se descartó el gel . El filtro se lavó con SSC 6X y se incubó a 80°C por dos horas para fijar el DNA al filtro.

#### 10 c. Prehibridación e hibridación.

Para bloquear el filtro de nylon, evitando así hibridación inespecífica, el filtro se prehibridó con una solución que contiene SSC 6X , solución de Denhardt 5X ( ficol al 1% , polivinilpirrolidona al 1% , BSA al 1% ), SDS al 0.2%, Tris- HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM y DNA de timo de ternera (CT DNA) 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Esta solución se incubó por 10 min en un baño de agua hirviendo y se enfrió por 10 min. en un baño de hielo-agua, para desnaturalizar el DNA. La mezcla se agregó a una bolsa de

hibridación junto con el filtro previamente humedecido en SSC 6X, se selló y se incubó a 65°C por 4 hrs. El paso siguiente fué la hibridación con la sonda marcada.

Se hizo una dilución de 1:200 de la sonda biotinilada en TE ( Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA 1 mM). Se incubó por 10 min. en un baño de agua hirviendo y se enfrió por 10 min. en un baño de hielo-agua para abrir las cadenas del DNA. Esta dilución se agregó a la bolsa de hibridación, se selló y se incubó a 65°C por 14 hrs.

Terminada la hibridación, se hicieron lavados posthibridación, para descartar la hibridación inespecífica y eliminar sonda libre. Estos lavados dependen de la similitud en la secuencia de la sonda y del DNA blanco. Para las sondas oli 1, cit b, rRNA 15S y rRNA 21S, se hicieron dos lavados de alta astringencia en SSC 6X, SDS al 0.1%; el primero de 30 min a temperatura ambiente y el segundo de 60 min. a 65°C. Para la sonda oli 2, se usó el mismo amortiguador pero se hicieron los lavados a temperatura ambiente, 10 min cada uno.

#### 10 d. Visualización.

Los híbridos sonda-DNA se visualizaron utilizando el sistema " Blu-Gene Nonradiative nucleic acid detection system" de BRL. Este sistema se basa en la alta afinidad que posee la estreptavidina por la biotina (Fig 2).

Después de realizados los lavados posthibridación, el filtro se lavó una vez en amortiguador 1 ( Tris- HCl 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.15 M ). Posteriormente, se bloqueó incubando una

hora a 65°C en amortiguador 2 (BSA al 3% en amortiguador 1). A continuación se incubó por 10 min. en una dilución de 1 µg/ml del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP) en amortiguador 1, para permitir que la estreptavidina se uniera al nucleótido biotinilado. El conjugado libre se eliminó lavando dos veces por 15 min. en amortiguador 1, y una vez en amortiguador 3 (Tris-HCl 0.1 M pH 9.5, NaCl 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM). La reacción de color se realizó incubando el filtro en una solución colorante de azul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP). La reacción se llevó a cabo en la oscuridad por un tiempo de 15-160 min. La fosfatasa alcalina desfosforila al BCIP y el producto reduce al NBT, dando un precipitado color púrpura.

Cuando las bandas fueron visibles, la reacción se detuvo lavando el filtro con amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 0.5 mM.

#### 10 d. Localización de los genes en el mapa de restricción.

Las bandas que hibridaron se localizaron en el mapa de restricción. Se midió en el filtro nylon la distancia de la banda que hibridó al origen del carril y se extrapoló la distancia correspondiente en la fotografía que previamente se había tomado del gel.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

Antes de entrar directamente al estudio del DNA mitocondrial, se caracterizaron morfológica y fisiológicamente las cepas aquí descritas.

##### 1. Características Morfológicas.

La siguiente diagnosis del género Kluyveromyces es la detallada por van der Walt y Johannsen (van der Walt y Johannsen, 1984).

" Las células vegetativas son esferoidales, ovoides, elipsoidales, cilíndricas a elongadas ; la reproducción es por gemación, en algunos casos con formación de pseudomicelio. Las ascas son evanescentes, uni o multiesporadas. Las ascosporas son crescentiformes, reniformes, oblongas, elipsoidales o esferoidales, tendientes a aglutinarse después de su liberación. Fermentación, nitrato no utilizable como única fuente de nitrógeno. Sistema de Coenzima Q-6 presente."

La reproducción vegetativa de las cepas que se estudiaron fué típicamente por gemación polar (Fig. 1.1), con formación en algunos casos de pseudomicelio (K. fragilis 2415 ; Fig. 1.1 a).

En cuanto a las características sexuales, cuando las cepas se cultivaron en medio de extracto de malta para favorecer la esporulación, sólo dos de ellas esporularon: K. fragilis 2415



Fig. 1.1 Fotomicrograffas de tres cepas pertenecientes al género Kluyveromyces.

- A) K. fragilis 2415. a) pseudomicelio, b) ascosporas reniformes.  
 B) K. bulgaricus I.B. a) células vegetativas, b) tétradas,  
 c) ascosporas esferoidales.  
 C) K. lactis WM37. a) células vegetativas, b) tétradas,  
 c) ascosporas esferoidales. (Las cepas de K. lactis son heterotálicas, por lo que se realizó una cruce con las cepas WM37, de factor sexual a, y MD2/1 de factor sexual  $\alpha$ )

presentó 4 esporas reniformes por asca , en número pequeño después de 24 hrs. de incubación (Fig. 1.1 a); así mismo, por estudios realizados en el laboratorio con la cepa K. marxianus I.B. y con otras de la misma especie, se conoce que éstas presentan 4 esporas reniformes por asca. La cepa K. bulgaricus I.B., presentó 4 esporas redondas por asca, en gran número después de 24 hrs (Fig. 1.1b).

Los resultados sugieren que éstas tres cepas son homotálicas, es decir que la reproducción sexual se lleva a cabo sin interacción precedente de tipos de cruzamiento complementarios.

Por otro lado, las cepas K. fragilis 278, K. bulgaricus 4327 y K. vanudenii, a pesar de que se permitió su crecimiento por un periodo de una semana, no hubo formación de esporas, sugiriendo un posible heterotalismo, el cual no pudo comprobarse por la carencia de otras cepas de factor sexual complementario.

En la Fig. 1.1 c, se muestra el tipo de esporas redondas producidas por la cepa heterotálica K. lactis WM37 . Esta cepa de factor sexual a, se cruzó con la cepa MD2/1 de K. lactis de factor sexual  $\alpha$  . Se produjeron 4 esporas redondas por asca.

Aunque el tipo y forma de las esporas, patrones de asimilación y fermentación de carbohidratos, son características que se toman en cuenta para la clasificación de levaduras, en algunos casos es difícil su aplicación. Uno de ellos se presentó en la cepa K. bulgaricus I.B. Esta levadura presenta esporas esferoidales, típicas de levaduras del tipo de K. lactis (Ver Fig 1b); sin embargo, se clasificó como K. bulgaricus porque a

diferencia de K. lactis, fermenta al carbohidrato inulina, ya sea lenta o activamente.

Los criterios en que se basó la clasificación de las levaduras que comprendieron este estudio ,fueron las características morfológicas de las células vegetativas, características de la reproducción sexual y asexual, y patrones de asimilación y fermentación de diversos compuestos químicos ; encontrándose cierto grado de homogeneidad en estos aspectos en la mayoría de los aislamientos. Sin embargo, a lo largo del estudio, la cepa K. bulgaricus I.B. , presentó una gran variación. Es necesario realizar más pruebas para comprobar la identidad de esta cepa.

## 2. Curvas de crecimiento.

El siguiente aspecto que se consideró fué la velocidad de crecimiento de las cepas. Se determinaron las curvas de crecimiento en cultivos de YPD. Fig 2.1

Los tiempos medios de generación calculados fueron los siguientes:

<u>K. fragilis</u>	278	1:15 hrs.
<u>K. fragilis</u>	2415	1:40 hrs.
<u>K. bulgaricus</u>	4327	1:45 hrs.
<u>K. bulgaricus</u>	I.B.	1:40 hrs.
<u>K. vanudenii</u>		1:35 hrs.

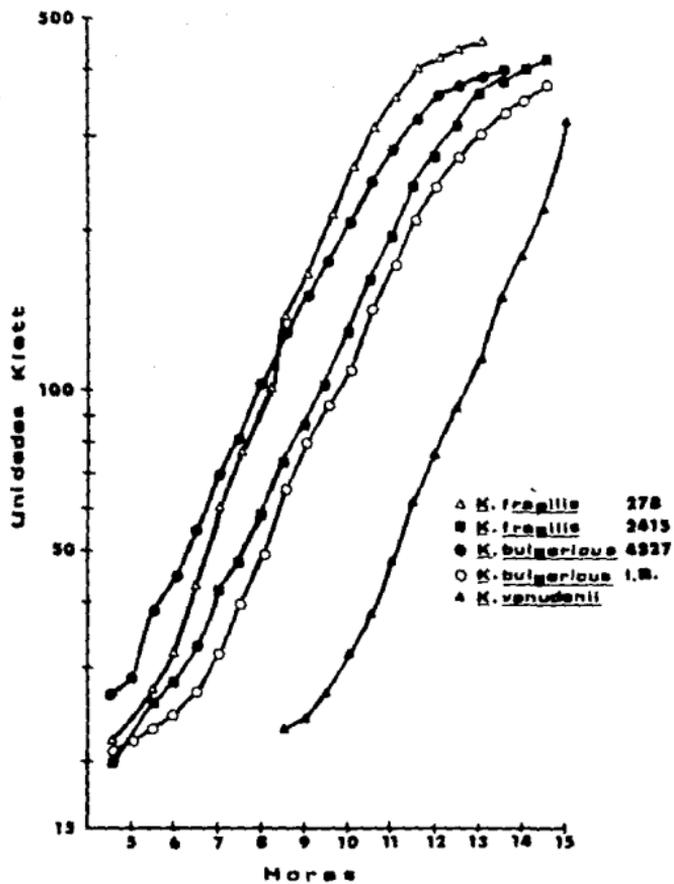


Fig. 2.1 Curvas de crecimiento en medio YPD de las cepas del género *Kluyveromyces* estudiadas.

Steensma (Steensma et al., 1988) al caracterizar fisiológicamente a varias cepas de este género para realizar cariotipos electroforéticos, encontró ciertas diferencias en el crecimiento. Observó que levaduras del tipo de K. marxianus crecen normalmente a temperaturas entre 25 - 45°C, mientras que cepas del tipo de K. lactis no forman colonias arriba de los 37°C. Además, cuando comparó las tasas de crecimiento observó que las primeras crecían más rápido que las segundas, a todas las temperaturas probadas.

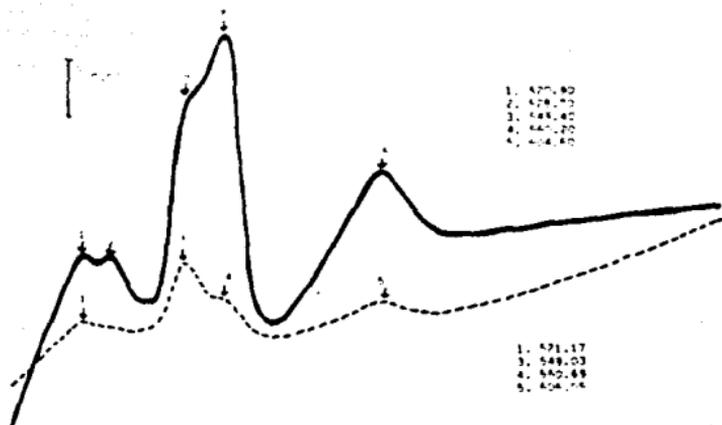
En las curvas de crecimiento que se obtuvieron para las cepas que estudiamos, no hubo diferencias significativas en los tiempos medios de duplicación

### 3. Espectros de absorción de citocromos.

El mtDNA de la mayoría de las levaduras estudiadas codifica para algunos citocromos que son parte integrante de la cadena respiratoria, tales como el apocitocromo b y tres subunidades de la citocromo oxidasa. Es por ello que se caracterizaron las cepas estudiadas en cuanto a la presencia de estas proteínas, además de que las células presentaban diferentes tonos de rosado, por lo que se pensó que pudieran haber existido diferencias en el contenido de citocromos.

