

Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Estudio de los plásmidos matadores presentes
en estirpes de Saccharomyces cerevisiae

Inés Martín Sánchez

Tesis Doctoral

1980

~~Prov. T 2-54~~

R. 48.701
B-137-42

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



"ESTUDIO DE LOS PLASMIDOS MATADORES PRESENTES
EN ESTIRPES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE"

Inés Martín Sánchez

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1980



CIENCIAS

"ESTUDIO DE LOS PLASMIDOS MATADORES PRESENTES EN
ESTIRPES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE"

MEMORIA presentada para aspirar al grado de
Doctor en Ciencias por la Licenciada D^a. Inés
Martín Sánchez.

Prof. Dr. D. ENRIQUE MONTOYA GOMEZ
Director de la Tesis

Dr. D. ANTONIO LUIS EXTREMERA LEON
Co-director de la Tesis

INES MARTIN SANCHEZ
Aspirante al grado de Doctor en Ciencias

Granada, Noviembre de 1980.

Tesis Doctoral dirigida por el Prof. Dr. D. Enrique Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Granada y codirigida por el Dr. D. Antonio Luis Extremera León profesor ayudante de Microbiología de la Universidad de Granada. Fue leída el 20 de Diciembre de 1980, obteniendo la calificación de Sobresaliente "cum laude" ante el Tribunal formado por los profesores Montoya Gómez, Recalde Martinez, Ramos Cormenzana, Olivares Pascual y Pretel Martinez.

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 1977 a 1980.

La realización del trabajo experimental ha sido sufragada en parte por una beca de Formación de Personal Investigador durante los años 1977, 1978, 1979.

Parte de los resultados de esta Tesis fueron presentados en el VII Congreso Nacional de Microbiología (Cádiz, 1979).

Quiero expresar mi agradecimiento :

A mis padres, por haber hecho posible que llegara -
este momento.

Al Director de esta Tesis Doctoral, Prof. Dr. D. -
Enrique Montoya Gómez, porque además de despertar mi interés
por la Microbiología, ha prestado su constante ayuda y orienta-
ción en la realización de este trabajo .

Al Dr. Extremera, co-director del mismo, por haber
seguido tan de cerca su realización y por su inestimable ayuda.

A mis compañeros, por su amistad y colaboración.

Por último quiero dar las gracias al personal técnico
y auxiliar de Dpto. de Microbiología.

A FEDERICO

INDICE

	<u>Pag.</u>
INTRODUCCION.....	17
1. Los sistemas matadores de levaduras.....	19
2. La toxina matadora de levaduras.....	24
3. La herencia del carácter matador.....	27
4. Genes nucleares relacionados con el fenotipo matador.....	29
5. Los determinantes extranucleares.....	32
6. Las partículas similares a virus.....	37
7. El carácter matador en la Naturaleza.....	39
8. Papel biológico, origen y evolución del carácter matador.....	41
OBJETO DEL TRABAJO.....	43
MATERIAL Y METODOS.....	47
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	49
1.1. Estirpes matadoras del primer sistema.....	49
1.2. Estirpes matadoras del segundo sistema.....	49
1.3. Estirpes neutrales y supresivas del primer sistema.....	50



	<u>Pag.</u>
1.4. Otras estirpes pertenecientes al primer sistema.....	50
1.5. Estirpes sensibles.....	51
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	51
2.1. Medio de crecimiento y conservación (NG).....	52
2.1.1. Medio NL.....	52
2.2. Medios especiales.....	52
2.1.1. Medio YEPG-T.....	53
2.2.2. Medio YEPG-T-AM.....	53
2.2.3. Medio YPD.....	54
2.2.4. Medio GYP.....	54
2.3. Medio de conjugación (MC).....	55
2.4. Medios de esporulación.....	55
2.4.1. Medio de preesporulación (MPE).....	55
2.4.2. Medio de esporulación (ME).....	56
2.5. Medios mínimos.....	57
2.5.1. Solución madre de vitaminas y sales minerales.....	57
2.5.2. Medio MG.....	58
2.5.3. Medios mínimos suplementados.....	58
3. TECNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE LAS ESTIRPES UTILIZADAS.....	59
3.1.- Determinación de fenotipos con respecto al carácter matador.....	59

	<u>Pag.</u>
3.1.1. Determinación de la producción de toxina matadora.....	59
3.1.2. Determinación de la resistencia de las estirpes frente a la ac- ción de la toxina matadora.....	60
3.2. Comprobación de los genotipos de las estirpes empleadas.....	61
4. TECNICAS EMPLEADAS EN LA OBTEN- CIÓN DE ESTIRPES DIPLOIDES MEDIAN TE CRUCES ENTRE HAPLOIDES.....	62
4.1. Técnica del cruce.....	63
4.2. Aislamiento de los cigotos.....	63
5. TECNICAS EMPLEADAS EN LA OBTEN- CIÓN Y AISLAMIENTO DE ASCOSPORAS HAPLOIDES.....	64
5.1. Preesporulación.....	64
5.2. Esporulación.....	64
5.3. Rotura de ascas.....	65
5.3.1. Obtención de microagujas.....	65
5.3.2. Preparación de la cámara húmeda para el aislamiento de ascosporas.....	66
5.3.3. Disección de las ascas.....	66
5.3.4. Aislamiento de ascosporas.....	67

	<u>Pag.</u>
6. TECNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LOS DETERMINANTES GENETICOS - EXTRANUCLEARES RESPONSABLES DE LOS FENOTIPOS MATADOR, NEUTRAL Y SENSIBLE.....	67
6.1. Extracción de los ARN de doble cadena.....	67
6.1.1. Producción, recolección y pretra- tamiento de la biomasa.....	68
6.1.2. Extracción del ARN.....	68
6.1.3. Purificación del ARN.....	69
6.2. Electroforesis en geles de poliacrila- mida.....	70
6.2.1. Preparación de los geles.....	70
6.2.2. Desarrollo del experimento.....	71
6.2.3. Fijación, tinción y destinción de los geles.....	72
7. TECNICAS EMPLEADAS EN LA OBTEN- CION Y OBSERVACION DE LAS PARTI- CULAS SIMILARES A VIRUS (VLP).....	73
7.1. Extracción de las partículas simila- res a virus (VLP).....	73
7.2. Examen al microscopio electrónico.....	74
7.2.1. Preparación de las muestras.....	74
7.2.2. Tinción de las muestras.....	75
7.2.3. Observación de las rejillas.....	75

	<u>Pag.</u>
EXPERIENCIAS Y RESULTADOS.....	77
1. EXPERIENCIAS PRELIMINARES	79
1.1. Caracterización de los fenotipos de las estirpes utilizadas.....	79
1.2. Comprobación de los genotipos de las estirpes empleadas.....	79
2. TRANSFERENCIA DE LA CAPACIDAD DE PRODUCIR LA TOXINA MATADORA DEL SEGUNDO SISTEMA A ESTIRPES HETEROTALICAS.....	82
3. ESTUDIO MEDIANTE CRUCES DE LAS INTERACCIONES ENTRE LOS DETER- MINANTES NUCLEARES Y EXTRANU- CLEARES RESPONSABLES DE LA PRO- DUCCION DE LA TOXINA MATADORA DE AMBOS SISTEMAS.....	90
4. DEMOSTRACION DE QUE LAS ESTIR- PES MATADORAS HOMOTALICAS DEL SEGUNDO SISTEMA, POSEEN LOS GE- NES NUCLEARES NECESARIOS PARA MANTENER LOS DETERMINANTES EX- TRANUCLEARES DEL PRIMERO.....	98
5. ESTUDIO DE LOS DIVERSOS TIPOS DE ARN DE DOBLE CADENA PRESEN	

	<u>Pag.</u>
TES EN ESTIRPES DE AMBOS <u>SIS</u>	
TEMAS CON DISTINTOS FENOTIPOS.....	102
6. ESTUDIO DE LOS DIVERSOS TIPOS	
DE ARN DE DOBLE CADENA PRE-	
SENTES EN DISTINTAS ESPECIES	
HOMOTALICAS DEL GENERO <u>SACCHA-</u>	
<u>ROMYCES</u> PRODUCTORAS DE LA TO-	
XINA MATADORA DEL SEGUNDO SIS-	
TEMA.....	108
6.1. Estudio de los fenotipos.....	108
6.2. Electroforesis en geles de poliacri-	
lamida.....	111
7. ESTUDIO DE LAS PARTICULAS SIMILA	
RES A VIRUS (VLP) PRESENTES EN -	
ESTIRPES MATADORAS DE AMBOS <u>SIS</u>	
TEMAS.....	111
8. ANTAGONISMO ENTRE ESTIRPES MATA	
DORAS DE AMBOS SISTEMAS Y SENSI-	
BLES EN DISTINTAS CONDICIONES DE	
CULTIVO.....	118
DISCUSION.....	145
CONCLUSIONES.....	157
BIBLIOGRAFIA.....	161

INTRODUCCION

1.- LOS SISTEMAS MATADORES DE LEVADURAS

En 1963 Makower y Bevan describieron el primer sistema matador de levaduras. Encontraron estirpes de Saccharomyces cerevisiae dotadas de la capacidad de producir la muerte a otras estirpes de la misma especie. Según dichos autores, las cepas de este microorganismo presentan tres fenotipos diferentes: matador o "killer", sensible y neutral.

Las estirpes con fenotipo matador son capaces de causar la muerte de otras células cuando se cultivan conjuntamente. Las estirpes que presentan fenotipo sensible mueren por acción de las anteriores.

El tercer fenotipo, el neutral, es el de las estirpes que carecen de los caracteres antes descritos, es decir, no matan a las células sensibles ni mueren por acción de las células matadoras.

Existe, pues, una clara diferencia entre la capacidad de matar y la resistencia a dicha capacidad, según se deduce de la existencia de células neutrales, que son incapaces de matar pero inmunes a la acción de las estirpes matadoras.

Wickner (1974, 1977), sugirió que se designaran como K^+ a las estirpes dotadas de la propiedad de matar, y como K^- a aquellas que carecen de esta capacidad. Análogamente, la resistencia a la acción matadora se designaría como R^+ y como R^-

la sensibilidad a dicha acción.

Según esto, las estirpes con fenotipo matador serían $K^+ R^+$, ya que poseen la capacidad de matar y de resistir la acción matadora; las estirpes con fenotipo neutral serían $K^- R^+$, ya que no son capaces de matar aunque sí resisten la acción de las estirpes matadoras; y finalmente, las estirpes sensibles se representarían como $K^- R^-$, pues presentan incapacidad de matar y sensibilidad a la acción matadora. Levaduras con fenotipos matador, neutral y sensible se encuentran ampliamente difundidas entre colecciones de laboratorio.

Más tarde (Wickner, 1974) se describió la existencia de un cuarto fenotipo, correspondiente a estirpes dotadas de la propiedad de matar pero incapaces de resistir la acción de las células matadoras. El fenotipo de estas estirpes, para las que se ha propuesto el nombre de "suicidas", se designaría como $K^+ R^-$. Lógicamente, la estabilidad de estas estirpes está restringida a unas condiciones en las que la acción matadora se encuentra bloqueada, como discutiremos más adelante.

Naumov y Naumova descubrieron en 1973 la existencia de fenómenos antagónicos semejantes entre levaduras de vinificación, hecho que fue confirmado posteriormente (Montoya y Extremera, 1975).

El sistema matador presente en estas estirpes de vinificación es diferente del hasta ahora descrito, y ha recibido

el nombre de segundo sistema matador. El que se trata de sistemas distintos lo demuestra el hecho de que las estirpes matadoras del primero se comportan como sensibles frente a las del segundo, y viceversa; es decir, no existe inmunidad cruzada entre ambos.

Para evitar confusiones entre los fenotipos de las estirpes de levadura correspondientes a dichos sistemas, se ha propuesto añadir el subíndice 2 tras las letras K y R cuando se refieren al segundo sistema, mientras que las del primero llevarían el subíndice 1, aunque sólo en los casos en que pueda haber motivo de error. Según esto, las estirpes matadoras del segundo sistema serían $K_2^+ R_2^+$, las neutrales $K_2^- R_2^+$ y las sensibles $K_2^- R_2^-$.

Todas las levaduras matadoras del segundo sistema aisladas de sus habitats naturales son diploides, y presentan la particularidad de ser homotáticas.

Dichas estirpes homotáticas se caracterizan por presentar un elevado índice de cambio de sexo, lo que produce la inestabilidad de su fase haploide. El homotalismo se debe a la presencia del alelo dominante HO, mientras que su alelo recesivo, ho, determina heterotalismo (Hicks et al, 1977. a).

El homotalismo representa una barrera casi insalvable y debe ser eliminado como paso previo a cualquier estudio genético.

Winge y Roberts (1949) demostraron que S.chevalieri posee un gen D, responsable de la diploidización de los cultivos. Posteriormente, Hawthorne (1963, b) sugirió que este gen se comportaría como un "mutator", causando una mutación en el gen responsable del tipo de conjugación a su alelo opuesto, durante las primeras divisiones somáticas de las células haploides procedentes de una ascospora homotática, fusionándose seguidamente las células de tipo de conjugación diferente.

Recientemente (Hicks et al, 1977, b) se ha propuesto una hipótesis según la cual el cambio de sexo es el resultado de un mecanismo tipo transposición, dicha hipótesis es conocida como el modelo "cassette" y en ella se encuentran implicados los genes MAT, determinante del sexo; el gen HO, responsable del homotalismo; y los genes HML y HMR, que al igual que MAT están localizados en el cromosoma III, el HML en su brazo izquierdo y el HMR en su brazo derecho.

Según el modelo del "cassette" la información contenida en el gen MAT es una secuencia polinucleotídica que puede ser reemplazada por otra proveniente de HML o de HMR, ya que son parcialmente complementarias a la de MAT (Leupold, 1980).

