

3/123

María Teresa González Muñoz

ESTUDIOS SOBRE LA SUPRESIVIDAD DE
MUTANTES r^- DE SACCHAROMYCES CE-
REVISIAE

TESIS DOCTORALES DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

53

R= 24.625

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

" ESTUDIOS SOBRE LA SUPRESIVIDAD DE MUTANTES e^{-}
DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE "

María Teresa González Muñoz

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613491258
N.º Copia 615437309

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1974

Tesis Doctoral dirigida por el Prof. Dr. D. Enrique Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Granada. Fue leída el día 28 de setiembre de 1974, ante el tribunal formado por los Profesores Montoya Gómez, Sañudo Palazuelos, Ramos Cormenzana, Cerdá Olmedo y Olivares Pascual. Obtuvo la calificación de Sobresaliente "cum laude".

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, durante los años 1970 - 1974.

La realización del trabajo experimental ha sido sufragada en parte por una Beca del Plan de Formación de Personal Docente e Investigador.

Mi agradecimiento

Al Director de esta Tesis Doctoral, Prof. Dr. Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, por su constante orientación y ayuda en la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. Recalde Martínez, Director de la Estación Experimental del Zaidín, del C.S.I.C., por haberme cedido amablemente sus instalaciones.

Al Dr. Olivares Pascual, Profesor de Investigación del C.S.I.C. por sus consejos en temas de su especialidad.

Igualmente, quiero dar las gracias a mis compañeros, personal técnico y auxiliar de la Estación Experimental del Zaidín y del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

INDICE

| | <u>Pág</u> |
|--|------------|
| INTRODUCCION | 7 |
| MATERIAL Y METODOS | 24 |
| 1. - Microorganismos | 25 |
| 1.1. - Razas aisladas a partir de levadura de pa- nadería | 25 |
| 1.2. - Razas haploides de <i>S. cerevisiae</i> | 25 |
| 1.3. - Razas derivadas de las citadas en el aparta- do 1.1 empleadas en la realización del tra- bajo | 26 |
| 1.4. - Conservación de las levaduras empleadas.. | 27 |
| 2. - Medios de cultivo | 27 |
| 2.1. - Medios de conservación y crecimiento | |
| 2.2. - Medios empleados para la esporulación de- levaduras | 28 |
| 2.2.1. - Medios de preesporulación..... | 28 |
| 2.2.2. - Medios de esporulación | 29 |
| 2.3. - Medio de conjugación | 29 |
| 2.4. - Medio mínimo de Wickerham | 30 |
| 2.4.1. - Composición | 30 |
| 2.4.2. - Preparación | 31 |
| 2.4.3. - Variantes empleadas | 33 |
| 2.5. - Medios especiales | 33 |
| 2.5.1. - Medios líquidos con derivados de acri- dina, bromuro de etidio y cicloheximi- da. | 34 |

| | <u>Pag</u> |
|--|------------|
| 2.5.2. – Medios con eritromicina y cloromicetina | 35 |
| 3. – Técnicas para la comprobación de los requerimientos nutritivos de razas auxótrofas | 35 |
| 3.1. – Preparación de los medios correspondientes | 35 |
| 3.2. – Comprobación de los requerimientos nutritivos | 36 |
| 4. – Técnicas empleadas en la obtención y selección de mutantes q^- y q^o | 37 |
| 4.1. – Inducción de mutaciones q^- y q^o | 37 |
| 4.1.1. – Tratamientos con derivados de acridina | 37 |
| 4.1.2. – Tratamientos con bromuro de etidio | 38 |
| 4.1.3. – Tratamientos con eritromicina y cloromicetina | 38 |
| 4.2. – Diferenciación y selección de razas q^- y q^o | 39 |
| 4.2.1. – Diferenciación por siembras en medio NLG | 39 |
| 4.2.2. – Técnica del cloruro de trifenil tetrazolio | 39 |
| 4.2.3. – Selección de razas q^- y q^o | 40 |
| 4.3. – Comprobación de la deficiencia respiratoria y tipo de la misma de las razas seleccionadas | 41 |
| 5. – Técnica de cruce entre levaduras haploides y selección de cigotos prototrofos | 41 |
| 5.1. – Determinación cualitativa de la capacidad de cruce y viabilidad de los cigotos | 42 |
| 5.2. – Cruce sobre medio de conjugación sólido | 42 |

| | <u>Pag</u> |
|--|------------|
| 5.3. – Cruce en medio de conjugación líquido | 43 |
| 5.3.1. – Cruce en aireación | 43 |
| 5.3.2. – Cruce sin aireación | 43 |
| 6. – Determinación del porcentaje de células con de- ficiencias respiratorias en cultivos estaciona- rios de razas q^+ | 44 |
| 7. – Determinación de la frecuencia de mutación es- pontánea | 45 |
| 8. – Determinación de la supresividad de las razas.. q^- | 46 |
| 9. – Esporulación de razas diploides y obtención – y selección de ascosporas | 46 |
| 9.1. – Esporulación | 46 |
| 9.2. – Rotura de las ascas y obtención de las – ascosporas | 47 |
| 9.3. – Selección de razas haploides a partir de. las ascosporas | 48 |
| 10. – Comprobación del carácter haploide o diploj.. de de una raza | 48 |
| 11. – Determinación de la sensibilidad o resisten- cia a antibióticos y selección de razas resis- tentes | 49 |
| 11.1. – Determinación de la sensibilidad o re- sistencia | 49 |
| 11.2. – Selección de razas resistentes. | 50 |
| EXPERIENCIAS Y RESULTADOS | 51 |
| 1. – Experiencias preliminares | 52 |

| | |
|---|----|
| 1. 1. - Obtención de razas haploides a partir de .. levadura comercial de panadería | 52 |
| 1. 2. - Comprobación del genotipo de las razas ha. ploides empleadas | 52 |
| 1. 3. - Comprobación de la capacidad de cruce e <u>l</u> . tre razas de distinto signo y puesta a pu <u>n</u> . to de las técnicas " standard " de cruce ... | 54 |
| 1. 3. 1. - Comprobación cualitativa de la capaci. de cruce de las razas seleccionadas y. viabilidad de los cigotos | 54 |
| 1. 3. 2. - Puesta a punto de los métodos de cru. ce | 56 |
| 2. - Obtención de razas q^- y q^0 . Efectos de los a-.. gentes mutagénicos empleados sobre las razas . q^+ y q^- | 57 |
| 2. 1. - Mutaciones espontáneas | 58 |
| 2. 2. - Mutantes obtenidos por tratamientos con de. rivados de acridina | 58 |
| 2. 3. - Mutantes obtenidos por tratamientos con ... bromuro de etidio | 59 |
| 2. 4. - Obtención de mutantes mediante tratamien <u>o</u> .. to con eritromicina | 63 |
| 2. 5. - Estabilidad de las razas q^- seleccionadas.. | 67 |
| 2. 5. 1. - Reversión espontánea a q^+ | 67 |
| 2. 5. 2. - Reversión por tratamientos con deriva. dos de acridina | 67 |
| 2. 5. 3. - Resistencia a la acción del bromuro de etidio | 67 |
| 3. - Efectos de tratamientos con antibióticos que in- hiben la síntesis de proteínas en ribosomas mi- tocondriales y citoplasmáticos sobre la supresi vidad de razas q^- | 70 |

| | |
|---|----|
| 3. 1. - Selección de razas q- y q+ sensibles y re- | |
| sistentes a la eritromicina y cloromiceti- | |
| na | 71 |
| 3. 1. 1. - Selección de razas sensibles a la eri- | |
| tromicina | 71 |
| 3. 1. 2. - Selección de razas sensibles a la clo- | |
| romicetina | 71 |
| 3. 1. 3. - Selección de razas q+ resistentes a la | |
| eritromicina | 73 |
| 3. 1. 4. - Selección de razas q+ resistentes a la | |
| cloromicetina | 73 |
| 3. 1. 5. - Comprobación de la sensibilidad de las | |
| razas q- a la eritromicina y cloromice- | |
| tina | 73 |
| 3. 1. 6. - Selección de razas q- resistentes a -. | |
| eritromicina y cloromicetina | 74 |
| 3. 2. - Supresividad de razas q- cultivadas y cru- | |
| zadas en presencia y ausencia de eritromi- | |
| cina | 74 |
| 3. 3. - Supresividad de razas q- cultivadas en pre- | |
| sencia y ausencia de cloromicetina | 75 |
| 3. 4. - Supresividad de una raza q- cultivada en -. | |
| presencia y ausencia de cicloheximida | 77 |
| 3. 5. - Supresividad de una raza q- frente a una .. | |
| raza q+ cultivada o no en presencia de eri- | |
| tromicina | 77 |
| 4. - Influencia de las razas q+ empleadas y de las .. | |
| condiciones en que se efectúan los cruces sobre | |
| la supresividad de las razas q- | 80 |
| 4. 1. - Variación de la supresividad de razas q- en | |
| cruces con diferentes q+. | 81 |

| | <u>Pag</u> |
|--|------------|
| 4.2. - Variación de la supresividad de una raza q^- . según las condiciones fisiológicas de las ra- zas q^+ con las que se cruza | 82 |
| 4.3. - Variación de la supresividad en función de ... las condiciones en que se llevan a cabo los .. cruces | 83 |
| 4.4. - Variación en el valor de la supresividad de .. una raza q^- de acuerdo con la proporción de . células q^- presentes en los cultivos de célu- las q^+ | 83 |
| 4.5. - Determinación de la habilidad de cruce entre . razas q^+ , q^- y q^0 | 84 |
| 4.6. - Efectos de sobrenadantes procedentes de cru- ces q^+xq^- y q^-xq^- sobre el rendimiento en <u>ci</u> . gotos q^- de cruces q^+xq^+ | 90 |
| 5. - Comportamiento de razas haploides q^+ proceden- tes de cigotos obtenidos en cruces de razas q^+ y . q^- | 96 |
| DISCUSION | 103 |
| CONCLUSIONES | 114 |
| BIBLIOGRAFIA | 117 |
| INDICE DE TABLAS Y FIGURAS | 130 |

INTRODUCCION

Mutantes " petites " de levadura

Varios tipos de levaduras, especialmente especies de Saccharomyces, poseen la capacidad de captar la energía necesaria para su vida mediante la oxidación de los substratos adecuados tanto por vía aerobia como por procesos fermentativos anaerobios, de manera que cuando por cualquier circunstancia no les es posible utilizar la primera de las vías citadas, son capaces aún de vivir a espensas de la segunda.

Con relativa frecuencia aparecen en los cultivos de las levaduras citadas células que han perdido de manera permanente la capacidad de utilizar substratos por vía respiratoria. Se ha demostrado que esta pérdida se transmite por herencia, tanto a través del proceso de reproducción vegetativa como sexual, por lo que se trata de verdaderos mutantes que a más de por su deficiencia respiratoria difieren de las levaduras normales en diversos caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. De estos caracteres, el tamaño de las colonias de levaduras - con deficiencias respiratorias fué el primero que llamó la atención. Efectivamente, los mutantes de que hablamos son menos eficientes que las levaduras normales a la hora de utilizar los azúcares presentes en el medio por lo que su crecimiento es más lento; como consecuencia de ello las colonias de estos mutantes son mucho menores que las colonias de levaduras normales en igualdad de condiciones de cultivo. En razón de este carácter, los investigadores franceses designaron como levaduras " petite " a los citados mutantes (Ephrussi et al, 1949a; Ephrussi et al, 1949b; Slonimski, 1949; Slonimski y Ephrussi 1949; Tavlitzki, 1949) denominación que se ha conservado hasta nuestros días y predominando sobre las propuestas por otros autores, tales como mutaciones " aer " (Lindegren, 1953; Ogur y St. John, 1956), " secondary colony variant " (Wild and

Hinshelwood, 1956), mutantes R^- (Wright and Lederberg 1957), mutantes M_k (Schwartz, 1959), variantes W (Yanagishima, 1956) e incluso sobre la denominación mucho más adecuada y genérica, propuesta por Moat et al, (1959) de mutantes RD (respiration-deficient).

Como queda dicho, la mutación petite es viable en aquellas levaduras capaces de obtener la energía necesaria para su vida por vía fermentativa, por lo que de acuerdo con Bulder (1964 a, b.) las levaduras pueden dividirse en dos grandes grupos: las llamadas "petites negativas" en las que no es posible demostrar la presencia de estos mutantes y las "petites positivas" que sí las presentan, y entre las que a más del S. cerevisiae se incluyen : S. pastorianus; S. exiguus; S. logos; S. bayanus; S. willianus; S. uvarum; S. carlsbergensis; S. chevalieri; S. heterogenicus; S. oviformis; S. italicus; S. steineri; S. fructuum; Torulopsis holmii; T. glabrata; Candida robusta; Kloeckera africana; Brettanomyces clausenii; B. fructuum; Schizosaccharomyces pombe; Saccharomyces florentinus; Brettanomyces lambicus; Saccharomyces fragilis .

A parte de las características morfológicas de sus colonias, que como queda dicho fué lo que primero llamó la atención, los mutantes "petites", cualquiera que sea su naturaleza genética, presentaban una serie de características bioquímicas y fisiológicas comunes. La principal de ellas como se dijo al principio es su deficiencia respiratoria o dicho de otra forma la incapacidad, prácticamente absoluta, para utilizar el oxígeno como aceptor de electrones. Esta deficiencia respiratoria es consecuencia de alteraciones, más o menos profundas, en la cadena transportadora de electrones que se traducen en la ausencia de varios citocromos presentes en células normales. Normalmente todas las mutaciones " petites " carecen de citocromos b y $a+a_3$, aunque en ocasiones la deficiencia respiratoria puede venir condicionada por la ausencia solamente en citocromos c_1+b_2 (Sherman y Slonimski, 1964, Sherman, - 1963). Paralelamente con esta alteración en su contenido

de citocromos existen otras alteraciones enzimáticas, entre las que destacan el bajo contenido en catalasa (Callao y Montoya, 1950) y el aumento o disminución en los niveles en varias deshidrogenasas (Nuñez de Castro, 1972; Arias de Saavedra, - 1974).

Como característica fisiológica más notable, destaca la incapacidad para esporular que muestran las razas diploides " petite " (Ephursi y Hottinguer, 1951).

La deficiencia respiratoria, consecuencia de las alteraciones de los citocromos y enzimas respiratorias antes expuestas, confiere a los mutantes " petites " una serie de características que les hacen fácilmente diferenciables y permiten, por tanto, su rápida selección:

- Capacidad nula de consumo de oxígeno ($QO_2 = 0$)
- Incapacidad para crecer en medios de cultivo cuya única fuente de carbono no puede ser degradada por vía fermentativa, tales como acetato (Ogur et al, 1954; Yanaguishima, 1956), lactato (Ogur y St. John, 1956; Yanaguishima, 1956); - glicerol y succinato (Yanaguishima, 1956), etc
- Incapacidad para utilizar como aceptor de electrones determinados compuestos químicos tales como el cloruro de 2-3-5 trifenil tetrazolio, que las levaduras normales reducen hasta el término de formazano de color rojo e insoluble y que se acumula en su interior (Nagai, 1955; Ogur et al, 1957; Yanaguishima, 1956).

Estos caracteres permiten, como ya se ha dicho, la fácil identificación y selección de los mutantes " petites " por una variedad de procedimientos:

- Diseminación de los cultivos a ensayar en medios, con lactato y una pequeña cantidad de glucosa como fuentes de carbono, en los que las levaduras suficientes respiratorias dan lugar a colonias de tamaño normal, en tanto que los mutantes " petites " originan colonias muy pequeñas debido a la escasa disponibilidad de glucosa (Ephrussi y Grandchamp, 1965; Słonimski et al, 1963).

- Diseminación en medios con glucosa y acetato sódico añadidos de un indicador adecuado en los que las colonias procedentes de mutantes "petites", al no utilizar el acetato después de agotada la glucosa, no alcalinizan el medio y por tanto, a diferencia de las levaduras normales, no hacen virar el indicador (Ogur et al, 1954).

- Diseminación en medios con glucosa y tratamiento de las colonias crecidas con cloruro de trifenil tetrazolio en condiciones adecuadas; tratamiento que trae como consecuencia la tinción en rojo de las colonias de levadura normal, mientras que no afecta al color de las colonias producidas por mutantes "petites". (Ogur et al, 1957)

- Finalmente, y aunque menos empleados, también ha sido utilizado: para la diferenciación de colonias normales y "petites" la incapacidad de estas últimas para teñirse de azul en presencia de la leucobase de azul de metileno (Gause et al 1957) ó, por el contrario, su capacidad para teñirse fuertemente de color rojo en medios con rojo de Magdala (Nagai, 1963a).

Tipos de mutantes "petites"

A pesar de la variedad de levaduras "petites" positivas "citadas anteriormente, la casi totalidad de las investigaciones bioquímicas y genéticas se han llevado a cabo casi exclusivamente sobre razas haploides ó diploides de S. cerevisiae.

La producción de mutantes espontáneos en cultivos estacionarios de la mayoría de las razas diploides de S. cerevisiae es 1%, lo que corresponde a una frecuencia de mutación del orden de 2×10^{-3} por célula y por generación (Ephursi et al, 1949c). Las razas haploides presentan normalmente proporciones de mutantes mayores (1-5%) y co-

correspondientes frecuencias de mutación también mayores; finalmente existen casos extremos de razas haploides, las llamadas "razas inestables" (Nagai et al, 1961), que llegan a presentar, en poblaciones en equilibrio en medios azucarados, hasta un 50% de mutantes "petites".

Esta frecuencia de mutación sorprendentemente alta si se compara con la frecuencia con que tienen lugar otros tipos de mutaciones, junto con el hecho de la ausencia total de reversión en períodos de experimentación que han abarcado varios años (Ephrussi y Hottinguer, 1951) hizo sospechar - que la aparición de los mutantes "petites" era el resultado de la pérdida o alteración de un elemento genético extracromosómico citoplasmático, hipótesis que fué confirmada plenamente por Ephrussi et al, (1949 a y b) al comprobar que la segregación de ascosporas procedentes de un cigoto normal obtenido en un cruce de una levadura normal con otra deficiente era del tipo 4:0 y no de 2:2 como hubiese ocurrido caso de que la mutación "petite" dependiese de mutaciones ocurridas en genes nucleares.

La existencia de un factor citoplasmático que condiciona la herencia de la capacidad respiratoria ha sido plenamente demostrada con posteridad en diversas investigaciones, entre las que cabe destacar los trabajos de Ephrussi (1953) y Wright y Lederberg (1957).

No obstante, en 1950, Chen et al. demostraron que ciertos mutantes, fenotípicamente idénticos a los anteriores, estaban condicionados por la mutación de un gen nuclear, como se deducía del hecho de que cuando se cruzaban con una raza normal daban lugar a cigotos, normales desde el punto de vista respiratorio, que al esporular segregaban un 50% de ascosporas normales y un 50% de ascosporas de tipo "petite". A este último tipo de mutantes se les denominó "segregacionales" para distinguirlos de los del tipo anterior que recibieron el nombre de "vegetativos".

Sherman y Ephrussi (1962) utilizaron los símbolos P y p para designar, respectivamente, los alelos nucleares de tipo silvestre y mutado que condicionan la normalidad o deficiencia respiratoria. Del mismo modo utilizaron los símbolos q^+ y q^- para designar, respectivamente, la presencia o ausencia del factor citoplasmático requerido para la síntesis de las enzimas respiratorias.

Las combinaciones de estos símbolos identifican los tres tipos de mutantes "petites" encontrados (Chen et al, 1950): mutante vegetativo, P q^- ; mutante segregacional, p q^+ ; doble mutante, p q^- . Siendo el tipo silvestre P q^+ .

En este trabajo se han utilizado exclusivamente mutantes vegetativos, P q^- , por lo que no se describirán los tipos ni características de los restantes mutantes " petites " (Sherman, 1963; Sherman y Slominski, 1964).

Inducción de mutantes " petites vegetativos "

Como ya ha sido citado, la frecuencia de aparición de estos tipos de mutantes en cultivos de razas q^+ es bastante alto, por lo que es posible seleccionar con facilidad mutantes espontáneos a partir de los cultivos antes citados. La frecuencia de aparición de mutantes " petites vegetativos " puede ser incrementada, no obstante, hasta un 100% por tratamientos adecuados con agentes físicos y químicos que actúan selectivamente sobre el factor q sin afectar grandemente los genes nucleares.

Entre los agentes físicos más eficaces se encuentran las temperaturas altas y la irradiación con luz ultravioleta. Así mismo existen razas sensibles al frío que dan lugar a alta proporción de mutantes " petites " cuando se cultivan a 18°C, que puede llegar a ser hasta de un 100% en el caso de razas inestables (Weislogel y Butow, 1970; Butow et al, 1971).

La producción de mutantes " petites " a partir de razas q^+ cultivadas a temperaturas superiores a la normal fue descrita primeramente por Ycas (1936) y comprobada más detalladamente con posterioridad por Sherman (1957; 53 y 59). Thomas y Williamson (1971) llegan a la conclusión de que las mutaciones producidas son consecuencias de transiciones y -transversiones provocadas por el calor en el ADN mitocondrial (ADN-M).

La utilización, no obstante, de temperaturas altas o bajas para la inducción de mutaciones " petites vegetativas " ha sido muy limitada ya que, como se verá seguidamente, existen otros métodos de mayor eficacia y mas fácil utilización para dicho objeto.

La radiación ultravioleta es un medio muy eficaz para aumentar la frecuencia de producción de mutantes " petites " (Raut, 1953, 1954). Aunque en estos tratamientos se originan mutantes $P q^-$, $p q^+$ y $p q^-$ (Saracheck, 1958; Nagai et al, 1961), Lachowicz et al, (1969), encuentran que la mayoría de los mutantes producidos son de tipo vegetativo . Es interesante citar, en relación con los efectos de la luz U. V. la existencia de un proceso de foto-reactivación que reduce la proporción de mutantes " petites " inducidos (Saracheck, 1958).

En cuanto a los agentes químicos, son multitud de ellos y de la más variada naturaleza los descritos como inductores de mutaciones " petites vegetativas " : derivados de la -acridina (Slominski, 1953; Marcovich, 1953; Nagai, 1959; -Schwartz, 1959; Nagai et al, 1961); bromuro de etidio (bromuro de 2:7-diamino-10-etil-9 fenilfenantridina) (Radloff et al, 1967; Slominski et al, 1963); pinaciano (Sugimura, et al 1969); 4-nitroquinolina-1-óxido (Nagai, 1959); auxina (Yanagishima, 1964); dodecil sulfato sódico (Pinto da Costa y Bacila, 1973); fluorouracilo (Arca et al, 1971), a más de una larga serie de diversos colorantes, sales de metales pesados y compuestos varios (Nagai et al, 1961).

De todos ellos, los derivados de acridina (acriflavina, euflavina, rojo de acridina, naranja de acridina etc) y el bromuro de etidio, son los agentes mas eficaces a la hora de inducir la mutación " petite vegetativa ".

Los derivados de acridina ejercen su acción merced a su bien conocida propiedad de intercalarse entre las bases del ADN constitutivo del factor ρ , identificado hoy día con el ADN-M; intercalación que da lugar a la producción de deleciones, cambios en el cociente GC:AT e incluso inhibición de la síntesis de dicho ADN (Lerman, 1961 ; Nagai, 1963b; Avers et al, 1965; Arca et al, 1971; Arakatsu, 1972, etc).

A concentraciones adecuadas los derivados de acridina no afectan a los genes nucleares por lo que se producen exclusivamente mutantes de tipo ρ^- , carentes de citocromos b y $a+a_3$ (Ephrussi, 1953; Slominski, 1953; Slominski et al, 1968).

Una particularidad de estos agentes químicos es que no afectan el ADN-M de las células madre, lo que significa que solamente dan lugar a mutantes ρ^- en cultivos en crecimiento (Ephrussi et al, 1949a). En cuanto al bromuro de etidio, también actúa intercalándose entre las bases del ADN-M, modificando no solamente la estructura superenrollada del mismo sino, como en el caso anterior, produciendo deleciones más o menos grandes e incluso la destrucción total de dicho ADN-M. El bromuro de etidio, a diferencia de los derivados de acridina, es capaz de alterar el ADN aún cuando no esté en fase de replicación (Slominski et al, 1968). Debido a su acción preferencial sobre el ADN-superenrollado cuando se emplea a baja concentración es aún más selectivo que los derivados de acridina sobre el factor ρ ó ADN-M, siendo por tanto, más acusada la diferencia entre las concentraciones a las que actúa como mutágeno y como agente letal (Waring, 1968).

Finalmente, merece especial atención el efecto sobre las razas ρ^+ de levadura de los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas en ribosomas 70s. Estos antibióticos, tales como el -

cloranfenicol y las tetraciclinas (Clark -Walker y Linnane, 1966; Wilkie et al, 1967) o la eritromicina (Thomas y Wilkie 1968), al inhibir la síntesis de parte de las enzimas respiratorias, dan lugar a copias fenotípicas " petites " incapaces de crecer en medios con fuentes de carbono no fermentables y en general con las mismas características que los mutantes "petites". Estos caracteres, sin embargo, solamente se conservan en tanto están los antibióticos presentes. En el momento en que estas copias fenotípicas se trasladan a medios exentos de los mismos, la levadura, pasadas unas cuantas generaciones necesarias para la síntesis de las enzimas hasta entonces reprimidas, vuelven a adquirir los caracteres propios de las razas q^+ .