Con tales objetivos se realizaron espectros de absorción diferenciales de citocromos, tanto de células como de mitocondrias purificadas. Estos se presentan en la Fig. 3.1. El espectro diferencial (reducido menos oxidado) de cada cepa, presentó dos regiones de absorción en la zona visible del

*K. fragilis* E78



*K. fragilis* E418

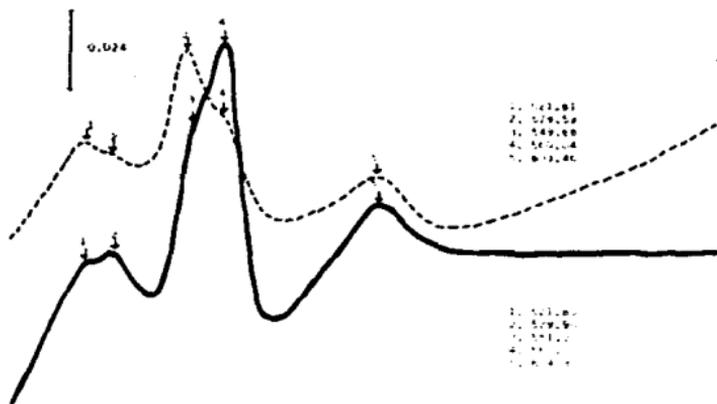
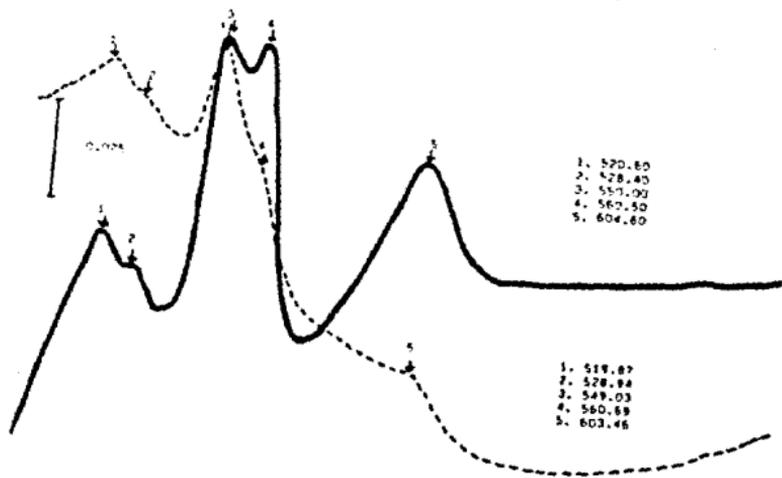


Fig. 3.1 Espectros de absorción diferenciales de citocromos de las cepas estudiadas.

Las gráficas muestran el espectro de absorción diferencial de citocromos (reducido menos oxidado), de células (trazos discontinuos) y de mitocondrias purificadas (trazos continuos). Se emplearon  $0.35 \times 10^7$  células / ml ó 5 mg. de proteína mitocondrial / ml respectivamente.

Fig. 3.1 Continuación.

*K. bulgaricus* 4327



*K. bulgaricus* I.B.

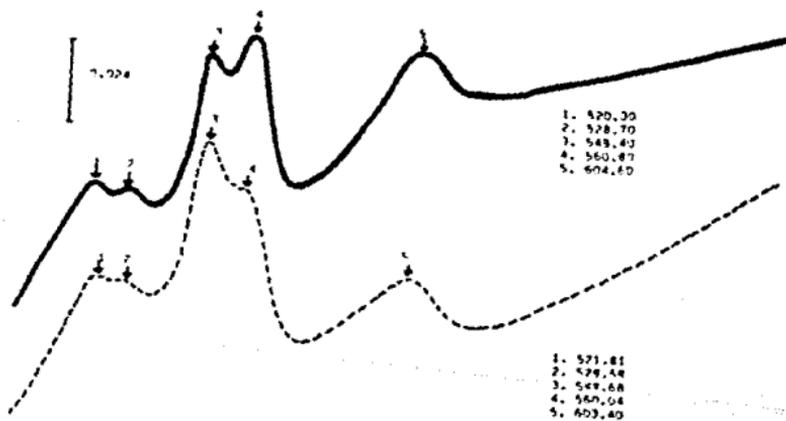
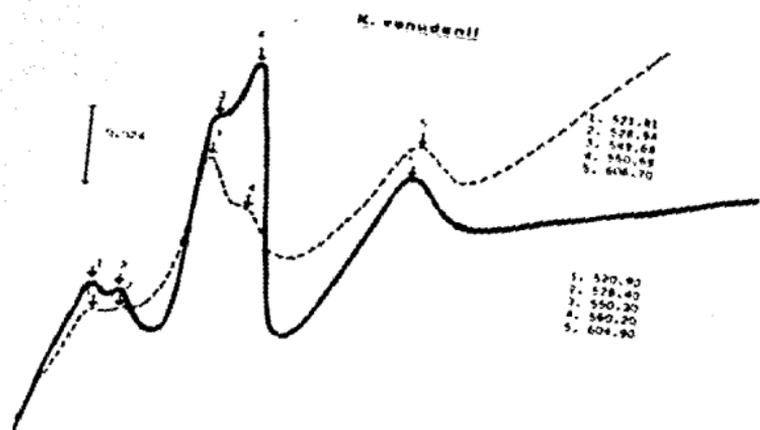


Fig. 3.1. Continuación.



espectro electromagnético : la región  $\alpha$  (540 - 650 nm) y la  $\beta$  (510 - 535 nm). No se muestra la región de Soret (410 - 460 nm).

Dentro de la región  $\alpha$ , la más adecuada para el estudio de los citocromos por la alta resolución de los picos, se encontró citocromo c que absorbe a 549-550 nm, citocromo b (560 nm) y citocromo oxidasa (603-606 nm). En cuanto a la región  $\beta$  se encontró contenido de citocromo c (519-521 nm) y de citocromo b (528-529 nm).

Como se observa, el pico de 550 nm que corresponde a citocromo c, aparentemente disminuye en los espectros con mitocondrias purificadas. Esto probablemente se debe a que este citocromo es soluble, y se pierde en el proceso de purificación de las mitocondrias.

De estos estudios se concluye que estos aislados no presentan ninguna deficiencia en cuanto a algún citocromo. Un análisis comparativo entre las cepas en cuanto al contenido de citocromos, se dificultó debido a la imposibilidad de estandarizar estrictamente todas las muestras mitocondriales.

La espectrofotometría diferencial proporciona información sobre los tipos de citocromos presentes, concentración y sus estados oxidado o reducido en células, membranas o preparaciones purificadas de citocromos (Jones y Poole, 1985). Han sido de valiosa ayuda para la identificación de mutantes deficientes respiratorias, así como en la identificación de deleciones y rearrreglos en el mtDNA de levaduras (Hardy et al., 1989).

#### 4. Análisis de los patrones de restricción del DNA mitocondrial.

Nuestro principal interés en este estudio se enfocó a comparar los patrones de restricción del DNA mitocondrial de cepas pertenecientes al género Kluyveromyces, para establecer similitudes y diferencias que pudieran arrojar luz acerca de las relaciones existentes entre los miembros de este grupo.

El mtDNA purificado de cada una de las cepas que comprendieron este estudio, se digirió con diferentes enzimas de restricción. Se sabe que el DNA mitocondrial de levaduras presenta extensas regiones espaciadoras ricas en A y T, por lo que se pensó que enzimas que reconocieran palíndromes integrados por estos nucleótidos, darían un número muy grande de fragmentos, que de hecho es el caso. Por lo tanto, se escogieron enzimas que reconocieran G y C, y combinaciones A-T y G-C. Así mismo se utilizaron enzimas que reconocieran 4 y 6 nucleótidos.

Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa y los patrones que se obtuvieron fueron comparados .

La Tabla IV.1 resume las enzimas de restricción que se utilizaron, secuencia de nucleótidos que reconoce y número de fragmentos que se produjeron para cada tipo de mtDNA.

Tabla IV.1 Número de sitios de reconocimiento para enzimas de restricción en el mtDNA de varias cepas del género Kluyveromyces.

Enz. de restr.	Sec. que reconoce. (5'→3')	CEPAS					
		278	2415	YB-4327	I.B.	WM-37*	vanud.
Hae III	GGCC	6	3	3	9	8	10
Hap II	CCGG	4	3	3	8	>16	>16
Hha I	GCGC	5	4	4	4	>10	8
Apa I	GGGCCC	1	nd	nd	nd	0	0
Sma I	CCGGGG	0	0	0	nd	5	7
Sst II	CCGGGG	2	2	2	2	>14	>14
Bam HI	GGATCC	0	0	0	1	2	3
Kpn I	GGTACC	1	1	1	3	2	1
Mlu I	ACGCGT	1	1	1	1	1	1
Nhe I	GCTAGC	0	0	0	nd	1	1
Nru I	TCGCGA	0	0	0	0	0	1
Pst I	CTGCAG	1	1	1	2	1	1
Pvu II	CAGCTG	2	2	2	3	3	3
Sal I	GTCCGAC	2	2	2	nd	2	2
Sst I	GAGCTC	0	0	0	0	1	1
Bcl I	TCATCA	4	nd	nd	3	5	6
Bgl II	AGATCT	2	1	1	6	7	6
Cla I	ATCGAT	1	1	1	1	3	3
Eco RI	GAATTC	7	5	5	8	4	4
Eco RV	GATATC	2	2	2	5	6	6
Hind III	AAGCTT	5	5	5	7	3	3
Nsi I	ATGCAT	9	9	9	nd	nd	11
Sca I	AGTACT	3	3	3	1	0	0
Xba I	TCTAGA	3	2	2	6	3	nd
Hinc II	GTYRAC**	9	5	5	7	7	6

\* Tomado de Coria et al., 1990 ; Ragnini y Fukuhara, 1988.

\*\* R = A o G , Y = C o T

nd = no determinado.

En dicha tabla se puede apreciar que en general, las cepas del tipo de K. marxianus (K. fragilis 278, K. fragilis 2415, K. bulgaricus 4327) presentan un menor número de sitios de restricción que aquellas cepas del grupo de K. lactis (K. lactis WM37 y K. vanudenii). La denominación de cepas del tipo de K. marxianus o cepas del tipo de K. lactis es convencional y se hará referencia varias veces a lo largo del texto. La cepa K. bulgaricus I.B. aparenta un estado intermedio entre ambos grupos.