Los tres genes presentan formas alélicas a y α y para que el cambio de sexo se realice, es necesario que uno de los dos genes de reserva contenga información diferente a la contenida en MAT, es decir, una estirpe cuyo genotipo sea HMLα, MATα y

HMR α , no puede cambiar de sexo, es por tanto haploide estable - aunque esté presente el alelo HO, determinante del homotalismo, cuya función es permitir el paso de información de HML y HMR a MAT.

Este paso de información es unidireccional, es decir se produce de HML y HMR a MAT, pero no a la inversa.

2.- LA TOXINA MATADORA DE LEVADURAS

Las experiencias realizadas por Makower y Bevan (1963) demostraron que las células matadoras ejercen su efecto letal a través de un factor que segregan al medio. Los citados autores encontraron que las células sensibles morían sin necesidad de un contacto físico con las células que poseen capacidad de matar. Un extracto libre de células obtenido a partir de un cultivo de 48 horas de una estirpe matadora era capaz de matar a las células sensibles, mientras que las células con fenotipo neutral eran capaces de resistir a la acción de dicho extracto. Esta sustancia que se segrega al medio y produce la muerte de las estirpes sensibles ha recibido el nombre de factor matador de levaduras (YKF: "yeast killer factor") o toxina matadora de levaduras (YKT: "yeast killer toxin").

Aunque estas experiencias fueron llevadas a cabo con estirpes del primer sistema matador, lo dicho puede hacerse extensivo al segundo (Extremera, 1978). Por analogía se designa YKF_2 o YKT_2 a la toxina matadora producida por estirpes de este segundo sistema, mientras que la del primero se designaría como YKF_1 o YKT_1 .

La naturaleza y propiedades fisicoquímicas del YKT_1 fueron inicialmente estudiadas por Woods y Bevan (1968). Encontraron que la toxina matadora del primer sistema es una macromolécula sensible a la acción de las proteasas, estable sólo dentro de

un estrecho margen de pH (4.6 - 4.8) y fácilmente inactivada por temperaturas superiores a 25° o por aireación en medios líquidos.

Bussey (1972) encontró que dicha molécula está formada por un 25% de polisacáridos y un 75% de proteína, sin detectar ningún tipo de ácido nucleico.

Posteriormente, trabajos de Palfree y Bussey (1979) han encontrado una situación aparentemente diferente. Al purificar más el YKT₁ han hallado un 90% de carbohidrato a base de D-manosa) y un 10% de proteína. Esta, con un peso molecular estimado en 11470, puede ser separada del carbohidrato mediante detergentes, y es el componente activo de la toxina.

En nuestro laboratorio, Extremera (1978) ha llevado a cabo un estudio bioquímico sobre las toxinas matadoras de ambos sistemas. Las dos toxinas difieren en su comportamiento en cromatografías por Sephadex G-100 y G-200, en su resistencia a diversos agentes físicos y químicos y en sus puntos isoeléctricos.

Por lo que respecta al mecanismo de acción del YKT₁, ya Woods y Bevan (1968) demostraron que la muerte de las células sensibles no iba acompañada de la lisis de las mismas, lo que sugería que su acción podría ejercerse de forma similar a la de las bacteriocinas, que son bactericidas pero no bacteriolíticas (Jacob y Wollman, 1959).

Posteriormente Bussey (1972, 1974), Bussey y Sherman (1973) y Bussey et al (1973) estudiaron mas ampliamente su mecanismo de acción. Encontraron que en células sensibles puestas en contacto con la toxina matadora se producía una inhibición coordinada de la biosíntesis de macromoléculas (ADN, ARN, proteínas y polisacáridos), debida a un desacompasamiento entre la rotura del ATP y la utilización de la energía liberada. Así mismo la célula vierte al medio una gran cantidad de moléculas pequeñas (glucosa, leucina, ATP), lo que indica que se producen importantes alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática. Pero el amplio lapso de tiempo existente entre la adsorción de la toxina sobre la pared celular y la detección en el medio de estos compuestos, apoya la existencia de otro lugar inicial de acción del YKT₁.

Por lo que respecta a la toxina matadora del segundo sistema, su mecanismo de acción no ha sido estudiado por el momento.

3.- LA HERENCIA DEL CARACTER MATADOR

Somers y Bevan (1968), en un análisis genético llevado a cabo entre estirpes matadoras, sensibles y neutrales del primer sistema, encontraron que el carácter matador está bajo control de determinantes genéticos extranucleares, aunque es necesaria la presencia de ciertos genes nucleares. Uno de los determinantes citoplasmáticos, que fue denominado (k), confiere la propiedad de producir la toxina matadora y de resistir la acción de la misma; se encontraría presente en células matadoras. El otro determinante, al que los autores citados designaron como (n), sería responsable sólo de la resistencia a la toxina, y se hallaría en células neutrales. La ausencia de ambos, que determinaría el fenotipo sensible, fue designado como genotipo (o).

Estos tipos de determinantes estarían bajo el control de un gen nuclear, cuyo alelo dominante M sería necesario para el mantenimiento de los mismos. Esta hipótesis se basa en el hecho de que existen dos tipos de estirpes sensibles, diferentes por su comportamiento en cruces con estirpes matadoras.

Uno de ellos se caracteriza porque al cruzarse con cepas matadoras da lugar a cigotos que muestran una segregación 4K:0S, típicamente citoplasmática. Este tipo de estirpes sensibles tendría el genomio nuclear adecuado para el mantenimiento de los determinantes genéticos extranucleares, pero carecería de dichos determinantes en su citoplasma; fueron denominadas, por lo tanto,

sensibles citoplasmáticas.

El otro tipo, por el contrario, en condiciones idénticas da lugar a cigotos que muestran una segregación meiótica 2K:2S, típicamente nuclear. Serían estirpes sensibles cuyo genomio nuclear es incapaz de mantener a los determinantes extranucleares en el citoplasma, y carecen, por tanto, de los mismos; recibieron el nombre de sensibles nucleares.

Los mismos autores (Bevan y Somers, 1969) estudiaron la descendencia de cruces entre estirpes matadoras y neutrales del primer sistema. En el análisis de tétradas encontraron que la proporción de neutrales obtenidas, variaba entre 0,3 y 84,6%. Estos resultados sugieren que no existe ningún mecanismo que asegure en la meiosis celular el reparto exacto de determinantes (k) y (n) entre las células hijas.

Estos primeros trabajos genéticos, llevados a cabo en su totalidad, como ya hemos dicho, sobre el primer sistema matador, único conocido entonces, evidenciaron, pues, que en la herencia del carácter matador se encuentran implicados genes nucleares y determinantes extranucleares, y demostraron la ausencia de un mecanismo de reparto de dichos determinantes en la división celular.

4.- GENES NUCLEARES RELACIONADOS CON EL FENOTIPO MATADOR

Los anteriores estudios, no parecían demostrar que ambos tipos de determinantes genéticos extranucleares (k) y (n) fuesen controlados por genes nucleares separados, pues los genotipos de todas las estirpes analizadas, eran capaces de mantener, bien ambos determinantes o bien ninguno de ellos.

Trabajos de Bevan et al (1969), parecieron confirmar la hipótesis del control de dichos determinantes por un único gen nuclear, M, además de ser necesaria la suficiencia respiratoria nuclear conferida por el gen pet₅⁺.

Sin embargo, los estudios posteriores han demostrado que son varios los grupos de genes nucleares implicados en el mantenimiento y expresión de los determinantes genéticos extranucleares.

Uno de ellos es el llamado kex⁺ (killer expression) (Wickner, 1974) necesario para la expresión del carácter matador. Los mutantes kex, con fenotipo K^-R^+ , dan lugar, tanto en cruces con estirpes sensibles citoplasmáticas K^-R^- , como con matadoras K^+R^+ , a cigotos K^+R^+ , los cuales tras esporulación dan una segregación de $2K^+R^+ : 2K^-R^+$, típicamente nuclear. Esta segregación demuestra que los mutantes kex llevan el determinante extracromosómico (k), pero que éste no puede expresar la capacidad de producir

la toxina matadora, aunque sí condiciona la resistencia a la misma.

Posteriormente, trabajos de Wickner y Leibowitz (1976), pusieron de manifiesto que existen dos genes kex, el kex 1 y el kex 2, localizados respectivamente, en los cromosomas VII y XIV.

Otro gen nuclear relacionado con el carácter matador es el rex, ("resistance expression") (Wickner, 1974). En este caso, la resistencia a la toxina matadora no se expresa fenotípicamente, aunque la toxina sí se produce. El fenotipo de estas estirpes sería el que hemos descrito como "suicida" (K^+R^-). Son, como ya se dijo, muy inestables, y sólo pueden ser mantenidas en estado heterocigótico o en condiciones en que la toxina matadora no pueda ser producida o se inactive rápidamente (cultivo a elevadas temperaturas; por ejemplo).

Análogamente a los kex, cuando los mutantes rex se cruzan con estirpes matadoras o sensibles citoplasmáticas, originan un cigoto K^+R^+ , del que al esporular, se obtiene una descendencia $2K^+R^+ : 2K^+R^-$, que también indica que se trata de una herencia nuclear.

Sólo se ha descrito un gen relacionado con este carácter, el rex 1, cuya localización cromosómica no ha sido aún determinada.

El tercer grupo de genes relacionados con el carácter matador, es el llamado mak, ("maintenance killer"), (Wickner, 1974;

Wickner y Leibowitz, 1976; Wickner, 1977). Los mutantes mak, son incapaces de mantener el determinante extranuclear (k), su fenotipo será por tanto K^-R^- . Equivalen a los genes M citados anteriormente.

En cruces con estirpes matadoras, estos mutantes, originan un cigoto K^+R^+ , que muestra una segregación $2K^+R^+ : 2K^-R^-$ es decir, se trata de una herencia de acuerdo con las leyes mendelianas y que ya hemos descrito antes al citar las estirpes sensibles nucleares.

En nuestra opinión, estos mutantes deben ser incapaces de sintetizar productos intermedios necesarios para la replicación del determinante extranuclear (k). Esta hipótesis se refuerza por el gran número de genes mak encontrados (se han descrito veintiseis, desde el mak 1 al mak 26). Sólo ha sido determinada la localización cromosómica de unos pocos de ellos.

Finalmente, ya fue citado al principio de este apartado el gen pet⁺, necesario para el mantenimiento de los determinantes extranucleares (k) y (n) (Bevan et al, 1969). Dicho gen nuclear fue localizado posteriormente en el cromosoma VII (Wickner, 1976).

En cuanto al segundo sistema matador, no se conoce ninguno de los genes nucleares que puedan intervenir en su mantenimiento y control.

5.- LOS DETERMINANTES EXTRANUCLEARES

Ya se han citado los trabajos de Somers y Bevan (1969) que ponen de manifiesto la existencia de dos tipos de determinantes extranucleares, los cuales fueron denominados (k) y (n).

Otro hecho a favor de la naturaleza extracromosómica de estos determinantes, es la posibilidad de "curar" el carácter matador mediante tratamientos con agentes mutagénicos que no tienen acción sobre loci cromosómicos. Así, Fink y Styles (1972) eliminaron el carácter matador empleando cicloheximida y Wickner (1974) utilizó cultivos a elevadas temperaturas para "curar" fenotipos matadores y neutros. Naumova y Naumov (1974) obtuvieron los mismos resultados en el segundo sistema con anaranjado de acridina. En todos los casos el fenotipo primitivo es recuperable mediante cruces con estirpes adecuadas, lo que indica que no se ha producido ninguna alteración en el genomio nuclear.

Hay numerosos elementos extranucleares conocidos en levaduras. Entre los más destacados se encuentran el $[\rho]$ o ADN mitocondrial (Mounolou et al, 1966), el super supresor $|\Psi|$ (Cox, 1965), el $[URE 3]$ (Lacroute, 1971) y los $[TETR^R]$ y $[VEN^R]$ (Lancashire y Griffiths, 1965) localizados sobre el ADN-ómicron (Clark-Walker, 1973).

Al-Aidross et al, (1973) demostraron que el carácter matador permanece tras la eliminación total del ADN mitocondrial con bromuro de etidio. De igual modo Wickner y Leibowitz

(observaciones no publicadas) sugieren la independencia entre los determinantes responsables del carácter matador y los elementos $[\Psi]$ y $[\text{URE } 3]$, ya que existen estirpes matadoras $[\Psi^+]$ y $[\Psi^-]$, así como $[\text{URE } 3]^+$ y $[\text{URE } 3]^-$.

Young y Perlman (1975) demostraron la independencia entre los determinantes responsables del carácter matador y los elementos $[\text{VEN}^R]$ y $[\text{TET}^R]$ de S. cerevisiae.

Los hechos anteriores sugieren, pues, que los plásmidos responsables del carácter matador son diferentes de los citados, ya que no están localizados sobre el ADN mitocondrial, ni sobre el ADN-ómicron, ni sobre ningún elemento extranuclear previamente conocido.

Son varios los tipos de plásmidos que condicionan los fenotipos matador y neutro. Se designa $[\text{KIL-k}]$ al plásmido matador presente en estirpes de laboratorio; este nombre fue propuesto por Sherman y Lawrence (1974). Por analogía, su nombre en el segundo sistema sería $[\text{KIL-k}_2]$, utilizando el de $[\text{KIL-k}_1]$ para el primero cuando pueda haber inducción a error. El plásmido de las estirpes neutrales recibe el nombre de $[\text{KIL-n}]$ y las sensibles se designan como $[\text{KIL-o}]$.

Otro tipo de plásmidos relacionados con el carácter matador son los llamados supresivos, que reciben el nombre de $[\text{KIL-s}]$. Los plásmidos supresivos, cuando coexisten con los matadores o neutros, suprimen a éstos y originan un cigoto cuya des-

cendencia haploide es siempre supresiva (Somers, 1973). Un fenómeno similar se ha descrito en relación con el carácter rho (Ephrussi et al, 1959).