No obstante lo dicho, algunos autores han preconizado que la síntesis de proteínas mitocondriales es necesaria para mantener la estabilidad del genoma mitocondrial (Weislogel y Butow, 1970), ó bien para mantener una concentración adecuada de una proteína que, ejerciendo un papel análogo al " iniciador " que " dispara " la replicación del cromosoma bacteriano, sería necesaria para la replicación del ADN-M (Wilkie 1970). De acuerdo con los citados autores por tanto y en contra de lo antes expuesto, propugnado por Clark -Walker y Linnane, concentraciones adecuadas de los antibióticos citados inducirían la producción de mutantes " petites vegetativos " carentes, en este caso, de ADN-M.

Factor q y ADN mitocondrial

En los párrafos anteriores se ha hecho alusión varias veces a que la mutación " petite vegetativa " o q^- se debe a alteraciones más o menos profundas o a la desaparición del ADN-M. Esto supone, como es lógico, identificar el citado factor q con el ADN-M.

Esta identificación está hoy, al parecer, fuera de

dudas. Es enorme el número de trabajos y revisiones aparecidos en los últimos años sobre distintos aspectos de la biogénesis de mitocondrias, la estructura y función del ADN-M y las consecuencias que trae consigo la alteración del mismo.

Citaremos, por tanto, sólo algunos de los estudios principales que han llevado a la identificación del ADN-M con el factor ρ :

- Estudiando la localización de la resistencia a antibióticos tales como la eritromicina, se encontró que ésta residía en el ADN-M. Por otra parte, tratamientos con acriflavina sobre razas resistentes a la eritromicina (ER) llevaron consigo, juntamente con la conversión de las razas tratadas en ρ^- , la pérdida de la resistencia al citado antibiótico (Thomas y Wilkie, 1968; Linnane et al, 1968; Wilkie, 1970).

- Numerosos autores (Mounolou et al, 1966; Mehrotta y Mahler, 1968; Bernardi et al, 1968; Carnevali et al, 1968; Carnevali et al, 1969; Nagley y Linnane, 1970; Hollemberg, 1971; Hollemberg et al, 1972; Bernardi et al, 1972; Clark-Walker 1972; Clark-Walker, 1973; etc) estudiando el ADN-M de cepas normales y ρ^- , encontraron que en estas últimas el ADN-M está alterado, produciéndose variaciones en la densidad en comparación con el de la raza ρ^+ de partida, y siendo también distinta la densidad entre los ADN-M de distintas razas ρ^- supresoras.

Así mismo, encuentran variaciones en el cociente GC:AT, apreciándose un aumento en favor del par AT.

- De otra parte Nagley y Linnane (1972) han encontrado una considerable variación en el número y la estructura de las unidades de ADN-M en razas ρ^+ y ρ^- .

- Por último, citaremos el hecho de razas neutras que han mostrado ausencia total de ADN-M (Yotsuyanagi, 1962). En apoyo de esta afirmación están los trabajos de Goldring et al (1970b), Michaelis et al (1971) y Nagley y Linnane, (1972) que hablan de obtención de razas neutras por tratamientos prolongados con bromuro de etidio, que destruyen totalmente el ADN-M.

Todos estos trabajos indican, sin lugar a duda que la mutación q^- va siempre acompañada de una alteración del citado ADN.

Supresividad de los mutantes "petites"

Una de las características de los mutantes "petites" y que probaron su naturaleza citoplásmica fué el hecho, ya descrito (Ephrussi et al., 1949c), de que los cigotos normales obtenidos a partir de estas razas segregaban ascosporas q^+ y q^- en proporción de 4:0.

Ephrussi et al. (1954, 1955) encontraron, sin embargo, que el carácter q^- no siempre es recesivo sino que en ocasiones excluye o suprime el factor q^+ , tanto de los cigotos como de la progenie haploide. Ephrussi y colaboradores designaron esta propiedad, que presentan algunos mutantes "petites", con el nombre de supresividad y clasificaron los mutantes "petites vegetativos" en dos categorías: "supresoras" y "neutros", según presentaran ó no la propiedad citada.

El grado de supresividad de una determinada raza q^- puede calcularse mediante la determinación de la proporción de cigotos q^- producidos en un cruce con una raza q^+ y es muy variable de unas razas a otras, ya que oscila desde 0% (neutras) hasta porcentajes muy próximos al 100% en las altamente supresoras (Sherman y Ephrussi, 1962).

De acuerdo con los trabajos de Ephrussi y Grandchamp (1965) y Ephrussi et al. (1966) esta variabilidad en el valor de la supresividad no se debe a que las razas q^- ensayadas sean mezclas de células neutras y supresoras, sino que dicho valor es una característica celular de las razas q^- , que presentan una notable estabilidad en relación con esta propiedad durante la reproducción vegetativa, o sea, que existe una gran correlación madre-hija en la transmisión de este carácter.

Así mismo, los autores citados llegan a la conclusión de que el grado de supresividad depende de la presencia de un factor en el citoplasma de las razas q^- y del grado de interacción del mismo con el factor q^+ de las razas normales. La interacción del factor supresor, aportado a los cigotos por la raza q^- , con el factor q^+ normal no lleva consigo la destrucción de las enzimas respiratorias aportadas por la raza q^+ , ni la detención inmediata de su síntesis, sino que más bien parece interferir en la multiplicación del factor normal que sería eliminado por simple dilución. Esta interferencia, en ocasiones, sería sólo parcial, originándose entonces una raza " inestable " caracterizada porque a partir de células con los caracteres normales se producirían con una alta frecuencia células q^- .

Supuesta la identidad del factor q con el ADN-M, de acuerdo con lo expuesto en el apartado anterior, hoy día se puede decir que la supresividad de una determinada raza q^- es el resultado de la interferencia del ADN-M alterado de las mismas con el ADN-M de tipo silvestre.

Es sabido que existen mutantes q^- carentes totalmente de ADN-M (Corneo et al, 1969; Mcustachi y Williamson, 1966), habiendo encontrado Yotsuyanagi (1962) que muchas razas q^- neutras no lo contienen. Esto ha llevado a formular la hipótesis de que las razas supresoras son aquellas que presentan un ADN-M alterado, mientras que las razas neutras serían aquellas carentes de ADN-M. En apoyo de esta hipótesis están los resultados obtenidos por Goldring et al (1970b) y los de Michaelis et al (1971), que muestran que tratamientos prolongados con bromuro de etidio inducen siempre la producción de mutantes " petites " carentes de ADN-M y neutros en todos estos casos. Naglay y Linnone (1972) han propuesto el símbolo q^0 para designar estas razas que según ellos pueden ser igualmente obtenidas a partir de q^- supresoras con tratamiento con bromuro de etidio. Esta hipótesis sin embargo, no puede ser aceptada en términos absolutos. Evidentemente, las llamadas razas q^0 son siempre neutras, pero también es igualmente cierto que razas q^- , con --

ADN-M en ocasiones poco alterado, son también igualmente neutras (Mounolou et al, 1966; Bernardi et al, 1968; Mehrotta y Mahler, 1968; Carnevali et al, 1969; Nagley y Linnae, 1970).

Lo anteriormente dicho es especialmente interesante a la hora de interpretar el mecanismo de la supresividad ya que, de acuerdo con lo dicho, no todos los ADN-M alterados poseen esta propiedad.

Ya ha sido expuesta la interpretación dada por Ephrussi y Grandchamp (1965) y Ephrussi et al (1966) sobre el mecanismo de la supresividad, interpretación que -- hoy por hoy sigue siendo admitida: la supresividad de un mutante ρ^- dependerá de la mayor o menor capacidad de su ADN-M alterado para eliminar el ADN-M normal presente en el cigoto, mediante una interferencia en su replicación.

¿Cómo se lleva a cabo esta interferencia ? . Rank y Person (1969) en un estudio sobre la supresividad de mutantes espontáneos obtenidos a partir de razas ρ^+ llegan a la conclusión, al igual que Ephrussi y colaboradores, de que el ADN-M de los mutantes supresores se replica más deprisa que el de las células de tipo silvestre, lo que trae como consecuencia la eliminación por dilución del ADN-M normal.

En el mismo sentido apuntan los resultados obtenidos por Slonimski (1968), Borst y Kroon (1969), Carnevali et al (1969), Mounolou (1967), Saunders et al (1970) y Rank (1970).

Coen et al (1970) han sugerido, sin embargo, -- una hipótesis totalmente distinta sobre el mecanismo de la supresividad basada no ya tanto en la velocidad de replicación de los ADN-M, sino en la posibilidad de que exista recombinación con una gran frecuencia entre los ADN-M supresores y los silvestres, lo que conduciría a la alteración rápida de todo el ADN-M presente en el cigoto. Esta hipótesis, sin embargo, no parece demasiado probable, ya que -- cuesta trabajo aceptar que la recombinación tenga lugar en

todas las unidades mitocondriales, y simultaneamente.

Si de otra parte se considera, de acuerdo con Nagley y Linnane (1972), que en las células haploides -- normales hay unas 50 unidades de ADN-M frente a aproximadamente 500 presentes en los mutantes q^- y que estas -- unidades son además de menor tamaño que las normales, lo que hace muy verosímil que su tiempo de replicación sea -- menor , parece mucho más razonable aceptar que la eliminación del ADN-M normal se deba a una simple dilución, -- fruto del mayor número de unidades aportadas por la raza q^- y de la mayor velocidad de replicación de las mismas.

En relación con lo anteriormente dicho se ha -- sugerido que cuanto mayor sea la alteración del ADN-M -- mayor será la supresividad del mutante q^- (Carnevali et al, 1969). Parece ser, sin embargo, (Saunders et al, -- 1970), que la alteración del ADN-M en orden a conferir su -- presividad tiene un límite, ya que, así como tratamientos -- cortos o a bajas concentraciones de bromuro de etidíio dan lugar a supresores de tipo medio al igual que ocurre en las mutaciones espontáneas, las alteraciones profundas, como -- son aquellas causadas por tratamientos a concentraciones -- altas de bromuro de etidíio o derivados de acridina, dan lugar a mutantes con un alto grado de supresividad o a mutantes -- neutros. Esto indica, que efectivamente, en principio, mientras más profunda es la alteración del ADN-M mayor es la supresividad del mismo, pero que una alteración ligeramente mayor conduce a la pérdida total de supresividad, probablemente porque el ADN-M pierde la capacidad de replicación -- autonomamente.

Esta es, brevemente expuesta, la situación de -- los conocimientos existentes sobre mutaciones q^- y la supre -- sividad de las mismas.

Objeto del trabajo

En esta tesis se consideró interesante abordar el estudio de la supresividad desde dos puntos de vista primordiales: el mecanismo de la misma y su significación biológica.

En relación con el mecanismo de la supresividad, ya ha quedado expuesta la interpretación actual del mismo: eliminación del ADN-M por dilución, como consecuencia de un mayor número de unidades de ADN-M alterado que se replican más rápidamente. Teniendo en cuenta, sin embargo, los trabajos de Wilkie (1970) y Weislogel y Butow (1970), antes citados, que preconizan la intervención de proteínas sintetizadas en ribosomas mitocondriales en la replicación del ADN-M, se pensó que quizás la supresividad de los mutantes q^- se ejerciera merced a la síntesis de una proteína en sus mitocondrias, reprimida en condiciones normales, que inhibiera la replicación del ADN-M normal o que actuara como iniciador específico para el ADN-M alterado. También cabía la posibilidad de que junto con el iniciador interviniere, en la replicación del ADN-M, una proteína represora que ejerciese un control negativo sobre la replicación del ADN-M normal y no afectara al ADN-M alterado.

En cualquiera de estos casos, tratamientos de las razas q^- supresoras o q^+ con antibioticos inhibidores de la síntesis de proteínas mitocondriales, deberían afectar profundamente la supresividad de las razas q^- caso de que esta hipótesis fuera cierta. Como podrá verse, esta hipótesis no ha podido ser comprobada.

En cuanto a la significación biológica de la supresividad, era éste un problema que no había sido abordado por ningún autor. Como ha sido expuesto, la supresividad trae como consecuencia la eliminación de los mitocondrias normales en los cruces $q^+ \times q^-$ y por consiguiente favorece la aparición de razas q^- con la consiguiente eliminación de las de tipo silvestre q^+ , mucho más eficientes desde todos los puntos de vis

ta que las primeras. Resultaba, por tanto, extraño que a lo largo del proceso evolutivo no hubiera sido eliminada esta propiedad de las razas q^- que, aparentemente, representa un perjuicio para la especie.

En esta tesis se ha abordado este problema y conseguido poner de manifiesto que la supresividad no sólo no ejerce un papel negativo, sino que es un mecanismo utilizado por la Naturaleza para asegurar la competencia y estabilidad de las razas de levadura ensayadas.

Aún cuando los objetivos originales fueron los dos citados, apenas iniciado el trabajo pudo comprobarse que la supresividad, en contra de lo admitido hasta el momento, no es una característica celular constante de los mutantes q^- , sino que varía de acuerdo con las condiciones en que se efectúa el cruce y de acuerdo con las características de la raza q^+ empleada. En este trabajo, pues, se han estudiado algunos de los factores más importantes que afectan a los valores de la supresividad de los mutantes q^- .

Finalmente, las experiencias previas necesarias para la obtención de razas q^- empleadas en las experiencias realizadas, han llevado a conclusiones interesantes sobre la acción del bromuro de etidio sobre razas q^+ y q^- y sobre la acción de antibióticos sobre razas q^+ , que son contrarias a lo admitido hasta el momento.

MATERIAL Y METODOS

1. - MICROORGANISMOS

Todos los ensayos y experiencias de esta memoria se han llevado a cabo sobre razas de Saccharomyces cerevisiae, cuya procedencia y características se exponen a continuación.

1.1. - Razas aisladas a partir de levadura de panadería

Para algunas experiencias preliminares de puesta a punto de técnicas, se utilizaron razas diploides de S. cerevisiae aisladas en nuestro laboratorio a partir de levadura prensada de panadería (tipo comercial), por la técnica usual en Microbiología.

Estas razas se denominaron:

N1A, N2A, N3A, N4A, N5A, y todas ellas fueron diploides y prototofas.

1.2. - Razas haploides de S. cerevisiae

Para todos los demás estudios y experiencias realizadas, se han utilizado razas haploides de S. cerevisiae amablemente enviadas por el Dr. Jean F. Warfel de la Universidad de California Berkeley, procedentes de la colección del Prof. Mortimer, del citado centro.

La nomenclatura y características genéticas de estas razas son las siguientes:

| | | |
|----------|-------|--|
| X979. 2A | | <u>a</u> , <u>tri</u> ₁ , <u>his</u> ₃ |
| S856c | | <u>a</u> , <u>ade</u> ₁ , <u>lis</u> ₂ |

1.3. - Razas derivadas de las citadas en el apartado 1.2. empleadas en la realización del trabajo.

X-1, X-2 y X-3. - Razas q^+ (\underline{a} , \underline{tri}_1 , \underline{his}_3), seleccionadas a partir de la X979.2A en razón de su estabilidad para el marcador \underline{his}_3

Sb-1, Sb-2 y Sb-3. - Razas q^+ (\underline{a} , \underline{ade}_1 , \underline{lis}_2), seleccionadas a partir de la S853c, que dan lugar a colonias blancas y lisas.

SER-19. - Raza q^+ (\underline{a} , \underline{ade}_1 , \underline{lis}_2 , ER), seleccionadas a partir de la Sb-2 y resistente a la eritromicina (5 mg / ml).

F1.14 y F1.27. - Razas q^+ (\underline{a} , \underline{ade}_1 , \underline{lis}_2), seleccionadas entre la progonie haploide de un cigoto q^+ procedente de un cruce entre SER-19 y AX-10.

Xp-2 y Xp-4 - Razas q^- (\underline{a} , \underline{tri}_1 , \underline{his}_3), obtenidas a partir de mutantes q^- espontáneos presentes en cultivos de la raza X-3.

Sb-2p1 y Sb-2p3. - Razas q^- (\underline{a} , \underline{ade}_1 , \underline{lis}_2) obtenidas a partir de mutantes q^- espontáneos presentes en cultivos de la raza Sb-2.

AX-10. - Raza q^- (\underline{a} , \underline{tri}_1 , \underline{his}_3), obtenida a partir de un mutante q^- inducido por tratamientos con anaranjado de acridina de la raza X-3.

1.4. - Conservación de las levaduras empleadas

Se ha llevado a cabo por siembras periódicas, cada 30 días, en tubos inclinados de agar NG. Los tubos se incubaron 48 horas a 28°C y se conservaron, hasta su posterior utilización o siembra, a la temperatura de 6°C.

2. - MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios que a continuación se relacionan, a excepción de aquellos en los que se indica expresamente, fueron preparados y esterilizados de acuerdo con las técnicas usuales empleadas en Microbiología.

2.1. - Medios de conservación y crecimiento

Medio NG. - Empleado para el cultivo y conservación de las levaduras utilizadas; corresponde al descrito por Lindegren et al (1958) y presenta la siguiente composición:

| | |
|----------------------------|---------|
| Sulfato magnésico | 1 g |
| Fosfato monopotásico | 2 g |
| Sulfato amónico | 3 g |
| Peptona | 3,6 g |
| Extracto de levadura | 4 g |
| Glucosa | 10 g |
| Agua | 1000 ml |

pH final 4,5

Para utilizarlo en forma sólida se añadieron 20 g de agar agar / litro.

Medio NL. - Igual al anterior, pero con lactato sódico a concentración de 20 g / litro como única fuente de carbono.

Ha sido utilizado para seleccionar razas q^+ o para comprobar la naturaleza q^0 o q^- de los diferentes mutantes ensaya-

dos, ya que las razas con deficiencias respiratorias no son capaces de utilizar el lactato como fuente de carbono.

Medio NLG. - Derivado, igualmente, del NG pero con glucosa, 1 g por litro, y lactato sódico, 20 g por litro. Ha sido empleado para el recuento de mezclas de células ρ^+ y ρ^- o ρ^0 , de acuerdo con la técnica descrita por Slonimsky et al (1963), ya que las razas DR al utilizar exclusivamente como fuente de C la pequeña cantidad de glucosa existente, dan lugar a colonias de muy pequeño tamaño, fácilmente diferenciables de las razas normales.

2.2. - Medios empleados para la esporulación de levaduras

Comprenden los llamados medios de " preesporulación " empleados para la obtención de una masa abundante de células en condiciones fisiológicas óptimas, y a los de " esporulación ", que por el contrario son medios pobres y con fuentes de carbono difícilmente utilizables.

2.2.1. - Medios de preesporulación

Medio pE. - Fowell, (1969b), modificado.

Tiene la siguiente composición:

| | |
|--------------------------|---------|
| Glucosa | 50 g |
| Extracto de levadura ... | 10 g |
| Agua | 1000 ml |

Medio pEL. - Es una variante del anterior, que ha sido empleado para eliminar al máximo la presencia de células con deficiencias respiratorias, mediante la sustitución de la glucosa por lactato sódico a la misma concentración.

2. 2. 2. - Medios de esporulación

Medio E. - Medio de Rousseau y Halvorson (1969), de la siguiente composición:

Glucosa 1 g
Extracto de levadura 2,5 g
Acetato potásico 20 g
Agua 1000 ml

Este medio ha mostrado ser muy eficaz, habiéndose podido comprobar en este trabajo que se llega a conseguir la esporulación del 90%, como mínimo, de las células presentes.

Medio EL . - Utilizado en raras ocasiones. Es una variante del anterior en la que se sustituye la glucosa por lactato sódico al 20%. El empleo de este medio tuvo por objeto evitar al máximo el crecimiento y supervivencia de las células q^- diploides que no esporulan y evitar así el confundirlas con las razas haploides provenientes de la germinación de las ascosporas, que en los medios mínimos empleados dan lugar a colonias prácticamente indistinguibles de las q^- citadas.

2. 3. - Medio de conjugación

Se han experimentado diversos medios para la puesta a punto del proceso de conjugación, habiéndose elegido como más eficaz el llamado medio MC, cuya constitución es la siguiente:

Glucosa 50 g
Extracto de levadura 10 g
Peptona 5 g
Agua 1000 ml

Este medio es el propuesto por Haefner (1965), con -

Las modificaciones introducidas por Fowell (1969c), consistentes en la adición de una alta concentración de glucosa que favorece el cruce entre las razas α y α .

2. 4. - Medio Mínimo de Wickerham (1946)

En este medio sólo pueden crecer razas prototrofas , por lo que se ha empleado para la selección de cigotos de dicho tipo y para la determinación del genotipo de las razas auxótrofas empleadas, mediante la adición, en cada caso, de los nutrientes adecuados, de acuerdo con la técnica descrita en el apartado 3.

2. 4. 1. - Composición

Contiene por litro:

Elementos traza

| | |
|--|----------|
| Boro, como BO_3H_3 | 0,01 ppm |
| Cobre, como $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,01 ppm |
| Iodo, como KI | 0,10 ppm |
| Hierro, como $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,05 ppm |
| Zinc, como $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,07 ppm |

Vitaminas

| | |
|-------------------------------|---------------------|
| Biotina | 2 μg |
| Pantotenato cálcico | 400 μg |
| Inositol | 2.000 μg |
| Niacina | 400 μg |
| Acido paraaminobenzoico | 200 μg |
| Piridoxina clorhidrato | 400 μg |
| Riboflavina | 200 μg |
| Tiamina clorhidrato | 400 μg |

Sales

| | |
|---|---------|
| KH_2PO_4 | 0,875 g |
| K_2HPO_4 | 0,125 g |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,500 g |
| NaCl | 0,100 g |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,100 g |

Fuente de nitrógeno

| | |
|------------------------------------|--------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 1,00 g |
|------------------------------------|--------|

Fuentes de carbono

Glucosa o lactato sódico, a diferentes concentraciones según el uso a que se destinó el medio.

2.4.2. - Preparación

Elementos traza

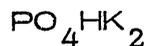
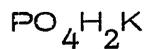
Se preparó una solución madre, 1.000 veces más concentrada que la que se requiere en el medio mínimo. La disolución sin esterilizar se guarda en botella de tapón de rosca. Para emplearla se esteriliza por filtración antes de añadirla al medio de cultivo en la cantidad adecuada para conseguir la concentración deseada.

Solución de vitaminas. - Se pesan cantidades 100 veces mayores de cada una de ellas y todas juntas se disuelven en agua destilada. Después, se pipetea dentro de tubos de manera que cada tubo contenga la cantidad necesaria para 20 litros de medio.

La disolución de vitaminas se congela inmediatamente y se liofiliza, conservándose en congelador hasta el momento de su

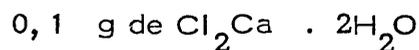
uso. La mezcla de vitaminas de cada tubo se disuelve en 200 ml de agua destilada conteniendo 2,91 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y 0,06 g de PO_4HK_2 ; esta disolución con una concentración de vitaminas 100 veces mayor que la que lleva el medio mínimo se esteriliza por filtración. La disolución estéril tiene un pH de 5 a 5,1. Conservándola en nevera puede utilizarse durante un par de semanas.

Solución de sales. - Se pesan cantidades 10 veces mayores que las requeridas para un litro de medio de las sales



y se disuelven en 900 ml de agua destilada. Esta preparación se guarda en nevera, conservándola estable durante varias semanas; se esteriliza por filtración inmediatamente antes de su uso.

Separadamente se preparan:



que se disuelven en 880 ml de agua destilada, guardándose en nevera hasta su uso.

En el momento de preparar medio mínimo se opera del siguiente modo:

Se toman las cantidades correspondientes (necesarias para el volumen de medio que se precise) de la fuente de carbono, de sulfato amónico (y de agar purificado en el caso de medios sólidos) y se disuelven en la solución de sulfato magnésico y cloruro cálcico esterilizando seguidamente en el autoclave. Una vez fría en el caso de medios líquidos, (o a 60°C en el de medios sólidos) se adicionan los volúmenes correspondientes de las soluciones de elementos traza, vitaminas y sales, en las condiciones de esterilidad usuales.

Dada la complejidad de este medio y lo engorroso de su preparación, a partir aproximadamente de la mitad del trabajo

experimental, se ha utilizado el medio de Wickerhan (1946) de la casa Difco (Bacto Yeast Nitrogen Base w / o amino acids dehydrated). La preparación del medio se hace disolviendo 13,4 g en 100 ml de agua destilada y esterilizando por filtración, con lo que se obtiene una solución 20 veces mas concentrada que la que se necesita para el medio mínimo tal como se emplea. Se guarda en nevera. Para medios sólidos se emplea agar purificado Difco o BBL a concentración de 20 g / litro. Para preparar el medio definitivo, se suspende el agar purificado en agua destilada, se añade la fuente de carbono correspondiente a la concentración adecuada, y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se deja enfriar hasta 60°C y se le añade la cantidad correspondiente de la solución de medio mínimo 20 veces concentrada. Tras breves momentos, para que se difunda a todo el volumen, se reparte en cajas de Petri a razón de 20 ml por caja.