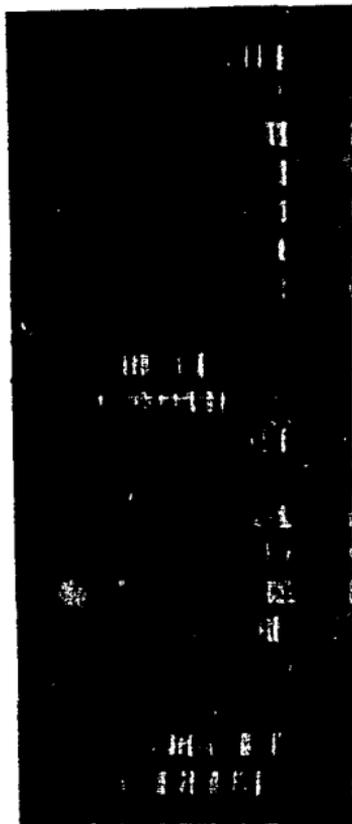
En la figura 4.1 se muestran los patrones de restricción con las enzimas Sst II y Hap II de los mtDNA de las cepas que se estudiaron, así como de algunas otras cepas que pertenecen al mismo género, las cuales fueron incluidas sólo en ésta parte del trabajo (K. fragilis 667 y K. drosophilarum).

Las levaduras K. lactis, K. drosophilarum y K. vanudenii, presentan, para Sst II, numerosos sitios de restricción (más de 16), a diferencia de los pocos sitios de restricción (2 o 3) que mostraron las cepas K. fragilis 278, K. fragilis 2415, K. bulgaricus 4327, K. bulgaricus I.B. y K. marxianus I.B..

Algo similar sucede para la enzima Hap II: más de 16 sitios de restricción en levaduras del tipo de K. lactis, mientras que las levaduras del tipo de K. marxianus presentan 3 o 4 sitios, excepto K. bulgaricus I.B. que tiene 8 sitios.

En la Figura 4.2 se muestran los patrones de restricción de los DNAs mitocondriales cortados con las enzimas Hinc II, Xba I y Hind III.

Fig. 4.1 Patrones de restricción de DNAs mitocondriales de varias cepas de levaduras del género *Kluyveromyces*. El mt DNA se digirió con  $\lambda$  en enzimas Sac II y Hap I. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en gels de agarosa al 0.8%.



$\lambda$  + HindIII

*K. fragilis* L-278

*K. fragilis* 667

*K. fragilis* 2415

*K. bulgaricus* YB-4327

*K. bulgaricus* I.B.

*K. marxianus* I.B.

*K. lactis* WM37

*K. drosophilae*

*K. waltersii*

$\lambda$  + HindIII

*K. fragilis* L-278

*K. fragilis* 667

*K. fragilis* 2415

*K. bulgaricus* YB-4327

*K. bulgaricus* I.B.

*K. marxianus* I.B.

*K. lactis* WM37

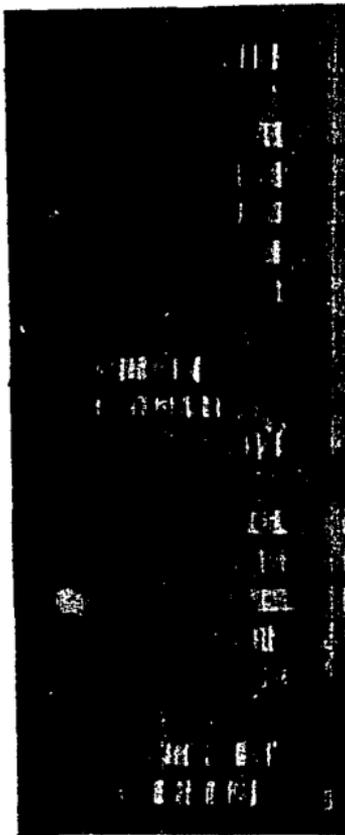
*K. drosophilae*

*K. waltersii*

Sac II

Hap I

Fig. 4.1 Patrones de restricción de DNAs mitocondriales de varias cepas de levaduras del género *Kluyveromyces*. El mt DNA se digirió con  $\lambda$  enzimasa Sac II y Hap II. Los fragmentos fueron separados por electroforesis en gels de agarosa al 0.8%.

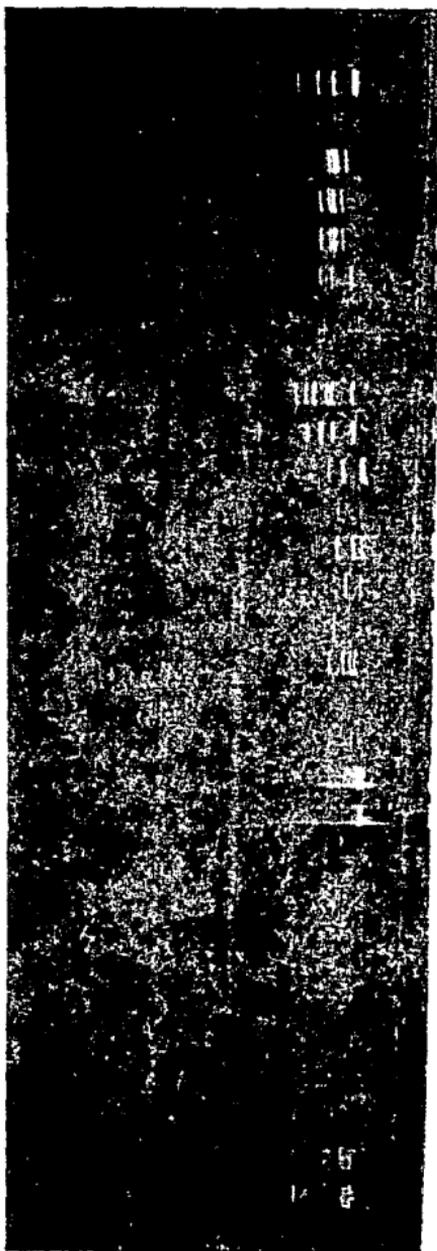


$\lambda$ + HindIII	
<i>K. fragilis</i>	L-278
<i>K. fragilis</i>	667
<i>K. fragilis</i>	2415
<i>K. bulgaricus</i>	YB-4327
<i>K. bulgaricus</i>	I.B.
<i>K. marxianus</i>	I.B.
<i>K. lactis</i>	WM37
<i>K. drosophilaeum</i>	
<i>K. varudenti</i>	
$\lambda$ + HindIII	
<i>K. fragilis</i>	L-278
<i>K. fragilis</i>	667
<i>K. fragilis</i>	2415
<i>K. bulgaricus</i>	YB-4327
<i>K. bulgaricus</i>	I.B.
<i>K. marxianus</i>	I.B.
<i>K. lactis</i>	WM37
<i>K. drosophilaeum</i>	
<i>K. varudenti</i>	

SccII

HapII

Fig. 4.2. Patrones de restriccion del DNA mitocondrial de cepas del genero *Kluyveromyces*, cortado con las enzimas Hinc II, Xba I y Hind III.



$\lambda$ + HindIII		
<i>K. fragilis</i>	L-278	HincII
<i>K. fragilis</i>	667	
<i>K. fragilis</i>	2415	
<i>K. bulgaricus</i>	YB-4327	
<i>K. bulgaricus</i>	I.B.	
<i>K. marxianus</i>	I.B.	
<i>K. lactis</i>	WM37	
<i>K. drosophilaeum</i>		
<i>K. vanudenii</i>		
$\lambda$ + HindIII		
<i>K. fragilis</i>	L-278	XbaI
<i>K. fragilis</i>	667	
<i>K. fragilis</i>	2415	
<i>K. bulgaricus</i>	YB-4327	
<i>K. bulgaricus</i>	I.B.	
<i>K. marxianus</i>	I.B.	
<i>K. lactis</i>	WM37	
<i>K. drosophilaeum</i>		
<i>K. vanudenii</i>		
$\lambda$ + HindIII		
<i>K. fragilis</i>	L-278	HindIII
<i>K. fragilis</i>	667	
<i>K. fragilis</i>	2415	
<i>K. bulgaricus</i>	YB-4327	
<i>K. bulgaricus</i>	I.B.	
<i>K. marxianus</i>	I.B.	
<i>K. lactis</i>	WM37	
<i>K. drosophilaeum</i>		
<i>K. vanudenii</i>		

Al comparar los patrones de restricción con estas enzimas y los de la Figura 4.1, encontramos que las cepas K. fragilis 2415, K. bulgaricus 4327 y K. marxianus, poseen el mismo número de fragmentos, con pesos moleculares muy parecidos.

Esta característica se conservó para la mayoría de las enzimas utilizadas. La única diferencia notable, se observó en los patrones de restricción obtenidos con la enzima Xba I. En este caso, el segundo fragmento en la cepa K. bulgaricus 4327 es de un tamaño menor que el obtenido en las otras dos cepas.

Debido a que los tamaños que resultan con estas enzimas son de alto peso molecular, otras variaciones más grandes podrían pasar desapercibidas. Por lo tanto, el mtDNA de estas cepas se digirió con enzimas que poseen más sitios de restricción: Mbo I (GATC), Hinf I (GANTC) y Dra I (TTTAAA) (Fig. 4.3). A este nivel, se localizaron más variaciones en algunas bandas, aunque los patrones en general fueron semejantes.

Los patrones de la cepa K. fragilis 278 variaron un poco con respecto a las otras cepas consideradas como del tipo de K. marxianus; mientras que en la cepa K. bulgaricus I.B., la variación fue mucho mayor.

En cuanto a los patrones de restricción de las levaduras K. lactis, K. drosophilum y K. vanudenii, éstos son muy parecidos, siendo más evidente la semejanza entre la primera y la última.

MboI

HinfI

DraI

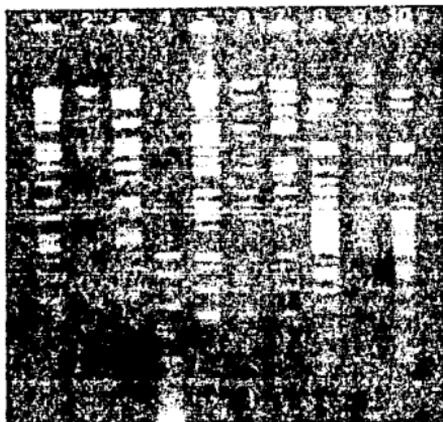


Fig. 4.3. Patrones de restricción de las cepas K. marxianus I.B. (carriles 1,5,8); K. fragilis 2415 (carriles 2,6,9) y K. bulgaricus 4327 (carriles 3,7,10) obtenidos por digestión con las enzimas MboI, HinfI y DraI. Carril 4 pBR322 + HapII.

### 5. Tamaño y forma de los DNAs mitocondriales.

Por medio de digestiones sencillas y dobles, se encontró que el mtDNA de las cinco cepas que se estudiaron eran moléculas circulares, ya que la suma de los fragmentos obtenidos de digestiones sencillas fué igual a la suma de los fragmentos obtenidos en una doble digestión utilizando las mismas enzimas.

Se calculó el tamaño de los fragmentos, por comparación con marcadores de tamaño, tales como  $\lambda$  + HindIII ,  $\phi$  X174 + Hae III y marcadores de alto peso molecular. Se obtuvieron los siguientes tamaños:

<u>K. fragilis</u>	278	42.6 Kb.
<u>K. fragilis</u>	2415	38.4 Kb.
<u>K. bulgaricus</u>	4327	38.2 Kb.
<u>K. bulgaricus</u>	I.B.	45.3 Kb.
<u>K. vanudenii</u>		38.6 Kb.