Un quinto tipo de plásmido es el llamado "diploide dependiente", designado como $[KIL-d]$. Su característica principal es que expresa el fenotipo matador en estado diploide, mientras que en estado haploide se comportan como sensibles (Wickner, 1976).

Durante bastante tiempo se ha venido especulando sobre la posible naturaleza de los determinantes extracromosómicos implicados en el carácter matador. Fink y Styles (1972), supusieron que dichos determinantes extranucleares podrían ser ARN de doble cadena, en un sistema similar al descrito por Banks et al (1968, 1969) para la producción de estatolón en Penicillium sp., y por Day y Agnastakis (1973) y Rawlinson (1973) para la secreción de sustancias tóxicas en Ustilago maydis.

Berry y Bevan (1972), descubrieron la existencia de varios tipos de ARN en estirpes matadoras, cuyas propiedades físico-químicas parecían indicar una estructura bicatenaria. Experiencias realizadas por Vodkin y Fink (1973), dieron resultados similares pero tampoco permitieron establecer una relación clara entre estos ARNs bicatenarios y el carácter matador.

Fueron Bevan et al (1973), los que relacionaron de forma concluyente la existencia de ARN bicatenario con el carácter

ter matador. Encontraron dos tipos de estos ARN, uno de los cuales faltaba en estirpes sensibles. El mayor, designado como P₁ ó L presentaba un peso molecular aproximado de 2,44 megadaltons, mientras que el menor, presente sólo en estirpes matadoras y designado como P₂ ó M, tenía un peso molecular de 1,28 megadaltons. Eran, indudablemente bicatenarios, como lo demostraba su fuerte hipercromicidad, su contenido en bases y la capacidad de inducir la producción de interferón.

Existen otros hechos que apoyan la hipótesis de que es el ARN de tipo M el que controla y dirige la producción de la toxina matadora. Vodkin et al (1973), mediante un nuevo procedimiento para aislar el ARN de doble cadena, encontraron que las estirpes supermatadoras (que producen mayor cantidad de toxina matadora) contenían 2,5 veces más ARN de tipo M que las matadoras normales, mientras que las estirpes sensibles carecían de esta fracción.

Por otra parte, las estirpes supresivas presentan nuevos tipos de ARN de menor peso molecular denominados como S (Tzen et al, 1974). Han sido descritos varios tipos de ARNs supresivos, S1, S3, S4, (Fried y Fink, 1978) con pesos moleculares entre 0,45 y 0,92 megadaltons y se supone que se han originado por delecciones a partir del tipo M.

Experiencias de traslación in vitro, utilizando la fracción M de ARN de doble cadena desnaturalizada, han demostrado de forma concluyente que este tipo de ARN es el que codifica la to-

xina matadora, (Bostian, 1978). Por otra parte, mediante experiencias similares, se ha comprobado que la fracción L dirige la síntesis del componente proteínico mayoritario de las partículas similares a virus (Hooper et al, 1978).

Wickner y Leibowitz (1976), llegaron a la conclusión de que en cada célula hay unas 100 copias de ARN de tipo L y unas 12 de la fracción M.

Encontraron además, un nuevo tipo de ARN bicatenario, el XL, con un peso molecular aproximado de 3,8 megadaltons, que parece estar formado por moléculas de L en replicación o con alguna conformación particular.

En el segundo sistema, Nesterova et al, (1976) han aislado varias fracciones de ARN que por su comportamiento parecen ser de doble cadena. Según los autores citados, la fracción de mayor tamaño, que denominaron x, es la responsable de la producción de la correspondiente toxina matadora.

Extremera (1978), en estudios realizados sobre ambos sistemas, confirmó que los determinantes genéticos extranucleares son ARNs de doble cadena. Para el primer sistema, habría una molécula que controla y dirige la producción de la toxina correspondiente, mientras que en el segundo serían dos.

6.- LAS PARTICULAS SIMILARES A VIRUS

La existencia de partículas con morfología muy semejante a la de ciertos virus, era conocida en diversas especies de hongos. Dichas partículas tenían un tamaño que variaba desde 30 nm. en Penicillium stoloniferum (Ellis y Kleinschmidt, 1968), o 35 nm. en P. chrisogenum (Banks et al, 1969) hasta 40 nm. en Aspergillus foetidus (Banks et al, 1970). En su interior contienen ARN de doble cadena, como se deduce del hecho de que son capaces de inducir la producción de interferón en células L de ratón.

Partiendo de estos hechos e intentando encontrar una similitud entre el carácter matador de levaduras y el de Ustilago maydis, se comenzó a investigar sobre la posible existencia de partículas similares a virus en Saccharomyces cerevisiae. Adler y Mackenzie (1972), aislaron de extractos celulares, unas partículas isométricas, de unos 40 nm. de diámetro, que denominaron VLP ("virus like particles").

Posteriormente, Herring y Bevan (1974), encontraron partículas similares en extractos procedentes de estirpes matadoras, conteniendo ARN de doble cadena.

Adler et al, (1976) estudiaron el ácido nucléico contenido en estas VLP. Mediante centrifugación en gradiente de sacarosa, separaron dos tipos de partículas de morfología similar, con densidades de 1,28-1,30 g.cm⁻³. Las mas pesadas contenían ARN

bicatenario de un peso molecular aproximado de 2,54 megadaltons (tipo L), y las más ligeras presentaban en su interior ARN bicatenario con un peso molecular de 1,19 megadaltons, correspondiente al descrito como tipo M. Asimismo existían partículas vacías.

Hooper et al (1977), y Oliver et al (1977), encontraron que el componente mayoritario de las partículas que contienen el ARN de tipo L, es un polipéptido con un peso molecular de unos 75000 daltons, codificado por dicho ARN. Se desconoce por el momento si las partículas que contienen el ARN tipo M tienen el mismo componente mayoritario.

Más recientemente, Herring y Bevan (1977) han descubierto en células de levadura en fase estacionaria, una ARN polimerasa asociada a las VLP capaz de dirigir la síntesis de un ARN de cadena simple, tomando como molde el ARN bicatenario contenido en dichas partículas. Esto parece sugerir que el ciclo replicativo de las partículas similares a virus, es igual al que describió Joklik (1974) para los reovirus.

7.- EL CARACTER MATADOR EN LA NATURALEZA

Los fenómenos de antagonismo entre hongos, basados en la producción de sustancias tóxicas, han sido demostrados en diversas especies y habitats.

Un sistema matador muy similar al descrito en S. cerevisiae, existe en Ustilago maydis (Day y Agnastakis, 1972; 1973; Hankin y Puhalla, 1973), bajo el control también de ARNs bicatenarios, localizados asimismo en partículas similares a virus. Las estirpes matadoras de U. maydis no tienen ningún efecto sobre las células de S. cerevisiae (Koltin y Day, 1975).

En Torulopsis glabrata se ha descrito igualmente la existencia de estirpes matadoras, no existiendo entre ellas y las de S. cerevisiae inmunidad cruzada (Bussey y Skipper, 1975, 1976).

En levaduras, la presencia de estirpes con fenotipo matador se ha descrito en numerosos géneros. Philliskirk y Young (1975), estudiaron la colección de levaduras del Reino Unido (NCYC) y hallaron estirpes matadoras en 7 de los 28 géneros estudiados. Dichos autores establecieron cuatro grupos de factores matadores, según la diferente estabilidad de las toxinas frente a cambios de pH.

Más recientemente, Stumm et al (1977), han encontrado estirpes con fenotipo matador en diferentes habitats naturales (frutos, setas, suelos, restos de plantas), que muestran diferente

comportamiento en cuanto a producción de toxina e inmunidad.

Asimismo, Young y Yagiu (1978), han estudiado las interacciones producidas entre una amplia colección de levaduras, _ encontrando 10 fenotipos matadores diferentes.

Estirpes matadoras se han descrito también en leva duras de cerveza (Maule y Thomas, 1973), de saké (Inmamura et al, 1974) y de panadería (Philliskirk y Young, 1975). Por otra par te, estirpes pertenecientes al segundo sistema matador, se encuen- tran ampliamente difundidas entre levaduras de vinificación (Naumova y Naumov , 1973; Extremera y García Maíquez, observaciones no - publicadas).

8.- PAPEL BIOLOGICO, ORIGEN Y EVOLUCION DEL CARACTER MATADOR

No se conoce el papel biológico que pueda jugar el carácter matador de levaduras.

Sobre su origen y evolución sólo hay, asimismo, hi pótesis. Hay que destacar el hecho de que en el interior de las cé lulas matadoras se han encontrado partículas similares a virus que contienen ARN bicatenario, con la información genética suficiente _ para dirigir la síntesis de una toxina, y de su propia cápsida, y el equipo enzimático necesario para iniciar su ciclo replicativo. Esto puede inducirnos a pensar que ciertos virus y levaduras, mantenían en un momento dado, una relación hésped-parásito.

Quizá en alguna fase, los virus perdieron la capacidad de sintetizar de forma completa nuevos viriones infectantes y quedó como residuo, la producción de una sustancia tóxica para _ otras estirpes no infectadas. La posesión de esta capacidad, constituiría una clara ventaja ecológica que ha sido seleccionada por el proceso evolutivo.

OBJETO DEL TRABAJO

De lo expuesto en esta Introducción, se deduce que los plásmidos que condicionan la producción de toxina matadora del primer sistema, así como su naturaleza y control genético nuclear, han sido objeto de numerosos estudios y son, por tanto, bastante conocidos.

No ocurre igual con los plásmidos del segundo sistema matador descrito, sobre los que prácticamente se carece de conocimientos en lo referente a sus diversos tipos, localización, control genético nuclear, así como sus posibles interacciones con los plásmidos del primer sistema.

Es por ello que el trabajo que se expone en esta Memoria, tiene por objeto contribuir al esclarecimiento de algunos extremos relacionados con los puntos citados.

A tal fin, y tras realizar una serie de experiencias previas, encaminadas a caracterizar fenotípica y genotípicamente las estirpes utilizadas, se han estudiado las interacciones entre los determinantes nucleares y extranucleares responsables de la producción de la toxina matadora de ambos sistemas. Igualmente se ha llevado a cabo un estudio comparativo de los diversos tipos de plásmidos - ARN bicatenarios, presentes en estirpes de ambos sistemas con diversos fenotipos, estudio que se ha extendido a otras especies homotéticas del género Saccharomyces y, así como realizado las pruebas oportunas para comprobar si los ARNs del segundo sistema se encuentran encapsidados en partículas similares a virus (VLP), al igual que las del primero.

Finalmente, hemos estudiado los fenómenos de competición que se dan entre las estirpes de ambos sistemas matadores y entre éstas y las sensibles en diferentes condiciones de cultivo.

MATERIAL Y METODOS

1.- MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Para el desarrollo del presente trabajo se han utilizado las estirpes que a continuación se detallan, todas ellas pertenecientes a la especie Saccharomyces cerevisiae.

1.1.- Estirpes matadoras del primer sistema.

Todas las estirpes matadoras pertenecientes al primer sistema presentan el mismo fenotipo, designado $K_1^+R_1^+K_2^-R_2^-$. Se han utilizado las siguientes:

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Referencia</u>
K ₁ 1	α , <u>tyr</u> , <u>his</u> , [KIL-k ₁]	Dr. van Udem, Oeiras (Port.)	3971
K ₁ 6	<u>a</u> , <u>ade</u> , <u>lys</u> , [KIL-k ₁]	Nuestro Lab.	
K ₁ 8	<u>a</u> , <u>lys</u> , [KIL-k ₁]	Nuestro Lab.	

1.2.- Estirpes matadoras del segundo sistema

En el transcurso del presente trabajo, se han utilizado las siguientes estirpes matadoras del segundo sistema, cuyo fenotipo es, en todos los casos $K_1^-R_1^-K_2^+R_2^+$.

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Referencia</u>
K ₂ 1	<u>a</u> α , homotálica, prototrofa [KIL-k ₂]	Jerez	AB - 71
K ₂ 2	<u>a</u> α , homotálica, <u>leu</u> , [KIL-k ₂]	Extremera 1978	
K ₂ 3	<u>a</u> α , homotálica, <u>arg</u> , [KIL-k ₂]	idem	
K ₂ 4	<u>a</u> α , homotálica, <u>met</u> , [KIL-k ₂]	idem	
K ₂ 5	<u>a</u> α , homotálica, <u>lys</u> , [KIL-k ₂]	idem	
K ₂ 7	<u>a</u> α , homotálica, <u>thr</u> , <u>met</u> , [KIL-k ₂]	idem	
K ₂ 8	<u>a</u> α , homotálica, <u>ade</u> , [KIL-k ₂]	idem	
K ₂ 9	<u>a</u> α , homotálica, <u>ser</u> , [KIL-k ₂]	idem	
K ₂ 24	<u>a</u> α , homotálica, protótrofa [KIL-k ₂]	Dr. Naumov (URSS)	M437

1.3.- Estirpes neutrales y supresivas del primer sistema

El fenotipo de las estirpes neutrales se designa como $K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-$ y el de las supresivas como $K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-$. Se han utilizado las siguientes:

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Referencia</u>
N ₁ 1	α , <u>ade</u> [KIL-n]	Dr. Fink, Cornell (USA)	T57-D
X ₁	<u>a</u> , <u>his</u> , <u>ade</u> [KIL-s]	idem	T123-B -NK ₁
X ₂	<u>a</u> , <u>his</u> , <u>ade</u> [KIL-s]	idem	T123-B -NK ₂

1.4.- Otras estirpes pertenecientes al primer sistema

Se incluyen en este apartado los mutantes kex, mak, y pets. A continuación se detallan las estirpes empleadas.