En el caso de medios líquidos se disuelve la fuente de carbono en agua destilada y se esteriliza por filtración o en autoclave. En frío, se le añade la cantidad correspondiente de la solución de medio mínimo, 20 veces más concentrada.

2.4.3. - Variantes empleadas

Medio MG. - En el que la fuente de carbono es glucosa a concentración de 10 g por litro.

Medio MLG. - En el que la fuente de carbono la constituyen glucosa y lactato sódico en concentraciones de 1 g y 20 g por litro, respectivamente.

Medio ML. - En el que la fuente de carbono es lactato sódico a una concentración de 20 g por litro.

2.5. - Medios especiales

Se incluyen en este apartado medios empleados en la obtención de razas α^- y α^0 , así como los medios que contienen

antibióticos u otra sustancia, utilizados en las experiencias que se describen en los capítulos correspondientes:

2.5.1. - Medios líquidos con:

- Derivados de la acridina
- Bromuro de etidio
- Cicloheximida

En todos los casos se ha empleado medio NG como medio base y todas las sustancias citadas se han añadido a partir de soluciones acuosas madre después de esterilizado el medio. Dichas soluciones madre se esterilizan por filtración en el caso de la cicloheximida. Las de derivados de acridina y bromuro de etidio se utilizaron sin previa esterilización, ya que la concentración de estas sustancias en la solución madre es lo suficientemente alta para matar cualquier contaminante.

Las concentraciones de las soluciones madre han sido las siguientes en cada uno de los casos.

- Derivados de acridina : 10 mg / ml
- Bromuro de etidio : 1 mg / ml
- Cicloheximida : 2 µg / ml

La cantidad de solución madre añadida depende de la concentración final deseada en cada caso y del volumen de medio de cultivo que se preparó. Se irá indicando en cada momento.

2. 5. 2. - Medios con eritromicina y cloromicetina

Como en los casos anteriores se prepararon añadiendo al medio, previamente esterilizado, la cantidad adecuada de una solución madre. Dada la escasa solubilidad de ambas sustancias en agua, las soluciones madre se prepararon en etanol, a concentraciones de 200 mg/ml en ambos casos.

Estas soluciones madre no precisan ningún tipo de esterilización debido a la clase de disolvente empleado y a la elevada concentración del antibiótico, que contiene. Los medios líquidos empleados han sido NG y MC. Los sólidos NG, NL, NLG, MLG, ML. En el caso de medios sólidos la solución madre se añadió al medio esteril fundido y mantenido a 55°.

La concentración final de antibiótico en el medio varió según el tipo de experiencias, tal como se indica en el Capítulo correspondiente.

3. -TECNICAS PARA LA COMPROBACION DE LOS REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS DE RAZAS AUXOTROFAS

3. 1. - Preparación de los medios correspondientes

Para comprobaciones de este tipo se empleó el medio mínimo MG, al que se añadió las sustancias requeridas en cada-

caso, hasta una concentración final de 20 µg / ml. Estas sustancias se prepararon disolviéndolas en agua destilada a una concentración 100 veces mayor que la final y se esterilizaron por filtración por Millipore (poros de 0,4 micras de diámetro). La cantidad correspondiente de solución estéril se añadió al medio a la vez y en las mismas condiciones que la solución concentrada de medio mínimo, según se ha descrito en el apartado 2.4. De acuerdo con las características de nuestras razas auxótrofas, se han empleado los siguientes medios:

MG + adenina
MG + lisina
MG + lisina + adenina
MG + triptófano
MG + histidina
MG + triptófano + histidina

Los tres primeros se utilizaron para la comprobación de las características de las razas S856c y sus derivadas. Los restantes en el caso de las razas X979.2A y las derivadas de ella.

Las sustancias citadas se añadieron bajo la forma de:

Adenina, sulfato, (Sigma)
(L +) - Lisina, monoclór. (Analema)
(L -) - Histidina, monoclór. (Merck)
(L -) - Triptófano. (Sigma)

3.2. - Comprobación de los requerimientos nutritivos

La comprobación de las necesidades nutritivas de las razas auxótrofas empleadas se llevó a cabo diseminando una suspensión de las mismas, de concentración adecuada, en los medios mínimos descritos en el apartado anterior y observando la aparición o no de crecimiento después de incubación a 28°C durante 48 horas.

4. - TECNICAS EMPLEADAS EN LA OBTENCION Y SELECCION DE MUTANTES q^- Y q^0

Parte de las razas con deficiencia respiratoria (q^- y q^0) empleadas en este trabajo se obtuvieron a partir de mutantes espontáneos aparecidos en cultivos de las correspondientes razas q^+ , empleando los métodos de diferenciación y selección que se describen más adelante.

La gran mayoría, sin embargo, se obtuvieron por tratamientos con agentes mutagénicos que inducen específicamente la aparición de mutaciones citoplasmáticas, por los métodos que se describen a continuación.

4. 1. - Inducción de mutaciones q^- y q^0

En todos los casos se ha llevado a cabo en cultivos en agitación, a 28°C en medio NG líquido, de las razas q^+ correspondientes, sometidas a las siguientes manipulaciones.

4. 1. 1. - Tratamientos con derivados de acridina

Se ha empleado indistintamente anaranjado de acridina o acriflavina, a una concentración de 20 μg / ml. Con ligeras variantes, el método seguido ha sido el de Nagai y Nagai (1958); matraces Erlenmeyer de 250 ml con 75 ml de medio NG al que se añadió solución acuosa de acriflavina (o anaranjado de acridina) al 1% hasta una concentración final de 20 μg / ml, se inocularon con 0,1 ml de cultivo de 24 horas en medio NG de la raza q^+ . Los matraces así inoculados se incubaron a 28°C durante 48 horas, con agitación constante. Transcurrido este tiempo se diseminaron en cajas de Petri conteniendo medio NG; las placas se incubaron a 28°C durante cuatro días, transcurridos los cuales se procedió a seleccionar las colonias q^- y q^0 , tal como se describe más adelante.

Por este procedimiento el 100% de las células presentes en los cultivos tratados mostraron deficiencia respiratoria.

4. 1. 2. - Tratamientos con bromuro de etidio

Teniendo en cuenta el método de Slonimski et al- (1968), en que realizan una curva de concentración óptima de bromuro de etidio para inducir la mutación, hemos empleado con centraciones de 2; 2, 4; 10; y 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Se prepararon matraces con medio NG Líquido, con 75 ml de medio / matraz, a los que se añadió solución acuosa de bromuro de etidio hasta la concentración final requerida, a partir de una solución madre con 1 mg / ml.

Estos matraces se inocularon con la raza a tratar, a razón de 10^7 células / matraz procedentes de un cultivo de 17 -24 horas en medio NG en agitación. Una vez inoculados se man tuvieron en agitación durante 24 ó 48 horas a 28°C. Los cultivos resultantes se diseminaron en cajas de Petri conteniendo medio NLG y se incubaron durante 4 días a 23°C. Las razas mutadas se seleccionaron como se describirá en el apartado correspondiente.

4. 1. 3. - Tratamientos con eritromicina o clcromicetina

Se llevaron a cabo empleando concentraciones de 3 mg / ml de los antibióticos en medios Líquidos NG en agitación. Las soluciones madre de los antibióticos se prepararon por di solución en etanol, a una concentración de 200 mg /ml. De esta solución se añadieron 1, 12 ml a matraces Erlenmeyer de 250 ml con 75 ml de medio NG, ya estériles, que se inocularon con 1 ml de un cultivo de 24 horas de la raza a tratar en medio NG.

Los matraces así inculados se manipularon exactamente igual que en los casos anteriores.

4. 2. - Diferenciación y selección de razas q^- y q^0

Para la diferenciación de las razas DR se han empleado dos técnicas distintas. Una de ellas consiste en utilizar como medio diferencial el NLG, en el cual las células deficientes respiratorias, incapaces de utilizar fuentes no fermentables de carbono, dan lugar a colonias muy pequeñas cuyo crecimiento es debido, exclusivamente, a la escasa cantidad de glucosa presente en el medio. Por el contrario, las células normales son capaces de utilizar el lactato originando colonias de un tamaño mucho mayor.

Esta técnica proporciona un método fácil de diferenciación entre razas normales y deficientes respiratorias.

El otro método consiste en la utilización de cloruro de 2, 3, 5- trifenil-tetrazolio (CTT), que actúa como aceptor final de electrones de la cadena transportadora de los mismos, pasando por reducción a formazano que es insoluble y de color rojo.

Utilizado, como mas abajo se describe, las colonias normales se tiñen de rojo mientras que las DR, cuya cadena transportadora de electrones carece de varios citocromos, permanecen blancas.

4. 2. 1. - Diferenciación por siembra en medio NLG

Se diseminó sobre cajas de Petri de medio NLG una suspensión adecuada de las células cuyo carácter normal o deficiente se quería probar, incubando posteriormente a 28°C durante 4 días. Transcurrido este tiempo se distinguían con facilidad dos tamaños de colonias en el caso de haber mezcla de células q^+ y q^0 ó q^- , o todas pequeñas en el caso de un cultivo enteramente deficiente.

4. 2. 2. - Técnica del cloruro de trifenil tetrazolio

Teniendo en cuenta que el CTT es mutagénico y tóxico para las células y que en un período de tiempo corto les produce la

muerte, no se puede emplear añadido al medio de cultivo, por lo que se utilizó siguiendo la técnica de Ogur et al (1957), como sigue:

La suspensión de células objeto de ensayo, se diseminaron en cajas de Petri con medio NG con glucosa al 2%. Tras 3 días de incubación a 28°C y una vez crecidas las colonias, se vierte sobre ellas una capa de agar-CTT mantenido a 45°C -50°C. Una vez solidificado el agar añadido, las placas se incuban durante 3 horas a 37°C.

El agar CTT se preparó como sigue:

300 ml de tampón fosfato 0,067M, pH 7, con el 2% de agar, se esterilizan en autoclave; se dejan enfriar hasta 50°C y se le adiciona 100 ml de una solución de CTT al 0,1% en la misma clase de tampón, previamente calentado a 50°C, y cuidando de que no solidifique la mezcla, se vierte sobre cajas de Petri, tal como se ha indicado arriba. Se aguarda unos minutos para que se solidifique y se incuban durante 3 horas a 37°C en la obscuridad. Pasado este tiempo se pueden distinguir perfectamente las colonias normales, teñidas de rojo, de las deficientes, enteramente blancas. En algunas ocasiones aparece un tercer tipo de colonias con sectores coloreados y blancos, provenientes de las llamadas razas inestables.

4.2.3. - Selección de razas ρ^- y ρ^0

Se utilizó siempre la técnica en que se emplea el medio diferencial NLG. El método del CTT no se utilizó para el aislamiento de razas, ya que como se ha dicho, esta sustancia ejerce un efecto tóxico, a más de que las manipulaciones son más engorrosas debido a la capa de agar con que se cubre las colonias.

La selección se llevó a cabo por siembra de las colonias de pequeño tamaño en tubos inclinados de agar NG, siguiendo los métodos usuales de técnica microbiológica.

4.3. - Comprobación de la deficiencia respiratoria y tipo de la misma de las razas seleccionadas

Aún cuando los métodos de diferenciación empleados son muy eficaces para distinguir las colonias de levaduras con deficiencia respiratoria, las razas seleccionadas fueron sometidas antes de su empleo a una serie de pruebas al objeto de confirmar dicha deficiencia respiratoria, así como la naturaleza nuclear (razas p) o citoplásmica de las mismas (razas q^- y q^o).

La deficiencia respiratoria se confirmó aplicando la técnica del CTT, ya descrita, a las razas seleccionadas y comprobando su crecimiento en medios con lactato como única fuente de carbono que debe ser nulo después de una incubación a 28° durante cuatro días, tiempo mas que suficiente para que crezca una raza normal.

La naturaleza nuclear o citoplasmática de las mutaciones seleccionadas se efectuó mediante pruebas de cruce con una raza q^+ de signo contrario, seguidas de selección de colonias q^+ diploides. Las razas obtenidas se hicieron esporular, y se procedió a analizar la proporción de ascosporas normales y con deficiencia respiratoria. La obtención de proporciones próximas a 50 / 50 indican que la raza es p, mientras que proporciones de 100 a 0 o cifras próximas indicaron la naturaleza citoplasmática de la mutación.

La diferencia entre q^o y q^- se estableció de acuerdo con el carácter neutro o supresor de la mutación citoplasmática.

5. - TECNICAS DE CRUCE ENTRE LEVADURAS HA PLOIDES Y SELECCION DE CIGOTOS PROTOTRO- FOS

En todos los casos, los cruces realizados han sido hechos empleando razas auxotróficas con marcadores complementarios, de manera que los cigotos originados en los cruces fueran capaces de crecer en medio mínimo, a diferencia de las células haploides que no llegan a cruzarse.

En los cruces se han empleado siempre razas heterotáticas, es decir una a y otra a, y las técnicas empleadas, con ligeras

variantes, han sido las citadas por Fowell (1969a).

5. 1. - Determinación cualitativa de la capacidad de cruce y viabilidad de los cigotos

Se llevó a cabo depositando en la superficie de medio MG sólido una gota de solución salina estéril en la que se mezclan, con ayuda de un asa de platino, las células $\underline{\alpha}$ y $\underline{\alpha}$ a cruzar. Se espera a que la gota se seque y las placas se llevan a la estufa a 28°C., incubándolas durante 3-4 días. La aparición de crecimiento indica que ha tenido lugar el cruce y que los cigotos son viables.

5. 2. -Cruce sobre medio de conjugación sólido

Es una variante del anterior que permite el aislamiento de las razas diploides obtenidas en los cruces.

Se realiza del siguiente modo: En una caja de Petri con medio de conjugación MC se depositan varias gotas grandes de agua estéril con pipeta Pasteur. En cada gota se mezclan inmediatamente un nº elevado (10^3) de células de cada una de las dos razas a cruzar.

Una vez realizada la mezcla de las células, las cajas de Petri se dejan en incubación a 20° durante 5 horas, transcurridas las cuales se toma con asa de platino de los lugares donde se depositaron las gotas y se siembran tubos con medio líquido MG, que se incuban a 28°C durante 4 días. Caso de haber tenido lugar los cruces se observará turbidez en los tubos de medio mínimo, procediéndose entonces al aislamiento de las razas diploides por la técnica usual de diseminación en placa.

Una variante de este método consiste en resuspender en solución salina la mezcla realizada sobre la caja de MC, después de transcurridas las 5 horas de incubación y de esta suspensión se toma 0,1 ml que se extiende con espátula de Drigralsky, sobre la superficie de las cajas de Petri con medio MG. Las colonias

que aparecen tras una incubación a 28° durante 4 días son el resultado del crecimiento directo de los cigotos formados.

5. 3. - Cruce en medio de conjugación líquido

Los dos métodos descritos son útiles solamente para comprobar si una raza haploide se cruza con otra y para el aislamiento de razas procedentes de cigotos prototrofos. A la hora de obtener grandes cantidades de cigotos o de realizar el cruce en condiciones "standardizadas" es necesario - llevar a cabo los cruces en medios líquidos. Se han utilizado los siguientes procedimientos.

5. 3. 1. - Cruce en aireación

Se parte de cultivos de 48 horas, en medio NG sólido, de las razas haploides correspondientes. Las células crecidas en un tubo de agar inclinado se recogieron en solución salina; se les dejó en reposo durante una noche para que dejaran de gemar, y se mezclaron 2 ml de suspensión de la raza a con 1 ml de la raza α junto con 10 ml de medio de conjugación. La mezcla se mantuvo en aireación, durante dos horas y pasado este tiempo se recogió en tubos de centrifuga estériles y se centrifugó durante 3 minutos a 1700 xg, dejando a continuación los tubos en reposo durante 5 horas a 20°C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces por centrifugación y resuspensión en solución salina haciéndose finalmente diluciones en solución salina estéril desde 10⁻¹ a 10⁻⁴, de cada una de las cuales se diseminaron muestras de 0, 1 ml en cajas de Petri con medio MG. Como de costumbre, las cajas de Petri se incubaron cuatro días a 28° antes de su observación.

5. 3. 2. - Cruce sin aireación

Como en el caso anterior, se partió de cultivos

de 48 horas de las razas a cruzar. Se obtuvieron suspensiones de cada raza en tubos de solución salina, con una concentración aproximada de 10^7 células por mililitro, que se dejaron en reposo durante una noche a temperatura ambiente (18 - 20°C). Después de este período de reposo, se mezclaron 1 ml de la suspensión de la raza α con 0,5 ml de la raza β , en un tubo de 5 ml de medio de conjugación líquido, centrifugando durante 3 minutos a 1.700xg y dejando en reposo a 20°C durante 5 horas.

La recogida, lavado y diseminación de los cigotos se llevó a cabo como en el caso anterior.

Por este procedimiento se obtuvo un menor rendimiento en cigotos, a pesar de lo cual y debido a la mayor simplicidad ha sido el método empleado a lo largo de las experiencias efectuadas.

6. - DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE CELULAS CON DEFICIENCIAS RESPIRATORIAS EN CULTIVOS ESTACIONARIOS DE RAZAS q^+

El porcentaje de células con deficiencias respiratorias (q^- y q^0) en cultivos estacionarios de razas q^+ se llevó a cabo tanto para determinar la estabilidad de las razas empleadas y variación de la misma en las distintas experiencias realizadas, como para poder efectuar las correcciones oportunas en el cálculo de la supresividad de las razas q^- empleadas (apartado 8 de este capítulo).

En todos los casos se partió de cultivos de 48 horas de levadura q^+ en medio NG, a partir de los cuales se prepararon suspensiones con 2000-3000 células / ml en solución salina de suspensiones " madre " cuyas concentraciones en células se determinaron por recuento en cámara de Thoma. El porcentaje de células q^- ó q^0 de las citadas suspensiones se determinó diseminando muestras de 0,1 ml de las mismas en cajas de Petri con medio NLG y contando, después de la incubación adecuada, el

número total de colonias aparecidas y el de colonias DR, diferenciables, como ha quedado dicho, por su pequeño tamaño.

Aunque con menor frecuencia, también se ha empleado para la determinación del porcentaje de células q^- y q^0 , el método del cloruro de trifenil tetrazolio. En este último caso las muestras se diseminaron en medio NG, procediéndose después según la técnica ya descrita.

En los dos casos, los recuentos se efectuaron con ayuda de un contador de colonias Gallenkamp XC-300.

Una vez efectuado el recuento, el porcentaje de células DR se calculó:

$$\% \text{ DR} = \frac{\text{n}^\circ \text{ colonias DR}}{\text{n}^\circ \text{ total colonias}} \times 100$$

7. - DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE MUTACION ESPONTANEA

Se llevó a cabo de acuerdo con la técnica de Ogur et al (1959). Estos autores han podido demostrar que el tanto por uno de mutantes DR existentes en un cultivo de una raza q^+ en fase estacionaria en un medio líquido con una fuente de carbono que no puede ser utilizada por fermentación, es numéricamente igual a la frecuencia de mutación (mutaciones DR producidas por célula y por división).

La técnica es muy simple : matraces Erlenmeyer de 100 ml con 30 ml de medio NL se inoculan con 0,1 ml de un cultivo de 24 horas de la levadura q^+ en medio NG. Los matraces se incuban a 28° durante 40 horas con agitación continua y al cabo de este tiempo el cultivo se diluye (10^{-5} - 10^{-6}) hasta una concentración de 2000-3000 células / ml y se procede a determinar la proporción de células DR bien por siembra en medio NLG o bien por el método del cloruro de trifenil tetrazolio, mediante las técnicas ya descritas.

8. - DETERMINACION DE LA SUPRESIVIDAD DE LAS RAZAS q^-

Se ha seguido el método propuesto por Sherman y Ephrussi (1962) en el que el valor de la supresividad de la raza q^- se expresa por un índice, S, derivado de la siguiente fórmula :

$$S \% = \frac{X - Y}{1 - Y} \times 100$$

donde X es el tanto por uno de cigotos q^- que resultan de un cruce $q^+ \times q^-$ e Y es el tanto por uno de mutantes q^- presentes en cultivos en fase estacionaria de la raza q^+ .

El valor de Y, se calculó por la técnica descrita en el apartado 6.

Para calcular el valor de X se efectuó en cada caso el cruce $q^- \times q^+$ oportuno, mediante las técnicas descritas y a continuación se determinó la proporción de cigotos q^- , bien por siembra en medio MLGo bien por siembra en medio MG seguida de tratamiento con CTT, según la misma técnica descrita para la determinación del porcentaje de células DR en cultivos estacionarios de una raza q^+ .

9. - ESPORULACION DE RAZAS DIPLOIDES Y OBTENCION Y SELECCION DE ASCOSPORAS.

Se ha seguido la técnica de Rousseau y Halvorson (1969), que comprende las siguientes etapas:

9. 1. - Esporulación

La levadura diploide objeto de ensayo se cultiva a 28° en medio de preesporulación líquido pE, durante 72 horas,

y con agitación constante, con el fin de obtener masa de células. El cultivo se somete a centrifugación, a 2600 xg durante 5 minutos en condiciones que eviten la contaminación, y el sedimento se re-suspende y diluye en medio esporulante líquido E, hasta una concentración de $10^7 - 10^8$ células/ml; ésta se reparte en matraces Erlenmeyer de 250 ml a razón de 75ml / matraz. Los matraces se incuban durante 6-7 días a 28°C con agitación continua. Transcurrido este tiempo se puede observar al microscopio que más del 90% de células han esporulado, dando lugar a ascas con 4 ascosporas, aún cuando también se observan algunas con 3 y 2.

El conjunto de células esporuladas ó nó se recoge por centrifugación a 2.600 xg durante 5 minutos.

9.2. - Rotura de las ascas y obtención de las ascosporas

Las células recogidas en el proceso anterior se re-suspenden en tampón citrato-fosfato pH 7, 0,02M, a una concentración de $10^9 - 10^{10}$ células / ml; se añade pronasa hasta una concentración de 5 mg / ml y la suspensión se incuba durante una noche a 28°C, con el fin de que la enzima actúe sobre la pared de las ascas. Terminada la incubación se añade Tween 80 hasta una concentración del 1% para facilitar la dispersión de las ascosporas que se liberen y, finalmente, se completa la ruptura de las cubiertas de las ascas en una " prensa francesa ", forzando el paso de la suspensión a través de un orificio de $1.000 \mu^2$ a una presión de 7.000 kg/cm^2 y manteniendo un flujo de 20-25 ml / minuto. La suspensión obtenida después de este tratamiento se deja en reposo durante unos minutos, a fin de que sedimenten las ascas y células diploides residuales, transcurridos los cuales se toma la parte superior de la suspensión, en la que, prácticamente, sólo se encuentran - ascosporas.

Todas las manipulaciones descritas se deben llevar a cabo en condiciones que aseguren la no contaminación de la suspensión.

9.3. -Selección de razas haploides a partir de las ascosporas

La suspensión de ascosporas, obtenida como se ha descrito, se diluye con solución salina hasta lograr una concentración de 2.000 - 3.000 ascosporas / ml y se toman muestras de 0,1 ml que se diseminan en cajas de Petri con el medio adecuado al tipo de experiencia en curso. Las cajas se incuban a 28° durante 3 - 4 días, tiempo suficiente para que aparezcan las colonias originadas por la germinación de las ascosporas, que por el procedimiento ordinario se trasladan a tubos de agar inclinado NG.

Hay que hacer notar que en las placas de Petri incubadas suelen aparecer tres tipos de colonias que presentan, respectivamente, un diámetro menor de 0,5 mm, entre 0,5 y 1 mm y mayor de 1 mm. Las primeras ha podido comprobarse que corresponden a razas DR y las terceras son colonias procedentes de ascas, o células diploides residuales. Sólo las de tamaño intermedio, que predominan notablemente sobre las demás, proceden de ascosporas y son, por tanto, las únicas que se seleccionan.

10.- COMPROBACION DEL CARACTER HAPLOIDE O DIPLOIDE DE UNA RAZA

La técnica que se ha seguido para comprobar si una raza es haploide o diploide ha sido la de someterla al proceso de esporulación descrito en 9.1. Si transcurridos 6 días, después de poner las células en el medio de esporulación, no se observó formación de ascas, se consideró que se trataba de una raza haploide.

En el caso de razas con deficiencia respiratoria no se puede acudir a este procedimiento ya que estas mutaciones son incapaces de esporular, Ephrussi y Hottinguer (1951). Este hecho no ha supuesto grave inconveniente ya que en este trabajo sólo ha interesado la comprobación del carácter haploide o diploide de razas normales.

11.- DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD O RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS Y SELECCION DE RAZAS RESISTENTES

En el transcurso de las experiencias realizadas, se ha investigado la influencia sobre el poder supresor de antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas mitocondriales - eritromicina y cloromicetina -, aplicados a razas q^- y / ó q^+ antes y en el momento del cruce. Igualmente se han aplicado estos tratamientos para intentar obtener de acuerdo con Wilkie (1970) mutaciones q^o a partir de q^+ . Tanto en un caso como en otro ha sido necesario poner a punto las técnicas adecuadas para la comprobación de la sensibilidad, de las razas q^+ empleadas, a los citados antibióticos y para la selección de razas q^+ resistentes.