En las cepas que se estudiaron, así como otras que pertenecen al mismo género y que se están estudiando en el laboratorio (K. marxianus y K. drosophilorum) los tamaños están en un rango de 38-45 Kb. Esto sugiere una cierta homogeneidad dentro del género, a diferencia de las variaciones encontradas en otros géneros de levaduras, tales como Saccharomyces (23-81 kb.) y Dekkera/Brettanomyces (28-101 Kb.) (Mc Arthur y Clark-Walker, 1983; Hoeben y Clark-Walker, 1986).

## 6. Análisis de los mapas de restricción.

A partir de digestiones sencillas ,dobles y triples con endonucleasas de restricción, se construyeron los mapas físicos de cinco cepas: K. fragilis 278, K. fragilis 2415, K. bulgaricus 4327, K. bulgaricus I.B. y K. vanudenii, los cuales se muestran lineatizados en la Fig. 6.1. En todos ellos se tomó como la coordenada 0, el sitio único de restricción para la enzima Pst I. En el caso de la cepa K. bulgaricus I.B., que posee dos sitios para ésta enzima, se escogió el sitio de Pst I más cercano al gen de citocromo b. El mapa de K. lactis WM37 es el descrito por Coria (Coria et al., 1990).

En la Figura 6.2 se muestran los mismos mapas físicos en forma condensada, para una mejor visualización de las diferencias en los sitios de restricción.

Como se esperaba de los patrones de restricción casi iguales de las levaduras K. fragilis 2415 y K. bulgaricus 4327, el orden de los fragmentos se conservó, excepto por la enzima Xba I ( Ver patrón de restricción de la Fig 4.2 y los mapas correspondientes en las Figs. 6.1b y 6.2b y c).

Al parecer, el sitio de restricción de Xba I cercano al sitio de restricción único de la enzima Mlu I, es común a ambas cepas, el cual ocupa la misma posición en la cepa K. marxianus I.B. estudiada en el laboratorio (mapa no mostrado). El restante sitio de restricción en la cepa 2415 se localiza 10.5 Kb. a la

izquierda del sitio de restricción común, mientras que en la cepa 4327, el segundo sitio de restricción se localiza a 7.8 Kb. a la derecha de dicho sitio ( indicado con líneas punteadas en la fig. 6.1 b y con asterisco en el mapa condensado de la figura 6.2 c).

Esta diferencia pudiera explicarse por un evento de transposición o recombinación en una región muy pequeña , de tal manera que no se observaron alteraciones con las enzimas aquí utilizadas. Para detectar la naturaleza real de este cambio, tendrían que secuenciarse las regiones involucradas.

El mapa de restricción de K. fragilis 278 (Figs. 6.1a y 6.2a) , presenta el mismo orden y una distancia de separación similar para las enzimas que tienen sitio único cuando se compara con las cepas K. fragilis 2415 y K. bulgaricus 4327.

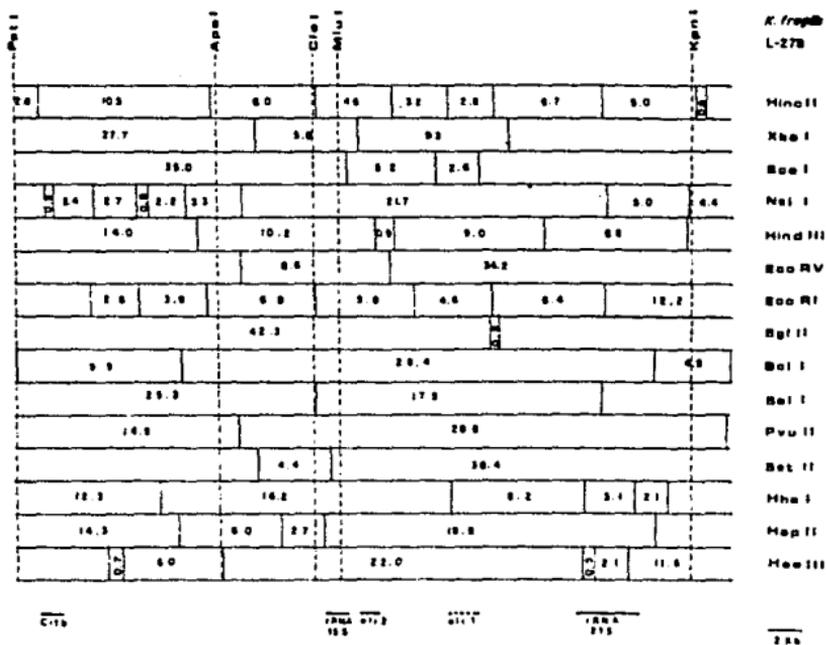
Con respecto al mapa de restricción de K. bulgaricus I.B., ( Figs. 6.1 c y 6.2 d), es más complejo, ya que esta cepa presentó un número mayor de sitios de restricción para la mayor parte de las enzimas. Además, posee sitios de restricción únicos para otras enzimas (Sca I y Bam HI). Los sitios para las enzimas Cla I y Mlu I, presentaron un orden inverso al encontrado en todas las cepas de Kluyveromyces que se están estudiando en el laboratorio.

El mapa de restricción de K. vanudenii (Figs. 6.1d y 6.2e) es muy semejante al de K. lactis (Figs. 6.1e y 6.2f). La distancia entre los sitios de restricción únicos de Pst I y Sst I es equivalente (8.4 y 8.8 Kb respectivamente). Así mismo, la distancia entre los sitios únicos Nhe I y Mlu I (0.8 kb.) y de

Mlu I a Kpn I (10.8 y 10.4 Kb. respectivamente) es prácticamente la misma. Sin embargo en la cepa K. vanudenii se observa un sitio único para Nru I, enzima que no presenta sitios en ningún mtDNA de las cepas que hemos estudiado; mientras que en K. lactis hay un sitio adicional para Kpn I entre Sst I y Nhe I, que corresponde también con una distancia de separación mayor entre estos sitios únicos (2.2 kb para K. vanudenii y 4.6 Kb. para K.lactis. Tal vez en esta zona se llevó a cabo un evento de transposición de una parte del fragmento de 2.8 Kb de Hinc II , el cual es cortado por KpnI, a una zona localizada entre los sitios únicos de Sst I y Nhe I. Este fragmento no está presente en K. vanudenii.

Fig. 6.1. Mapas físicos de cinco cepas del género Kluyveromyces.

- a) K. fragilis L-278  
 b) K. fragilis 2415  
 c) K. bulgaricus I.B.  
 d) K. vanudenii  
 e) K. lactis WM37 (tomado de Coria et al., 1990).



8)

Post	Class	Rate	Post	Rate	E. Anglin 245
	10 6	3 8	8 0	8 2	7 8
	11 2		27 2		
			3 5	3 5	33 6
1 0	4 2	2 6	8 6	10 0	7 2
3 6	8 7	8 2	3 0	13 0	
	8 6		31 8		
	3 4	1 9	4 0	6 2	13 9
	2 4 0		18 4		
	7 0		31 4		
			6 0	32 4	
	26 9		8 4	3 0	21
	8 6	29 4		4 0	
	17 0	18 4		2 0	
C 19		195	211	200	219

D 1

Post	Class	Rate	Post	Rate	E. Anglin 18
	1 0	1 0	1 2 4	5 0	6 8
	1 8		8 4	10 0	7 3
			10 0		13 2
3 0	8 8			4 0	10 0
2 1	11 5		18 9		3 7
	4 3	10	8 9	3 0	2 0
	12 0	18 4		2 5	17
	28 4		13 8		4 8
	27 3		3 4	14 7	
	2 0	18 7		23 8	
	5 8		2 4	17 8	
	18 1	23	18	10 8	9 4
	8 2	4 0	2 4	4 8	8 3
			8 3	5 5	2 0
			7 5		
C 19	8 13	185	211	200	219

C 1



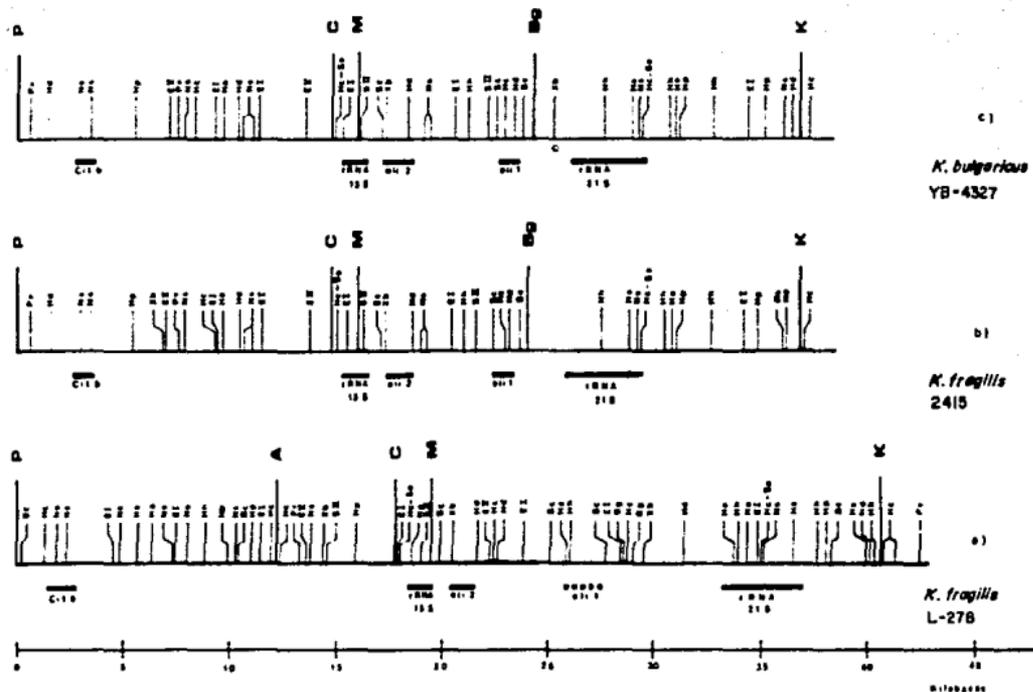


Fig. 6.2 Mapas físicos condensado de las cepas estudiadas.

Ai:Apal; Av:Aval; Ba:BamHI; Bc:BclI; Bg:BglII; C:Clai; E1:EcoRI; EV:EcoRV; Ha:HaellI; Hp:HpaII;  
 Hb:HapI; Hh:HhaI; Hc:HincII; Hd:HindIII; K:KpnI; M:MilI; Nh:NheI; Nr:NruI; Na:NaiI; P:PsiI; -  
 Pv:PvuII; Sa:SaiI; Sc:ScaI; Sm:SmaI; Sl:SclI; Sll:SxII; Sp:SpeI; Xb:XbaI.

Genes indicados con cajas discontinuas representan el fragmento que dió señal de hibridación.