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>		<u>Fenotipo</u>	<u>Procedencia</u>	<u>Referencia</u>
K ₁ ¹¹	α , <u>tyr</u> , <u>his</u> , <u>kex</u>	[KIL-k ₁]	K ₁ ^{-R₁+} K ₂ ^{-R₂-}	Extremera 1978	
S18	<u>a</u> , <u>ura</u> , <u>mak</u>	[KIL-o]	K ₁ ^{-R₁-} K ₂ ^{-R₂-}	Dr. Wickner, Bethesda (USA)	M176
S19	<u>a</u> , <u>his</u> , <u>lys</u> , <u>mak</u>	[KIL-o]	K ₁ ^{-R₁-} K ₂ ^{-R₂-}	idem	86
S21	α , <u>ade</u> , <u>lys</u> , <u>tyr</u> , <u>mak</u>	[KIL-o]	K ₁ ^{-R₁-} K ₂ ^{-R₂-}	idem	672
S22	α , <u>try</u> , <u>pets</u> ,	[KIL-o]	K ₁ ^{-R₁-} K ₂ ^{-R₂-}	idem	M189
S23	<u>a</u> , <u>ade</u> , <u>try</u> , <u>pets</u>	[KIL-o]	K ₁ ^{-R₁-} K ₂ ^{-R₂-}	idem	M190

1.5.- Estirpes sensibles

Las estirpes sensibles utilizadas en el presente trabajo, todas ellas con fenotipo K₁^{-R₁-} K₂^{-R₂-}, son las siguientes:

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo</u>		<u>Procedencia</u>	<u>Referencia</u>
S ₁	α , prototrofa	[KIL-o]	Dr. van Udem, Oeiras (Port)	3972
S12	<u>a</u> , <u>ade</u> , <u>lys</u>	[KIL-o]	Nuestro lab.	
S13	α , <u>try</u> , <u>his</u>	[KIL-o]	idem	
S14	α , <u>ade</u> , <u>lys</u>	[KIL-o]	idem	
S15	α , <u>his</u>	[KIL-o]	Dr. Fink, Cornell (USA)	x17/17

2.- MEDIOS DE CULTIVO

En este apartado se describe la composición de los medios de cultivo utilizados en el transcurso del presente trabajo. La preparación y el proceso de esterilización son idénticos para todos ellos.

2.1.- Medio de crecimiento y conservación (NG)

Se ha utilizado el medio semisintético de Lindegren et al (1958). Su composición es la siguiente:

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 destilada	1000 ml

Una vez pesados todos los productos, se añadió el agua destilada, agitando hasta conseguir una mezcla homogénea. El pH se ajustó entre 4 y 4.5. Tras repartir en tubos, la esterilización se llevó a cabo en autoclave a 117°C durante 20 minutos.

2.1.1- Medio NL

Su composición es idéntica a la del medio anterior, pero en lugar de glucosa contiene un 2% de lactato sódico. En este medio, los mutantes deficientes respiratorios son incapaces de crecer al no poder utilizar el lactato como fuente de carbono.

2.2.- Medios especiales

Los medios de cultivo que se incluyen en este apartado han sido utilizados para poner de manifiesto la producción de toxinas matadoras, así como para la obtención de células destinadas

a la extracción de los ARN de doble cadena y para el aislamiento de las partículas similares a virus (VLP).

2.2.1.- Medio YEPG-T

Este medio se ha usado para poner de manifiesto la producción de toxinas matadoras. Está basado en el descrito por Fink y Styles (1972).

Presenta la siguiente composición:

Extracto de levadura	10 g
Peptona	10 g
Glucosa	20 g
Tampón citrato-fosfato	
0.1 M a pH 4,5	1000 ml

La esterilización en autoclave se llevó a cabo durante 20 minutos a 117°C.

El correspondiente medio sólido lleva un 2.5% de agar.

2.2.2.- Medio YEPG-T-AM

La composición de este medio es idéntica a la del anterior, pero además lleva incorporado azul de metileno hasta una concentración final de 0,003%.

2.2.3.- Medio YPD

El medio YPD ha sido utilizado para cultivar las -
estirpes de las que posteriormente se extrajeron ARNs de doble ca-
dena. Su composición es la siguiente:

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
Glucosa	20 g
Agua destilada	1000 ml

Una vez disueltos los productos en agua destilada,
se ajustó el pH a 4,5 y se procedió a esterilizarlo en autoclave du-
rante 20 minutos a 117°C.

2.2.4.- Medio GYP

Este medio se ha utilizado en la extracción de las
partículas similares a virus (VLP). Presenta la siguiente composición:

Extracto de levadura	5 g
Peptona	10 g
Glucosa	20 g
Agua destilada	1000 ml

El método de preparación y esterilización es idéntico
al del medio anterior. Antes de esterilizarlo el pH se ajustó a 4,5.

2.3.- Medio de conjugación (MC)

Se ha utilizado para realizar cruces entre estirpes haploides. Es una modificación del medio de Fowell (1969) y su composición es la siguiente:

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

Se esterilizó en autoclave a 117°C durante 20 minutos.

El pH de este medio es de 5,5.

2.4.- Medios de esporulación

Para inducir la esporulación de estirpes diploides se han utilizado dos medios: el de preesporulación y el de esporulación. El primero de ellos es muy rico en glucosa con el fin de conseguir una masa abundante de células en óptimas condiciones fisiológicas, - mientras que el de esporulación propiamente dicho, muy pobre en - glucosa y con acetato potásico, está destinado a favorecer la formación de ascas.

2.4.1- Medio de preesporulación (MPE)

Es una modificación del descrito por Fowell (1969).

Presenta la siguiente composición:

Extracto de levadura	1 g
Glucosa	50 g
Agua destilada	1000 ml

La esterilización se llevó a cabo en autoclave a 117° durante 20 minutos. Previamente el pH se ajustó a 6,5.

2.4.2.- Medio de esporulación (ME)

Se ha empleado el medio de Rousseau y Halvorson (1969) cuya composición es la siguiente:

Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa	1 g
Acetato potásico	20 g
Agua destilada	1000 ml

Una vez disueltas las sustancias en agua destilada, el medio se esterilizó en autoclave a 117°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo y cuando la temperatura hubo descendido por debajo de 60°C, se añadió tetraciclina, a partir de una solución previamente esterilizada por filtración, hasta una concentración final de 20 µg/ml con el fin de evitar contaminaciones bacterianas.

Tanto el medio de preesporulación como el de esporulación llevan un 2,5% de agar en caso de ser preparados en forma sólida.

2.5.- Medios mínimos

Los medios mínimos presentan en su composición los nutrientes indispensables para permitir el crecimiento de las levaduras: un sustrato inerte, agar, una fuente de carbono, generalmente glucosa, y una solución base que contiene vitaminas y sales minerales.

Sólo las estirpes protótrofas pueden crecer en dichos medios, ya que son capaces de sintetizar todos los aminoácidos, bases púricas y pirimidínicas. No ocurre lo mismo con las estirpes auxótrofas y de ahí la necesidad de suplementar el medio mínimo con los requerimientos que presenten dichas estirpes para hacer posible su crecimiento.

2.5.1.- Solución madre de vitaminas y sales minerales

Esta solución contiene la totalidad de vitaminas y sales minerales necesarias para el crecimiento de las levaduras (Wickerham, 1946). Se preparó disolviendo 13.4 g de Bacto Yeast Nitrogen Base (Difco) en 100 ml de agua destilada y se esterilizó por filtración. Una vez estéril, la solución se guardó en refrigerador hasta su uso.

La concentración resultante es veinte veces la adecuada por lo que debe añadirse al medio en la proporción correspondiente cuando vaya a ser utilizado.

2.5.2.- Medio MG

Su composición es la siguiente:

Glucosa	2 g
Agar purificado (Difco)	2. 5 g
Solución madre de vitaminas y sales minerales	5 ml
Agua destilada	95 ml

Tras mezclar la glucosa y el agar en agua destilada, el medio se esterilizó a 117°C durante 20 minutos. Posteriormente se pasó a un baño a 50°C y cuando el medio se estabilizó a esta temperatura, se le añadió la cantidad adecuada de la solución madre de vitaminas y sales minerales. El medio se agitó suavemente para homogeneizarlo y se utilizó para llenar cajas de Petri o tubos de ensayo, según su uso.

El correspondiente medio líquido carece de agar.

2.5.3.- Medios mínimos suplementados

Los medios mínimos pueden ser suplementados con aminoácidos o con bases púricas y pirimidínicas, posibilitando de este modo el crecimiento de las estirpes auxótrofas para dichos requerimientos. Estos se adicionan al medio al mismo tiempo que la solución madre de vitaminas y sales minerales.

Los correspondiente requerimientos se disolvieron en agua destilada a una concentración de 2 mg/ml (excepto la solución de tirosina que se preparó a 1 mg/ml) y se esterilizaron por filtración.

La concentración final a la que se añadieron fue de 20 $\mu\text{g/ml}$, es decir, diluyendo 100 veces (o 50 veces en el caso de la tirosina).

3.- TECNICAS EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE LAS ESTIRPES UTILIZADAS

Las técnicas que a continuación se describen han sido aplicadas para comprobar, o averiguar en su caso, los fenotipos y genotipos de las estirpes, como paso previo a su utilización.

3.1.- Determinación de fenotipos con respecto al carácter matador

A la hora de determinar los fenotipos de las estirpes con respecto al carácter matador es necesario, de un lado comprobar la producción de toxina matadora y de otro, ver si la estirpe en cuestión es resistente o no a la acción de la misma.

3.1.1.- Determinación de la producción de toxina matadora

La técnica utilizada está basada en la descrita por Fink y Styles (1972).

Sobre cajas de Petri que contenían medio YEPG-T-AM, se colocaron con el asa de platino, muestras de las estirpes en cuestión y tras 14 - 18 horas de incubación a 28° las cajas fueron pulverizadas con una suspensión salina de una estirpe sensible adecuada. Posteriormente se mantuvieron durante 48 horas a 22°.

Si alguna de las estirpes presenta fenotipo matador, durante el período de incubación a 22° producirá la toxina matadora

y ésta por difusión en el medio, matará a las células sensibles de la capa base. Como esta muerte no va seguida de lisis, las células muertas incorporarán el azul de metileno del medio apareciendo a las 48 horas un halo de inhibición del crecimiento bordeado de color azul alrededor de las colonias productoras de toxina.

Las estirpes no productoras de toxina no presentaran halo a su alrededor.

3.1.2.- Determinación de la resistencia de las estirpes frente a la acción de la toxina matadora

Se ha utilizado una modificación de la técnica descrita por Bevan y Somers (1969) y Somers y Bevan (1969).

Las estirpes a analizar se resuspendieron en solución salina estéril y con 0.1 ml de dichas suspensiones se inocularon tubos de ensayo que contenían 3 ml de medio YEPG-T-AM previamente fundido y mantenido en un baño a 45°. Los tubos se agitaron suavemente para mezclar de forma homogénea y se vertieron rápidamente sobre cajas de Petri que contenían el mismo medio, procurando que éstas se encontraran completamente planas para que el medio quedase uniformemente repartido sobre la superficie de la caja. Transcurridos 10-15 minutos, se depositaron sobre ella muestras de las estirpes matadoras frente a las que se deseaba conocer el comportamiento de la capa base y tras 48 horas de incubación a 22° se observaron los resultados. Si la capa base es sensible, aparecerá un halo azul alrededor de las estirpes matadoras; por el contrario, si la capa base es resistente el halo no aparecerá.

Es de hacer notar que las estirpes de tipo de conjugación α , producen una sustancia de naturaleza proteínica (factor α) que inhibe el crecimiento de las estirpes de tipo de conjugación a (Duntze et al 1970, 1973). Esto podría inducir a error en el caso de que la capa base fuese resistente, ya que si la estirpe de dicha capa es de tipo de conjugación a y la matadora colocada sobre ellas es α , puede producirse una inhibición del crecimiento alrededor de la muestra, motivada por la producción y secreción del factor α , sin embargo en este caso no se observan halos azules de muerte celular, sino pequeños halos de inhibición del crecimiento. En cualquier caso y para evitar errores se han utilizado en este trabajo estirpes matadoras a o diploides.

3.2.- Comprobación de los genotipos de las estirpes empleadas

Para averiguar el carácter protótrofo o auxótrofo de las estirpes estudiadas, se inocularon con las mismas, utilizando un asa de platino, cajas de Petri con medio MG; las estirpes que crecieron tras 48 horas de incubación a 28° se consideraron protótrofas y auxótrofas las que no crecieron.

Los marcadores de las estirpes auxótrofas se averiguaron inoculando con ellas cajas de Petri que contenían medio MG suplementado con los requerimientos adecuados. Las estirpes auxótrofas solo crecen cuando se encuentran presentes todos los nutrientes que necesitan.

En cuanto al carácter diploide o haploide de las estirpes, se determinó basándonos en la capacidad que presentan las estirpes diploides de formar ascas que contienen un número variable de ascosporas, generalmente de 2 a 4. Para inducir la formación de ascas se siguieron las técnicas que se describen en los apartados 5.1 y 5.2 de este capítulo de Material y Métodos.

Al cabo de 5 días se observaron los cultivos al microscopio; la presencia de ascas indicó que se trataba de una estirpe diploide mientras que su ausencia tras 10 días de incubación indicó que la estirpe era haploide.

4.- TECNICAS EMPLEADAS EN LA OBTENCION DE ESTIRPES DIPLOIDES MEDIANTE CRUCES ENTRE HAPLOIDES

Para realizar un cruce entre dos estirpes haploides y obtener un cigoto diploide, es preciso que ambas estirpes presenten diferente signo de conjugación (una ha de ser \underline{a} y otra $\underline{\alpha}$) y además es necesario seleccionar estas estirpes de forma que el cigoto resultante sea fácilmente diferenciable de las estirpes progenitoras. Por ello el cruce debe realizarse entre dos estirpes haploides que se diferencien, al menos en uno o dos marcadores, siendo más adecuadas éstas últimas ya que así disminuye la posibilidad de reversión al tipo silvestre.