En el caso de razas q^- se han considerado como razas sensibles las obtenidas a partir de q^+ sensibles. No ha sido posible el empleo o caracterización de razas q^- resistentes.

11.1.- Determinación de la sensibilidad o resistencia

Se llevó a cabo basándose en el hecho de que las levaduras sensibles a los antibióticos ensayados se comportan en su presencia como razas DR, y son incapaces de crecer en medios con lactato como única fuente de carbono.

Las razas objeto de ensayo se diseminaron, en cada caso, en la superficie de dos cajas de Petri, conteniendo una de ellas medio NL y la otra medio NL con el antibiótico a ensayar. Tras cuatro días de incubación se comparó el crecimiento obtenido en las dos cajas de Petri: si se observó crecimiento en las dos, la raza se consideró como resistente al antibiótico añadido; por el contrario, se consideró como sensible cuando creció en medio NL y no en medio NL mas antibiótico.

Para comprobar la sensibilidad se emplearon concentraciones finales en el medio, de cloromicetina y eritromicina, de 0, 1 a 3 mg / ml. Para la comprobación de la resistencia se emplearon en el caso del primero de ellos 3mg/ml y 5mg/ml en el -- del segundo.

11. 2. - Selección de razas resistentes

Tanto en el caso de selección de razas resistentes a la eritromicina como a la cloromicetina se siguió la técnica - que a continuación se describe:

A partir de cultivos de 24 horas en medio NG de la levadura Q^+ correspondiente, se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 75 ml de medio NL que se incubaron en agitación a 28° durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en solución salina para obtener una suspensión con 10^7 -- 10^8 células / ml. Con 1 ml de ésta se inoculó un matraz de 250 ml de medio NL más el antibiótico correspondiente a concentración de 3 mg / ml. El matraz se incubó en agitación a 28° y a partir de las 24 horas de incubación se fueron tomando muestras de 1 ml, a intervalos de 6 horas, y hasta un total de 5, que se sembraron en tubos con 10 ml de medio NL más el antibiótico; los tubos se incubaron a 28° durante 48 horas. Transcurrido - este tiempo, el contenido de los tubos en que apareció crecimiento se diseminó en cajas de Petri con medio NL más antibiótico - que se incubaron a 28° durante 4 días. Las colonias que aparecieron se trasladaron a tubos de agar-NG inclinados y posteriormente se comprobó la resistencia de las razas por el procedimiento descrito.

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

1. - EXPERIENCIAS PRELIMINARES

En este apartado se describen las primeras experiencias realizadas en este trabajo y que consistieron, fundamentalmente, en la comprobación del genotipo de las razas haploides empleadas y la puesta a punto y "standardización" de los métodos de cruce, así como de obtención de ascosporas.

1.1. - Obtención de razas haploides a partir de levadura comercial de panadería

Aún cuando no se emplearon en los estudios y experiencias realizadas en este trabajo, en la primera parte del mismo se obtuvieron catorce razas haploides a partir de clones aislados de levadura de panadería: los designados como N1A, N2A y N5A, todos ellos diploides y prototrofos.

El objeto de esta experiencia consistió en poner a punto y comprobar la eficacia de los métodos, descritos en el apartado correspondiente, empleados en la esporulación de las razas diploides, rotura de las ascas y aislamiento de las razas haploides correspondientes.

1.2. - Comprobación del genotipo de las razas haploides empleadas

Se llevó a cabo sobre las razas X979·2A (α , tri_1 , his_3) y S856c (a , ade_1 , lis_2)

En el transcurso de esta comprobación se puso de manifiesto que, efectivamente, las razas citadas presentaban los requerimientos nutritivos correspondientes al genotipo indicado. No obstante, pudo comprobarse que dichas razas mostraban algunas anomalías.

En el caso de la raza S856c se observó, cuando diseminada en cajas de Petri, la presencia simultánea de tres tipos de colonias: rosas, blancas lisas y blancas rugosas. Los tres tipos se aislaron en cultivo puro, no observándose después fenómeno de disociación alguno, por lo que se llegó a la conclusión de que, aún cuando presentando el mismo genotipo, la levadura que nos fué suministrada era una mezcla de tres razas distintas. De acuerdo con sus características morfológicas las tres razas obtenidas se denominaron respectivamente Sb (blancas lisas), Sbr (blancas rugosas), y Sr (rosas).

En total se obtuvieron tres cultivos de la raza Sb (Sb-1, Sb-2, Sb-3), cuatro de la raza Sr (Sr-1, Sr-2, Sr-3 y Sr-4) y una de la raza Sbr.

De otra parte las pruebas efectuadas para la comprobación del genotipo de la raza X979-2A, indicaron que el cultivo original presentaba un pequeño, aunque no despreciable, número de células que revertían para la histidina. Se trató, por tanto, de seleccionar razas estables para los dos marcadores, para lo cual se aisló un crecido número de colonias, capaces de crecer en medio mínimo con triptófano e histidina, a cada una de las cuales se les determinó su capacidad de reversión para el marcador indicado. Mediante este procedimiento se aislaron tres razas que presentaban ausencia casi total de reversión, y a las que se designó como X-1, X-2, X-3.

En todos los cultivos seleccionados se determinó el porcentaje de células q^- en cultivos estacionarios en medios con glucosa.

Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 1, y son sensiblemente iguales para todos los cultivos pertenecientes a una misma raza.

Tabla 1. - Porcentaje de células q^- en cultivos estacionarios de las razas q^+ seleccionadas. \times

| Raza | células q^- (%) |
|------|----------------------|
| Sb-1 | 10 |
| Sb-2 | 12 |
| Sb-3 | 13 |
| Sbr | 30 |
| Sr-1 | 4 |
| Sr-2 | 5 |
| Sr-3 | 5 |
| Sr-4 | 4 |
| X-1 | 3 |
| X-2 | 2 |
| X-3 | 3 |

\times Los resultados obtenidos son la media de tres determinaciones.

1.3. - Comprobación de la capacidad de cruce entre razas de distinto signo y puesta a punto de las técnicas "standard" de cruce

1.3.1. - Determinación cualitativa de la capacidad de cruce de las razas seleccionadas y viabilidad de los cigotos

Se llevó a cabo de acuerdo con la técnica descrita en 5.1. y 5.2 entre todas las razas de tipo X y todas las de tipo S. Los resultados se exponen en la tabla 2 y demuestran que todas las razas seleccionadas, con excepción de las Sr, son capaces de cruzarse normalmente con las de signo contrario, dando clones prototrofos viables.

Dado que entre las razas de tipo S la variedad Sr era

Tabla 2. - Capacidad de cruce entre las razas q^+ haploides seleccionadas. *

| Razas cruzadas | resultado del cruce † |
|----------------|-----------------------|
| X-1 x Sb-1 | + |
| X-1 x Sb-2 | + |
| X-1 x Sb-3 | + |
| X-1 x Sbr | + |
| X-1 x Sr-1 | - |
| X-1 x Sr-2 | - |
| X-1 x Sr-3 | - |
| X-1 x Sr-4 | - |
| X-1 x Sb-1 | + |
| X-2 x Sb-2 | + |
| X-2 x Sb-3 | + |
| X-2 x Sbr | + |
| X-2 x Sr-1 | - |
| X-2 x Sr-2 | - |
| X-2 x Sr-3 | - |
| X-2 x Sr-4 | - |
| X-3 x Sb-1 | + |
| X-3 x Sb-2 | + |
| X-3 x Sb-3 | + |
| X-3 x Sbr | + |
| X-3 x Sr-1 | - |
| X-3 x Sr-2 | - |
| X-3 x Sr-3 | - |
| X-3 x Sr-4 | - |

† Los signos + indican producción de cigotos prototrofos.

* Los resultados obtenidos son la media de tres determinaciones.

raza que presentaba menor porcentaje de mutación espontánea a α , y en principio parecía mas adecuada para nuestro trabajo, se volvió a comprobar su capacidad de cruce con las de la serie X en medios de conjugación líquidos (5. 3. 1. y 5. 3. 2.); los resultados fueron igualmente negativos, por lo que la utilización de esta raza fué descartada.

Dada la uniformidad de las restantes razas se eligieron arbitrariamente, para llevar a cabo todas las experiencias descritas en este trabajo, las razas Sb-2 y X-3. La raza Sbr se desechó debido a su alto grado de mutación espontánea.

1. 3. 2. - Puesta a punto de los métodos de cruce

Estas experiencias tuvieron por objeto poner a punto los métodos cuantitativos de cruce, así como comprobar el rendimiento en cigotos en cruces X-3 x Sb-2, llevados a cabo con aireación (5. 3. 1.) y sin aireación (5. 3. 2.).

Las dos razas se cultivaron y recogieron en las mismas condiciones para obtener suspensiones de la raza X-3 con una concentración de $16,4 \times 10^7$ células / ml, y de la raza Sb-2 con una concentración de $25,1 \times 10^7$ células / ml. Los cruces se llevaron a cabo en las condiciones descritas en 5. 3. 1. y 5. 3. 2. con lo que la proporción entre células α y α fué aproximadamente 3 : 1, ; proporción que de acuerdo con Iguchi y Onobu(1964) es la más adecuada para la obtención de un rendimiento máximo en cigotos.

Los resultados obtenidos se dan en la tabla 3 y muestran que la efectividad del cruce es de diez veces superior cuando éste se lleva a cabo en aireación.

A pesar de los resultados obtenidos, que demuestran la mayor efectividad de los cruces con aireación no se ha empleado este último método en ninguna de las experiencias que se describen a continuación. Las razones que han movido a ello son, de una parte su mayor dificultad técnica que dado el enorme número de cruces efectuados a lo largo de este trabajo hubiera

Tabla 3. -Rendimiento en cigotos de cruces entre las razas Sb-2 (a) y X-3 (α) en distintas condiciones. \times

| condiciones del cruce | cigotos obtenidos sobre el número máximo posible(%) |
|----------------------------|---|
| Sin aireación (5.3.1.) | 0,13 |
| Con aireación (5.3.2.) | 1,3 |

\times Los resultados obtenidos son la media de tres determinaciones.

complicado enormemente el mismo y, de otra, el considerar que durante las dos horas que las suspensiones se mantienen en aireación los cigotos que se formen precozmente pueden multiplicarse con el consiguiente falseamiento de los resultados.

2.- OBTENCION DE RAZAS q^- Y q^0 . EFECTOS DE LOS AGENTES MUTAGENICOS EMPLEADOS SOBRE LAS RAZAS q^+ Y q^- .

A partir de las razas X-3 y Sb-2 seleccionadas se obtuvieron mutantes con deficiencias respiratorias de tipo q^- , con distintos grados de supresividad. Igualmente se obtuvieron y seleccionaron mutantes q^0 , entendiéndose como tales, como queda dicho, aquellos mutantes citoplasmáticos carentes de supresividad. Aún cuando el número de razas q^- y q^0 utilizadas ha sido muy reducido, en el transcurso de esta parte del trabajo se obtuvo un enorme número de mutantes citoplasmáticos con deficiencias respiratorias, a todos los cuales se determinó su carácter supresor.

El motivo de haber seleccionado y estudiado este gran número de razas ha sido, a más de obtener las necesarias para experiencias posteriores, el comprobar la eficacia de los distintos agentes mutagénicos en relación con su capacidad de inducción de las citadas mutaciones.

Igualmente quiso también comprobarse si la eritromicina era capaz, de acuerdo con la hipótesis de Wilkie (1970), de inducir el cambio a q^{\ominus} de las razas q^+ .

Las razas q^- y q^{\ominus} se han obtenido a partir de cultivos no tratados de las razas X-3 y Sb-2 (mutaciones espontáneas) o sometidos a tratamientos con derivados de acridina, bromuro de etidio y eritromicina.

2.1. - Mutaciones espontáneas

A partir de la raza X-3 se seleccionaron los mutantes "petite" Xp-2, Xp-3, y Xp-4, y a partir de la raza Sb-2 los designados como Sb-2p1, Sb-2p2 y Sb-2p3.

Después de confirmada su deficiencia respiratoria y su naturaleza citoplasmática se determinó la supresividad de cada uno de ellos.

Los resultados se expresan en la tabla 4, y como puede observarse, el grado de supresividad oscila entre 0 y 65%.

2.2. - Mutantes obtenidos por tratamientos con derivados de acridina

Se obtuvieron únicamente a partir de la raza X-3, dado que el porcentaje de células q^- presentes en los cultivos de Sb-2 (12%) hacía muy probable el seleccionar mutantes espontáneos en lugar de los inducidos por el agente mutagénico.

Tabla 4. - Supresividad de las razas " petite " seleccionadas a partir de mutantes espontáneos. *

| Raza ensayada | Raza ρ^+ empleada en el cruce | Supresividad (%) |
|---------------|------------------------------------|------------------|
| Sb-2p1 | X-3 | 53 |
| Sb-2p2 | X-3 | 0 |
| Sb-2p3 | X-3 | 65 |
| Xp-2 | Sb-2 | 0 |
| Xp-3 | Sb-2 | 0 |
| Xp-4 | Sb-2 | 64 |

* Los resultados son la media de tres determinaciones.

Se obtuvieron 24 razas que se designaron AX-1 a AX-24.

Como en el caso anterior se determinó la supresividad de cada una de las razas, una vez confirmada su deficiencia respiratoria y comprobada su naturaleza citoplasmática.

Los resultados se expresan en la tabla 5, e indican que la casi totalidad (87,5%) de los mutantes inducidos por los derivados de acridina tienen capacidad supresora, es decir, son de tipo ρ^- .

2.3. - Mutantes obtenidos por tratamientos con bromuro de etidio

De acuerdo con los antecedentes bibliográficos citados, los tratamientos prolongados con este agente mutagénico destruyen por completo el ADN mitocondrial, por lo que -

Tabla 5. - Supresividad de las razas " petite " seleccionadas a partir de mutantes con deficiencias respiratorias obtenidos en tratamientos con derivados de acridina
 *

| Raza ensayada | Raza g ⁺ empleada en el cruce | Supresividad (%) |
|---------------|--|------------------|
| AX-1 | Sb-2 | 49 |
| AX-2 | " | 42 |
| AX-3 | " | 28 |
| AX-4 | " | 52 |
| AX-5 | " | 15 |
| AX-6 | " | 12 |
| AX-7 | " | 15 |
| AX-8 | " | 55 |
| AX-9 | " | 7 |
| AX-10 | " | 48 |
| AX-11 | " | 15 |
| AX-12 | SER-19** | 8 |
| AX-13 | " | 3 |
| AX-14 | " | 0 |
| AX-15 | " | 0 |
| AX-16 | " | 0 |
| AX-17 | " | 26 |
| AX-18 | " | 31 |
| AX-19 | " | 16 |
| AX-20 | " | 4 |
| AX-21 | " | 28 |
| AX-22 | " | 13 |
| AX-23 | " | 26 |
| AX-24 | " | 21 |

* Los resultados son la media de tres determinaciones.

** La raza SER-19 es una raza, como se verá mas adelante, resistente a eritromicina (5mg/ml), obtenida a partir de la Sb-2.

sú aplicación tuvo por objeto obtener razas q^{\ominus} .

Experiencias preliminares, sin embargo, en las que las razas X-3 y Sb-2 se cultivaron durante 48 horas en medios con $2 \mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio, demostraron que las masas de células seguían mostrando supresividad cuando, después de recogidas y lavadas, se cruzaban con células q^+ adecuadas. La supresividad del cultivo de la raza X-3 así tratada fué del 45% en cruces con la SER-19; mientras que la supresividad de la Sb-2, sometida al mismo tratamiento y cruzada con la X-3, fué del 19%. Este hecho fué interpretado, en principio, como debido posiblemente a la acción directa del bromuro de etidio residual (no lavado) sobre las células ó los cigotos q^+ . Para evitar esta posible interferencia se repitieron las experiencias, pero en vez de medir directamente la supresividad global de las masas de células obtenidas en los cultivos tratados, estos se diseminaron en la superficie de un medio adecuado. La concentración del bromuro de etidio fué en este caso, de $2,4 \mu\text{g/ml}$ ($6 \mu\text{M}$). El 100% de las colonias crecidas fueron "petites", tal como había sido demostrado previamente por Slonimski *et al* (1968). En el caso de la raza X-3 tratada se aislaron 12 razas (BX-1 a BX-12) a partir de colonias distintas y en el caso de la Sb-2, 11 razas (BS-1 a BS-11).

La supresividad de las razas aisladas se determinó por el procedimiento acostumbrado, en cruces con las razas q^+ SER-19 y X-3 y los resultados obtenidos se expresan en la tabla 6.

A la vista de estos resultados se repitieron las experiencias aumentando la concentración de bromuro de etidio a $20 \mu\text{g/ml}$ en el caso de la X-3 y 10 y $20 \mu\text{g/ml}$ en el caso de la raza Sb-2. A partir de la raza X-3 se seleccionaron 24 cultivos procedentes de otras tantas colonias (BX-13 a BX-36). A partir de la raza Sb-2 se seleccionaron 10 cultivos en tratamientos con $10 \mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio (BS-12 a BS-21) y otros 10 en tratamientos con $20 \mu\text{g/ml}$ (BS-22 a BS-31).

Como en el caso anterior se determinó la supresividad de las razas de la serie X seleccionadas en cruces con

Tabla 6. - Supresividad de razas " petites " obtenidas por tra
tamientos con bromuro de etidio (2, 4 μ g/ml) de las
razas X-3 y Sb-2, determinada en cruces con las ra
zas q⁺ SER-19 y X-3 respectivamente. *

| Raza ensayada | Supresividad (%) |
|---------------|---------------------|
| BX-1 | 31 |
| BX-2 | 27 |
| BX-3 | 0 |
| BX-4 | 0 |
| BX-5 | 34 |
| BX-6 | 0 |
| BX-7 | 0 |
| BX-8 | 0 |
| BX-9 | 0 |
| BX-10 | 12 |
| BX-11 | 6 |
| BX-12 | 27 |
| BS-1 | 29 |
| BS-2 | 21 |
| BS-3 | 0 |
| BS-4 | 31 |
| BS-5 | 21 |
| BS-6 | 14 |
| BS-7 | 0 |
| BS-8 | 17 |
| BS-9 | 3 |
| BS-10 | 0 |
| BS-11 | 2 |

* Los resultados son la media de tres determina-
ciones.

la raza ρ^+ SER-19 y las de la serie S en cruces con la ρ^+ X - 3. Los resultados de esta experiencia se exponen en la tabla 7 y son del mismo tipo que los obtenidos en el caso anterior.

2.4. - Obtención de mutantes mediante tratamiento con eritromicina

De acuerdo con Wilkie (1.970) los tratamientos con cloromicetina o eritromicina durante mas de 10 generaciones inducen la conversión total del cultivo en " petites ". Los autores citados suponen que la causa de este hecho puede ser la inhibición de la síntesis de una proteína necesaria para la replicación del ADN mitocondrial y que se produce en ribosomas mitocondriales. De acuerdo con esta hipótesis los mutantes " petites " obtenidos carecerán de ADN mitocondrial, es decir serán de tipo ρ^- .

Con objeto, de una parte, de comprobar la citada hipótesis y, de otra, para obtener razas ρ^- se efectuaron experiencias en las que la raza Sb-2, sensible a la eritromicina (2 mg/ml) se sometió a tratamientos con esta droga (3mg / ml de eritromicina base bajo la forma de lactibionato de eritromicina) durante 24 horas en medio líquido NG (28° y agitación constante), durante 48 horas en las mismas condiciones y durante dos cultivos sucesivos de 24 horas en las mismas condiciones.

En ninguno de los casos descritos se demostró un 100 % de mutaciones " petites ". La proporción de mutantes " petites " de la raza Sb-2 en cultivos en medio líquido NG a las 24 y 48 horas fué, respectivamente, del 20 y 21 % y del 21 % en los cultivos con igual tiempo de incubación añadidos de eritromicina. Solamente en los tratamientos a lo largo de dos cultivos sucesivos de 24 horas se pudo apreciar alguna diferencia: la proporción de mutantes " petites " de la raza Sb-2 cultivada en estas condiciones fué del 29 %, mientras que

Tabla 7. - Supresividad de razas " petites " obtenidas por tratamientos con bromuro de etidio (10 y 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$) de las razas X-3 y Sb-2, determinadas en cruces con las razas q^+ SER-19 y X-3, respectivamente. *

| Razas ensayadas | Supresividad (%) |
|-----------------|---------------------|
| BX-13 | 0 |
| BX-14 | 33 |
| BX-15 | 27 |
| BX-16 | 0 |
| BX-17 | 0 |
| BX-18 | 20 |
| BX-19 | 42 |
| BX-20 | 26 |
| BX-21 | 0 |
| BX-22 | 0 |
| BX-23 | 30 |
| BX-24 | 38 |
| BX-25 | 0 |
| BX-26 | 28 |
| BX-27 | 0 |
| BX-28 | 0 |
| BX-29 | 31 |
| BX-30 | 0 |
| BX-31 | 36 |
| BX-32 | 20 |
| BX-33 | 0 |
| BX-34 | 20 |
| BX-35 | 30 |
| BX-36 | 26 |
| BS-12 | 20 |
| BS-13 | 0 |
| BS-14 | 9 |
| BS-15 | 22 |

Tabla 7. - (continuación)

| Raza ensayada | Supresividad (%) |
|---------------|---------------------|
| BS-16 | 31 |
| BS-17 | 22 |
| BS-18 | 15 |
| BS-19 | 10 |
| BS-20 | 10 |
| BS-21 | 5 |
| BS-22 | 19 |
| BS-23 | 9 |
| BS-24 | 13 |
| BS-25 | 6 |
| BS-26 | 10 |
| BS-27 | 16 |
| BS-28 | 10 |
| BS-29 | 9 |
| BS-30 | 21 |
| BS-31 | 15 |

× Los resultados son la media de tres determinaciones.

cuando se cultivó en presencia de eritromicina esta proporción aumentó al 43%.

La raza X-3 sometida a los mismos tratamientos dió lugar a resultados similares.

A la vista de estos resultados, podemos afirmar que, al menos para las razas ensayadas en este trabajo, no

puede admitirse la hipótesis de la escuela de Wilkie sobre la existencia de una proteína mitocondrial necesaria para la replicación del ADN mitocondrial. Los resultados obtenidos en los tratamientos durante dos cultivos sucesivos pueden ser fácilmente explicados suponiendo que la eritromicina, al anular el metabolismo aerobio de las células q^+ , permite que los mutantes "petites" espontáneos se desarrollen más fácilmente. En cuanto al carácter q^- o q^0 de los mutantes "petites" obtenidos en estos tratamientos los resultados que se exponen en la tabla 8, en relación con la supresividad de seis estirpes "petites" obtenidas por este procedimiento, demuestran que la proporción de mutantes q^0 es del mismo orden que la existente en poblaciones "petites" originadas por mutación espontánea (tabla 4).

Tabla 8. - Supresividad de razas "petites" seleccionadas a partir de la raza X-3 sometida durante dos cultivos sucesivos de 24 horas a tratamientos con 3 mg / ml de eritromicina. * †

| Raza ensayada | Supresividad (%) |
|---------------|------------------|
| 1EX | 57 |
| 2EX | 0 |
| 3EX | 6 |
| 4EX | 0 |
| 5EX | 0 |
| 6EX | 56 |

* Los resultados son la media de tres determinaciones

† La supresividad se midió en cruces con la raza Sb-2.

2. 5. - Estabilidad de las razas q^- seleccionadas

2. 5. 1. - Reversión espontánea a q^+

Todas las razas q^- seleccionadas han sido conservadas por resiembras periódicas en medio NG, a intervalos de 15 días, incubación durante 24 horas a 28° y mantenimiento a 6° hasta la próxima resiembra.

A lo largo de dos años y cada cuatro resiembras, se ha investigado la presencia de revertientes q^+ en dichos cultivos, no habiéndose obtenido en ningún caso resultados positivos. Las razas q^- seleccionadas, BS-2, Xp-3 y Xp-4 han mostrado por tanto una reversión nula, o al menos no detectable, en relación con su carácter q^- .

2. 5. 2. - Reversión por tratamientos con derivados de acridina

Como complemento de las experiencias anteriores, se realizaron otras en las que se investigó la aparición de revertientes q^+ , a partir de mutantes q^- de distinta procedencia, sometidos a tratamientos con derivados de acridina.

Se emplearon las razas AX-10, AX-12, BS-2, Xp-3 y Xp-4, que fueron sometidas a tratamientos con anaranjado de acridina (25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)añadido a cultivos en medio líquido NG. La investigación de revertientes q^+ en muestras tomadas a las 8, 16, 24, 40 y 48 horas de tratamiento, dió resultados uniformemente negativos.

2. 5. 3. - Resistencia a la acción del bromuro de etidio

En experiencias anteriores pudo observarse cómo el porcentaje de mutaciones q^0 obtenidas en tratamientos con

bromuro de etidio es menor en aquellos casos en que la raza q^+ tratada presenta un alto porcentaje de células q^- en cultivos estacionarios en medios con glucosa. Este hecho resulta especialmente patente en la tabla 7, en la que el porcentaje de mutaciones q^0 obtenidas es de 41,6 en el caso de la raza X-3, que muestra un 3% de células q^- en cultivos estacionarios, y de 3 en el caso de la Sb-2, que muestra un 12% de células q^- en las mismas condiciones.