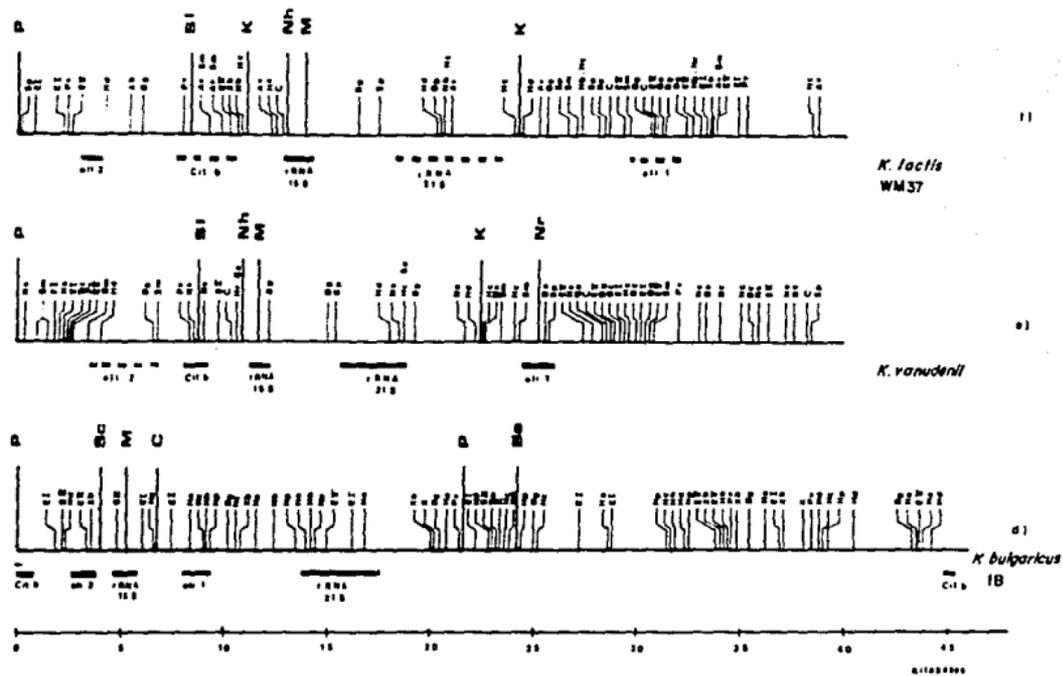


Fig. 6.2. Continuación

## 7. Mapeo Genético.

Se localizaron por hibridación con sondas marcadas con derivados biotinilados, secuencias similares a aquellas que codifican para las subunidades 6 (oli 2) y 9 (oli 1) de la ATPasa mitocondrial, las subunidades ribosomales 15S y 21S y el apocitocromo b.

Las sondas que se utilizaron provienen de secuencias del mtDNA de S. cerevisiae para los tres primeros, y de K. lactis para los dos restantes. De la estrecha relación filogenética de ambos grupos, esperábamos que la similitud en la secuencia nucleotídica de los fragmentos fuera elevada, por lo que se escogieron condiciones generales de hibridación muy estrictas (de alta astringencia), las cuales permitieron una hibridación confiable para las sondas heterólogas oli 1 y rRNA 15S y para las homólogas cit b y rRNA 21S.

En el caso de la sonda heteróloga oli 2, en estas mismas condiciones no se observó ningún tipo de hibridación, por lo tanto se disminuyó la astringencia de los lavados posthibridación. Este hecho nos indica que la similitud en la secuencia de estos genes es menor que la que se presentó para los otros 4. Cuando se realicen pruebas de su porcentaje de reasociación y se determine la secuencia de nucleótidos de este gen en las levaduras que pertenecen al género Kluyveromyces y se compare con la secuencia de S. cerevisiae y la de otros organismos, se podrá determinar qué tan divergente es.

En la fig. 7.1 se muestra una hibridación con la sonda para apocitocromo b con el mtDNA digerido con Hae III y Eco RI de las cepas estudiadas, así como de otras pertenecientes al género. Las flechas indican la banda que dió señal de hibridación.

Como se observa para las cepas del tipo de K. marxianus (K. fragilis 278, 667 y 2-15, K. bulgaricus 4327 e I.B. y K. marxianus I.B.), hibridaron bandas de alto peso molecular, por lo tanto se hicieron dobles y triples digestiones para determinar la localización más precisa del gen (Fig. 7.2).

Con las cepas K. lactis y K. vanudenii hibridaron dos bandas, una pequeña de aproximadamente 1.3 Kb. y una más grande de 3.5 Kb. para la primera cepa y de 4 Kb. para la segunda; mientras que en K. drosophilum, hibridó una única banda de aproximadamente 4 Kb.

Estos tres fragmentos son equivalentes, ya que se sabe por estudios realizados en el laboratorio (Brunner y Coria, 1989), que el gen de citocromo b de K. lactis es cortado por la enzima Sst I. Se hizo una digestión del mtDNA de las tres cepas con Hae III + Sst I y se encontró que en las tres, la banda que hibrida es cortada por Sst I; indicando que este sitio es marcador de este gen para las levaduras del tipo de K. lactis, pero no para las de K. marxianus, ya que éstas carecen de sitios para esta enzima.

En las Figuras 7.2 a 7.9 se muestran algunos ejemplos de las hibridaciones con las diferentes sondas para cada una de las cepas, las cuales permitieron un mapeo más fino.

		Hae III	Eco RI
pM37-10H			
<i>K. fragilis</i> 1-278			
<i>K. fragilis</i> 667			
<i>K. fragilis</i> 2415			
<i>K. bulgaricus</i> YB-6327			
<i>K. bulgaricus</i> I.B.			
<i>K. marxianus</i> I.B.			
<i>K. lactis</i> W37			
<i>K. chronophilum</i>			
<i>K. variabilis</i>			
$\lambda$ + HindIII			
<i>K. fragilis</i> 1-278			
<i>K. fragilis</i> 667			
<i>K. fragilis</i> 2415			
<i>K. bulgaricus</i> YB-6327			
<i>K. bulgaricus</i> I.B.			
<i>K. marxianus</i> I.B.			
<i>K. lactis</i> W37			
<i>K. chronophilum</i>			
<i>K. variabilis</i>			



Fig. 7.1. Hibridación de la sonda cit b con DNA mitocondrial de varias cepas del género, cortado con las enzimas HaeIII y EcoRI. Control negativo:  $\lambda$ + HindIII. Control positivo: plásmido pM37-10H. El orden de los carriles en el filtro es el inverso al orden del gel.

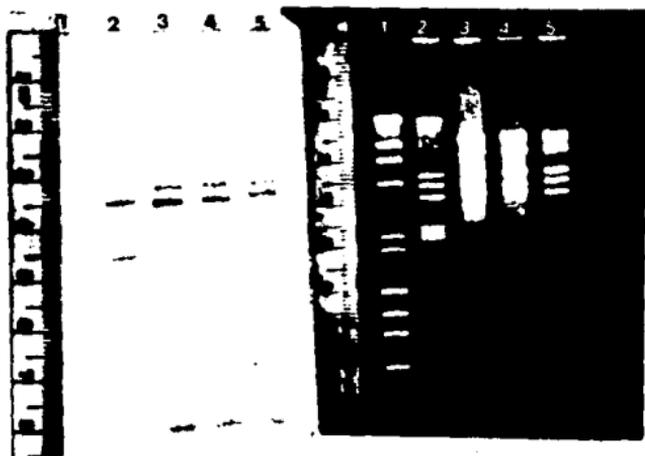


Fig. 7.2. Hibridación de la sonda *cit b* con el mtDNA cortado con *NsiI* de varias cepas de *Kluveromyces*. 1)  $\lambda$  + *HindIII* +  $\phi$ X174 + *HaeIII*; 2) *K. fragilis* 278; 3) *K. marxianus* I.B. ; 4) *K. fragilis* 2415; 5) *K. bulgaricus* 4327.

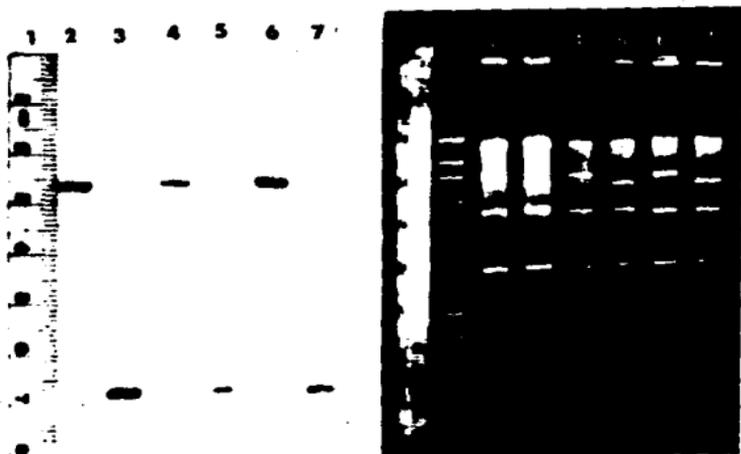
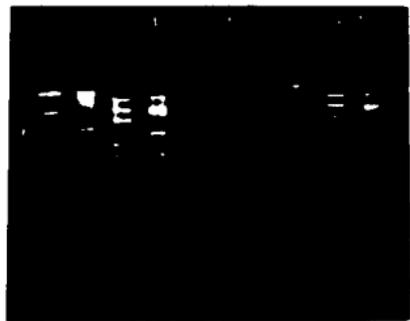


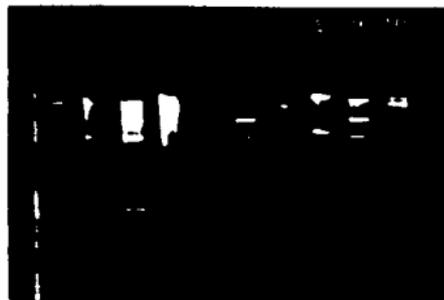
Fig. 7.3. Hibridación de la sonda *rRNA 15S*. 1)  $\lambda$  + *HindIII* +  $\phi$ X174 + *HaeIII*; 2,3) *K. marxianus* I.B. + *EcoRI*, *EcoRI* + *MluI*; 4,5) *K. fragilis* 2415 + *EcoRI*, *EcoRI* + *MluI*; 6 y 7) *K. bulgaricus* 4327 + *EcoRI*, *EcoRI* + *MluI*.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10,



Fig.7.4. Hibridación con la sonda oli 1.  
 1)  $\lambda$  + HindIII +  $\phi$ X174 + HaeIII; 2,3,4 ) K. marxianus I.B. + ScaI, HindIII + ScaI, HindIII; 5,6,7) K. fragilis 2415 + ScaI, HindIII + ScaI, HindIII; 8,9,10) K. bulgaricus 4327 + ScaI, HindIII + ScaI, - HindIII.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Fig. 7.5. Hibridación con la sonda rRNA21S .  
 1)  $\lambda$  + HindIII +  $\phi$ X174 + HaeIII; 2,3,4) K. marxianus I.B. + HhaI, HhaI + Sall, Sall; 5,6,7) K. fragilis 2415 + HhaI, HhaI + Sall, Sall; - 8,9,10) K. bulgaricus 4327 + HhaI, HhaI + Sall, Sall.

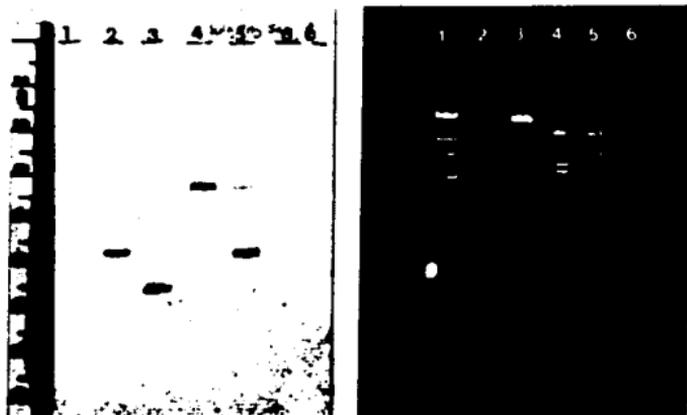


Fig. 7.6. Hibridación de la sonda oli 2 con el mtDNA de la cepa *K. bulgaricus* I.B. 1)  $\lambda$  + Hind III; 2) mtDNA cortado con Sst II; 3) SstII + Sca I; 4) Eco RI; 5) Eco RI+ Sca I; 6) pLO-4.