4.1.- Técnica del cruce

Todos los cruces se han realizado en medio líquido. Las estirpes que queríamos cruzar se cultivaron en medio NG líquido durante 24 horas a 28° en agitación, los cultivos una vez crecidos, se centrifugaron a baja velocidad y las células tras ser lavadas se resuspendieron en 5 ml de solución salina estéril. Las suspensiones se mantuvieron en reposo durante una noche para que las células que se encontraban en división terminasen el proceso.

Posteriormente se añadió 1 ml de cada una de ellas a un tubo con 5 ml de medio de conjugación (MC), se centrifugó a baja velocidad y sin desechar el sobrenadante, el sedimento se dejó en reposo durante 3-5 horas a temperatura ambiente. Durante este tiempo se produce el cruce entre las células con signo de conjugación opuesto, originándose los correspondientes cigotos.

4.2.- Aislamiento de los cigotos

Transcurridas 3-5 horas, los cultivos se centrifugaron y tras lavar las células con solución salina estéril tres veces consecutivas, se resuspendieron en 5 ml de la misma. A partir de esta suspensión y de diluciones sucesivas se inocularon con 0.1 ml cajas de Petri que contenían medio MG o MG suplementado con los requerimientos comunes a las dos estirpes haploides.

Las cajas de Petri se mantuvieron en incubación durante 48 horas a 28° y cuando las colonias derivadas de los presuntos cigotos fueron visibles, se pasaron con un hilo de platino

a tubos con medio NG. Para confirmar que el cultivo resultante -- provenía de cigotos y no de reversiones de las estirpes progenitoras al tipo silvestre, se comprobó el carácter diploide de las células según las técnicas descritas anteriormente.

5.- TECNICAS EMPLEADAS EN LA OBTENCION Y AISLAMIENTO DE ASCOSPORAS HAPLOIDES

Hemos seguido la técnica descrita por Rousseau y Halvorson (1969). El proceso de obtención y aislamiento de ascosporas haploides podemos dividirlo en las siguientes fases: preesporulación, esporulación, rotura de ascas y aislamiento de ascosporas. Cada una de ellas se describe a continuación.

5.1.- Preesporulación

Los cigotos objeto del ensayo se cultivaron en tubos con 5 ml de medio preesporulante (MPE) durante 48-72 horas a 28° con el fin de obtener una gran masa celular en óptimas condiciones fisiológicas.

5.2.- Esporulación

Una vez crecidos, los cultivos se centrifugaron a baja velocidad. Tras desechar el sobrenadante, la masa celular fue resuspendida en 5 ml de medio esporulante (ME) y se mantuvo en agitación a 28° durante, al menos, 5 días. A partir de este momento

puede observarse al microscopio la formación de ascas.

Se consideró que el cultivo se hallaba en condiciones óptimas para obtener ascosporas haploides, cuando al menos un 50 - 60 % de las células vegetativas se habían transformado en ascas.

5.3.- Rotura de ascas

Como paso previo a la obtención de ascosporas es preciso conseguir un reblandecimiento de las paredes de las ascas. Para ello los cultivos esporulados se centrifugaron y los sedimentos se resuspendieron en 5 ml de tampón citrato fosfato 0.02 M a pH 7,2 al que se adicionó pronasa hasta una concentración final de 5 mg/ml. Tras incubar en agitación a 28° durante 24 horas, las ascas están en condiciones de ser rotas. La rotura de las mismas se llevó a cabo mediante micromanipulación en un micromanipulador Leitz-Wetzlar.

5.3.1- Obtención de microagujas

Para iniciar la rotura de ascas es preciso disponer de microagujas con un grosor adecuado y de punta curva ya que la aproximación de la misma a las ascas se lleva a cabo desde abajo.

Las que hemos utilizado se han obtenido a partir - de capilares de vidrio de aproximadamente 1 mm de diámetro exterior con ayuda de un micromechero (un mechero Bunsen en el cual se ha sustituido el tubo de la llama por una aguja).

5.3.2.- Preparación de la cámara húmeda para el aislamiento de ascosporas

La cámara que hemos utilizado es de cuarzo y presenta una altura interior de 5 mm, antes de usarla se esterilizó - mediante exposición a la luz ultravioleta.

Sobre esta cámara se colocaron unos cubreobjetos de 35 x 30 mm. también esterilizados por el mismo procedimiento.

Sobre los cubreobjetos se había depositado previamente una capa de medio MG y sobre un extremo de esta fina lámina se colocó con el asa de platino una muestra de las ascas a romper.

La cámara actúa a modo de cámara húmeda evitando así la desecación de la película durante el proceso de micromanipulación.

5.3.3- Disecación de las ascas

Una vez preparada la cámara húmeda se colocó sobre la platina del micromanipulador y se procedió a enfocar la suspensión de ascas con el objetivo de 10 aumentos.

Con ayuda de la microaguja, que se mueve por indicación de los mandos del aparato, se seleccionó un asca de la suspensión y mediante suaves golpes se procedió a la rotura de su pared. Una vez liberadas y separadas las 4 ascosporas se inició, siempre con ayuda de la microaguja, el traslado de las mismas sobre la película de medio, colocándolas en línea recta y a una dis-

tancia adecuada (5 mm) para facilitar su posterior aislamiento.

5.3.4.- Aislamiento de ascosporas

Por el procedimiento descrito anteriormente se suelen romper sobre cada cubreobjetos 4 ó 5 ascas. Una vez concluida la operación, la película de medio fue cuidadosamente separada del cubreobjetos y depositada con las ascosporas hacia arriba sobre una caja de Petri que contenía medio NG, extremando en todo momento las precauciones para evitar una posible contaminación. Tras un período de incubación de 48 horas a 28º, las colonias originadas por las ascosporas se tomaron con el hilo de picadura y se cultivaron en medio NG líquido.

6.- TECNICAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LOS DETERMINANTES GENETICOS EXTRANUCLEARES RESPONSABLES DE LOS FENOTIPOS MATADOR, NEUTRAL y SENSIBLE.

El estudio de los determinantes responsables de los fenotipos matador, neutral y sensible, comprende la extracción de los ARN de doble cadena y la electroforesis de los mismos en geles de poliacrilamida.

6.1.- Extracción de los ARN de doble cadena

La técnica de extracción está basada en la descrita por Fink (J. Conde, comunicación personal), ligeramente modificada por nosotros.

6.1.1.- Producción , recolección y pretratamiento de la biomasa

Las estirpes seleccionadas se cultivaron durante - 24 horas en tubos con 5 ml de medio YPD. Con dichos cultivos se inocularon matraces que contenían 80 ml del mismo medio que se - mantuvieron en agitación a 28° durante 18 horas. Posteriormente las células fueron recogidas por centrifugación a baja velocidad y resuspendidas en 40 ml de EDTA 0.05 M, agitándose las suspensiones durante cinco minutos a temperatura ambiente.

Las suspensiones se centrifugaron nuevamente y el sedimento se resuspendió en 20 ml de tampón Tris-sulfúrico 0.05 M, pH 9, adicionando 0.5 ml de β -mercaptoetanol. Una vez cerrados los tubos (los vapores del β -mercaptoetanol son tóxicos) la mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos con agita-- ción ocasional, centrifugando a continuación para obtener la biomasa.

Los tubos conteniendo la biomasa se llevaron al con gelador a -18° y una vez congeladas las células, se sacaron y se - dejaron descongelar a temperatura ambiente; con ello se consiguió la rotura celular.

6.1.2.- Extracción del ARN

Una vez descongeladas, las muestras se resuspen- dieron en 4 ml de ClNa 0.1 M, Tris 0.01 M, EDTA 0.01 M y So- dio Dodecil Sulfato (SDS) al 2%, agitando hasta conseguir una mezcla homogénea. La desproteinización se llevó a cabo añadiendo un

volumen igual de fenol, equilibrado frente a la mezcla anterior, en proporción 3:1, y agitando manualmente durante 1 hora a temperatura ambiente.

Seguidamente las mezclas se centrifugaron durante 45 minutos para conseguir la separación de fases. La superior o acuosa, que es la que contiene el ARN, se separó mediante una pipeta invertida a la que se había acoplado un tubo de teflón y fue añadido un volumen doble de etanol frío para precipitar los ácidos nucleicos. La mezcla se mantuvo en el congelador durante 15 minutos para consolidar el precipitado y posteriormente se centrifugó a 4° a baja velocidad durante 30 minutos. El precipitado, una vez seco, se resuspendió en 1 ml de Solución Salina Citrato (ClNa 0.15M Citrato Sódico 0.015 M, pH 7).

6.1.3.- Purificación del ARN

Para eliminar el ARN ribosómico se añadió un volumen igual de Cloruro de Litio 4M. La mezcla se dejó en reposo a 4° durante una noche y transcurrido éste tiempo se centrifugó en frío a baja velocidad durante una hora. Se recogió el sobrenadante y se añadió un volumen doble de etanol frío consiguiéndose así la precipitación de los ARN, que fueron posteriormente recogidos por nueva centrifugación. El precipitado final, una vez seco, se resuspendió en una mezcla al 50% de glicerina y tampón Tris 0.2 M, Acetato Sódico 0.1 M EDTA 0.005 M a pH 7,8 en proporción de 0.2 ml por gramo de células.

De este modo las muestras quedaron preparadas para ser sometidas a electroforesis.

6.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

El análisis de los ARN se ha llevado a cabo mediante electroforesis en placa, utilizando un aparato de Bio- Rad.

6.2.1.- Preparación de los geles

Se han empleado geles de acrilamida al 5%. Se prepararon utilizando cantidades de acrilamida y de N-N-metil bisacrilamida en proporción de 40:1. Las cantidades utilizadas han sido -- las siguientes:

Acrilamida	3.2 g
N-N-metil bisacrilamida	0.08 g
Tampón Tris 0.2 M, Acetato Sódico 0.1 M, EDTA 0.05 M, pH 7,8	65.6 ml

Las sustancias, una vez disueltas en el tampón, se filtraron por un papel de filtro normal y la mezcla se desgasó mediante succión por trompa de agua.

Posteriormente y procurando evitar la formación de burbujas, se añadieron los catalizadores de la gelificación. Hemos utilizado como tales persulfato amónico al 7% y β -dimetilaminopropionitrilo; el volumen añadido fue de 2.6 y 0.15 ml respectivamente.

A continuación y con ayuda de una pipeta se procedió a llenar la placa formadora de geles. Esta consiste en dos placas de vidrio separadas entre sí por dos espaciadores de 0.3 mm de grosor. El emparedado de cristal va montado sobre un núcleo central y sujeto a él mediante seis pinzas, tres a cada lado. El borde inferior del emparedado va ajustado a su vez sobre una barra soporte y entre ambos va colocada una goma de teflón para que el ajuste sea perfecto.

La placa formadora de gel se llenó hasta una altura conveniente y a continuación se introdujo un peine formador de 10 pocillos, terminándose la operación de llenado con una pipeta Pasteur. El gel se cubrió finalmente con una capa de Sodio Dodecil Sulfato (Sigma) al 0.2 % en agua destilada procurando no distorsionarlo, y el conjunto se dejó gelificar a temperatura ambiente sobre una plataforma nivelada.

6.2.2.- Desarrollo del experimento

Una vez gelificada la solución de poliacrilamida se retiró el peine formador de pocillos y se procedió a eliminar los catalizadores de gelificación realizando una preelectroforesis sin muestra. Para ello el núcleo central, que lleva adosado el gel, se introdujo en una cubeta que completa el aparato de electroforesis, llenándose las cámaras superior e inferior con el mismo tampón utilizado en la confección del gel. La preelectroforesis se realizó a 10 mA durante 1 hora.

Una vez equilibrado el gel se desechó el tampón - utilizado y los pocillos se secaron con tiras de papel de filtro, depositando a continuación en cada uno de ellos 50 μ l de la muestra adecuada, que se cubrieron cuidadosamente con tampón para evitar distorsionar el gradiente creado por la glicerina que acompaña la muestra. Las cámaras superior e inferior se llenaron con el volumen adecuado de tampón y se procedió a desarrollar el experimento haciendo pasar durante la primera hora una intensidad de corriente de 10 mA con objeto de conseguir la penetración lenta y homogénea de las muestras. Después la intensidad se elevó a 40 mA, manteniéndose el voltaje constante durante 21 horas.

6.2.3.- Fijación, tinción y destinción de los geles

Una vez finalizado el experimento y desconectada la fuente de alimentación, el gel fue extraído del emparedado para fijarlo y teñirlo.

La extracción del gel se realizó inyectando agua destilada entre él y las placas de vidrio mediante una jeringa con aguja no biselada y se introdujo en un recipiente adecuado que contenía la solución fijadora (Acido Acético 1 M) dejándola al menos durante una hora. Transcurrido este tiempo se eliminó la solución fijadora y se procedió a teñir el gel adicionando azul de metileno al 0.2 % en tampón Acético-Acetato Sódico 0.4 M a pH 4,5: el tiempo de tinción fue de 15-20 minutos.

Cuando el gel se hubo teñido se eliminó el colorante y se añadió agua destilada que fue renovada cuantas veces fue necesario hasta desteñir el fondo por completo.

7.- TECNICAS EMPLEADAS EN LA OBTENCION Y OBSERVACION DE LAS PARTICULAS SIMILARES A VIRUS (VLP)

Se ha seguido la técnica de Adler et al (1976) modificada por nosotros.

7.1.- Extracción de las partículas similares a virus (VLP)

Las estirpes adecuadas se cultivaron en 3 litros de medio GYP durante cinco días a 25° en reposo.