De acuerdo con ello se pensó que la no conversión total de la estirpe q^+ en q^0 pudiera deberse al distinto comportamiento de las células q^+ y q^- , coexistentes en el cultivo q^+ , frente al agente mutagénico empleado, en el sentido de que las mutaciones q^- fuesen resistentes al mismo.

Para comprobar este extremo se montó una experiencia en la que mutantes q^- espontáneos o inducidos por derivados de acridina fueron sometidos a un intenso tratamiento con bromuro de etidio: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 48 horas. Las razas q^- empleadas fueron la Xp-4 y la AX-10.

Después del tratamiento, el cultivo se diseminó en medio NG aislándose en cada caso once estirpes a partir de otras colonias (1Xp-4 a 11Xp-4 y 1AX-10 a 11AX-10, respectivamente.)

La supresividad de cada estirpe fué medida frente a la raza SER-19 y los resultados obtenidos se expresan en la tabla 9. Estos resultados demuestran que, efectivamente, tanto los mutantes espontáneos q^- como los inducidos con derivados de acridina no pierden la supresividad, si bien en el caso de la raza Xp-4 el valor de la misma disminuye en todos los casos.

Estos resultados parecen confirmar la hipótesis antes sugerida. En cuanto a las causas que condicionan esta resistencia, aunque su estudio hubiera sido muy interesante, se salía de los límites de este trabajo, por lo que no ha sido abordado. No obstante, algunas experiencias realizadas parecen demostrar que esta resistencia se transmite a la progenie por un mecanismo de herencia citoplasmática.

Tabla 9. - Efectos de tratamientos con bromuro de etidio (20 μ g/ml durante 48 horas) sobre la supresividad de los mutantes g^- Xp-4 y AX-10. *

| Estirpe | Supresividad (%) |
|---------|------------------|
| Xp-4 | 39 |
| 1Xp-4 | 16 |
| 2Xp-4 | 33 |
| 3Xp-4 | 19 |
| 4Xp-4 | 20 |
| 5Xp-4 | 21 |
| 6Xp-4 | 24 |
| 7Xp-4 | 21 |
| 8Xp-4 | 26 |
| 9Xp-4 | 25 |
| 10Xp-4 | 32 |
| 11Xp-4 | 31 |
| AX-10 | 47 |
| 1AX-10 | 30 |
| 2AX-10 | 46 |
| 3AX-10 | 32 |
| 4AX-10 | 51 |
| 5AX-10 | 51 |
| 6AX-10 | 42 |
| 7AX-10 | 34 |
| 8AX-10 | 26 |
| 9AX-10 | 50 |
| 10AX-10 | 32 |
| 11AX-10 | 40 |

* Los resultados obtenidos son la media de tres-determinaciones. La supresividad se determinó en cruces con la raza SER-19.

3.- EFECTOS DE TRATAMIENTOS CON ANTI--BIOTICOS QUE INHIBEN LA SINTESIS DE PROTEINAS EN RIBOSOMAS MITOCONDRIALES Y-CITOPLASMATICOS SOBRE LA SUPRESIVIDAD DE RAZAS q^- .

Uno de los objetivos principales de este estudio sobre la supresividad de los mutantes q^- de S. cerevisiae, consistía, como se expresó en el plan de trabajo, en tratar de descifrar el mecanismo por el que se lleva a cabo este fenómeno.

Desde las experiencias de Ephrussi et al (1966) , - parece demostrado que el ADN mitocondrial alterado, aportado - por la raza q^- , interfiere competitivamente con la replicación del ADN mitocondrial aportado por la raza q^+ . El fundamento de esta interferencia viene atribuyéndose como ya se ha dicho a la rápida eliminación de mitocondrias q^+ , debido al mayor número de unida des de ADN mitocondrial que poseen los mutantes q^- y a su mayor velocidad de replicación, consecuencia de un menor tamaño mole- cular.

Sería no obstante posible que la citada interferencia se ejerciera mediante proteínas difusibles producidas en las ra- zas q^- y que de alguna manera inhibiesen la replicación del ADN mitocondrial q^+ ; proteínas que podrían ser sintetizadas en los ri bosomas mitocondriales o citoplasmáticos de las citadas razas.

Otra posibilidad sería que la replicación del ADN mi tocondrial q^+ estuviese regulada negativamente por una proteína de origen mitocondrial mientras que el q^- no respondiese a este control.

Para verificar la primera de estas alternativas se - plantearon unas experiencias en las que se determinó la supresi vidad de razas q^- sometidas a tratamientos más o menos prolon - gados, antes del cruce, con eritromicina y cloromicetina, que - inhiben la síntesis de proteínas de origen mitocondrial y ciclohe- ximida, que inhibe la síntesis de proteínas de origen citoplasmá- tico.

En cuanto a la segunda alternativa se verificó someti - tiendo a las razas q^+ , antes y en el momento del cruce, a trata- mientos con eritromicina que al inhibir la síntesis de la supuesta proteína represora permitiría una replicación del ADN mitocon-

drial q^+ similar a la del q^- .

Para la realización de estas experiencias fué necesaria la obtención de estirpes q^+ y q^- sensibles y resistentes a la eritromicina y cloromicetina, a fin de que los citados antibióticos sólo tuviesen acción sobre la raza deseada en cada caso.

3. 1. - Selección de razas q^- y q^+ sensibles y resistentes a la eritromicina y cloromicetina

3. 1. 1. - Selección de razas sensibles a la eritromicina

Se llevó a cabo mediante la técnica descrita en 11.1 y empleando las razas X-1, X-2, X-3, Sb-1, Sb-2 y Sb-3. Se comprobó su crecimiento en medio NL (con concentraciones de eritromicina de 0, 1, 0,5, 1 y 2 mg/ml). Las lecturas se efectuaron después de una incubación a 28°C de 4-7 días, considerándose como resistentes a cada concentración las razas que daban un crecimiento positivo. Los resultados de estas experiencias se expresan en la tabla 10.

Como puede comprobarse, todas las razas ensayadas fueron sensibles a la acción de la eritromicina a la concentración de 2 mg/ml, por lo que fueron consideradas aptas para ser empleadas en las experiencias que se describirán a continuación.

3. 1. 2. - Selección de razas sensibles a la cloromicetina

Se llevó a cabo como en el caso anterior, cultivando las razas X-1, X-2, X-3, Sb-1, Sb-2, y Sb-3 en medio NL adicionado de cloromicetina a las concentraciones de 0, 1, 1, 2 y 3 mg/ml. Los resultados se expresan en la tabla 11 y en ella puede verse cómo las razas de la serie S son todas sensibles a concentraciones de cloromicetina 2 mg/ml.

Tabla 10. - Crecimiento de distintas razas q^+ en medio NL a adicionado de eritromicina.

| Raza | Concentración de eritromicina (mg / ml) | | | |
|------|--|-----|---|---|
| | 0,1 | 0,5 | 1 | 2 |
| X-1 | + | + | - | - |
| X-2 | + | + | + | - |
| X-3 | + | + | - | - |
| Sb-1 | + | + | + | - |
| Sb-2 | + | + | + | - |
| Sb-3 | + | + | - | - |

Los signos + y - indican, respectivamente, crecimiento o ausencia del mismo.

Tabla 11 .- Crecimiento de distintas razas q^+ en medio NL adicionado de cloromicetina.

| Raza | Concentración de cloromicetina (mg / ml) | | | |
|------|---|---|---|---|
| | 0,1 | 1 | 2 | 3 |
| X-1 | + | + | + | - |
| X-2 | + | + | + | - |
| X-3 | + | + | + | - |
| Sb-1 | + | + | - | - |
| Sb-2 | + | + | - | - |
| Sb-3 | + | + | - | - |

Los signos + y -, respectivamente, indican crecimiento o ausencia del mismo.

3. 1. 3. - Selección de razas q^+ resistentes a la eritromicina

Se llevó a cabo a partir de la raza Sb-2 de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado correspondiente (11. 2). Mediante este procedimiento se seleccionaron un conjunto de 25 razas que crecían normalmente en medio NL adicionado de 3 mg/ml de eritromicina (razas SER-1 a SER-25).

Con posteridad a esta primera selección se comprobó la resistencia al antibiótico de las razas aisladas en medio NL adicionado de 5 mg / ml del antibiotico, bajo la forma de - lactibionato de eritromicina. En todos los casos se pudo comprobar la resistencia de las razas seleccionadas.

Igualmente se determinó la habilidad de cruce frente a la raza X-3 de todas las razas citadas, seleccionándose la designada como SER-19 para experiencias ulteriores, debido a que su capacidad de formación de cigotos fué la más elevada.

3. 1. 4. - Selección de razas q^+ resistentes a la cloromicetina

Se llevó a cabo por el mismo procedimiento indicado anteriormente, seleccionándose en este caso 24 razas capaces de crecer normalmente en medios NL con 3 mg / ml de cloromicetina (razas SCR-1 a SCR-24).

Como en el caso anterior se determinó la habilidad de cruce de las razas obtenidas, seleccionándose de acuerdo con este carácter las designadas como SCR-2, 7, 9, 15, 18, - 20 y 24.

3. 1. 5. - Comprobación de la sensibilidad de las razas q^- a la eritromicina y cloromicetina

La mutación q^- lleva consigo, normalmente, la pér-

dida de la resistencia a los antibióticos ensayados, (Linnane et al, 1968); Thomas and Wilkie (1968), Wilkie, (1970) No obstante, en principio sólo se consideraron como razas q^- sensibles las provenientes de q^+ que ya lo eran. Una ulterior comprobación de la sensibilidad de las razas q^- a emplear fué llevada a cabo mediante cruces con razas q^+ sensibles y comprobación de la sensibilidad de los cigotos obtenidos.

Las razas ensayadas fueron la AX-10 y la Xp-4. Los cruces se efectuaron frente a la raza Sb-2, sensible tanto a la eritromicina como a la cloromicetina, y los resultados obtenidos confirmaron la sensibilidad de ambas razas a los dos antibióticos.

3. 1. 6. - Selección de razas q^- resistentes a la eritromicina y cloromicetina

Se trató de conseguir, determinando la capacidad de crecimiento en medio NL , adicionado de eritromicina o cloromicetina, de los cigotos obtenidos en cruces de las razas q^- de que se disponía con razas q^+ sensibles a la eritromicina y cloromicetina. A pesar del gran número de razas ensayadas, en ningún caso pudo demostrarse crecimiento de los cigotos obtenidos en el medio citado, por lo que no ha sido posible el empleo de una raza q^- resistente a los citados antibióticos.

3. 2. - Supresividad de razas q^- cultivadas y cruzadas en presencia y ausencia de eritromicina

Las razas q^- AX-10 y Xp-4 se cultivaron durante 48 horas en medio NG con 3 mg/ml de eritromicina. Al cabo de este tiempo se volvieron a sembrar en el mismo medio, cultivándose durante 48 horas antes de proceder a la recogida de células para efectuar los cruces. Estos se llevaron a cabo

por el procedimiento ordinario, en unos casos, y en otros añadiendo al medio de conjugación la misma cantidad de eritromicina (3 mg / ml). Los cruces se efectuaron en todos los casos frente a la raza SER-19, resistente a la eritromicina, para descartar cualquier efecto que el antibiótico pudiese tener sobre la raza q^+ . Los valores de la supresividad se determinaron por el procedimiento ordinario, utilizando en unos casos medio MLG para determinar la proporción de cigotos q^- y en otros medio MLG con 3 mg / ml de eritromicina. Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 12. Dichos resultados indican que los tratamientos con eritromicina de la raza q^- , en cualquiera de las condiciones ensayadas, no afectan apreciablemente los valores de la supresividad.

3. 3. - Supresividad de razas q^- cultivadas en presencia y ausencia de cloromicetina

A diferencia del caso anterior, en éste se prescindió de utilizar la cloromicetina en el medio de conjugación y en el medio empleado para el crecimiento de los cigotos. Por lo demás las experiencias se realizaron igualmente sobre las razas AX-10 y Xp-4, cultivadas en medio NG añadido de cloromicetina (3 mg / ml). Como en el caso anterior las razas q^- se sometieron a dos pases sucesivos de 48 horas en el medio citado antes de recoger las células y efectuar los cruces frente a la raza SER-19. Los resultados obtenidos en estas experiencias fueron los siguientes:

- Supresividad de la raza Xp-4 cultivada en medio NG. . . 38 %
- Supresividad de la raza Xp-4 cultivada en presencia de cloromicetina . . . 38, 5 %
- Supresividad de la raza AX-10 cultivada en medio NG. . 43 %
- Supresividad de la raza AX-10 cultivada en presencia de cloromicetina . . . 51 %.

Como en la experiencia anterior los tratamientos con cloromicetina sobre razas q^- no parecen tener efecto

Tabla 12.- Valores de la supresividad de las razas AX-10 y Xp-4 cultivadas y cruzadas en ausencia y presencia de eritromicina. *

| Raza ensayada | Eritromicina (3 mg / ml) en Medio cultivo Medio conjugación M. MLG | | Supresividad (%) |
|---------------|--|----|------------------|
| AX-10 | - | - | 48 |
| AX-10 | sf | - | 51 |
| AX-10 | sf | sf | 46 |
| AX-10 | sf | sf | 51 |
| Xp-4 | - | - | 38 |
| Xp-4 | sf | - | 38 |
| Xp-4 | sf | sf | 38 |
| Xp-4 | sf | sf | 34 |

* La supresividad se determinó frente a la raza SER-19, y los resultados son la media de tres determinaciones.

sobre la supresividad de la misma.

3. 4. - Supresividad de una raza q^- cultivada en presencia y ausencia de cicloheximida .

La raza q^- AX-10 se incubó en medio NG líquido durante 14 horas al cabo de las cuales las células crecidas se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en un volumen igual de medio NG al que se añadió cicloheximida hasta una concentración de 20 ng / ml, reanudándose la incubación durante otras 24 horas. Transcurrido este tiempo, se recogieron las células por centrifugación, y se lavaron y resuspendieron en solución salina, para a continuación efectuar los cruces correspondientes frente a la raza SER-19. El valor de la supresividad obtenida en el caso de cultivos realizados en presencia de cicloheximida fué del 49%, no presentando, por tanto, diferencia apreciable sobre la supresividad normal de la raza AX-10 (48%).

3. 5. - Supresividad de una raza q^- frente a una raza q^+ cultivada o no en presencia de eritromicina

Como se dijo al principio, esta experiencia tuvo por objeto comprobar la posible existencia de una proteína represora de naturaleza mitocondrial que controlara la replicación del ADN q^+ . Caso de ser cierta esta suposición, la inhibición de síntesis de proteínas mitocondriales por la eritromicina haría que desapareciese el citado control y por tanto que las unidades de ADN mitocondrial q^+ se multiplicasen a igual ritmo que las del q^- con lo que en definitiva la supresividad de la raza q^- ensayada debería disminuir.

Se utilizó la raza q^+ Sb-2 y los tratamientos

con eritromicina se aplicaron según las tres variantes siguientes:

- a) Cultivo de la raza Sb-2 durante 24 horas en medio NG con eritromicina a la concentración de 3 mg / ml.
- b) Idéntico al anterior, pero en este caso también se añadió eritromicina a igual concentración en el momento del cruce.
- c) La raza Sb-2 fué cultivada durante 24 horas en medio NG con eritromicina (3 mg / ml), seguido de resiembra en el mismo medio durante otras 24 horas.

La raza q^- cuya supresividad se determinó frente a la Sb-2 cultivada normalmente y tratada con eritromicina fué la AX-10. Los resultados se exponen en la tabla 13, e indican que en las condiciones ensayadas los tratamientos sobre la raza q^+ no afectan la supresividad de la raza q^- , ya que el aumento en el caso en que se somete la raza q^+ a dos cultivos sucesivos en presencia de eritromicina no puede ser tomado en consideración puesto que probablemente se debe al aumento en la proporción de mutantes q^- espontáneos en los cultivos de la raza q^+ , de acuerdo con lo que se expondrá en el capítulo siguiente.

Tabla 13. - Valores de la supresividad de la raza AX-10 en cruces con la raza Sb-2 cultivada y cruzada en ausencia y presencia de eritromicina. x

| Tratamientos razas Sb-2 | células q ⁻ presentes en los cultivos q ⁺ (%) | Supresividad de la raza AX-10 (%) |
|---|---|-----------------------------------|
| ninguno | 20 | 56 |
| eritromicina (24 horas) | 20 | 56 |
| idem, más eritromicina en el medio de conjugación | 21 | 57 |
| ninguno (dos cultivos-sucesivos de 24 horas en medio NG) | 29 | 63 |
| eritromicina, a lo largo de dos cultivos sucesivos de 24 horas, en medio NG | 43 | 78 |

x Los resultados son la media de tres determinaciones.

4 .-INFLUENCIA DE LAS RAZAS q^+ EMPLEADAS Y DE LAS CONDICIONES EN QUE SE EFECTUAN LOS CRUCES SOBRE LA SUPRESIVIDAD DE LAS RAZAS q^-

Todas las experiencias planteadas hasta el momento, en orden a descifrar el mecanismo de la supresividad, se llevaron a cabo, como queda expuesto, utilizando razas q^- y q^+ determinadas en cada caso, pero en ocasiones, de unas experiencias a otras, se utilizaron razas q^+ distintas para comprobar la supresividad de una misma q^- o bien, aún utilizando la misma raza q^+ , las condiciones fisiológicas de ésta, así como las condiciones del cruce, pudieron ser diferentes, ya que no se controlaron de una manera estricta las condiciones de cultivo de las citadas razas, ni tampoco el número absoluto y relativo de células q^- usadas en el cruce.

Un examen global de los resultados obtenidos en las experiencias expuestas hasta ahora, llevó a la conclusión de que la supresividad de una determinada raza q^- calculada por la fórmula de Sherman y Ephrusi (1962) arrojaba cifras bastante dispares, según el tipo de raza q^+ frente a la que se determinaba. Esto fué especialmente aparente en el caso de aquellas razas q^- más frecuentemente usadas: AX-10 y Xp4, lo que llevó a pensar que la supresividad de una raza q^- , en lugar de ser una cualidad intrínseca e inalterable de la misma, tal como se venía admitiendo, pudiera estar condicionada por las características de la raza q^+ empleada y las condiciones fisiológicas de ésta.

Para confirmar esta idea se determinó la supresividad de la raza q^- frente a distintas q^+ , así como la posible variación de la misma en distintas condiciones de cruce. Los resultados obtenidos han confirmado plenamente la idea de que el valor de la supresividad de una determinada raza q^- no es una constante, sino que varía en función de una serie de factores dependientes; fundamentalmente, de la raza q^+ .

4. 1. - Variación de la supresividad de razas q^- en cruces con diferentes q^+

La comprobación de este extremo se llevó a cabo determinando el poder supresor de la raza AX-10 frente a las razas q^+ : Sb-2, SER-19, F1. 14 y F1. 27, y de la Xp-4 frente a las razas Sb-2 y SER-19. Las razas q^+ fueron todas ellas a, ada₁, lis₂, y las q^- , a, tri₁, his₃.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 14 y demuestran que, efectivamente, la supresividad de las razas encayadas varía, en ocasiones enormemente, según la raza q^+ empleada en su determinación.

Tabla 14. - Variación en el valor de la supresividad de razas q^- de acuerdo con la raza q^+ con la que se cruza. *

| Razas q^- | Razas q^+ | Supresividad q^- (%) |
|-------------|-------------|---------------------------|
| AX-10 | Sb-2 | 54 |
| AX-10 | SER-19 | 48 |
| AX-10 | F1. 14 | 33 |
| AX-10 | F1. 27 | 21 |
| Xp-4 | Sb-2 | 64 |
| Xp-4 | SER-19 | 38 |

* Los resultados son la media de tres determinaciones.

4. 2. - Variación de la supresividad de una raza q^- según las condiciones fisiológicas de las razas q^+ con las que se cruza

Esta experiencia tuvo por objeto comprobar si, aún en relación con una misma raza q^+ , los valores de la supresividad de una determinada raza q^- se afectan por las condiciones de la raza q^+ .

Para ello, se planeó una experiencia en la que la raza AX-10 se cruzó con las razas SER-19, F1. 14 y F1. 27 que habían sido obtenidas en medios con lactato como única fuente de carbono y que por tanto debían poseer características fisiológicas totalmente distintas a cuando se cultivan en medios con glucosa.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 15. Junto con los correspondientes de la experiencia anterior y el porcentaje de mutantes espontáneos que mostraron las razas q^+ en los dos tipos de medios ponen de manifiesto cómo efectivamente, la supresividad de la raza AX-10 se vé profundamente afectada por la modalidad de cultivo de la raza q^+ .

Tabla 15. - Variación en el valor de la supresividad de una raza q^- de acuerdo con la fuente de carbono del medio empleado para cultivar las razas q^+ con las que se cruza. *

| Raza q^+ | Fuente de carbono | % células q^- en el cultivo q^+ | Supresividad raza AX-10 (%) |
|------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| SER-19 | glucosa | 17 | 48 |
| SER-19 | lactato | 3 | 8 |
| F1. 14 | glucosa | 7 | 33 |
| F1. 14 | lactato | 4 | 12, 5 |
| F1. 27 | glucosa | 2 | 21 |
| F1. 27 | lactato | 2 | 1 |

* Los resultados son la media de tres determinaciones,

4. 3. - Variación de la supresividad en función de las condiciones en que se llevan a cabo los cruces

De acuerdo con la bibliografía existente sobre el tema, todos los cruces efectuados para determinar la supresividad se llevaron a cabo, como quedó expuesto en "Material y Metodos", poniendo doble cantidad de células \underline{a} que de células $\underline{\alpha}$.

A la hora de determinar los factores que afectan la supresividad de una raza q^- , se pensó que quizás la proporción de células a/α presentes en el cruce fuera uno de tales factores.

Para comprobar este extremo se plantearon una serie de experiencias en todas las cuales se cruzó la raza SER-19 (\underline{a} , $\underline{q^+}$, \underline{ade}_1 , \underline{lis}_2) con la AX-10 (\underline{a} , $\underline{q^-}$, \underline{tri}_1 , \underline{his}_3), pero variando en cada caso el cociente a/α .

En cada experiencia en particular se determinó la supresividad de la raza q^- .

Los resultados se exponen en la tabla 16, junto con los valores que expresan el rendimiento en cigotos totales y q^+ del cruce, con respecto al número total de células (a) q^+ . De estos datos se deduce que efectivamente la proporción de células a/α influye en la supresividad de la raza q^- (α).

4. 4. - Variación en el valor de la supresividad de una raza q^- de acuerdo con la proporción de células q^- presentes en los cultivos de células q^+

Las experiencias reseñadas en los apartados anteriores indican que la supresividad de una raza q^- , calculada por la fórmula de Sherman y Ephrusi (1962), no puede ser considerada como un carácter constante de la misma, sino que depende en alto grado de la raza q^+ utilizada y de las condiciones en que éste se efectúa. Dado que, con alguna excepción, las variaciones de la supresividad de las razas q^- coinciden con valores distintos en el porcentaje de células q^- presentes en los cultivos de la q^+ con la que se cruzó o del número relativo de células q^- de los tipos (\underline{a}) y ($\underline{\alpha}$) presentes, se pensó que la variación de la supresividad podría acentuarse aumentando

do artificialmente la proporción de células q^- en las suspensiones de células q^+ .

Para comprobar este extremo se plantearon una serie de experiencias en las cuales se midió la supresividad de la raza AX-10 en cruces con suspensiones de las razas q^+ SER-19 y F1.27 cuya proporción de células q^- se elevó artificialmente hasta un porcentaje del 26,7 y 7,5 respectivamente.

Para conseguir este aumento se aislaron previamente mutantes q^- espontáneos de las dos razas empleadas. Las dos razas q^- aisladas se cultivaron y recogieron en idénticas condiciones que las razas q^+ madres correspondientes. Las suspensiones obtenidas se añadieron inmediatamente antes del cruce a las de las razas q^+ , en cantidades adecuadas para conseguir un aumento de células q^- hasta los límites antes indicados, y a continuación se efectuaron los cruces con la raza AX-10 por la técnica acostumbrada.

Dado que, según quedó demostrado, la fuente de carbono empleada en los medios donde se cultiva la raza q^+ influye decisivamente en la supresividad de la raza q^- , se efectuaron paralelamente dos experiencias, una en la que las razas q^+ fueron cultivadas en medios con glucosa y otra en la que se cultivaron en medios con lactato.

Los resultados se exponen en las tablas 17 y 18 y en las figuras 1 y 2, y demuestran que los valores de la supresividad varían enormemente conforme varía la proporción de células q^- presentes en las suspensiones q^+ . Es de hacer notar que, según se trate de una u otra raza q^+ , las variaciones obtenidas son muy distintas para incrementos iguales en la proporción de células q^- .