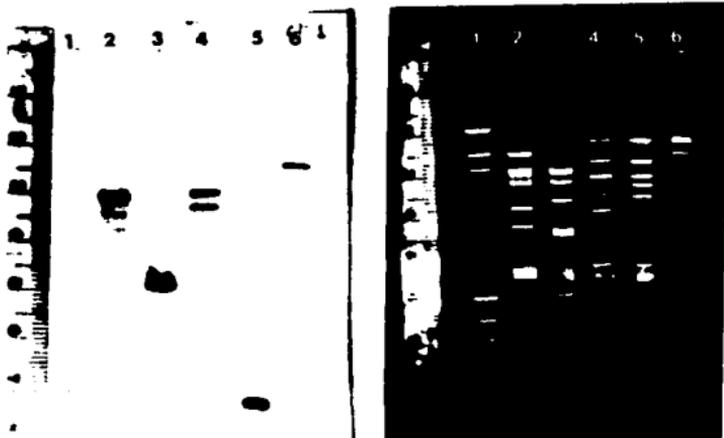


Fig. 7.7. Hibridación de la sonda oli 1 con el mtDNA de la cepa *K. vanudenii*. 1)  $\lambda$  + Hind III +  $\phi$ X174 + HaeIII; 2) mtDNA digerido con Nsi I; 3) Hha I; 4) HincII; 5) HincII + NruI; 6) SpeI + NruI.

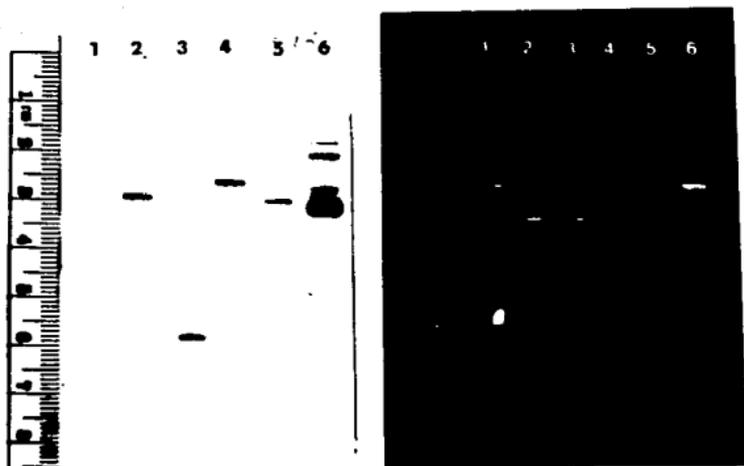


Fig. 7.8. Hibridación de la sonda rRNA 15S con el mtDNA de la cepa *K. fragilis* 278. 1)  $\lambda$  + Hind III; 2) mtDNA cortado con HincII; 3) HincII + MluI; 4) XbaI; 5) XbaI + MluI; 6) pES-15S.

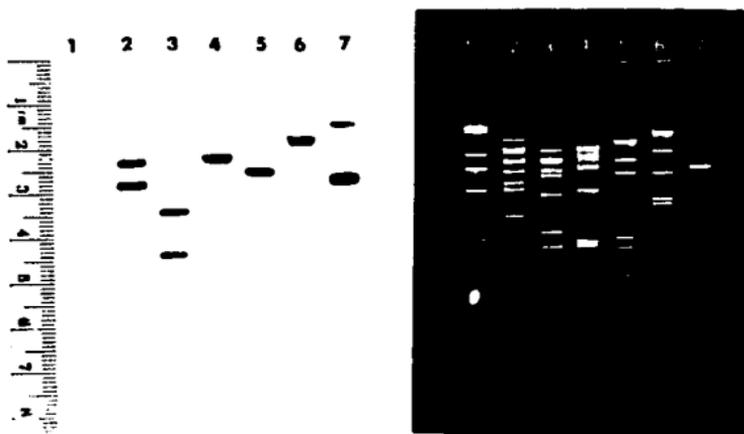


Fig. 7.9 Hibridación de la sonda rRNA 21S con el mtDNA de la cepa *K. bulgaricus* 1.8. 1)  $\lambda$  + Hind III; 2) mtDNA cortado con EcoRI; 3) HaeIII; 4) HapII; 5) HincII; 6) HindIII; 7) KLM 15/4.

En los mapas físicos de las figuras 6.1 y 6.2, se muestran los fragmentos de restricción más pequeños obtenidos con las enzimas utilizadas que dieron señales de hibridación.

Como puede observarse en las figuras 6.1 a,b y 6.2 a,b y c, el arreglo de los genes es el mismo en las cepas K. fragilis 278, K. fragilis 2415 y K. bulgaricus 4327. Tomando como referencia el gen de citocromo b, se tiene el siguiente arreglo: cit b, rRNA 15S, oli 2, oli 1 y rRNA 21S. Este arreglo es el mismo que se presenta en varias cepas de K. marxianus que se están estudiando en el laboratorio. La distancia que hay entre ellos es muy similar, principalmente aquella entre los genes rRNA 15S, oli2 y oli 1. En el caso de la cepa 278 la distancia entre cit b y el rRNA 15S y entre oli 1 y rRNA 21S es mayor en comparación con las cepas 2415 y 4327.

Hay que hacer notar que la mayoría de los sitios de restricción adyacentes a las secuencias que mostraron hibridación, se conservan en estas tres cepas.

La cepa K. bulgaricus I.B. (figs. 6.1c y 6.2 d), presentó un arreglo diferente: cit b, oli 2, rRNA 15S, oli 1 y rRNA 21S. Hubo una inversión en los genes de rRNA 15S y oli 2, que concuerda con la inversión en los sitios únicos de restricción de Cla I y Mlu I. Este último sitio es marcador del gen para la subunidad ribosomal 15S.

La inversión que se propone debe tomarse con ciertas reservas, ya que como se puede observar en los mapas, los genes que se localizaron se encuentran en una zona muy pequeña del DNA,

mientras que en las otras cepas, tanto de K. lactis como de K. marxianus, están más distribuidos a lo largo de la molécula. Hay que considerar también que no se localizaron las subunidades de la citocromo oxidasa ni los genes para los RNAs de transferencia.

Las cepas K. lactis y K. vanudenii, tomando como referencia el mismo citocromo b, presentan el siguiente arreglo: cit b, rRNA 15S, rRNA 21S, oli 1 y oli 2. La distancia entre cada una de las secuencias hibridizables es similar, tomando en cuenta una separación adicional de aproximadamente 1 Kb entre los genes de cit b y rRNA 15S, debida el evento de transposición propuesto anteriormente.

La tabla IV.2 resume el arreglo de los genes mapeados en este estudio.

Tabla IV.2 Arreglo de los genes en el DNA mitocondrial de las cepas estudiadas.

Cepa	Arreglo de los genes.
<u>K. fragilis</u> L-278	cit b, rRNA 15S, oli 2, oli 1, rRNA 21S.
<u>K. fragilis</u> 2415	cit b, rRNA 15S, oli 2, oli 1, rRNA 21S.
<u>K. bulgaricus</u> 4327	cit b, rRNA 15S, oli 2, oli 1, rRNA 21S.
<u>K. bulgaricus</u> I.B.	cit b, oli 2, rRNA 15S, oli 1, rRNA 21S.
<u>K. vanudenii</u>	cit b, rRNA 15S, rRNA 21S, oli 1, oli 2.
<u>K. lactis</u> WM37	cit b, rRNA 15S, rRNA 21S, oli 1, oli 2.

Discusión de los resultados obtenidos sobre la estructura del  
DNA mitocondrial.

En estudios previos (Ragnini y Fukuhara, 1988; Coria et al., 1990), se ha analizado la variación en los sitios de restricción del mtDNA de algunas cepas pertenecientes al género.

En la tabla IV.1, que resume el número de sitios de restricción para cada una de las cepas, se puede apreciar que hay algunas enzimas que tienen sitios de corte únicos dentro de la molécula de DNA y que son muy conservados dentro de ciertos grupos: Cla I, Mlu I, Pst I y Kpn I cortan en un sitio el mtDNA de las levaduras del tipo de K. marxianus (K. fragilis 278, K. fragilis 2415, K. bulgaricus 4327); mientras que las enzimas Pst I, Sst I, Mlu I y Nhe I, tienen sitio único en los mtDNA de las levaduras del tipo de K. lactis (K. lactis y K. vanudenii). Variación a estos resultados se presentó en la cepa K. bulgaricus I.B., cuyos sitios únicos son para las enzimas Bam HI, Mlu I, Cla I y Sca I.

La presencia de numerosos sitios de restricción para las enzimas Hap II y Sst II en las cepas del tipo de K. lactis pero no en las del tipo de K. marxianus (Tabla IV.1 y Fig. 4.1), concuerdan con los reportados por Ragnini y Fukuhara (op. cit.) para otras cepas de ambos grupos. El hecho de que se encuentren

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

numerosos sitios de restricción para enzimas que reconocen CCGCGG y CCGG (Sst II y Hap II respectivamente), es una rara ocurrencia, ya que se sabe que los genomas mitocondriales de levaduras poseen menos del 20 % de los nucleótidos G y C. Estos autores haciendo un análisis de la secuencia de algunos fragmentos del mtDNA, encontraron agrupamientos de secuencias ricas en G y C, caracterizados por numerosos sitios de restricción para esas enzimas y asociadas a la formación de estructuras palindrómicas cuya función no ha sido dilucidada, aunque se han propuesto como sitios de recombinación intramolecular, duplicación de orígenes de replicación, vestigios de elementos transponibles, etc.

Un comportamiento similar sobre la heterogeneidad de las bases nucleotídicas en la levadura S. cerevisiae ya había sido descrito por Prunell y Bernardi (Prunell y Bernardi, 1977). Estos investigadores observaron que casi el 50% de la molécula de mtDNA, estaba compuesta de secuencias ricas en A y T, con menos del 5% de G y C. Además encontraron de 70-100 regiones con 30-50 pares de bases ricas en G y C, que contenían sitios para Hap II y Hae III. Estos sitios normalmente se presentaban una sola vez por molécula de DNA mitocondrial.

Posteriormente por análisis de la secuencia (Cosson y Tzagoloff, 1979), se encontró que las secuencias génicas estaban separadas por motivos ricos en A y T, y que los agrupamientos de G y C estaban dentro y entre ellas. Cada una de las secuencias ricas en G y C está flanqueada en su extremo 3' por AAGGAG, lo que hizo sugerir que estos nucleótidos pudieran tomar parte en la

inserción en secuencias ricas en A y T dentro del mtDNA (Sor y Fukuhara, 1982).

De los patrones de restricción que se obtuvieron con algunas endonucleasas, en las cepas estudiadas, se puede decir que hay dos grupos principales dentro del género: levaduras del tipo de K. marxianus y levaduras del tipo de K. lactis, presentando cierta homogeneidad dentro de cada uno de ellos. Además la presencia de agrupamientos ricos en G y C en sólo algunos de los miembros del género Kluyveromyces, aquellos que se consideran del grupo de K. lactis, sugieren una estructuración diferencial del mtDNA en cada grupo.

Al analizar los mapas de restricción, encontramos que hay diferencias entre ambos grupos, algunas de las cuales son la presencia de algunos sitios de restricción únicos característicos para cada uno de ellos, así como también una mayor complejidad debido a un mayor número de sitios de restricción con las enzimas empleadas.