Los cultivos fueron centrifugados y las células pesadas, resuspendiéndolas a continuación en tampón fosfato 0.03 M con Cl Na 0.15 M a pH 7,5 en proporción de 1 ml de tampón por cada gramo de células. A la suspensión celular se añadió un volumen doble de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro, agitando con una varilla de vidrio hasta conseguir una mezcla homogénea. Dicha mezcla fue sometida a una vibración de 4600 r.p.m. durante 30 minutos en un homogeneizador celular Edmund Bühler. Durante este tiempo, el homogeneizador se mantuvo refrigerado haciendo pasar a su través una corriente de agua a 0°.

El homogeneizado resultante se diluyó a la mitad en el mismo tampón, hecho que se llevó a cabo durante el proceso de separación y lavado de las perlas de vidrio. La separación se rea-

lizó por filtración sobre vacío en un embudo de placa porosa y el extracto libre de perlas fue sometido a centrifugaciones sucesivas de 3.000xg, 5.000xg, 10.000xg y 15.000xg para sedimentar células - intactas y paredes celulares, membranas, mitocondrias y otros orgá- nulos de similar densidad respectivamente.

En todos los casos se recogieron los sobrenadantes, y el final se centrifugó a 74.000xg durante dos horas a 4° a tra- vés de una capa de ClCs de densidad 1.26 g/cm³. El sedimento ob- tenido fue resuspendido en 4-5 ml del mismo tampón y nuevamente centrifugado a 15.000xg desechándose en esta ocasión el sedimento. El sobrenadante se volvió a centrifugar a través de ClCs durante dos horas a 74.000xg. Finalmente, el sedimento obtenido, que contie- ne las VLP, se resuspendió en 0.5 ml de tampón fosfato 0.03 M - ClNa 0.15 M a pH 7,5, quedando en condiciones de ser observadas al microscopio electrónico.

7.2.- Examen al microscopio electrónico de las VLP

Una vez extraídas las VLP, se procedió a su examen al microscopio electrónico, siguiendo para ello las técnicas usuales de preparación y tinción de las muestras.

7.2.1.- Preparación de las muestras

La preparación de las muestras se llevó a cabo de- positando una gota de la suspensión de partículas sobre rejillas de cobre de 300-400 mallas que previamente se habían recubierto de una película de formvar-carbón; el exceso de muestra fué retirado

con ayuda de un papel de filtro y las rejillas se dejaron secar al aire dentro de una caja de Petri para protegerlas del polvo.

7.2.2.- Tinción de las muestras

La tinción fue realizada depositando sobre las rejillas una solución de fosfotungstato potásico al 2% en agua destilada a pH 6,5 previamente filtrada por Millipore . El exceso de solución se retiró rápidamente con ayuda de un papel de filtro repitiendo la operación 2-3 veces consecutivas, y dejando finalmente una fina película de ácido que se dejó secar al aire.

7.2.3.- Observación de las rejillas

La observación de las rejillas se llevó a cabo en un microscopio electrónico Phillips EM-300.

EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

1.- EXPERIENCIAS PRELIMINARES

Antes de iniciar el estudio sobre los plásmidos matadores presentes en estirpes de Saccharomyces cerevisiae, se realizaron una serie de experiencias preliminares para comprobar, tanto los fenotipos matador, neutral o sensible, como los genotipos de las estirpes que iban a ser objeto de nuestro trabajo.

1.1.- Caracterización de los fenotipos de las estirpes utilizadas

Mediante la técnica descrita en el apartado 3.1 del capítulo de Material y Métodos, se comprobaron los fenotipos de las estirpes que se detallan en el apartado 1 del mismo capítulo, confirmando la existencia de estirpes matadoras ($K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$) y neutrales ($K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-$) del primer sistema, matadoras del segundo ($K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$) y sensibles ($K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-$).

1.2.- Comprobación de los genotipos de las estirpes empleadas

El carácter auxótrofo o protótrofo de las estirpes utilizadas, previamente descritas, así como su haploidía o diploidía se estudiaron siguiendo las técnicas que se detallan en el apartado 3.2 del capítulo de Material y Métodos. Dichos caracteres se confirmaron en todos los casos.

Puede ocurrir, que estirpes que presentan el mismo fenotipo con respecto al carácter matador, tengan distinto genotipo. Tal es el caso de las estirpes neutrales y de los mutantes kex; am ambos son fenotípicamente $K_1^- R_1^+$. Igual ocurre con las estirpes sensi-

bles, los mutantes mak y las estirpes supresivas, que fenotípica-- mente son K^-R^- . Sin embargo, al cruzarlas con otras estirpes haploides y analizar los fenotipos de los cigotos y de las ascosporas resultantes, se obtienen diferentes segregaciones. Al cruzar una estirpe de fenotipo sensible (K^-R^-) con otra estirpe de fenotipo matador (K^+R^+), resulta un cigoto con fenotipo matador (K^+R^+) y las cuatro ascosporas presentan también el mismo fenotipo (K^+R^+); en cambio, si la estirpe de fenotipo sensible es un mutante mak, al cruzarla con la matadora nos aparecerá un cigoto con fenotipo matador (K^+R^+) y las esporas serán, fenotípicamente, dos matadoras (K^+R^+) y dos sensibles (K^-R^-).

En el caso de que la estirpe con fenotipo sensible fuese supresiva, al cruzarla con una estirpe matadora, se originaría un cigoto con fenotipo sensible y las ascosporas resultantes serían también sensibles.

Para comprobar lo expuesto anteriormente, se ha llevado a cabo un análisis de tétradas procedentes de cruces entre estirpes que contienen el plásmido $[KIL-k]$ y diversos mutantes del primer sistema matador. Los resultados obtenidos que se muestran en la tabla 1, permitieron comprobar, o averiguar en su caso, los genotipos de las estirpes de partida.

Igualmente, estos análisis han sido necesarios como paso previo para el estudio de las interacciones entre los genes nucleares y los plásmidos de ambos sistemas matadores, y pos

Tabla 1 .- Estudio de los fenotipos de las ascosporas procedentes de cruces entre estirpes que contienen el plásmido $[KIL-k_1]$ y diversas mutantes del primer sistema matador.

Cruce	Tipo	Fenotipo cigoto	Fenotipo ascosporas	Nº de ascas analizadas
$K_1 1 \times S 7$	$[KIL-k_1] \times [KIL-o]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 0$	8
$K_1 1 \times S 12$	$[KIL-k_1] \times [KIL-o]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 0$	7
$K_1 8 \times N_1 1$	$[KIL-K_1] \times [KIL-n]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 0$	4
$K_1 16 \times N_1 6$	$[KIL-k_1] \times [KIL-n]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 0$	3
$K_1 1 \times X 1$	$[KIL-k_1] \times [KIL-s]$	$K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-) : 0$	4
$K_1 1 \times X 2$	$[KIL-k_1] \times [KIL-s]$	$K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-) : 0$	4
$K_1 6 \times K_1 11$	$[KIL-k_1] \times \underline{kex} [KIL-k_1]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-)$	3
$K_1 1 \times K_1 14$	$[KIL-k_1] \times \underline{kex} [KIL-k_1]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-)$	5
$K_1 9 \times S 19$	$[KIL-k_1] \times \underline{mak} [KIL-o]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-)$	4
$K_1 7 \times S 21$	$[KIL-k_1] \times \underline{mak} [KIL-o]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-)$	4
$K_1 6 \times S 22$	$[KIL-k_1] \times \underline{pets} [KIL-o]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-)$	4
$K_1 1 \times S 23$	$[KIL-k_1] \times \underline{pets} [KIL-o]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-)$	5

teriormente serán comparados con los obtenidos del análisis de tetradas procedentes de cruces entre estirpes que contienen el plásmido matador del segundo sistema y las estirpes mutantes del primero.

2.- TRANSFERENCIA DE LA CAPACIDAD DE PRODUCIR LA TOXINA MATADORA DEL SEGUNDO SISTEMA A ESTIRPES HETEROTALICAS

Como se ha indicado en varias ocasiones, todas las estirpes matadoras del segundo sistema, aisladas de hábitats naturales, son diploides y presentan la particularidad de ser homotálicas. Esto supone un gran inconveniente a la hora de realizar estudios genéticos, ya que al cruzar dichas estirpes con otras estirpes haploides se originan cigotos triploides con el consiguiente problema para analizar la herencia de un determinado carácter.

Con el fin de paliar esta dificultad, antes de iniciar los estudios genéticos, se procedió a transferir la capacidad de producir este tipo de toxina matadora a estirpes heterotálicas. Para ello, las estirpes K_2^2 , K_2^8 y K_2^4 , diploides, homotálicas y productoras de YKT_2 , fueron sometidas a un proceso de esporulación según la técnica que se describe en los apartados 5.1 y 5.2 del capítulo anterior. Los cultivos fueron observados al microscopio regularmente para comprobar la formación de ascas y cuando el porcentaje de las mismas fué elevado (80 - 90 %) se centrifugaron.

El sedimento fue resuspendido en 5 ml de tampón citrato fosfato 0,02 M a pH 7, que contenía pronasa a una concentración de 10 mg/ml.

Tras 24 horas de incubación a 28° en agitación, se añadió a cada tubo 0,1 ml de Tween 20, manteniéndolos durante 24 horas en iguales condiciones. La adición de pronasa y Tween 20 tiene como finalidad el reblandecimiento y rotura de las paredes de las ascas, liberándose de este modo la mayor parte de las ascosporas, hecho que fue comprobado observando los cultivos al microscopio.

Una vez conseguida la liberación masiva de las ascosporas, los cultivos se centrifugaron y se lavaron con solución salina; los sedimentos finales se resuspendieron en 5ml de solución salina y se dejaron en reposo durante una noche a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se realizaron cruces entre estas ascosporas homotáticas procedentes de K₂2, K₂8 y K₂4 y las estirpes sensibles S12 y S13 según la técnica que se describe en el apartado 4 del capítulo de Material y Métodos. Los cigotos, una vez crecidos se aislaron en tubos con medio NG, analizándose posteriormente sus fenotipos con respecto al carácter matador por la técnica previamente descrita. Todos los cigotos obtenidos producían el YKT₂.

Los cigotos se hicieron esporular en los medios adecuados y posteriormente se procedió a la disección de las ascas mediante micromanipulación (Apartado 5.3 del capítulo de Material y

Métodos). Transcurridas 48 horas, las ascosporas fueron aisladas a tubos con medio NG líquido y comprobados sus fenotipos con respecto al carácter matador. La tabla 2 muestra los cruces realizados así como los fenotipos de los cigotos y de las ascosporas.

El carácter haploide y los marcadores auxotróficos de las ascosporas, se comprobaron mediante las técnicas descritas en el apartado 3.2 del capítulo correspondiente. Se desecharon las diploides y las protótrofas (las estirpes protótrofas no son aptas para la realización de cruces), las siete restantes se cruzaron con estirpes \underline{a} y $\underline{\alpha}$ para averiguar su tipo sexual.

En la tabla 3 se muestran las siete ascosporas seleccionadas como estirpes heterotálicas con sus correspondientes marcadores, signos de conjugación y procedencia.

Las siete ascosporas produjeron, como ha sido indicado, una toxina matadora que en principio fue considerada como la típica YKT_2 producida por la estirpe K_21 , ya que al igual que la obtenida de las estirpes homotálicas parentales, ejercía su acción matadora sobre las estirpes del primer sistema, mientras que no afectaba a la K_21 . No obstante, en experiencias posteriores, se pudo comprobar que las siete estirpes heterotálicas aisladas se comportaban como sensibles frente a la estirpe K_21 .

Este hecho, unido a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio por Extremera (1978) en los cuales, el YKT_2 obtenido de la estirpe K_21 , al someterlo a filtración por Sephadex

Tabla 2 .- Estudio de los fenotipos de las ascosporas procedentes de cruces entre estirpes matadoras homotálicas esporuladas del segundo sistema y sensibles.

Cruce	Fenotipo cigotos	Fenotipo ascosporas	Nº de Ascas analizadas
$K_2^2 \times S12$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	4 ($K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$) : 0	6
$K_2^2 \times S13$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	4 ($K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$) : 0	5
$K_2^8 \times S12$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	4 ($K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$) : 0	6
$K_2^8 \times S13$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	4 ($K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$) : 0	7
$K_2^4 \times S12$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	4 ($K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$) : 0	5
$K_2^4 \times S13$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	4 ($K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$) : 0	5

Tabla 3 .- Estirpes matadoras heterotáticas del segundo sistema.

Estirpe	Tipo sexual y marcadores	Cruce del que proceden
K ₂ 11	α , <u>arg</u> , <u>ade</u>	K ₂ 8 x S12
K ₂ 12	α , <u>ade</u>	K ₂ 8 x S12
K ₂ 13	<u>a</u> , <u>arg</u>	K ₂ 8 x S13
K ₂ 14	α , <u>try</u> , <u>his</u>	K ₂ 4 x S13
K ₂ 15	α , <u>lys</u> , <u>ade</u> , <u>met</u>	K ₂ 4 x S12
K ₂ 16	<u>a</u> , <u>met</u> , <u>his</u>	K ₂ 4 x S13
K ₂ 17	α , <u>met</u> , <u>his</u>	K ₂ 4 x S13

G-200 presentaba dos picos o fracciones activas, nos llevó a pensar que la toxina producida por las estirpes heterotáticas y la producida por la estirpe $K_2 1$, presentaban distinta especificidad.

Para esclarecer este punto, se realizaron experiencias dirigidas a comprobar la resistencia de las siete estirpes seleccionadas y el efecto de su toxina, frente a estirpes matadoras del primer sistema, matadoras homotáticas del segundo, sensibles y frente a las propias estirpes heterotáticas.

En las tablas 4 y 5 se muestran los resultados obtenidos. Como puede comprobarse, las siete estirpes heterotáticas presentan igual especificidad frente a las estirpes matadoras del primer sistema, las matadoras homotáticas del segundo y frente a las estirpes sensibles, pero de acuerdo con el comportamiento de cada una de las siete frente a las demás heterotáticas, se pueden agrupar en dos lotes diferentes, uno de ellos formado por las estirpes $K_2 11$, $K_2 12$ y $K_2 13$ y el otro, formado por las $K_2 14$, $K_2 15$, $K_2 16$ y $K_2 17$. Entre las estirpes de ambos grupos no existe inmunidad cruzada.