4.5. - Determinación de la habilidad de cruce entre razas q^+ , q^- y q^0

La experiencia anterior demuestra claramente que la proporción de células q^- presentes en los cultivos o suspensiones de la raza q^+ influye de una manera radical sobre la supresividad de una determinada raza q^- . Este hecho induce a pensar que, in-

Tabla 16. - Variación en el valor de la supresividad de una raza q^- (α), así como en el rendimiento de cigotos totales y q^+ , de acuerdo con la proporción de células a y α empleadas en el cruce. * †

| Nº total células (<u>a</u>) | Nº total células (<u>α</u>) | a / α | cigotos totales frente a q^+ (<u>α</u>) (%) | cigotos q^+ frente a q^+ (<u>a</u>) (%) | Supresividad de la raza (<u>α</u>) (%) |
|-------------------------------|---|--------------|---|---|--|
| 2×10^6 | 4×10^4 | 50 | 2,72 | 1 | 60 |
| 2×10^6 | 4×10^5 | 5 | 12,4 | 4,3 | 53 |
| 2×10^6 | 4×10^6 | 0,5 | 34,8 | 14,8 | 47 |
| 2×10^6 | 4×10^7 | 0,05 | 7,7 | 2,9 | 53 |
| 2×10^6 | 4×10^8 | 0,005 | 5,5 | 1,9 | 50 |
| 2×10^6 | 8×10^8 | 0,0025 | 5,1 | 1,5 | 63 |

* Raza a : SER-19, q^+ , con un 17% de células q^-
 Raza α : AX-10, q^-

† Los resultados son la media de tres determinaciones

Tabla 17. - Variación en el valor de la supresividad de una raza q^- (α) cuando se incrementa artificialmente la proporción de células q^- (a), en las suspensiones de células q^+ (a) -obtenidas en medios con lactato- con las que se cruza. *

| Raza q^- (<u>α</u>) | Razas q^+ (<u>a</u>) | células q^- en los cultivos q^+ (%) | Supresividad (%) |
|---|--------------------------|---|------------------|
| AX-10 | SER-19 | 17 | 48 |
| " | " | 19,7 | 57,6 |
| " | " | 22,2 | 61,4 |
| " | " | 24,5 | 66,9 |
| " | " | 26,7 | 70 |
| " | F1.27 | 2 | 21 |
| " | " | 3,44 | 45 |
| " | " | 4,8 | 51,7 |
| " | " | 6,2 | 58,4 |
| " | " | 7,5 | 67 |

* Los resultados obtenidos son la media de tres determinaciones.

Tabla 18 .- Variación en el valor de la supresividad de una raza q^- (α) cuando se incrementa artificialmente la proporción $q^-(a)$ en las suspensiones de células $q^+(a)$ -obtenidas en medios con lactato- con las que se cruza . *

| Raza q^- (α) | Razas q^+ (a) | células q^- en los cultivos q^+ (%) | Supresividad (%) |
|-------------------------|-----------------|---|------------------|
| AX-10 | SER-19 | 3 | 0 |
| " | " | 19,1 | 21,6 |
| " | " | 30,7 | 32,2 |
| " | " | 39,3 | 50,6 |
| " | " | 46,1 | 64,7 |
| " | F1.27 | 2 | 1 |
| " | " | 13,8 | 2 |
| " | " | 22,4 | 43,4 |
| " | " | 29,4 | 49 |
| " | " | 35,3 | 58,3 |

* Los resultados son la media de tres determinaciones

dependientemente de la supresividad real de una determinada raza q^- , los valores de la misma calculados por la técnica ordinaria, deben presentar un error por exceso, mayor o menor según la proporción de células q^- presentes en cultivos estables de la raza q^+ , o lo que es lo mismo decir, según sea menor o mayor la estabilidad de la raza q^+ .

La fórmula de Sherman y Ephrusi (1962) tiene en cuenta este hecho y aplica el factor de corrección correspondiente, pero parte de la base de que la habilidad de cruce entre q^+xq^- y q^-xq^- es la misma. Dado que su aplicación dá los resultados tan discordantes antes expuestos, hubo que pensar que este supuesto de partida no es cierto, sino que dicha habilidad de cruce debe ser forzosamente distinta.

Para comprobar este extremo se llevaron a cabo una serie de cruces entre células q^+xq^+ ; q^+xq^- ; q^-xq^- ; y q^0xq^0 , en los

que se determinó el rendimiento en cigotos de los cruces frente al número máximo posible. El rendimiento en cigotos de las razas madre q^+ , Sb-2 y X-3 se tomó como unidad de referencia para calcular el índice de habilidad de cruce.

Los resultados obtenidos se expresan en la tabla 19, e indican que efectivamente la habilidad de cruce entre células $q^- \times q^-$, $q^- \times q^0$ y $q^0 \times q^0$ es superior a la de células $q^+ \times q^+$.

Tabla 19. - Estudio de la habilidad de cruce entre razas de levadura diferentes en relación con las características de su factor q . *

| Razas cruzadas | Nº células cruzadas | cigotos obtenidos sobre el nº máximo posible (%) | índice habilidad de cruce |
|--|----------------------------|--|---------------------------|
| $q^+(a) \times q^+(a)$ (Sb-2 x X-3) | $4.10^7 \times 3,8.10^7$ | 0,13 | 1 |
| $q^+(a) \times q^+(a)$ (Sb-3 x X-3) | $3,8.10^7 \times 3,8.10^7$ | 0,14 | 1,1 |
| $q^+(a) \times q^-(a)$ (Sb-3 x AX-10) | $3,8.10^7 \times 3,8.10^7$ | 1,3 | 9,9 |
| $q^+(a) \times q^-(a)$ (SER-19 x AX-10) | $4,8.10^7 \times 4.10^7$ | 0,59 | 4,5 |
| $q^-(a) \times q^-(a)$ (Sb-2p3 x AX-10) | $4.10^7 \times 3,8.10^7$ | 0,96 | 7,3 |
| $q^-(a) \times q^0(a)$ (Sb-2p3 x Xp-2) | $4.10^7 \times 4.10^7$ | 0,78 | 6 |
| $q^0(a) \times q^0(a)$ (Sb-2p1 x Xp-2) | $8.10^6 \times 4.10^7$ | 0,56 | 4,3 |

* Los resultados obtenidos son la media de tres determinaciones.

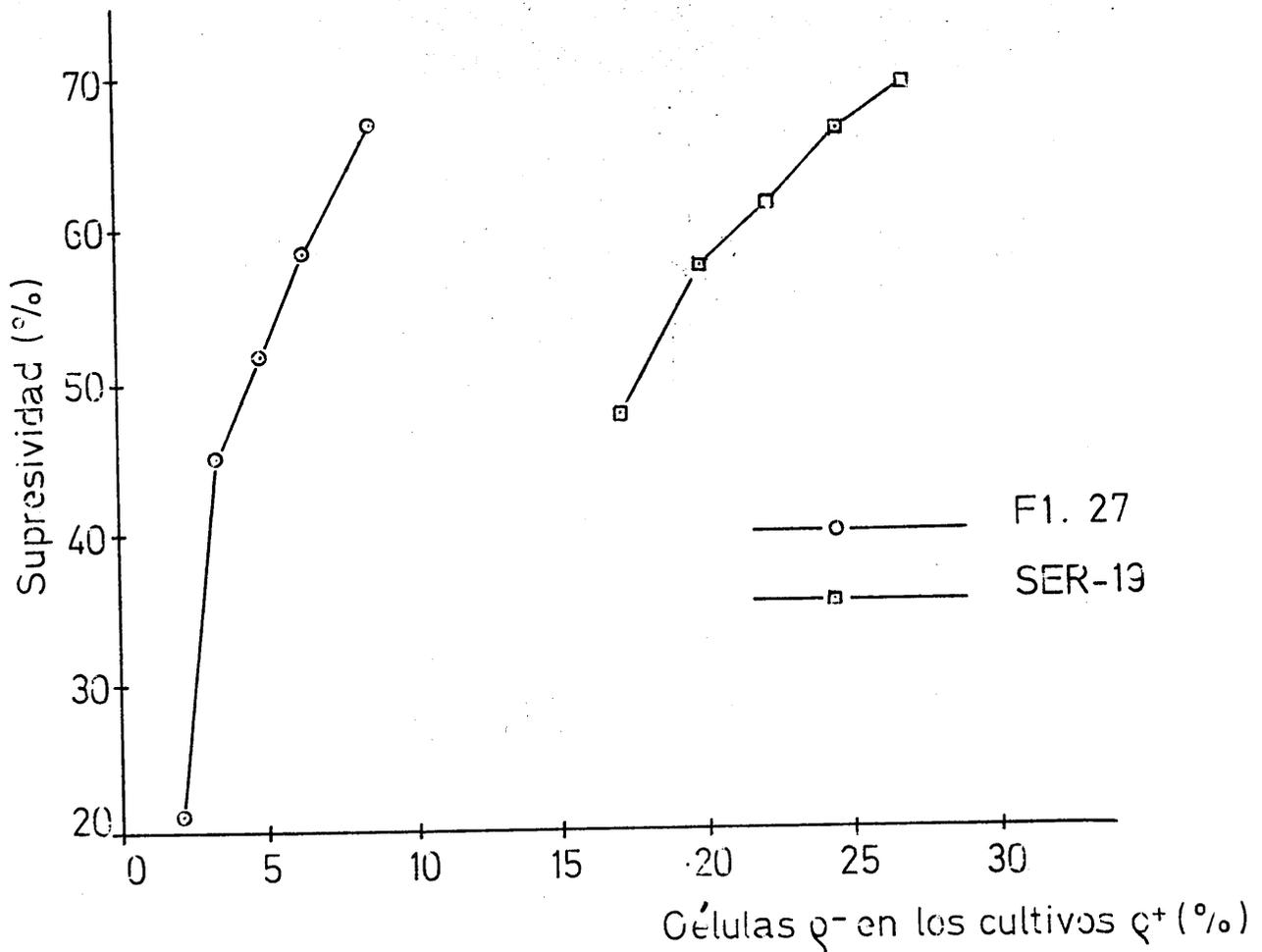


Figura. 1. -

Variación en el valor de la supresividad de una raza q⁻ (α) cuando se incrementa artificialmente la proporción de células q⁻ (a), en las suspensiones q⁺(a) -obtenidas en medios con lactato- con las que se cruza.

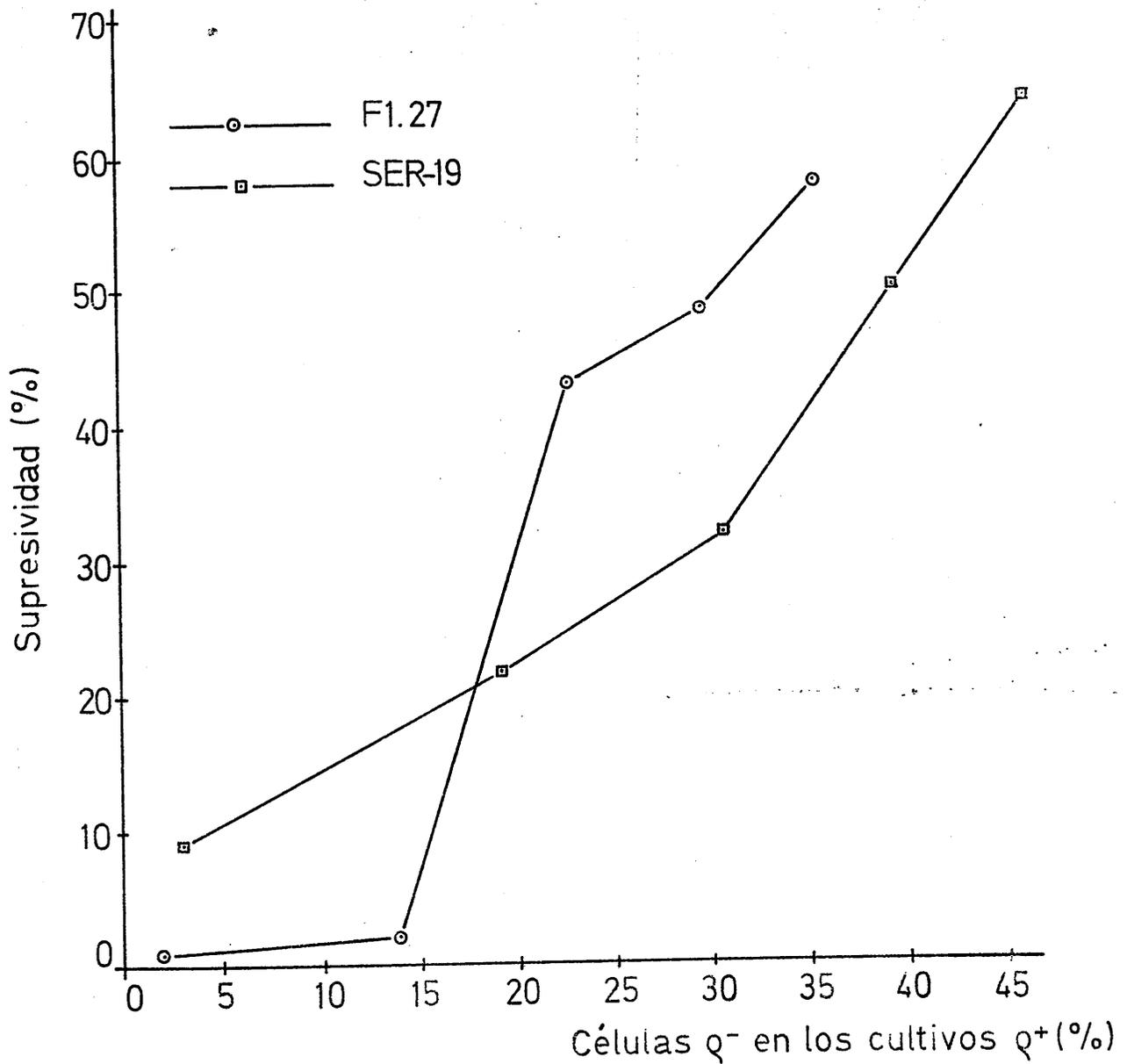


Figura. 2.-

Variación en el valor de la supresividad de una raza $q^-(a)$ cuando se incrementa artificialmente la proporción $q^-(a)$ en las suspensiones de células $q^+(a)$ -obtenidas en medios con lactato- con las que se cruza.

4. 6. -Efectos de sobrenadantes procedentes de cruces $q^+ \times q^-$ y $q^- \times q^-$ sobre el rendimiento en cigotos q^- de cruces $q^+ \times q^+$

Tal como se expondrá más detalladamente en la Discusión, se trató de establecer una fórmula que teniendo en cuenta la proporción de células q^- de los cultivos q^+ empleados en el cruce, así como la distinta habilidad de cruce entre células $q^+ \times q^+$ y $q^- \times q^-$, permitiera calcular la supresividad real de una raza q^- . Como podrá verse estos intentos fracasaron, por lo que hubo que pensar que aún considerando la supresividad frente a una determinada raza q^+ , en el valor de la misma deberían influir otros factores no controlados.

Entre estos factores se pensó que quizás pudieran influir factores solubles segregados en el momento del cruce por las células q^- que favoreciesen o inhibiesen cruces ulteriores entre $q^+ \times q^+$ ó $q^- \times q^-$.

Para comprobar si efectivamente existían estos factores se plantearon y llevaron a efecto una serie de experiencias encaminadas a poner de manifiesto si un cruce $q^+ \times q^+$ ó $q^+ \times q^-$, realizado en medio de conjugación en el que previamente se había realizado un cruce $q^+ \times q^-$ ó $q^- \times q^-$, presentaba un incremento en el número relativo de cigotos q^- .

La realización de estas experiencias, así como los resultados obtenidos, en detalle, fué como sigue:

a) Estudio del efecto de sobrenadantes procedentes de cruces $q^+ \times q^-$ y $q^- \times q^-$ sobre un cruce $q^+ \times q^+$.

Se realizaron en el primer caso cuatro cruces preliminares y en el segundo tres, recogiendo los sobrenadantes, después de transcurridas las cinco horas necesarias para los cruces, por centrifugación durante 20 minutos a 1.700 xg.

De estos sobrenadantes uno se sometió a calentamiento a 60°C durante 15 minutos, otro se filtró por Millipore (poro de 0,45 μ) y finalmente, otro se filtró por Millipore y posteriormente se calentó el mismo tiempo y a la misma temperatura.

Inmediatamente se procedió a realizar los cruces $q^+ \times q^+$ en estos sobrenadantes y en medio de conjugación fresco.

Las razas empleadas fueron:

para los cruces preliminares :

q^+ (a) : SER-19

q^- (a) : Sb-2p3

q^- (a) : AX-10

para los segundos cruces:

q^+ (a) : SER-19

q^+ (a) : X-3

Los resultados de estas experiencias se dan en las ta
blas 20 y 21.

Tabla 20 .- Efecto de sobrenadantes procedentes de cruces $q^+(a) \times q^-(a)$, sobre la eficacia de un cruce $q^+(a) \times q^-(a)$ y su rendimiento en cigotos q^- . *

| Medio en que se realiza el cruce $q^+(a) \times q^-(a)$ | Eficacia del cruce ($\%$) † | cigotos q^- (%) |
|--|-------------------------------|-------------------|
| Medio de conjugación fresco | 2,5 | 2 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación | 3,4 | 39 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación y calentado | 0,7 | 2,4 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación y filtrado | 1,9 | 5,2 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación, filtrado y calentado | 1,25 | 2,5 |

* Los resultados son la media de tres determinaciones

† La eficacia del cruce se expresa en $\%$ de cigotos totales frente al número máximo posible.

Tabla 21. - Efectos de sobrenadantes procedentes de cruces $q^-(a)$ \times $q^-(a)$ sobre la eficacia de un cruce $q^+(a) \times q^-(a)$ y su rendimiento en cigotos q^- . \times

| Medio en que se realizó el cruce $q^+(a) \times q^-(a)$ | Eficacia del cruce (% $_{\sigma}$) † | cigotos q^- (%) |
|---|---------------------------------------|-------------------|
| Medio de conjugación fresco | 2,5 | 2 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación | 5 | 11,8 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación y filtrado | 4,5 | 3,8 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación y calentado | 3,7 | 4,3 |

\times Los resultados son la media de tres determinaciones

† La eficacia del cruce se expresa en % $_{\sigma}$ de cigotos totales frente al número máximo posible.

b) También se estudió como se veía afectada la proporción de cigotos q^- en un cruce $q^+(a) \times q^-(a)$, cuando éste se realizaba en un sobrenadante procedente de un cruce $q^+(a) \times q^-(a)$.

Las experiencias al respecto se llevaron a cabo como en el apartado a), pero puesto que ya se había visto en esas experiencias que el someter el sobrenadante a calentamiento hacía desaparecer el efecto en estudio, se prescindió de esta variante.

Las razas empleadas fueron:
para los cruces preliminares:

$q^+(a)$: SER-19

$q^-(a)$: AX-10

para los segundos cruces:

$q^+(a) : \text{SER-19}$

$q^0(a) : \text{Xp-2}$

Los resultados se dan en la tabla 22

Tabla 22 .- Efectos de sobrenadantes procedentes de cruces $q^+(a) \times q^-(a)$ sobre la eficacia de un cruce $q^+(a) \times q^0(a)$ y su rendimiento en cigotos q^- . *

| Medio en que se realizó el cruce $q^+(a) \times q^0(a)$ | Eficacia del cruce (%) † | cigotos q^- (%) |
|---|--------------------------|-------------------|
| Medio de conjugación fresco | 4,5 | 27 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación | 4,5 | 48 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación y filtrado | 1,5 | 34 |

* Los resultados son la media de tres determinaciones.

† La eficacia del cruce se expresa en % de cigotos totales frente al número máximo posible.

c) A la vista de los resultados anteriores se pensó que el efecto que ejercían estos sobrenadantes podría deberse a alguna proteína, termolábil, sintetizada en ribosomas mitocondriales, o citoplasmáticos, durante el cruce preliminar.

Si esto era así, debería de haber un efecto inhibitorio en su síntesis cuando los cruces se realizaran en presencia de eritromicina o cicloheximida, respectivamente.

Con el fin de aclarar esta hipótesis se realizaron cruces $q^+(a) \times q^+(a)$ en sobrenadantes procedentes de cruces

q^+ (a) x q^- (α) efectuados en presencia de uno y otro antibióticos, a concentraciones, respectivamente, de 2 mg / ml y 20 ng / ml, y recogidos por centrifugación, sin ningún otro tratamiento.

Las razas empleadas, igual que en los tratamientos anteriores, fueron:

para los cruces preliminares:

q^+ (a) : SER-19

q^- (α) : AX-10

para los segundos :

q^+ (a) : SER-19

q^+ (α) : X-3

Los resultados se dan en la tabla 23.

En todos los cruces llevados a cabo en este capítulo se introdujo una modificación en el medio de conjugación, consistente en poner una concentración de glucosa del 1% en lugar del 5%, a fin de favorecer la centrifugación y filtración.

En todos los casos, en los que los segundos cruces se realizaron en sobrenadantes sin someter a filtración se llevaron a cabo controles del número de células a y α y de cigotos residuales en dichos sobrenadantes con el fin de evitar posibles errores, debidos a su presencia, en los resultados finales. Los resultados obtenidos, en todos los casos, indicaron que las células presentes no aportaban error apreciable.

Tabla 23. - Efecto de sobrenadantes procedentes de cruces q^+ (a) \times $q^-(\alpha)$, efectuados en presencia de antibióticos, sobre la eficacia de un cruce $q^+(a) \times q^+(\alpha)$ y su rendimiento en cigotos q^- . *

| Medio en que se realizó el cruce $q^+(a) \times q^+(\alpha)$ | Eficacia del cruce (% _o) † | cigotos q^- (%) |
|---|--|-------------------|
| Medio de conjugación fresco | 2, 5 | 2 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación | 3, 4 | 39 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación. Cruce realizado en presencia de eritromicina | 1, 3 | 7 |
| Sobrenadante recogido por centrifugación. Cruce realizado en presencia de cicloheximida | 1, 5 | 8, 5 |

* Los resultados obtenidos son la media de tres - determinaciones.

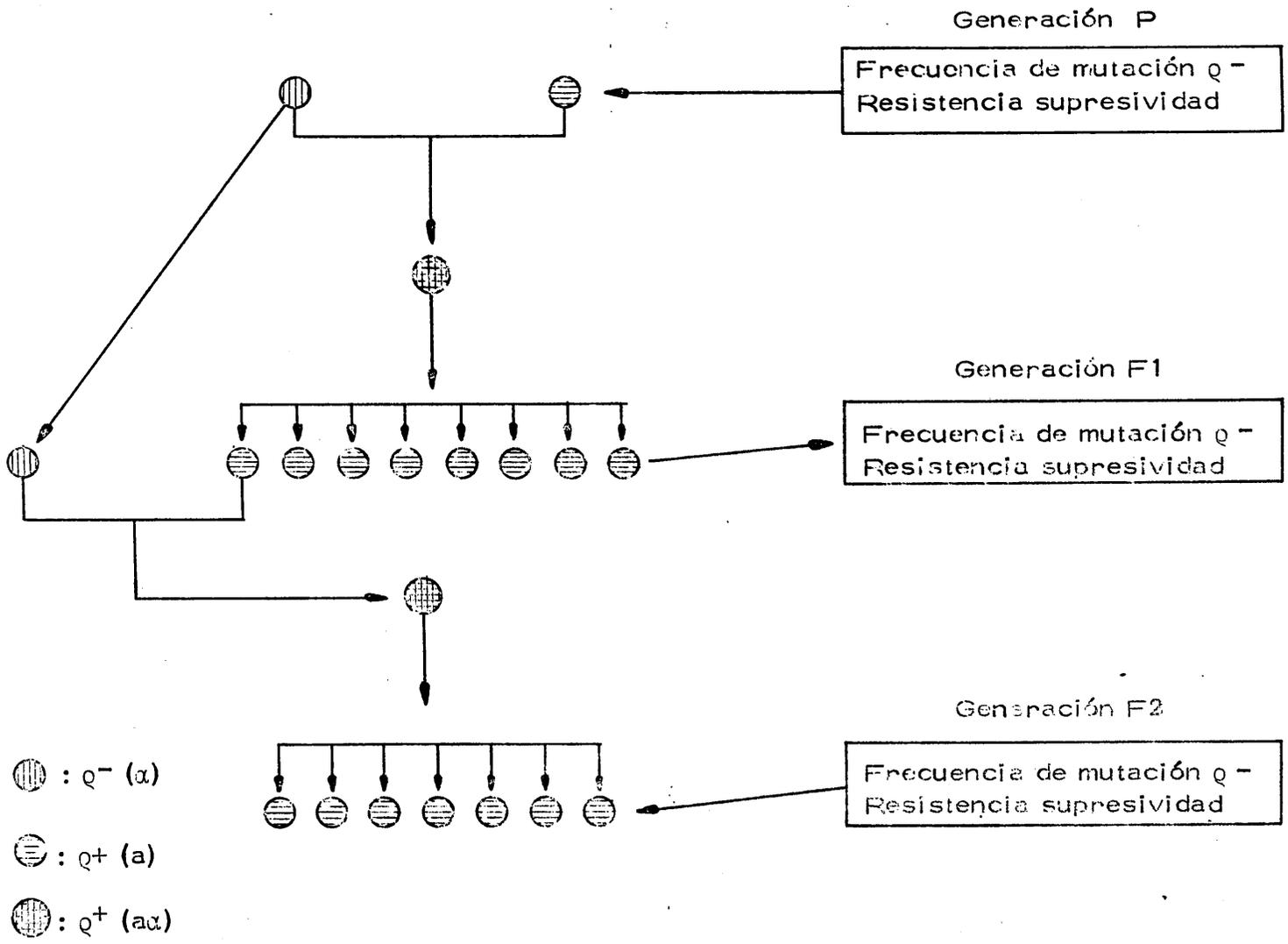
† La eficacia del cruce se expresa en %_o de cigotos totales frente al número máximo posible.