Se ha discutido el significado taxonómico de los mapas de restricción debido al polimorfismo presente en esta molécula. Se ha visto que levaduras pertenecientes a géneros distintos, determinado por pruebas de asimilación y fermentación, o de interfertilidad, presentan patrones de restricción de mtDNA muy similares (Clark-Walker et al., 1987). Así mismo se ha encontrado que levaduras pertenecientes al mismo género, presentan variaciones en los mapas de restricción (Coria et al., 1990;

Sanders et al., 1977). Sin embargo, los resultados obtenidos acerca de la composición de bases del mtDNA ( patrones de restricción y agrupamientos de G y C), diferentes en los dos grupos principales discutidos en ésta tesis, así como en cepas de Kluyveromyces estudiadas por otros autores, indican una separación entre esos grupos, la cual pudo ser comprobada por los estudios de mapeo genético realizados en nuestras cepas.

Se sabe que el arreglo de los genes difiere de una especie a otra, aunque algunas semejanzas locales pueden existir. Tal es el caso de los estudios sobre la diversidad en el mtDNA de la levadura Dekkera anteriormente mencionados, de Saccharomyces exiguus (Clark- Walker et al., 1983a) y de Candida glabrata (Clark-Walker y Sriprakash, 1983b) por citar algunos ejemplos.

Los cinco genes que se localizaron en el mtDNA de las cepas que comprendieron este estudio, presentan dos disposiciones principales en cuanto al arreglo (tabla IV.2) y a la distancia entre cada uno de ellos (mapas físicos de las figuras 6.1 y 6.2).

Tomando como referencia el gen de *cit b*, las levaduras del tipo de K. marxianus (K. fragilis 2415, K. fragilis 278 y K. bulgaricus 4327) presentan el orden: *cit b*, rRNA 15S, *oli 2*, *oli 1* y rRNA 21S; mientras que el orden de las levaduras del tipo de K. lactis (K. lactis y K. vanudeni) es *cit b*, rRNA 15S, rRNA 21S, *oli 1* y *oli 2*.

La cepa K. bulgaricus I.B. presentó un orden y disposición diferente a ambos grupos: *cít b*, *olí 2*, *rRNA 15S*, *olí 1* y *rRNA 21S*, todos localizados en una región muy pequeña del DNA. Las diferencias que se observaron en este aislamiento, a todo lo largo del estudio, nos sugiere que es una cepa (tal vez especie) diferente a las que estudiamos en ésta tesis. Quedan por realizar más pruebas tales como contenido de G y C, zimogramas, para determinar la posición que tiene dentro del género.

El número de genes localizados es limitado. Un estudio que comprenda el resto de los genes mitocondriales, las tres subunidades de la citocromo oxidasa así como los RNAs de transferencia, podrá completar la información acerca de la organización de éstas moléculas.

Aunque no se sabe si el tamaño del mtDNA es una consecuencia de rearrreglos, o si un tamaño más grande los hace susceptibles a cambios en el orden de los genes (Clark-Walker et al., 1987), es notable el hecho que levaduras pertenecientes al género Kluyveromyces sean tan homogéneas en cuanto al tamaño y al arreglo de los genes, cosa que no ocurre para otras levaduras (McArthur y Clark-Walker, 1983 ; Hoeben y Clark-Walker, 1986), en las que los rangos de tamaño son muy grandes, por lo que en éste género, el estudio del mtDNA sí puede ser considerado como un criterio taxonómico que puede ser utilizado para una diferenciación más fina dentro del mismo.

Un aspecto interesante que surge de la localización de secuencias que codifican para la subunidad 9 de la ATPasa, es determinar su funcionalidad. Se conoce que ésta proteína es codificada en el genoma nuclear de células de mamífero (Anderson et al., 1961), mientras que en levaduras, está codificada en el DNA mitocondrial (Tzagoloff et al., 1979). Por otro lado, en hongos filamentosos, específicamente Neurospora crassa y Aspergillus (Van den Boogart et al., 1961) contiene secuencias capaces de codificar para ésta subunidad en el mtDNA y en el DNA nuclear, aunque ésta última es la funcional. Es por esto, que sería interesante analizar los productos de traducción del mtDNA en las especies de Kluyveromyces.

### 5. Clonación del gen que codifica para el rRNA 15S.

Un trabajo colateral al estudio del mtDNA, fue la clonación del gen que codifica para la subunidad ribosomal pequeña (rRNA 15S) de S. cerevisiae, para su utilización como sonda de hibridación.

La mutante petite citoplásmica (rho-) D580 de S. cerevisiae porta el locus de resistencia al antibiótico paromomicina adyacente al gen que codifica para el rRNA 15S (Li et al., 1982).

Se aisló del DNA mitocondrial de esta petite, un fragmento Hae III- Hae III de 1.3 Kb. que contiene el gen y se clonó en el sitio de Eco RV del plásmido pBR322. El plásmido resultante se denominó pES-15S, con el cual se transformó a la cepa HB101 de E. coli, obteniéndose 48 transformantes  $Amp^R$ -Tet<sup>S</sup>, de las cuales se seleccionó una clona (clona 5) cuyos plásmidos amplificados, al ser cortados con la enzima Bam HI, dieron dos fragmentos de 4.4 y 1.2 Kb.

El fragmento correspondiente al gen se recuperó del plásmido digiriendo con Hap II y se marcó con derivados biotinilados. Se verificó la identidad del gen haciendo una hibridación con el mtDNA de la cepa D273-108 de S. cerevisiae digerido con Hha I + Bam HI. El fragmento clonado hibridó con la banda correspondiente a la descrita por Morimoto y Rabinowitz (Morimoto y Rabinowitz, 1979).

## V. CONCLUSIONES

El valor de las características morfológicas, fisiológicas, ecológicas y bioquímicas que hacen factible el reconocimiento de una especie, depende de la proporción en la que cada una de ellas permite su diferenciación con respecto a otras especies.

En algunos casos las pruebas que se han utilizado normalmente para la clasificación no permiten una diferenciación clara entre los organismos que se están comparando. La taxonomía, como otros aspectos del saber humano, ha ido evolucionando al introducirse nuevas técnicas. A los trabajos tradicionales, se han incorporado otros criterios que comprenden la ultraestructura celular, diversidad de algunos sistemas enzimáticos, composición de bases del DNA nuclear y secuencias del rRNA 5S, etc, que han permitido rearrreglos dentro de los grupos taxonómicos.

En este trabajo se ha aplicado el estudio de la estructura y organización del DNA mitocondrial de las levaduras que pertenecen al género Kluyveromyces para tratar de establecer las relaciones taxonómicas entre las mismas. Esta molécula ya ha sido estudiada con este fin, en otros organismos incluidos en los reinos animal, vegetal y protocista.

A lo largo del desarrollo de esta tesis en que se comparó el DNA mitocondrial de cinco cepas de levaduras pertenecientes al género Kluyveromyces, se observaron diferencias marcadas en cuanto a la composición y estructura de esta molécula; la más notable es la presencia de secuencias ricas en los nucleótidos guanina y citosina (agrupamientos de G y C), caracterizadas por numerosos sitios de restricción para las enzimas Sst II y Hap II en las cepas K. lactis, K. vanudenii y K. drosophilum. Esta característica también se ha descrito para otros aislamientos dentro de este mismo género (Ragnini y Fukuhara, 1988).

Cuando se compararon los patrones de restricción obtenidos con otras enzimas, también se encontraron similitudes entre levaduras del grupo de K. lactis. En general, presentan más sitios de restricción que los DNAs mitocondriales de las cepas del grupo de K. marxianus (K. fragilis 278, K. fragilis 2415 y K. bulgaricus 4327).

En los mapas de restricción que se construyeron se encontró que el orden y distancia aproximada de los sitios de restricción únicos, se conservó para cada grupo. También se encontró que algunos de ellos son marcadores de genes mitocondriales, como es el caso de las enzimas Mlu I, que identifica al rRNA 15S en todas las cepas que se estudiaron y Sst I que se localiza en el gen de apocitocromo b para las levaduras del grupo de K. lactis.

Los mapas de restricción y genéticos que se construyeron aportaron tres datos importantes:

- Permitieron la detección de polimorfismos entre las cepas.
- Se encontró que dos de las secuencias de S. cerevisiae utilizadas para localizar en Kluyveromyces secuencias homólogas (rRNA 15S y oli 1), al parecer presentan una gran similitud en la secuencia, deducible de su fuerte señal de hibridación en condiciones de alta astringencia; mientras que la sonda oli 2 requirió de condiciones de hibridación más suaves, lo que sugiere menos semejanza. Cuando se dispongan de las secuencias de estos genes en Kluyveromyces se podrán comprobar estos hechos y se establecerá una comparación más significativa.
- Al analizarse el orden de los genes se observó que cada grupo posee un arreglo característico. Tomando como punto de referencia al gen de apocitocromo b, en las levaduras del tipo de K. marxianus este orden corresponde a citocromo b, rRNA 15S, oli 2, oli 1 y rRNA 21S; en las del grupo de K. lactis el orden es citocromo b, rRNA 15S, rRNA 21S, oli 1 y oli 2. La cepa K. bulgaricus I.B. es la excepción, ya que presentó un arreglo distinto (citocromo b, oli 2, rRNA 15S, oli 1 y rRNA 21S) y una distribución en una zona muy estrecha del mtDNA.

Hay que hacer notar que los sitios de restricción adyacentes a las posibles secuencias génicas, están muy conservados entre las cepas de K. fragilis 278, K. fragilis 2415 y por lo tanto en K. bulgaricus 4327.

Las diferencias encontradas en cuanto a la composición y estructura del DNA mitocondrial, junto con las encontradas en otros aislamientos del mismo género en estudios de zimogramas (Sidenberg y Lachance, 1983 ; Lachance, 1985; Sidenberg y Lachance, 1986; Martini et al., 1987) ; patrones electroforéticos de DNA cromosómico ( Steensma et al., 1988; Sor y Fukuhara, 1989); reasociación de DNA nuclear ( Fuson, 1987) así como otros estudios de la organización del mtDNA (Wésolowski et al., 1981; Ragnini y Fukuhara, 1988; Coria et al. , 1990), fundamentan una separación de los miembros de este género, por lo menos en dos especies diferentes: K. lactis ( con las variedades lactis, vanudenii y drosophilarum) y K. marxianus (con las variedades fragilis, marxianus y bulgaricus ; proposición distinta a la de Johannsen (Johannsen, 1980), que basándose en estudios de entrecruzamiento , propone la unificación de las especies K. vanudenii, K. lactis, K. drosophilarum, K. fragilis, K. marxianus , K. bulgaricus, y aquellas otras K. phaseolusporus, K. dozhanskii, K. wikenii y K. cicerisporus, como variedades de la especie única K. marxianus.

El DNA mitocondrial, como cualquier otro criterio que se evalúa en los estudios taxonómicos, no puede ser considerado como único para la clasificación, sino que debe formar parte de todas aquellas características que definen a una especie.

### Perspectivas.

Los trabajos realizados en esta tesis, pueden ser la base de estudios posteriores.

Dentro de los estudios taxonómicos o evolutivos, la localización de algunos genes podría conducir a su clonación y secuenciación, para establecer las posibles relaciones filogenéticas dentro de este grupo de levaduras a nivel de secuencia de DNA.

En cuanto al aspecto bioquímico y molecular, sería de gran interés caracterizar los genes localizados cubriendo aspectos tales como funcionalidad, expresión, regulación, transcripción, etc., fenómenos que pueden ahora ser estudiados gracias al avance de las técnicas bioquímicas y del DNA recombinante.