De estos resultados se deduce que la toxina matadora producida por las estirpes $K_2 11$, $K_2 12$ y $K_2 13$ es diferente de la producida por las estirpes $K_2 14$, $K_2 15$, $K_2 16$ y $K_2 17$. Ambas pertenecen al segundo sistema y las hemos denominado YKT_{2A} e YKT_{2B} respectivamente.

Como resumen de todas las experiencias anteriores

Tabla 4.- Determinación de las toxinas producidas por las estirpes matadoras heterotáticas del segundo sistema.

Muestras de las estirpes	Pulverizadas con						Tipo de toxina
	K ₁ 1	K ₂ 1	K ₂ 24	K ₂ 11	K ₂ 15	S15	
K ₂ 11	+	-	+	-	+	+	YKT _{2A}
K ₂ 12	+	-	+	-	+	+	YKT _{2A}
K ₂ 13	+	-	+	-	+	+	YKT _{2A}
K ₂ 14	+	-	-	+	-	+	YKT _{2B}
K ₂ 15	+	-	-	+	-	+	YKT _{2B}
K ₂ 16	+	-	-	+	-	+	YKT _{2B}
K ₂ 17	+	-	-	+	-	+	YKT _{2B}

+ : Halo de inhibición del crecimiento y muerte.

- : No halo.

Tabla 5 .- Resistencia de las estirpes heterotáticas seleccionadas frente a las toxinas producidas por estirpes matadoras de ambos sistemas.

Muestras de las estirpes	Tipo de toxina	Pulverizadas con						
		K ₂ 11	K ₂ 12	K ₂ 13	K ₂ 14	K ₂ 15	K ₂ 16	K ₂ 17
K ₁ 6	YKT ₁	+	+	+	+	+	+	+
K ₂ 1	YKT _{2A} YKT _{2B}	+	+	+	+	+	+	+
K ₂ 13	YKT _{2A}	-	-	-	+	+	+	+
K ₂ 16	YKT _{2B}	+	+	+	-	-	-	-
K ₂ 24	YKT _{2B}	+	+	+	-	-	-	-
S1	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Halo de inhibición del crecimiento y muerte.

- : No halo.

en la tabla 6 se muestran las estirpes seleccionadas con sus corres-
pondientes genotipos, fenotipos y procedencia.

En las tablas 3 y 6 , puede verse que , mientras -
que la K_2^{11} , K_2^{12} y K_2^{13} proceden de la estirpe homotática K_2^8 ,
la K_2^{14} , K_2^{15} , K_2^{16} y K_2^{17} proceden de otra homotática, la K_2^4 .
Basándonos en ésto, se pensó que las estirpes parentales -podrían
producir también dos toxinas matadoras diferentes.

Para comprobar esta hipótesis, los fenotipos de las
estirpes matadoras homotáticas fueron analizados por el mismo pro-
cedimiento utilizado para las estirpes heterotáticas. Como puede -
verse en las tablas 7 y 8, al igual que ocurría con las estirpes -
matadoras heterotáticas, las homotáticas también producen dos tipos
diferentes de YKT_2 , algunas estirpes solo uno , y otras ambos tipos.

3.- ESTUDIO MEDIANTE CRUCES DE LAS INTERACCIONES EN- TRE LOS DETERMINANTES NUCLEARES Y EXTRANUCLEARES RESPONSABLES DE LA PRODUCCION DE LA TOXINA MATA- DORA EN AMBOS SISTEMAS

Este estudio se ha llevado a cabo mediante la rea-
lización de cruces con posterior análisis de tétradas, entre diver-
sos mutantes del primer sistema matador y estirpes matadoras he--
terotáticas del segundo.

Como vimos en el apartado 2 de este mismo capítu-

Tabla 6 .- Estirpes heterotáticas seleccionadas : genotipos, fenotipos y procedencia de las mismas.

Estirpe	Genotipo	Fenotipo	Procedencia
K ₂ 11	α , <u>arg</u> , <u>ade</u> , [KIL-k _{2A}]	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻ K _{2A} ⁺ R _{2A} ⁺	K ₂ ⁸ x S12
K ₂ 12	α , <u>ade</u> , [KIL-k _{2A}]	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻ K _{2A} ⁺ R _{2A} ⁺	K ₂ ⁸ x S12
K ₂ 13	<u>a</u> , <u>arg</u> , [KIL-k _{2A}]	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻ K _{2A} ⁺ R _{2A} ⁺	K ₂ ⁸ x S13
K ₂ 14	α , <u>try</u> , <u>his</u> , [KIL-k _{2B}]	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻ K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	K ₂ ⁴ x S13
K ₂ 15	α , <u>lys</u> , <u>ade</u> , <u>met</u> , [KIL-k _{2B}]	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻ K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	K ₂ ⁴ x S12
K ₂ 16	<u>a</u> , <u>met</u> , <u>his</u> , [KIL-k _{2B}]	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻ K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	K ₂ ⁴ x S13
K ₂ 17	α , <u>met</u> , <u>his</u> , [KIL-k _{2B}]	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻ K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	K ₂ ⁴ x S13

Tabla 7 .- Determinación de las toxinas producidas por las estirpes matadoras homotálicas del segundo sistema.

Muestras de las estirpes	Pulverizadas con					Tipo de toxina	
	K ₁ ¹	K ₂ ¹	K ₂ ¹¹	K ₂ ¹⁷	K ₂ ²⁴		
K ₂ ¹	+	-	+	+	+	YKT _{2A}	YKT _{2B}
K ₂ ²	+	-	+	+	+	YKT _{2A}	YKT _{2B}
K ₂ ³	+	-	+	+	+	YKT _{2A}	YKT _{2B}
K ₂ ⁴	+	-	+	-	-		YKT _{2B}
K ₂ ⁵	+	-	-	+	+	YKT _{2A}	
K ₂ ⁷	+	-	+	-	-		YKT _{2B}
K ₂ ⁸	+	-	-	+	+	YKT _{2A}	
K ₂ ⁹	+	-	+	-	-		YKT _{2B}
K ₂ ¹⁰	+	-	+	+	+	YKT _{2A}	YKT _{2B}
K ₂ ²⁴	+	-	+	-	-		YKT _{2B}

+ : Halo de inhibición del crecimiento y muerte.

- : No halo.

Tabla 8 .- Resistencia de las estirpes matadoras homotálicas del segundo sistema frente a las distintas toxinas matadoras.

Muestras de las estirpes	Tipo de toxina	Pulverizadas con									
		K ₂ ¹	K ₂ ²	K ₂ ³	K ₂ ⁴	K ₂ ⁵	K ₂ ⁷	K ₂ ⁸	K ₂ ⁹	K ₂ ¹⁰	K ₂ ²⁴
K ₁ ¹	YKT ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K ₂ ¹	YKT _{2A} YKT _{2B}	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
K ₂ ¹³	YKT _{2A}	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
K ₂ ¹⁶	YKT _{2B}	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
K ₂ ²⁴	YKT _{2B}	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Halo de inhibición del crecimiento y muerte .

- : No halo.

tulo, las estirpes matadoras heterotáticas del segundo sistema producían dos tipos diferentes de toxina matadora. Se han realizado, por tanto, dos tandas análogas de cruces, utilizando en unos casos estirpes productoras de YKT_{2A} , y en otros, estirpes productoras de YKT_{2B} .

Tanto unas como otras se han cruzado con estirpes matadoras, neutrales, supresivas, mutantes kex, mutantes mak y mutantes pets del primer sistema y con estirpes sensibles. También se han realizado cruces entre estirpes productoras de YKT_{2A} y productoras de YKT_{2B} . La técnica del cruce fue descrita en el apartado 4 del capítulo anterior.

Tras obtener los cigotos correspondientes se determinaron sus fenotipos con respecto al carácter matador. Posteriormente se hicieron esporular y se procedió al análisis de tétradas.

Al comprobar los resultados obtenidos, que se muestran en las tablas 9, 10 y 11, con los expuestos en la tabla 1, observamos que son idénticos para los cruces realizados entre estirpes neutrales, supresivas, mutantes kex y mutantes mak del primer sistema con estirpes portadoras de los plásmidos matadores, ya sean $[KIL-k_1]$, $[KIL-k_{2A}]$ o $[KIL-k_{2B}]$.

Iguales resultados se obtienen también al cruzar las estirpes matadoras del primero o del segundo sistema con las sensibles.

No ocurre lo mismo con los mutantes pets del primer

Tabla 9 .- Estudio de los fenotipos de las ascosporas procedentes de cruces entre estirpes matadoras heterotálicas productoras de $\bar{Y}KT_{2A}$ y diversas estirpes del primer sistema.

Cruce	Tipo	Fenotipo cigoto	Fenotipo ascosporas	Nº de ascas analizadas
$K_1 4 \times K_2 11$	$\boxed{KIL-k_1} \times \boxed{KIL-k_{2A}}$	$K_1^+ R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-) : 0$	3
$K_1 5 \times K_2 13$	$\boxed{KIL-k_1} \times \boxed{KIL-k_{2A}}$	$K_1^+ R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-) : 0$	9
$K_2 11 \times S 12$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \boxed{KIL-o}$	$K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+$	$4 (K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+) : 0$	5
$K_2 13 \times S 13$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \boxed{KIL-o}$	$K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+$	$4 (K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+) : 0$	16
$K_2 11 \times N_1 6$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \boxed{KIL-n}$	$K_1^- R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-$	$4 (K_1^- R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-) : 0$	4
$K_2 13 \times N_1 1$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \boxed{KIL-n}$	$K_1^- R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-$	$4 (K_1^- R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-) : 0$	5
$K_2 11 \times X 1$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \boxed{KIL-s}$	$K_1^- R_1^- K_{2A}^- R_{2A}^-$	$4 (K_1^- R_1^- K_{2A}^- R_{2A}^-) : 0$	5
$K_2 11 \times X 2$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \boxed{KIL-s}$	$K_1^- R_1^- K_{2A}^- R_{2A}^-$	$4 (K_1^- R_1^- K_{2A}^- R_{2A}^-) : 0$	4
$K_2 11 \times K_1 14$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \underline{kex} \boxed{KIL-k_1}$	$K_1^+ R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-) : 2 (K_1^- R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-)$	4
$K_2 13 \times K_1 11$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \underline{kex} \boxed{KIL-k_1}$	$K_1^+ R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-) : 2 (K_1^- R_1^+ K_{2A}^- R_{2A}^-)$	6
$K_2 11 \times S 19$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \underline{mak} \boxed{KIL-k_1}$	$K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+$	$2 (K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+) : 2 (K_1^- R_1^- K_{2A}^- R_{2A}^-)$	9
$K_2 13 \times S 21$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \underline{mak} \boxed{KIL-k_1}$	$K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+$	$2 (K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+) : 2 (K_1^- R_1^- K_{2A}^- R_{2A}^-)$	4
$K_2 19 \times S 22$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \underline{pets} \boxed{KIL-k_1}$	$K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+$	$4 (K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+) : 0$	3
$K_2 17 \times S 23$	$\boxed{KIL-k_{2A}} \times \underline{pets} \boxed{KIL-k_1}$	$K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+$	$4 (K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2A}^+) : 0$	6

Tabla 10.- Estudio de los fenotipos de las ascosporas procedentes de cruces entre estirpes matadoras heterotáticas productoras de YKT_{2B} y diversas estirpes del primer sistema.

Cruce	Tipo	Fenotipo cigoto	Fenotipo ascosporas	Nº de ascas analizadas
$K_1 4 \times K_2 14$	$[KIL-k_1] \times [KIL-k_{2B}]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 0$	4
$K_1 7 \times K_2 17$	$[KIL-k_1] \times [KIL-k_{2B}]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 0$	5
$K_2 14 \times S12$	$[KIL-k_{2B}] \times [KIL-o]$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	$4 (K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+) : 0$	3
$K_2 16 \times S13$	$[KIL-k_{2B}] \times [KIL-o]$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	$4 (K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+) : 0$	5
$K_2 16 \times N_1 1$	$[KIL-k_{2B}] \times [KIL-n]$	$K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-) : 0$	5
$K_2 15 \times X1$	$[KIL-k_{2B}] \times [KIL-s]$	$K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-) : 0$	4
$K_2 14 \times K_1 14$	$[KIL-k_{2B}] \times \underline{kex} [KIL-k_1]$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-)$	4
$K_2 16 \times S17$	$[KIL-k_{2B}] \times \underline{mak} [KIL-o]$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	$2 (K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+)$	3
$K_2 17 \times S18$	$[KIL-k_{2B}] \times \underline{mak} [KIL-o]$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	$2 (K_1^- R_1^- K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+)$	5
$K_2 16 \times S22$	$[KIL-k_{2B}] \times \underline{pets} [KIL-o]$	$K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+$	$4 (K_1^- R_1^- K_2^+ R_2^+) : 0$	3

Tabla 11 .- Estudio de los fenotipos de las ascosporas procedentes de cruces entre estirpes heterotálicas produc-
toras de YKT_{2A} e YKT_{2B} .

Cruce	Tipo	Fenotipo cigoto	Fenotipo ascospora	Nº de ascas analizadas
$K_{213} \times K_{217}$	$[KIL-k_{2A}] \times [KIL-k_{2B}]$	$K_1^- R_1^- K_{2AB}^+ R_{2AB}^+$	$4 (K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2AB}^+) : 0$	6
$K_{212} \times K_{216}$	$[KIL-k_{2A}] \times [KIL-k_{2B}]$	$K_1^- R_1^- K_{2AB}^+ R_{2AB}^+$	$4 (K_1^- R_1^- K_{2A}^+ R_{2AB}^+) : 0$	4

sistema, estas estirpes, de fenotipo sensible, al cruzarlas con las matadoras del primer sistema, arrojan una segregación de 2 matadoras:2 sensibles, mientras que en cruces con matadoras del segundo sistema, ya sean portadoras del plásmido $\overline{[KIL-k_{2A}]}$ o del $\overline{[KIL-k_{2B}]}$, se segregan 4 matadoras:0 sensibles.