5. - COMPROTAMIENTO DE RAZAS HAPLOIDES q^+ PROCEDENTES DE CIGOTOS OBTENIDOS EN CRUCES DE RAZAS q^+ Y q^-

En estos estudios se comprobó si la progenie haploide de q^+ procedente de un cigoto obtenido a partir de una raza haploide q^+ y otra q^- conservaba las mismas características que la raza madre utilizada en el cruce, en lo referente a su estabilidad y a su comportamiento en cruces con la misma raza q^- .

En definitiva estas experiencias tuvieron por objeto determinar si los cigotos que habían conservado su carácter q^+ a pesar del poder supresor de la raza q^- utilizada en su obtención, transmitían a su progenie haploide una mayor capacidad de resistencia frente al poder supresor de la misma raza q^- , de una parte, y de otra una mayor estabilidad, entendiéndose por tal, como ya se ha dicho, la disminución de la frecuencia de la aparición de mutaciones q^- espontáneas.

La experiencia se planteó de acuerdo con el esquema 1, y como puede verse, se determinó la frecuencia de mutación q^- y la resistencia a la supresividad frente a la raza de origen q^- , de dos generaciones de razas haploides q^+ .



Esquema 1

Las razas haploides de partida fueron la AX-10 (q^- , α , tri₁, his₃) y la SER-19 (q^+ , a , ade₁, lis₂); esta última con una frecuencia de mutación espontánea a q^- de 64×10^{-3} y una resistencia a la supresividad de la raza AX-10 del 52%.

El cruce se realizó por el procedimiento ordinario, seleccionándose los cigotos q^+ prototrofos en medio ML. A partir de un cigoto escogido al azar se obtuvo el cultivo correspondiente que se hizo esporular de la forma acostumbrada para obtener una masa elevada de ascosporas.

Dado que para realizar la experiencia, de acuerdo con el esquema previsto, las razas haploides F₁ debían poseer las mismas características y el mismo sexo que la raza q^+ de partida, se llevó a cabo un proceso de selección que comprendió las siguientes etapas:

a) Diseminación directa de la suspensión de ascosporas en medio ML, ade⁺, lis[±].

b) Siembra de las razas procedentes de las colonias seleccionadas en medio MG, lis⁺, y MG, ade⁺. Se desecharon todas aquellas que mostraron crecimiento en los dos medios (prototrofas) o en uno de ellos (ade₁ y lis₂, respectivamente).

c) Cruce con la raza X₃ (α , tri₁, his₃) y diseminación en medio ML. Las razas que dieron lugar a cigotos prototrofos se seleccionaron definitivamente como q^+ , a , ade₁, lis₂.

En la experiencia que se describe se seleccionaron en la etapa a) 125 razas procedentes de otras tantas ascosporas, que se designaron como F1.1 a F1.125. De estas 125 razas sólo se seleccionaron 12 en la etapa b) como q^+ , ade₁, lis₂; y, finalmente, en la etapa c) se identificaron como q^+ , a , ade₁, lis₂, las designadas F1.1, F1.12, F1.14, F1.27, F1.28, F1.122, F1.123, F1.125.

A cada una de las razas citadas se le determinó la frecuencia de mutación espontánea por el método de Ogur

et al. (1959), así como el porcentaje de células con deficiencia respiratoria en cultivos estacionarios en medio NG.

Los resultados encontrados se expresan en la tabla 24 y muestran cómo, salvo en el caso de la raza F1.23, la estabilidad de las razas seleccionadas fué sensiblemente mayor que la de la raza madre SER-19.

Tabla 24 .- Estabilidad de las razas haploides q^+ , a, (generación F1), procedentes de cigotos obtenidos en un cruce $q^+(a) \times q^-(a)$ *

| Raza | Frecuencia de mutaciones q^- ($\times 10^3$) | células q^- en cultivos estacionarios en NG (%) |
|--------|--|---|
| SER-19 | 64 | 17% |
| F1.1 | 16 | 8% |
| F1.12 | 50 | 11% |
| F1.14 | 28 | 5% |
| F1.27 | 2 | 1% |
| F1.28 | 103 | 18% |
| F1.122 | 23 | 8% |
| F1.123 | 12 | 12% |
| F1.125 | 16 | 2% |

* Los resultados son la media de tres determinaciones

Igualmente se determinó la supresividad de la raza AX-10 frente a las ocho razas seleccionadas. Los resultados encontrados se expresan en la tabla 25 como resistencia a la supresividad y muestran que todas las razas, sin excepción, fueron más resistentes al poder supresor de la raza empleada que la raza madre SER-19.

Tabla 25 .- Resistencia de las razas haploides (generación F 1), procedentes de cigotos obtenidos en un cruce $q^+(a) \times q^-(a)$ a la supresividad de la raza AX-10 *
*

| Raza | Resistencia a la supresividad ** |
|--------|----------------------------------|
| SER-19 | 52% |
| F1.1 | 79% |
| F1.12 | 77% |
| F1.14 | 89% |
| F1.27 | 93% |
| F1.28 | 70% |
| F1.122 | 82% |
| F1.123 | 83% |
| F1.125 | 100% |

* Los resultados son la media de tres determinaciones.

** Resistencia a la supresividad : $100 - (S\% \text{ de la raza AX-10})$.

En la segunda etapa de la experiencia las razas de partida fueron la F1.27 (q^+ , a , \underline{ade}_1 , \underline{lis}_2) y la misma AX-10 (q^- , a , \underline{tri}_1 , \underline{his}_3) usada anteriormente. Los procedimientos empleados en la obtención y selección de las razas F2 (q^+ , a , \underline{ade}_1 , \underline{lis}_2) fueron los mismos descritos anteriormente; en este caso de 100 razas seleccionadas en la etapa a) sólo reunieron las condiciones requeridas siete de ellas; las designadas F2.33, F2.45, F2.46, F2.47, F2.60, F2.78, F2.79.

Como en el caso anterior a cada una de las razas citadas se le determinó la frecuencia de mutación y el porcentaje de células q^- en cultivos estacionarios, así como su resistencia al poder supresor de la raza madre AX-10.

Los resultados obtenidos se muestran respectivamente, en las tablas 26 y 27, e indican un notable y uniforme aumento de la estabilidad de las razas ensayadas, así como de su resistencia a la supresividad, con respecto a la raza madre.

Tabla 26. - Estabilidad de las razas haploides q^+ (a) (generación F2) procedentes de cigotos obtenidos en cruces q^+ (a) \times q^- (a). \times

| Raza | Frecuencia de mutación q^- ($\times 10^3$) | células q^- en cultivos estacionarios en NG (%) |
|--------|--|---|
| SER-19 | 64 | 17% |
| F1.27 | 2 | 0,6% |
| F2.33 | 10 | 7% |
| F2.45 | 8 | 3% |
| F2.46 | 6 | 3% |
| F2.47 | 5 | 3% |
| F2.60 | 2 | 1% |
| F2.78 | 5 | 3% |
| F2.79 | 2 | 3% |

\times Los resultados son la media de tres determinaciones.

Tabla 27. - Resistencia de las razas haploides (generación F2) procedentes de cigotos obtenidos en cruces q^+ (a) \times q^- (a) al poder supresor de la raza q^- AX-10 . \times

| Raza | Resistencia a la supresividad $\times \times$ |
|--------|--|
| SER-19 | 52% |
| F1.27 | 93% |
| F2.33 | 39% |
| F2.45 | 87% |
| F2.46 | 80% |
| F2.47 | 100% |
| F2.60 | 97% |
| F2.78 | 87% |
| F2.79 | 86% |

\times Los resultados son la media de tres determinaciones.

$\times \times$ Resistencia a la supresividad : $100 - \text{E}\%$ de la raza AX-10)

DISCUSION

En cada uno de los apartados en los que se describen las distintas experiencias realizadas, se ha incluido un breve comentario sobre la significación e interpretación de los resultados obtenidos en cada caso.

En este capítulo, por tanto, nos limitaremos a resumir parte de lo anteriormente dicho y ampliar la discusión sobre la significación de los resultados más importantes obtenidos.

A efectos de establecimiento de un orden, se discutirán por separado la posible significación de los resultados obtenidos en el transcurso de la inducción de mutantes q^- y q^0 , en el estudio del efecto de los tratamientos con antibióticos sobre la supresividad, en el de los factores que pueden influir en la misma y finalmente, en el significado biológico que puede atribuirse a la supresividad.

Inducción de mutantes q^- y q^0

De acuerdo con los antecedentes bibliográficos, las experiencias realizadas en este trabajo han confirmado la eficacia de los derivados de acridina y del bromuro de etidio para la inducción de mutantes "petites" citoplasmáticos. Ha podido comprobarse, como ya había sido demostrado por varios autores, que los tratamientos con bromuro de etidio de cultivos q^+ inducen la aparición de un 100% de mutantes q^- . Ahora bien, en las razas ensayadas en este trabajo no se ha conseguido en ningún caso que los tratamientos prolongados a altas concentraciones con este agente mutagénico den lugar a mutantes neutros, designados en la bibliografía, como ya ha sido expuesto, como q^0 ó carentes de ADN-M (Goldring et al, -- 1970; Michaelis, 1971; Nagley y Linnane, 1972).

Este hecho es fácilmente explicable teniendo en cuenta de una parte que las razas q^+ empleadas por nosotros presentan un porcentaje relativamente alto de mutantes q^- espontáneos en sus cultivos en equilibrio, y de otra que, como ha sido perfectamente demostrado en este trabajo, en contra de lo afirmado por Nagley y Linnane (1972), que los mutantes q^- supresores son resistentes a la --

acción del bromuro de etidio.

Por consiguiente, al tratar un cultivo q^+ con este agente mutágeno solamente pasarían a q^0 las células q^+ , pero no aquellas que hubiesen mutado previamente de forma espontánea a q^- .

El mecanismo de la resistencia al bromuro de etidio de los mutantes q^- no es posible interpretarlo adecuadamente con los datos que se poseen. No obstante, en nuestra opinión, sólo caben dos alternativas: o bien que las modificaciones estructurales introducidas en el ADN-M por la mutación espontánea impiden o dificultan la intercalación en el mismo de este agente mutagénico, o bien que una vez establecida la supresividad, el ADN-M respcnsable de la misma puede ser regenerado a partir de una copia maestra (Luha et al, 1971 ; Whitaker y Wright, 1972; Whitaker et al 1972) a la que no alcanza la acción del bromuro de etidio. Una tercera posibilidad a considerar, aunque poco probable, sería que los mutantes q^- posean una permeabilidad alterada que no permita que el bromuro de etidio se ponga en contacto con el ADN-M .

En relación con los derivados de acridina los resultados obtenidos no han hecho sino confirmar lo ya encontrado por -- otros autores, por lo que no insistiremos sobre la acción de estos agentes.

Lo mismo cabe decir de los mutantes espontáneos, entre los que como era de esperar se han encontrado mutantes supresores y neutros, sin que aparezca ninguna tendencia determinada en uno u otro sentido.

En cuanto al empleo de antibióticos que inhiben la síntésis de proteínas mitocondriales, las experiencias realizadas para la obtención de mutantes q^0 indican que, al menos en las razas ensayadas en este trabajo, la acción prolongada de estos agentes sobre las razas q^+ no llevan como consecuencia la obtención de un 100% de mutantes " petites" y de otra parte que los mutantes obtenidos no son todos ellos de tipo neutro. Esto nos lleva a concluir que la hipótesis de Wilkie y colaboradores, que supone la existencia de una proteína sintetizada en ribosomas mitocondriales que controlaría la iniciación de la replicación del ADN-M, no puede ser admitida, al menos desde

un punto de vista general.

Tratamientos con antibioticos y supresividad

Como se expuso en la introducción, uno de los objetivos de este trabajo era examinar la posibilidad de que la inhibición de la replicación del ADN-M aportado por las razas q^+ fuese ocasionada por factores difusibles de tipo proteínico sintetizados en los ribosomas mitocondriales de la raza q^- .

Las experiencias realizadas en las que la raza q^- se sometió a tratamientos con eritromicina y cloromicetina antes y durante el cruce, indican que los citados tratamientos no afectan de manera apreciable la supresividad de las razas q^- ensayadas.

El mismo tipo de tratamiento, esta vez sobre la raza q^+ con la que se cruza la q^- , tampoco dió los resultados esperados, ya que aún cuando en el caso de tratamientos prolongados con eritromicina el valor de la supresividad aumentó con respecto a los testigos aproximadamente en un 20%, ello fue acompañado por un aumento de un 50% en el porcentaje de mutantes q^- presentes en los cultivos q^+ tratados, lo que como veremos a continuación afecta enormemente el valor de la supresividad de una raza q^- .

Los tratamientos con cicloheximida de las razas q^- empleadas tampoco afecta la supresividad de las mismas.

Hay que concluir, por tanto, que en la interferencia entre el ADN-M supresor y el de tipo silvestre no intervienen factores difusibles de tipo proteínico cuya síntesis esté condicionada por el ADN-M supresor, así como que tampoco influyen proteínas mitocondriales sintetizadas por las células q^+ que pudieran afectar la replicación del ADN-M silvestre y no del alterado.

En consecuencia creemos que debe ser aceptada la explicación de que la supresividad está condicionada por la existencia en los mutantes q^- de una cantidad mucho mayor de ADN-M alterado; cuya velocidad de replicación es mayor que la del ADN-M silvestre.

Esto, como ya se indicó en la introducción, llevaría rápidamente a la eliminación del ADN-M silvestre por un simple proceso de dilución.

Factores que afectan la supresividad de mutantes q^- ensayados

Una consecuencia inesperada de los resultados obtenidos en la determinación del valor de la supresividad de las razas q^- mediante la aplicación de la fórmula de Sherman y Ephrussi (1962) ha sido el hecho, perfectamente demostrado, de que dicho valor no es constante para una determinada raza q^- , sino que varía, en ocasiones enormemente, de acuerdo con la naturaleza de la raza q^+ con la que se cruza y de las condiciones fisiológicas de la misma.

Lo primero puede ya apreciarse en los resultados expuestos en la tabla 14, pero se demuestra de manera rotunda y sin lugar a dudas observando los resultados de las tablas 25 y 27. En estas tablas puede verse como la raza AX-10 que frente a la raza q^+ SER-19 presenta una supresividad del 48%, es decir se comporta como una raza de supresividad media, pasa a comportarse como un mutante q^- neutro cuando se cruza con las razas F1.125 y F2.47 obtenidas a partir de la primera. Esto en dos casos extremos, en los restantes, si bien no se comporta como una raza neutra, su supresividad se muestra en todos los casos muy disminuída.

También ha podido ser demostrado que el estado fisiológico de las razas q^+ influye de manera decisiva en la supresividad de una determinada raza q^- . Basta considerar el hecho de que simplemente mediante la sustitución de glucosa por lactato en el medio de cultivo de las razas q^+ con las que se cruza, la supresividad de la raza AX-10, como puede observarse en la tabla 15, experimenta disminuciones en su supresividad entre un 62 a un 95%, según el tipo de raza q^+ empleada.

Así pues, creemos que la supresividad de una determinada raza q^- no puede seguir siendo coniderada por más tiem

po como un carácter específico y constante de la misma, sino que puede aumentar o disminuir, hasta llegar a anularse, dependiendo de la naturaleza de la raza q^+ empleada para la valoración de dicha propiedad.

Si esta interpretación es correcta, es evidente - que todos los datos sobre supresividad aparecidos hasta el momento en los trabajos relacionados con el tema, tiene un valor muy aleatorio, como así mismo las clasificaciones de altamente supresoras y neutras en las que se han incluido las distintas - mutaciones q^- ensayadas.

Otro de los factores que influye decisivamente sobre lo que hasta ahora se ha venido considerando como supresividad de una raza q^- , y que como es lógico va unido expresamente al tipo de raza q^+ empleada y al estado fisiológico de la misma, es la proporción de mutantes espontáneos q^- que existan en los cultivos en el momento de efectuarse el cruce. Aún cuando no existe una correlación definida, puede verse sin lugar a duda, que a medida que aumenta la proporción de dichos mutantes en los cultivos q^+ , el valor de la supresividad, calculado por la fórmula de Sherman y Ephrussi, sufre un incremento considerable, de hasta más de 50 veces como es el caso de la raza AX-10 en cruce con la F1.27 cultivada en lactato.

Este hecho, junto con la observación de que la habilidad de cruce de células q^+xq^+ , q^+xq^- , q^-xq^- , q^-xq^0 , q^0xq^0 , varía apreciablemente de unas a otras hace que, independientemente de la raza q^+ empleada y de sus condiciones fisiológicas, la fórmula anteriormente citada sea totalmente inadecuada para calcular la supresividad de una raza q^- .

En un esfuerzo para encontrar un medio de calcular la supresividad real de una determinada raza q^- frente a otra - determinada raza q^+ hemos intentado encontrar una fórmula que tomando en consideración no sólo la proporción de mutantes q^- presentes en los cultivos q^+ sino también la distinta habilidad - de cruce de q^+xq^- y de q^-xq^- , sustituyera a la ya citada de Sherman y Ephrussi.

Para ello se hizo el siguiente planteamiento:

Sea m la proporción de células q^- (tanto por uno) presentes en el cultivo q^+ ; $(1-m)$ será la proporción de células q^+ presentes en dicho cultivo, también en tanto por uno.

Suponiendo un exceso de células q^- a las que se pretende calcular la supresividad, el número de cigotos q^+ producidos será:

$$(1-m) (1-s) p,$$

donde s será la supresividad de la raza q^- y p un factor que expresa la habilidad de cruce entre $q^+ \times q^-$.

El número de cigotos q^- será igual a los producidos como consecuencia de la supresividad de la raza q^- :

$$(1-m) sp,$$

más los que se producen como consecuencia de los cruces $q^- \times q^-$:

$$qm$$

donde q sería un factor que expresara la habilidad de cruce entre $q^- \times q^-$.

El número total de cigotos N será:

$$N = (1-m) (1-s) p + (1-m) sp + qm = (1-m) p + qm.$$

De ahí que el número relativo de cigotos q^- , n , obtenidos en dicho cruce sería :

$$n = \frac{(1-m) sp + qm}{(1-m) p + qm}$$

Despejando de esta fórmula s , que sería el valor de la supresividad como ya se ha dicho (expresada también en tanto por uno), se encuentra:

$$s = n - \frac{q}{p} m (1-n) / (1-m),$$

fórmula, en la que llamando $f = q/p$, quedaría finalmente reducida a la expresión siguiente :

$$s = n - f \frac{m(1-n)}{(1-m)}$$

Tanto n como m pueden ser fácilmente determinados por las técnicas oportunas. En cuanto a f , debe ser teóricamente una constante, al igual que s , por lo que podrían ser fácilmente determinados midiendo n y m en cruces en los que se altere este último valor de forma artificial.

Aplicando sin embargo esta fórmula a los resultados expuestos en las tablas 17 y 18 se encontró que al calcular éste entre distintos pares de valores para m y n , los valores de este factor no fueron constantes, lo que indica que la fórmula propuesta tampoco es adecuada para el cálculo de la supresividad de una raza q^- . Posiblemente esto se debe a que en la citada fórmula se ha considerado como constante la habilidad de cruce entre q^+xq^- y q^-xq^- , cosa que de acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado 4.6 es probable que no sea cierta.

Efectivamente, en dicho apartado, los resultados obtenidos parecen indicar que en los cruces q^+xq^- , q^-xq^- y q^+xq^0 , se producen algunos factores solubles, cuya producción se inhibe tanto por antibióticos que actúan sobre ribosomas citoplasmáticos como mitocondriales, y que incrementan notablemente la habilidad de cruce q^-xq^- y como consecuencia el porcentaje de cigotos q^- en cruces en que intervengan células q^+xq^- .

Es posible, no obstante, que la fórmula sea válida considerando que f sea a su vez variable, en función de los efectos producidos por los citados factores solubles.

Ahora bien, dado que por el momento carecemos de datos sobre la naturaleza, producción y modo de acción de los citados factores, es imposible llegar a una expresión matemática que dé la supresividad teniendo en cuenta todos los factores citados.

En definitiva, y en relación con este apartado, la conclusión a la que se llega es totalmente de tipo negativo, no ya sólo porque nuestros resultados invaliden gran parte de lo escrito sobre supresividad, sino también porque es necesario admitir

que por el momento es imposible calcular la supresividad real de una raza q^- .

Significación biológica

Con las limitaciones expuestas en el apartado anterior, la supresividad de los mutantes q^- es una propiedad de los mismos que tiende a disminuir el número de cigotos q^+ producidos en un cruce $q^+ \times q^-$ así como la proporción de progenie q^+ haploide que se derive de los cigotos que hayan superado la supresividad.

Tal como quedó expuesto en la introducción, es evidente que los mutantes q^- , tanto haploides como diploides, están mucho menos capacitados, debido a sus deficiencias respiratorias, para desarrollarse en los medios naturales e incluso para perpetuar la especie, ya que los diploides q^- son incapaces de esporular.

Aparentemente, por tanto, la supresividad es una propiedad que va en detrimento de la especie, por lo que resulta extraño que este mecanismo no haya sido eliminado en el transcurso del proceso evolutivo.

Los resultados que hemos obtenido al estudiar el comportamiento de razas haploides q^+ procedentes de cigotos obtenidos en cruces $q^+ \times q^-$ supresoras, nos han llevado, sin embargo, a la conclusión de que la supresividad no solamente no juega un papel negativo en relación con la conservación de la especie, sino que por el contrario puede considerarse como un método altamente eficaz que poseen las razas de Saccharomyces cerevisiae para mantener al máximo su capacidad respiratoria y de supervivencia.

Efectivamente, en el apartado citado, puede verse que todos los clones pertenecientes a la generación F1, haploide, seleccionados a partir de ascosporas procedentes de un -

cigoto obtenido en un cruce de la raza SER-19 con la AX-10 presentan, de una parte, una frecuencia de mutación q^- apreciablemente menor que la raza madre q^+ y que de otra cuando se cruzan con la raza AX-10, la supresividad de esta última es mucho menor que la que muestra frente a la citada raza - madre SER-19.

Esto indica, en nuestra opinión, que la supresividad de la raza AX-10 ha impedido la formación de cigotos q^+ a partir de todas aquellas células cuyas mitocondrias son débiles o pierden con frecuencia su carácter q^+ , por lo que sólo aparecen cigotos q^+ a partir de células estables y competentes desde el punto de vista respiratorio. Como estas características van adscritas al ADN-M de la célula q^+ , si éste es capaz de superar la interferencia del q^- es lógico que los resultados encontrados sean los descritos, ya que mediante un mecanismo de herencia citoplasmática estos caracteres del ADN-M se transmitirán a la progenie haploide.

Si esta interpretación es correcta, el fenómeno observado en los citados resultados se debería reforzar con la descendencia haploide de los cigotos obtenidos en un cruce entre la misma raza supresora y una de las razas pertenecientes a la generación F1, que ha visto ya aumentada su estabilidad y su resistencia a la supresividad.

Como ha sido expuesto, los resultados obtenidos en esta segunda experiencia confirmaron totalmente lo anteriormente dicho, ya que los clones haploides de la generación F2 seleccionados mostraron todos ellos una estabilidad todavía mayor que los correspondientes a la generación F1 e, igualmente, la supresividad de la raza AX-10 frente a ellos fué también menor.

Si tenemos en cuenta, como se ha repetido varias veces, que las razas diploides q^- son incapaces de esporular y que es muy frecuente que en su habitat natural se den condiciones ambientales que hacen imposible la reproducción vegetativa se llega fácilmente a la conclusión de que la supresividad,

en definitiva, lo que hace es eliminar de la naturaleza todas aquellas razas ρ^+ inestables, ó, lo que es lo mismo decir, con una capacidad o suficiencia respiratoria limitada, ocasionada por la presencia en su citoplasma de una población mezclada de mitocondrias ρ^+ y ρ^- .

Aún cuando no se ha llegado a incluir en este trabajo, experiencias en curso en nuestro laboratorio han demostrado que la estabilidad de las razas ρ^+ se transmite por un mecanismo de herencia citoplasmática, lo que confirma que el papel de la supresividad es el de permitir solamente la transmisión de aquellos ADN-M que aseguran una suficiencia respiratoria máxima.