Es vasto el campo de estudio para aquellas personas interesadas en descubrir las maravillas de los fenómenos biológicos.

## VI. BIBLIOGRAFIA.

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, J.H., Staden, R. y Young, I.G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, Lond. 290: 457-464.

Bianchi, M.M., Falcone, C., Xin, J.Ch., Wésolowski-Louvel, M., Frontali, L. y Fukuhara, H. 1987. Transformation of the yeast Kluyveromyces lactis by new vectors derived from the 1.6 m circular plasmid pKD1. *Curr.Genet.* 12:185-192.

Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, R.W., Boyer, H.W., Cross, J.H. y Falkow, S. 1977. Construction and characterization of new cloning vectors. II. A multipurpose cloning system. *Gene.* 2:95.

Brunner, L.A. y Coris, O.R. 1989. Cloning and sequencing of the gene for apocytochrome b of the yeast Kluyveromyces lactis strains WM27 (NRRL Y-17066) and WM37 (NRRL Y-1140). *Yeast.* 5:209-218.

Clark-Walker, G.D., McArthur, C.R. y Sriprakash, K.S. 1983a. 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. 1983b. Analysis of a five gene cluster and unique orientation of large genic sequences in Torulopsis glabrata mitochondrial DNA. *J.Mol.Evol.* 19: 342-345.

Clark-Walker, G.D. 1985. Basis of diversity in mitochondrial DNAs. En T. Cavalier-Smith (ed.). The evolution of genome size. John Wiley & Sons. pp 277-297.

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: G.S. de Hoog, M.Th. Smith & A.C.M. Weijman (eds.) The expanding realm of yeast-like fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Elsevier, Amsterdam.

Clark-Walker,G.D. 1989. In vivo rearrangements of mitochondrial DNA in Saccharomyces cerevisiae. Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A. 86:8847-8851.

Coria,O.R., Zalce,O.M.E., Mendoza,R.V., Alvarez,J.G., Tuena,C.A. y Brunner,L.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.

Cosson,J. & Tzagoloff,A. 1979. Sequence homologies of (Guanosine + Cytidine)-rich regions of mitochondrial DNA of Saccharomyces cerevisiae. J.Biol.Chem. 254(1):42-43.

Ephrusii,B. 1953. Nucleo-cytoplasmic relations in microorganism. Clarendon Press,Oxford,Inglaterra.

Fabiani,L., Aragona,M. y Frontali,L. 1990. Isolation and sequence analysis of a K. lactis chromosomal DNA element able to autonomously replicate in S. cerevisiae and K. lactis. Yeast. 6:69-76.

Fitch,W.M., Smith,T.F. y Ralph,W.W. 1983. Mapping the order of DNA restriction fragments. Gene. 22: 19-29.

Fuson,G.B., Presley,H.L., y Phaff,H.J. 1987. Deoxyribonucleic acid base sequence relatedness among members of the yeast genus Kluyveromyces. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 371-379.

Grivell,L.A. 1983. Mitochondrial DNA. Sci. Am. 248: 60-73.

Grivell,L.A. 1989. Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. Eur.J.Biochem.182: 477-493.

Hadfield,C., Jordan,B.E., Mount,R.C., Pretorius,G.H.J. y Burak,E. 1990. GA18-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in Saccharomyces cerevisiae. Curr.Genet. 18: 303-313.

Hardy,C.M., Galeotti,C.L. y Clark-Walker,G.D. 1989. Deletions and rearrangements in Kluyveromyces lactis mitochondrial DNA. Curr. Genet. 16: 419-427.

- Hinnen, A., Hicks, J.B. y Fink, G.R. 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:1929.
- Hoeben, P. y Clark-Walker, G.D. 1986. An approach to yeast classification by mapping mitochondrial DNA from Dekkera/Brettanomyces and Eeniella genera. *Curr. Genet.* 10:371-379.
- Hudspeth, M.E.S., Sumrad, D.S., Tatti, K.H. y Grossman, L.T. 1980. Rapid purification of yeast mitochondrial DNA in high yield. *Biophys. Acta.* 60:221-228.
- Johannsen, E. y van der Walt, J.P.. 1978. Interfertility as basis for the delimitation of Kluveromyces marxianus. *Arch. Microbiol.* 118: 45-48.
- Johannsen, E. 1980. Hybridization studies within the genus Kluveromyces van der Walt emend. van der Walt. *Antonie van Leeuwenhoek.* 46: 177-189.
- Jones, C.W. y Poole, R.K. 1985. The analysis of cytochromes. *Methods in Microbiology.* 18: 285-327.
- Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. The yeasts a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam.
- Kurtzman, C.P. y Robnett, C.J. 1991. Phylogenetic relationships among species of Saccharomyces, Schizosaccharomyces, Debaryomyces & Schwannomyces determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast.* 7: 61-72.
- Lachance, M.A. 1985. Current views on the yeast species. *Microbiological Sciences.* 2(4):122-126.
- Li, M., Tzagoloff, A., Underbrink-Lyon, K. y Martin, N.C. 1982. Identification of the paromomycin-resistance mutation in the 15s rRNA gene of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257(10):5921-5928.
- Macino, G. y Tzagoloff, A. 1980. Assembly of the mitochondrial membrane system: sequence analysis of a yeast mitochondrial ATPase gene containing the oli-2 and oli-4 loci. *Cell.* 20:507-517.

Macreadie, I.G., Horaitis, O., Vaughan, P.R. y Clark-Walker, G.D. 1991. Constitutive expression of the Saccharomyces cerevisiae CUP1 gene in Kluyveromyces lactis. Yeast. 7: 127-135.

Mandel, M. y Higa, A. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53:154.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York.

Martini, A., Phaff, H.J., y Douglas, S.A. 1972. Deoxyribonucleic acid composition of species in the yeast genus Kluyveromyces van der Walt. emend. van der Walt. J. Bacteriol. 111: 481-487.

Martini, A. y Phaff, H.J. 1973. The optical determination of DNA-DNA homologies in yeasts. Ann. Microbiol. 23:59-68.

Martini, A.V., Sidenberg, D.G. y Lachance, M.A. 1987. Analysis of a hybrid between Kluyveromyces marxianus and K. thermotolerans by physiological profile comparison, isoenzyme electrophoresis, DNA reassociation, and restriction mapping of ribosomal DNA. Can. J. Microbiol. 33: 971-978.

McArthur, C.R. y Clark-Walker, G.D. 1983. Mitochondrial DNA size diversity in the Dekkera/Brettanomyces yeasts. Curr.Genet. 7:29-35.

Morimoto, R. y Rabinowitz, M. 1979. Physical mapping of the yeast mitochondrial genome. Molec.Gen.Genet. 170 :25-48.

Phaff, H.J. 1980. The species concept in yeast: physiologic, morphologic, genetic and ecological parameters. p. 635-643. En. G.G. Stewart and I. Rusell (eds). Current Developments in Yeast Research. Pergamon Press. Toronto.

Phaff, H.J. 1984. DNA, enzymes and cell wall. En N.J.W. Kreger-van Rij (ed.). The yeasts a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam.

Poncet, S. 1973. Taxonomique numerique du genre Kluyveromyces. Mycopathol. Mycol. Appl. 51: 267-281.

Prunell, A. y Bernardi, G. 1977. The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. VI. Genome organization. J.Mol.Biol. 110: 53-74.

Ragnini, A. y Fukuhara, H. 1988. Mitochondrial DNA of the yeast Kluyveromyces: guanine-cytosine rich sequence clusters. Nucleic Acids Research. 16 (17): 8433-8442.

Roman, H. 1981. Development of yeast as an experimental organism. En: J.N. Strathern, E.W. Jones & J.R. Broach. (Eds.). The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. pp 1-9.

Rose, A.H. y Harrison, J.S. 1987. The yeasts. Vol 1. Academic Press. Londres.

Sanders, J.P.M., Heyting, C., Verbeet, M.P., Meijlink, F.C.P.W. y Borst, P. 1977. The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. III. Comparison of the physical maps of the mitochondrial DNAs from three wild-type Saccharomyces strains. Molec.Gen.Genet. 157: 239-261.

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.

Sidenberg, D.G. y Lachance, M.A. 1983. Speciation, species delineation and electrophoretic isoenzyme patterns of the type strains of Kluyveromyces van der Walt emend. van der Walt. Int.J. Syst. Bact. 33(6): 822-828.

Sidenberg, G.D. 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(1): 94-102.

Sor, F. y Fukuhara, H. 1982. Nucleotide sequence of the small ribosomal RNA gene from the mitochondria of S. cerevisiae. En: P.P. Slonimski, P. Borst & G. Attardi (eds.). Mitochondrial Genes. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, pp 255-262.

Sor, F. y Fukuhara, H. 1989. Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus Kluyveromyces. Yeast. 5: 1-10.

Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98:503.

Steensma, H.J., de Jonge, F.C.M. y Linnekamp, M. 1968. The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: Kluyveromyces marxianus and K. lactis. *Curr.Genet.* 14:311-317.

Suyama, Y. y Miura, K. 1968. Size and structural variations of mitochondrial DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 60:235-242.

Tanguy-Rougeau, C., Chen, X.J., Wésolowski-Louvel, M, y Fukuhara, H. 1990. Expression of a foreign Km<sup>R</sup> gene in linear killer DNA plasmid in yeast. *Gene.* 91:43-50.

Tzagoloff, A., Macino, G. y Sebald, W. 1979. Mitochondrial genes and translation products. *Ann.Rev.Biochem.* 48: 419-441.

Tzagoloff, A. 1982. Mitocondria. Plenum Press. Nueva York y Londres.

Tzagoloff, A. y Dieckmann, C. 1990. PET genes of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiological Reviews.* 54(9):211-225.

Vaughan Martini, A. y Martini, A. 1987. Taxonomic revision of the yeast genus Kluyveromyces by nuclear deoxyribonucleic acid reassociation. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 37:380-385.

Vaughan Martini, A. 1991. Evaluation of philogenetic relationships among fission yeast by nDNA/nDNA reassociation and conventional taxonomic criteria. *Yeast*, 7: 73-78.

Van den Boogaart, P., Samallo, J. y Agsteribbe, E. 1982. Similar genes for a mitochondrial ATPase subunit in the nuclear and mitochondrial genomes of Neurospora crassa. *Nature, Lond.* 298: 187-189.

van der Walt, J.P. 1956. Antonie van Leeuwenhoek. *J. Microbiol.Serol.* 22:321-326.

van der Walt, J.P. y Johannsen, E. 1984. Kluyveromyces van der Walt emend. van der Walt. En: N.J.W. Kreger-van Rij (ed.). The yeasts a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam, pp 224-251.

van der Walt, J.P. y Yarrow, D. 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. En: N.J.W. Kreger-van Rij (ed.) The yeasts a taxonomic study. Elsevier, Amsterdam pp 52-99.

Ward, B.L., Anderson, R.S. y Bendich, A.J. 1981. The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae). Cell. 35:793-803.

Wesolowski, M., Algeri, A. y Fukuhara, H. 1981. Gene organization of the mitochondrial DNA of yeasts: Kluyveromyces lactis and Saccharomycopsis lipolytica. Curr. Genet. 1: 157-162.

Yamada, Y. Kondo, K. 1972. Taxonomic significance of the coenzyme Q system in yeasts and yeast-like fungi. En: K. Iwata (ed.). Yeasts and yeast-like Microorganism in Medical Science. Proc. 2nd. Int. Specialized Symp. Yeasts, Tokyo, pp. 63-69.