CONCLUSIONES

- 1^a. - De las observaciones realizadas en los procesos de obtención de mutantes q^- supresores y neutros mediante tratamientos con diversos agentes químicos, se concluye lo siguiente:
- a) Las razas q^- ensayadas no pierden su poder supresor por tratamientos prolongados con bromuro de etidio, lo que indica que el ADN-M alterado de las mismas es resistente a la acción del citado agente mutagénico.
Los datos de que se dispone no permiten una interpretación adecuada de la naturaleza de esta resistencia.
 - b) Los tratamientos prolongados con eritromicina indican, en contra de lo que ha sido postulado por varios autores, que la replicación del ADN-M no es controlada por ninguna proteína iniciadora sintetizada en ribosomas mitocondriales.
- 2^a. - Los tratamientos con eritromicina y cloromicetina demuestran que la supresividad no depende de la síntesis de proteínas mitocondriales en las razas q^- que interfieren la replicación del ADN-mitocondrial aportado por la raza q^+ .
- 3^a. - Igualmente, también se descarta la posibilidad de que la supresividad esté influenciada por proteínas sintetizadas en ribosomas citoplasmáticos de las razas q^- .
- 4^a. - Se acepta, por tanto, que la supresividad se debe a la existencia en q^- de una cantidad mucho mayor de unidades de ADN-mitocondrial alterado, de menor tamaño que en q^+ , lo que da lugar a que a partir de los cigotos la probabilidad de que se segregen células diploides dotadas exclusivamente de ADN-mitocondrial q^- se incremente notablemente.

5^a. - La supresividad de una determinada raza q^- muestra valores distintos cuando se determina frente a diferentes razas q^+ e incluso frente a una determinada, según las condiciones fisiológicas de la misma.

6^a. - Igualmente, se ha llegado a la conclusión de que la supresividad de una determinada raza q^- muestra valores muy distintos según sea el porcentaje de mutantes espontáneos q^- de los cultivos q^+ .

Esta variación se interpreta como una consecuencia de la distinta habilidad de cruce entre células $q^- \times q^-$ de una parte y $q^+ \times q^-$ de otra; habilidad que a su vez parece estar influenciada por factores solubles de tipo proteínico que se producen en el momento de los cruces $q^+ \times q^-$ y $q^- \times q^-$.

7^a. - Se considera, por tanto, que todos los datos consignados en la copiosa bibliografía existente sobre la supresividad de distintos tipos de razas q^- sólo tiene un valor comparativo y eso siempre y cuando las determinaciones hayan sido realizadas frente a una misma raza q^+ y en condiciones perfectamente fijadas.

8^a. - Se llega por último a la conclusión de que el papel biológico de la supresividad en S. cerevisiae consiste en mantener la capacidad respiratoria de la especie mediante la eliminación de aquellas razas inestables que segregan mutaciones q^- con una alta frecuencia.

BIBLIOGRAFIA

- ARAKATSU, Y. 1972. "Action of acriflavine on the growth and mutation yeast". *Mutation Res.* 14, 165-184.
- ARCA, M., CANEVA, R., FRONTALI, L. e TECCE, G. 1971. "Mutazione piccola colonia del lievito ed azione delle acridine sulla DNA". *Lincei-Rend, Sc. Fis. Mat. e Nat.* 51, 579-586.
- ARIAS DE SAAVEDRA, J.M., 1974. "Regulación de la citrato sintasa en levadura". Tesis Doctorales de la Universidad de Granada, 45.
- AVERS, C. J., PFEFFER, C. R. and RANCOURT, M. W. 1965. "Acriflavine induction of different kinds of "petite" mitochondrial populations in Saccharomyces cerevisiae". *J. Bacteriol.* 90, 481-494.
- BERNARDI, G., CARNEVALI, F., NICOLAIEFF, A., PIPERNO, G. and TECCE, G. 1968. "Separation and characterization of a satellite DNA from a yeast cytoplasmic petite mutant". *J. Mol. Biol.* 37, 493-505.
- BERNARDI, G., PIPERNO, G. and FONTY, G. 1972. "The mitochondrial genome of wild-type yeast cells. I. Preparation and heterogeneity of mitochondrial DNA". *J. Mol. Biol.* 65, 173-189.
- BORST, P., KROON, A. M. 1969. "Mitochondrial DNA. Physicochemical properties, replication and genetic function". *Int. Rev. Cytol.* 26, 107-190.
- BULDER, C. J. E. A. 1964a. "Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeast". *A. van Leeuwenhoek*, 30, 1-9.
- BULDER, C. J. E. A. 1964b. Lethality of the petite mutation in

- petite negative yeast". A. van Leeuwenhoek, 30, 442-454.
- BUTOW, R. A., WEISLOGEL, P. O. and CADERBAUM, A. : 1971. Cold sensitive mutants in yeast defective in mitochondrial function". Fed. Proc. 30, 1225.
- CALLAO, V. y MONTOYA, E. 1960. "Actividad catalasa de mutantes de Saccharomyces cerevisiae con deficiencia respiratoria". Laboratorio, agosto, 101-106.
- CARNEVALI, F., MORPURGO, G. and TECCE, G. 1966. "Density changes of cytoplasmic DNA from petite mutants of Saccharomyces cerevisiae and a hypothesis on the mechanism of mutation". -- Gior. Bot. Ital. 102, 231-237.
- CARNEVALI, F., MORPURGO, G. and TECCE, G. 1969. "Cytoplasmic DNA from petite colonies of Saccharomyces cerevisiae; a hypothesis on the nature of the mutation". Science 163, 1331-1333.
- CLARK -WALKER, G. D. 1972. "Isolation of circular DNA from a mitochondrial fraction from yeast". Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69, 388-392.
- CLARK -WALKER, G. D. 1973. "Size distribution of circular DNA from petite-mutant yeast lacking ρ DNA". Europ. J. Biochem. 32, 263-267.
- CLARK- WALKER, G. D. y LINNANE, A. W. 1966. "In vivo differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics". Biochem. and Biophys. Res. Comm. 25, 8-13.
- COEN, D. , DEUTSCH, J., NETTER, P., PETROCHILLO, E. and SLONIMSKI, P. P. 1970. "Mitochondrial

- genetics . I. Methodology and phenomenology ".
En "Control of organelle developement". Soc.
Exp. Biol. Symp. 24, ed. P.L. Miller, New
York Academic 524 pp. 449-496.
- CORNEO, G. , MOORE, C. , SANADI, D. R. , GROSSMAN, L. I.
and MARMUR, J. 1969. "Mitochondrial DNA
in yeast and some mammalian species". S-
cience 151, 687-689.
- CHEN, S. J. , EPHRUSSI, B. and HOTTINGER, H. 1950. "Na-
ture genetique des mutants a deficiencie res-
piratoire de la souche B-11 de la levure de
boulangerie". Heredity 4, 337-351.
- EPHRUSSI, B. 1953. "nucleo-cytoplasmic relations in micro-
organism". Clarendon Press. Oxford, England.
- EPHRUSSI, B. , GRANDCHAMP, S. 1965. "Etudes sur la su-
pressivité des mutants à deficiencie respira-
toire de la levure. I. Existence au cellulaire -
de divers " degrés des suppressivité". Here-
dity, 20, 1-7.
- EPHRUSSI, B. , HOTTINGUER, H. 1951. "Cytoplasmic cons-
tituents of heredity. On an unstable cell state
in yeast". Cold. Spring Harbor Symp. Quant.
Biol. 16, 75-84
- EPHRUSSI, B. , HOTTINGUER, H. et CHIMENES, A.M. 1949a
" Action de l'acriflavine sur les levures. I. La
mutation " petites colonie ". Ann. Inst. Pasteur
76, 351-367.
- EPHRUSSI, B. , HOTTINGUER, H. et TAVLITZKI, J. 1949b.
" Action de l'acriflavine sur les levures. II. E-
tude genetique du mutant "petite colonie". Ann.
Inst. Pasteur, 76, 419-450.

- EPHRUSSI, B., L'HERITIER, PH. et HOTTINGUER, H. 1949c
"Action de l'acri flavine sur les levures .IV. A-
nalyse quantitative de la transformation des po-
pulations ". Ann. Inst. Pasteur 76, 64-83.
- EPHRUSSI, B., JACOB, H. et GRANDCHAMP, S. 1966. "Etu-
des sur la suppressivité des mutants a deficien-
ce respiratoire de la levure. II. Etapes de la mu-
tation grande en petite provoquée par le facteur
suppressif ". Genetics 54, 1-29.
- EPHRUSSI, B. MARGERIE-HOTTINGUER, H. et ROMAN, H. -
1954. "Sur le comportement genetique des mu-
tants à déficience respiratoire de la levure".
8ème. Congrès Int. Bot. 111-120.
- EPHRUSSI, B., MARGERIE-HOTTINGUER, H. et ROMAN, H.
1955. "Suppressiveness: a new factor in the ge-
netic determinism of the synthesis of respirato-
ry enzymes in yeast ". Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.
41, 1065-1071.
- FOWELL, R. R. 1969a. " Sporulation and hybridization of --
yeast", en " The yeasts ". ed. A. H. Rose and
J. S. Harrison. Academic Press. New York, -
1969. Vol. 1. pp. 303-376
- FOWELL, R. R. 1969b. en " The Yeasts " ed. A. H. Rose and
J. S. Harrison. Academic Press. New York. -
1969. Vol 1, p. 358.
- FOWELL, R. R. 1969c. en " The Yeasts " ed. A. H. Rose and
J. S. Harrison. Academic Press. New York, -
1969. Vol 1, p. 375.
- GAUSE, G. F., KOCHETKOVA, G. V. and VLADIMIROVA, G. B.
1957. " On the biochemical mutant of yeast with
impaired respiration ". Doklady Akad. Nauk. S.
S. S. R. 117, 138-141.

- GOLDRING, E. S., GROSSMAN, L. I., KRUPNIK, D., CRYER, D. R. and MARMUR, J. 1970a. "The ethidium bromide (E. B.) induced breakdown of yeast mitochondrial DNA (mDNA) during induction of petites". *Fed. Proc.* 29, 2710.
- GOLDRING, E. S., GROSSMAN, L. I., KRUPNIK, D., KRYER, D. R. and MARMUR, J. 1970b. "The petite mutation in yeast : loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide". *J. Mol. Biol.* 52, 323-335.
- HAEFNER, K. 1965. En "The Yeasts" ed. A. H. Rose and J. S. Harrison .Academic Press. New York, 1969. Vol 1, p. 375.
- HOLLEMBERG, C. P. 1971. "The yeast "petite" mutant RD1A: report of its properties and genesis " *Phys. Veget.* 9, 333.
- HOLLEMBERG, C. P., BORST, P. and BRUGGEN, E. F. van, 1972. "Mitochondrial DNA from cytoplasmic petite mutants of yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 277, 35-43.
- IGUCHI, S. and ONOBU, T. 1964. "Conjugation in Saccharomyces cerevisiae". *Botan. Mag.* 77, 181-190.
- LACHOWICZ, T. M., KOTILAK, Z.; KOLODINSKI, J. and SNIEGOCKA, Z. 1969. "New types of respiratory deficient mutants in Saccharomyces cerevisiae. II. Physiology and genetics of a series of segregational mutants induced by ultraviolet irradiation or nitrous acid treatment". - *Archi. Imm. et Thera. Exp.* 17, 72-85.
- LERMAN, L. S. 1961. "Structural considerations on interaction of deoxyribonucleic acid and acridines". *J. Mol. Biol.* 3, 18-30.
- LINDEGREN, C. C. 1956. "Mutation and other variations in microorganisms. " *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol.* 26, 256-271.

- LINDEGREN, C. C., NAGAI, S. and NAGAI, H. 1958. "Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel". *Nature* 182, 446-449.
- LINNANE, A. W., SAUNDERS, G. W., GINGOLD, E. B. and LUKINS, H. B. 1968. "The biogenesis of mitochondria. V. Cytoplasmic inheritance of erythromycin resistance in Saccharomyces cerevisiae". *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 59, 903-910.
- LUHA, A. A., SARCOE, L. E., WHITTAKER, P. A. 1971. "Biosynthesis of yeast mitochondria. Drugs effects on the petite negative yeast Klyveromyces lactis". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 24, 56-61.
- MARCOVICH, H. 1953. "Rapports entre la structure des acridines et leur activité en tant qu'agents inducteurs des mutants respiratoires chez la levure". *Ann. Inst. Pasteur* 85, 199-216.
- MEHROTRA, B. D., MAHLER, H. R. 1968. "Characterization of some unusual DNA's from certain "petite" strains Saccharomyces cerevisiae". *Arch. Biophys.* 128, 695-703.
- MICHAELIS, G., DOUGLAS, S., TSAI, M. J., CRIDDLE, R. S., 1971 "Mitochondrial DNA suppressiveness of petite mutants in Saccharomyces cerevisiae". *Biochem. Genetics* 5, 487-495.
- MOAT, A. G., PETERS, N., Jr. and SBR, A. M. 1959. "Selection and isolation of auxotrophic yeast mutants with the aid of antibiotics". *J. Bacteriol.* 77, 673-677.
- MOUNOLOU, J. C. 1967. "Molecular nature of hereditary cytoplasmic factors affecting gene expression in mitochondria" En "The control of nuclear activity" ed. L. Goldstein. Englewood Cliffs: Prentice-Hall. pp. 413-431.
- MOUNOLOU, J. C., JACOB, H., SLONIMSKI, P. P. 1966. "Mitochon-

- drial DNA from yeast "petite" mutants: specific changes of buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations". *Biochem. Biophys. Res. Comm* 24, 218-224.
- MOUSTACHI, E. and WILLIAMSON, D. H. 1966. "Physiological variations in satellite components of yeast DNA detected by density gradient centrifugation". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23, 56-61.
- NAGAI, S. 1955. "Sur la reduction du chlorure de triphenil tetrazolium par les levures". *Compt. Rend. Soc. Biol.* 149, 2047-2050.
- NAGAI, S. 1959. "Induction of respiration deficient mutation in yeast by various synthetic dyes". *Science* 130, 1168-1189.
- NAGAI, S. 1963a. "Diagnostic color differentiation plates for hereditary respiration deficiency in yeast". *J. Bacteriol.* 86, 299-302.
- NAGAI, S. 1963b. "Methylene blue and toluidine blue interfering with the production of respiration-deficient mutants in yeast by acriflavine". *Experimental Cell Res.* 29, 82-85.
- NAGAI, S. 1969. "Production of respiration-deficient mutants in yeast by a carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide". *Mutation Res.* 7, 333-337.
- NAGAI, S. and NAGAI, H. 1958. "A new evidence for induction of respiration deficiency in yeast by acriflavine". *Experientia* 14, 321-323.
- NAGAI, S., YANAGISHIMA, N. and NAGAI, H. 1961. "Advances in the study of respiration-deficient (RD) mutation in yeast and other microorganisms". *Bact. Rev.* 25, 404-426.

- NAGLEY, P., LINNANE, A.W. 1970. "Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 39, 989-996.
- NAGLEY, P. and LINNANE, A.W. 1972. "Biogenesis of mitochondria .XXI. Studies on the nature of mitochondrial genome in yeast: the degenerative effects of ethidium bromide on mitochondrial genetic information in a respiratory competent strain". *J. Mol. Biol.* 63, 181-193.
- NUÑEZ DE CASTRO, I. 1972. "Regulación de L-glutamato deshidrogenasas (NAD^+ y NADP^+) en Saccharomices cerevisiae". Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- OGUR, M., LINDEGREN, G. and LINDEGREN, C. C. 1954. "A simple screening test for genetic studies of respiration deficiency in yeast". *J. Bacteriol.* 63, 391-392.
- OGUR, M. and St. JOHN, R. 1956. "A differential and diagnostic plating method for population studies of respiration deficiency in yeast". *J. Bacteriol.* 72, 500-504.
- OGUR, M., St. JOHN, R. and NAGAI, S. 1957. "Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast". *Science* 125, 928-929.
- OGUR, M., St. JOHN, R., OGUR, S. and MARK, A. M. 1959. "The direct estimation of mutation rate from mutant frequency under special conditions". *Genetics* 44, 483-496.
- PINTO DA COSTA, S.O. and BACILA, M. 1973. "Induction of respiratory-deficient non-chromosomal "petites" of S. cerevisiae by sodium dodecyl sulfate". *J. Bacteriol.* 115, 461-463.
- RADLOFF, R., BAUER, W., VINOGRAD, J. 1967. "A dye-bouyant density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in hela cells". *Biochemistry* 57, 1514-1521.

- RANK, G. H. 1970. "Genetic evidence for "Darwinian" selection at the molecular level. II. Genetic analysis of cytoplasmically-inherited high and low suppressitivity in Saccharomyces cerevisiae". Can. J. Genet. Cytol. 12, 340-346.
- RANK, G. H. and PERSON, C. 1969. "Reversion of spontaneously arising respiratory deficiency in Saccharomyces cerevisiae". Can. J. Genet. Cytol. 11, 716-728.
- RAUT, C. 1953. "A cytochrome deficient mutant of Saccharomyces cerevisiae". Exptl. Cell Research 4, 295-305.
- RAUT, C. 1954. "Heritable non-genic changes in yeast by ultraviolet light". J. Cell Comp. Physiol. 44, 463-475.
- ROUSSEAU, P. and HALVORSON, H. O. 1969. "Preparation and storage of single spores of Saccharomyces cerevisiae". J. Bacteriol. 100, 1426-1427.
- SARACHEK, A. 1958. "The induction by ultraviolet radiation and the photoreactivation of heritable respiratory deficiency in Saccharomyces adapted and unadapted to aerobic respiration". Cytologia 23, 143-158.
- SAUNDERS, G. W., GINGOLD, E. B., TREMBATH, M. K., LUKINS, H. B. and LINNANE, A. W. 1970. "Mitochondrial genetics in yeast : segregation of a cytoplasmic determinant in crosses and its loss or retention in the petite". In "Autonomy and Biogenesis of mitochondria and chloroplasts" ed. N. K. Boardman, A. W. Linnane, R. M. Smillie. Amsterdam: North Holland.
- SCHWARTZ, G. 1959. "Der einfluss von langfarbungen mit acridinorange auf die entwicklung von Saccharomyces cerevisiae" (Hansen) Bissertation, Tech. Hochschule Braunschweig, W. Gemmeny.

- SHERMAN, F. 1957. "The heat inactivation and production of - cytochrome deficiency in yeast". *Exptl. Cell Res.* 11, 659-660.
- SHERMAN, F. 1958. "A study of the effects of elevated temperatures on the growth and inheritance of Saccharomyces cerevisiae". Thesis . U C R L 8573, University of California, Berkeley.
- SHERMAN, F. 1959. "The effects of elevated temperatures on - yeast". *J. Cell. Comp. Physiol.* 54, 29-52.
- SHERMAN, F. 1963. "Respiration-deficient mutants of yeast". I. *Genetics* 48, 375-378.
- SHERMAN, F. and EPHRUSSI, B. 1962. "The relationship between respiratory deficiency and suppressiveness in yeast as determined with segregational mutants". *Genetics* 47, 695-700.
- SHERMAN, F. and SLONIMSKI, P.P. 1964. "Respiration-deficient mutants of yeast. II. Biochemistry". *Biochem. Biophys. Acta* 90, 1-15.
- SLONIMSKI, P.P. 1949. "Action de l'acriflavine sur les levures. IV. Mode d'utilisation du glucose par les mutants "petite colonie". *Ann. Inst. Pasteur* 76, 510-530.
- SLONIMSKI, P.P. 1953. "A specific relation between enzymic adaptation and cytoplasmic mutation". *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 3, 76-97.
- SLONIMSKI, P.P. 1968. "Discussion. Round table discussion on biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria". In "Biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria". ed. E.C. Slater, J.M. Tager, S. Pappa, E. Quagliariello, Italy:Adriatica, pp. 475-478.

- SLONIMSKI, P. P. et EPHRUSSI, B. 1949. "Action de l'acri^{fl}avine sur les levures. V. Le système des cytochromes des mutants "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur 77, 47-63.
- SLONIMSKI, P. P., PERRODIN, G. and CROFT, J. H. 1968. "E-thidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient non-chromosomal "petites". Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 233-239.
- SUGIMURA, T., OKABE, K., KODAMA, M. 1969. "Induction of -respiration-deficient mutant of Saccharomyces cerevisiae by pinacianol". J. Bacteriol. 97, 964-965.
- TAVLITZKI, J. 1949. "Action de l'acri^{fl}avine sur les levures. III. Etude de la croissance des mutants "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur 76, 497-509.
- THOMAS, D. Y. and WILKIE, D. 1968. "Inhibition of mitochondrial synthesis in yeast by erythromycin: cytoplasmic and nuclear factor controlling resistance". Genet. Res. 11, 33-41.
- THOMAS, D. Y. and WILLIAMSON, D. H. 1971. "Products of mitochondrial protein synthesis in yeast". Nature new Biology 233, 196-199.
- WARING, M. J. 1968. "Drugs which affect the structure and function of DNA". Nature 219, 1320-1325.
- WEISLOGEL, P. O. and BUTOW, R. A. 1970. "Low temperature and chloramphenicol induction of respiratory deficiency in a cold sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae". Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 67, 52-58.
- WHITTAKER, P. A., HAMMOND, R. C. and LUHA, A. A. 1972. "Mechanism of mitochondrial mutation in yeast". Nature new Biology 238, 266-268.

- WHITTAKER, P. A. and WRIGHT, M. 1972. "Prevention by cycloheximide of petite mutation in yeast". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48, 1455-1459.
- WICKERHAM, L. J. 1946. "A critical evaluation of the nitrogen assimilation of test commonly used in the classification of yeast". *J. Bacteriol.* 52, 299-301.
- WILD, G. and HINSELWOOD, C. 1956. "The response of yeast cells to the action of inhibitory substances". *Proc. Roy. Soc. (London) B* 145, 14-41.
- WILKIE, D. 1970. "Reproduction of mitochondria and chloroplast". *Symposia of the Society General Microbiology* .20, 381-399.
- WILKIE, D., SAUNDERS, G. and LINNANE, A. W. 1967. "Inhibition of respiratory enzyme synthesis in yeast by chloramphenicol tolerance and resistance to other antibacterial antibiotics". *Gen. Res. Camb.* 10, 199-203.
- WRIGHT, R. and LEDERBERG, J. 1957. "Extranuclear transmission in yeast heterokaryons". *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 43, 919-923.
- YANAGISHIMA, N. 1956. "On the W variant of yeast with special reference to its appearance and character". *J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. Ser. D* 7, 131-146.
- YANAGISHIMA, N. 1964. "Induction by auxin of respiratory deficiency in yeast". *Plant and Cell Phys.* 5, 316-364.
- YCAS, M. 1956. "A hereditary cytochrome deficiency appearing in yeast grown at an elevated temperature". *Expl. Cell Res.* 11, 1-6.
- YOTSUYANAGI, Y. 1962. "Etudes sur le chondriome de la levure II. Chondriomes des mutants à déficience respiratoire". *J. Ultrastruct. Res.* 7, 141-158.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | <u>Pag</u> |
|-------------------|------------|
| Tabla 1. - | 54 |
| Tabla 2. - | 55 |
| Tabla 3 .-..... | 57 |
| Tabla 4. - | 59 |
| Tabla 5. - | 60 |
| Tabla 6. - | 62 |
| Tabla 7. - | 64 |
| Tabla 8. - | 66 |
| Tabla 9. - | 69 |
| Tabla 10. - | 72 |
| Tabla 11. - | 72 |
| Tabla 12. - | 76 |
| Tabla 13. - | 79 |
| Tabla 14. - | 81 |
| Tabla 15. - | 82 |
| Tabla 16. - | 85 |
| Tabla 17. - | 85 |
| Tabla 18. - | 86 |
| Tabla 19. - | 87 |
| Tabla 20. - | 91 |
| Tabla 21. - | 92 |
| Tabla 22. - | 93 |
| Tabla 23. - | 95 |
| Tabla 24. - | 99 |
| Tabla 25. - | 100 |
| Tabla 26. - | 101 |

| | |
|-------------------|-----|
| Tabla 27.- | 102 |
| Figura 1.-..... | 88 |
| Figura 2.-..... | 89 |
| Esquema 1.- | 97 |

ERRATAS ADVERTIDAS

- Pag. 9 ; línea -2, dice: citocromos c_1+b_2 ; debe decir: citocromos $a+a_3$, deficiencia parcial en citocromo c ó alte raciones en el contenido en citocromos c_1+b_2 .
- Pag. 55 ; Tabla 2, dice: Los resultados obtenidos son la media de tres determinaciones; debe decir: Los resultados obtenidos se confirmaron mediante triple - repetición de la experiencia.
- Pag. 85 ; Tabla 17, línea 4 del encabezamiento, dice: lactato ; de be decir: glucosa.
- Pag. 88 ; línea 4 del pié de la gráfica, dice: lactato; debe decir: glucosa.
- Pag. 91 ; Tabla 20, dice: Medio en que se realiza el cruce $q+(a)$ $\times q^-(a)$; debe decir : $q+(a)\times q+(a)$.
- Pag. 92 ; Tabla 21, línea 2 del encabezamiento, dice: $q+(a)\times q^-(a)$; debe decir: $q+(a)\times q+(a)$.
- Pag. 100; Tabla 25, en los valores reseñados de la resistencia a la supresividad, línea 4, dice: 89; debe decir: 67 ; línea 5, dice: 93; debe decir: 79.
- Pag. 102; Tabla 27, en los valores reseñados de la resistencia a la supresividad, línea 2, dice: 93; debe decir: 79.
- Pag. 110;; línea 8, dice: éste; debe decir: f.