De otra parte, puede comprobarse que el plásmido $\overline{[KIL-k_1]}$ elimina a los $\overline{[KIL-k_{2A}]}$ y $\overline{[KIL-k_{2B}]}$, ya en los cigotos, y que en cruces entre estirpes productoras de YKT_{2A} e YKT_{2B} , los cigotos producen ambas toxinas mientras que las ascosporas solo producen la YKT_{2A} , aunque resisten la acción de ambas.

4.- DEMOSTRACION DE QUE LAS ESTIRPES MATADORAS HOMOTALICAS DEL SEGUNDO SISTEMA POSEEN LOS GENES NUCLEARES NECESARIOS PARA MANTENER LOS DETERMINANTES EXTRANUCLEARES DEL PRIMERO

Ascosporas procedentes de las estirpes K_{24} y K_{28} , ambas matadoras del segundo sistema, portadoras respectivamente de los plásmidos $\overline{[KIL-k_{2A}]}$ y $\overline{[KIL-k_{2B}]}$ y, como es lógico, de los genes nucleares necesarios para su mantenimiento, se cruzaron con las estirpes K_{11} y K_{18} , matadoras del primer sistema, portadoras del plásmido que confiere dicho fenotipo, $\overline{[KIL-k_1]}$, y de los genes nucleares necesarios para el mantenimiento del mismo, según la técnica que se describe en el apartado 2 de este mismo capítulo.

Tras 48 horas de incubación a 28°, los cigotos fueron aislados y estudiados sus fenotipos con respecto al carácter matador (apartado 3.1 del capítulo de Material y Métodos), comprobán--

dose que sólo producían el YKT_1 a pesar de estar presentes en -- ellos los genes nucleares necesarios para el mantenimiento de ambos plásmidos. Los cigotos se hicieron esporular y posteriormente se -- procedió al análisis de tétradas que mostró una segregación 4:0 en relación con la producción del YKT_1 . Lógicamente, dos de las ascosporas de cada tétrada serán portadoras de los genes nucleares necesarios para mantener los plásmidos $[KIL-k_2]$ y sin embargo producen la toxina matadora correspondiente al primero YKT_1 , pueden por -- tanto mantener y expresar los plásmidos $[KIL-k_1]$. La tabla 12 muestra los resultados obtenidos.

La misma experiencia fue realizada cruzando las mismas estirpes matadoras homotálicas ($K_2 4$ y $K_2 8$) con las estirpes $K_1 11$ y $K_1 14$, mutantes kex del primer sistema cuyo fenotipo es -- $K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-$. Estas estirpes llevan el plásmido matador $[KIL-k_1]$ pero la ausencia de los genes kex-1 y/o kex-2 impide la expresión del -- mismo; los cigotos obtenidos, no obstante, presentaron igual fenotipo que en el caso anterior, es decir producían el YKT_1 . De las 4 ascosporas, dos presentaron fenotipo matador y las otras dos fenotipo neutral, correspondiente a los mutantes kex, lo que confirma los resultados anteriores.

La tabla 13 muestra los fenotipos de los cigotos y de las ascosporas aisladas.

Tabla 12 .- Estudio de los fenotipos de las ascosporas procedentes de cruces entre estirpes matadoras homotálicas esporuladas del segundo sistema y estirpes matadoras del primero.

Cruce	Fenotipo cigotos	Fenotipo ascosporas
Ascosporas de $K_2^4 \times K_1^1$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-): 0$
Ascosporas de $K_2^4 \times K_1^8$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-): 0$
Ascosporas de $K_2^8 \times K_1^1$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-): 0$
Ascosporas de $K_2^8 \times K_1^8$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$4 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-): 0$

Tabla 13.- Estudio de los fenotipos de las ascosporas procedentes de cruces entre estirpes matadoras homotálicas esporuladas del segundo sistema y mutantes kex del primero.

Cruce	Fenotipo cigotos	Fenotipo ascosporas
Ascosporas de $K_2^4 \times K_1^{11}$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-)$
Ascosporas de $K_2^4 \times K_1^{14}$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-)$
Ascosporas de $K_2^8 \times K_1^{11}$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-)$
Ascosporas de $K_2^8 \times K_1^{14}$	$K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-$	$2 (K_1^+ R_1^+ K_2^- R_2^-) : 2 (K_1^- R_1^+ K_2^- R_2^-)$

5.- ESTUDIO DE LOS DIVERSOS TIPOS DE ARN DE DOBLE CADENA PRESENTES EN ESTIRPES DE AMBOS SISTEMAS CON DISTINTOS FENOTIPOS.

Mediante la técnica descrita en el apartado 6 del capítulo de Material y Métodos, se extrajeron los ARNs de doble cadena de estirpes matadoras, neutrales, supresivas, mutantes kex, mutantes mak y mutantes pets del primer sistema, de estirpes matadoras homotáticas y heterotáticas del segundo, así como de estirpes sensibles.

Las estirpes elegidas fueron las siguientes: $K_1 1$, $K_1 10$ (ambas con fenotipo matador), $N_1 1$ (neutra), X_1 y X_2 (supresivas), $K_1 11$ (mutante kex), $S17$ (mutante mak) y $S22$ (mutante pets), pertenecientes todas ellas al primer sistema matador.

Las estirpes matadoras homotáticas del segundo sistema fueron la $K_2 1$, $K_2 2$, $K_2 3$, $K_2 4$, $K_2 5$, $K_2 7$, $K_2 8$, $K_2 9$ y $K_2 10$; - las matadoras heterotáticas fueron la $K_2 11$, $K_2 12$, $K_2 13$, $K_2 14$, $K_2 15$, $K_2 16$ y $K_2 17$ y las estirpes sensibles fueron la S_1 y la $S15$.

Como controles se han utilizado distintas estirpes matadoras, sensibles y supresivas de diversos laboratorios.

La electroforesis se realizó sobre geles de poliacrilamida según la técnica explicada en el mismo apartado, una vez teñidos y desteñidos los geles, se observan distintos tipos de bandas que se corresponden con los diversos ARNs de doble cadena contenidos en los extractos sometidos a electroforesis.

Como puede comprobarse a la vista de estos resultados, las estirpes matadoras del primer sistema presentan dos bandas que se corresponden con los dc-RNA tipo L (banda superior) y M (banda inferior), al igual que las estirpes neutrales y los mutantes kex de este mismo sistema.

El ARN tipo M está ausente tanto en las estirpes - sensibles como en los mutantes mak y pets, siendo visible la banda correspondiente al dc-RNA tipo S en las muestras de estirpes supre sivas. (Figura 1).

En las estirpes matadoras homotáticas del segundo sistema, existen 3 tipos diferentes de ARN de doble cadena; el que origina la banda superior, común en todas ellas, se corresponde - con el tipo L descrito para el primer sistema. Las dos bandas inferiores, correspondientes a las dc-RNA de las toxinas matadoras - YKT_{2A} e YKT_{2B} respectivamente, coexisten en algunas estirpes ma- tadoras homotáticas, presentándose independientemente una de otra en las matadoras heterotáticas. (Figuras 2 y 3).

Estos resultados obtenidos mediante electroforesis - confirman los expuestos anteriormente en el apartado 2 de este mismo capítulo.

Mediante la misma técnica, han sido estudiados los - ARN contenidos en el cigoto $K_2^{13} \times K_2^{17}$ y los de cuatro ascosporas obtenidas por esporulación del mismo.

En la figura 4 que muestra los resultados, se observa que el cigoto, que produce las toxinas YKT_{2A} e YKT_{2B} , es por- tador de los dc-RNA correspondientes. Las ascosporas, a pesar de producir solo la YKT_{2A} también presentan los dos plásmidos.

Figura 1 .- Electroforesis en gel de poliacrilamida de los ARN de doble cadena pertenecientes a estirpes del primer sistema matador.

Designación	Estirpe	Fenotipo	Genotipo
a	K ₁ 1	K ₁ ⁺ R ₁ ⁺	[KIL - k ₁]
b	K ₁ 10	K ₁ ⁺ R ₁ ⁺	[KIL - k ₁]
c	S ₁	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻	[KIL - o]
d	S ₁₅	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻	[KIL - o]
e	N ₁ 1	K ₁ ⁻ R ₁ ⁺	[KIL - n]
f	X ₁	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻	[KIL - s]
g	X ₂	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻	[KIL - s]
h	K ₁ 11	K ₁ ⁻ R ₁ ⁺	kex [KIL - k ₁]
i	S ₁₇	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻	mak [KIL - o]
j	S ₂₂	K ₁ ⁻ R ₁ ⁻	pets [KIL - o]

Figura 2 .- Electroforesis en gel de poliacrilamida de los ARN de doble cadena pertenecientes a estirpes matadoras homotálicas del segundo sistema.

Designación	Estirpes	Fenotipo	Genotipo
a	K ₂ 24	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
b	K ₂ 1	K _{2AB} ⁺ R _{2AB} ⁺	[KIL - k _{2A}] [KIL - k _{2B}]
c	K ₂ 2	K _{2AB} ⁺ R _{2AB} ⁺	[KIL - k _{2A}] [KIL - k _{2B}]
d	K ₂ 3	K _{2AB} ⁺ R _{2AB} ⁺	[KIL - k _{2A}] [KIL - k _{2B}]
e	K ₂ 4	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
f	K ₂ 5	K _{2A} ⁺ R _{2A} ⁺	[KIL - k _{2A}]
g	K ₂ 7	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
h	K ₂ 8	K _{2A} ⁺ R _{2A} ⁺	[KIL - k _{2A}]
i	K ₂ 9	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
j	K ₂ 10	K _{2AB} ⁺ R _{2AB} ⁺	[KIL - k _{2A}] [KIL - k _{2B}]

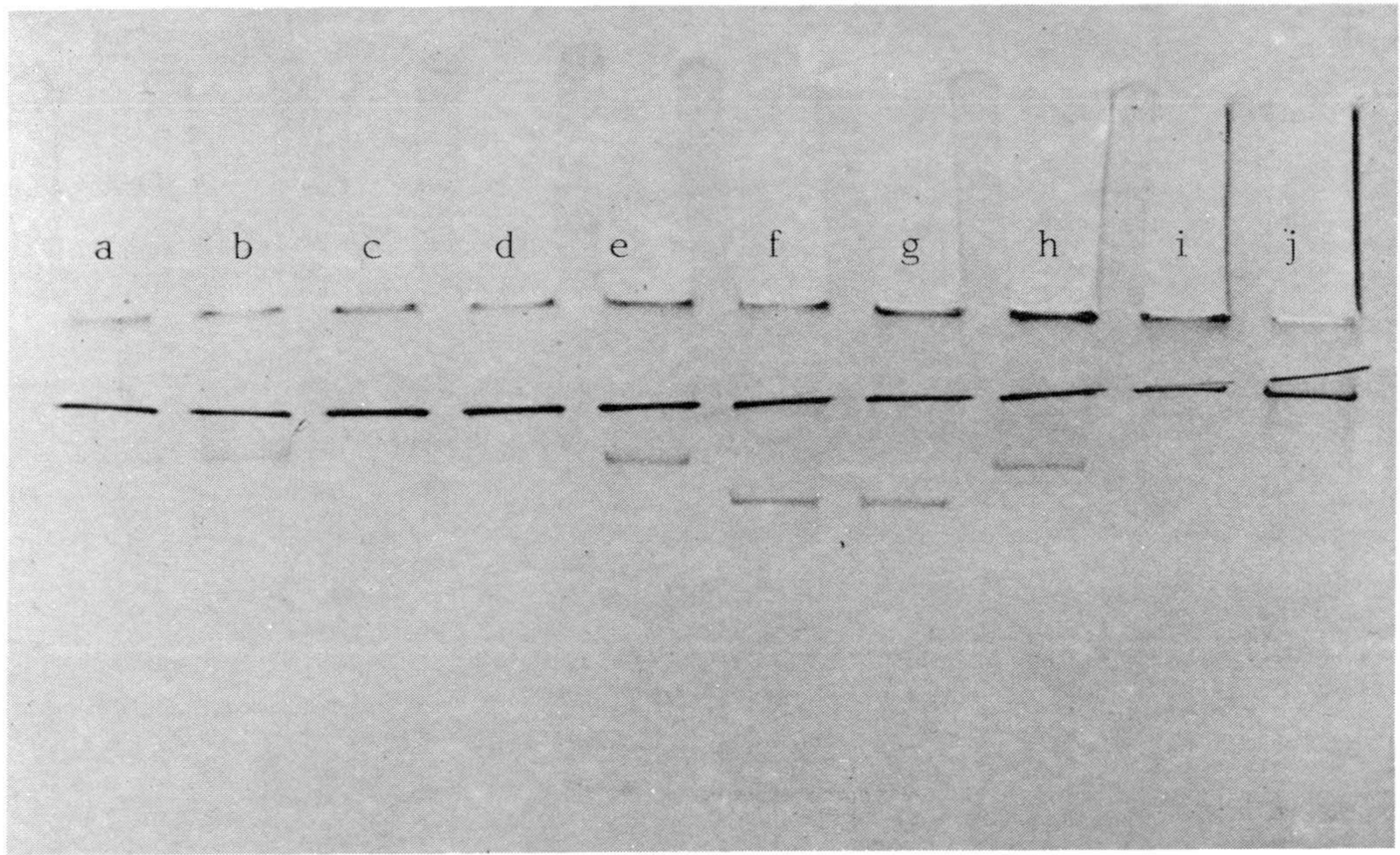


Figura 1

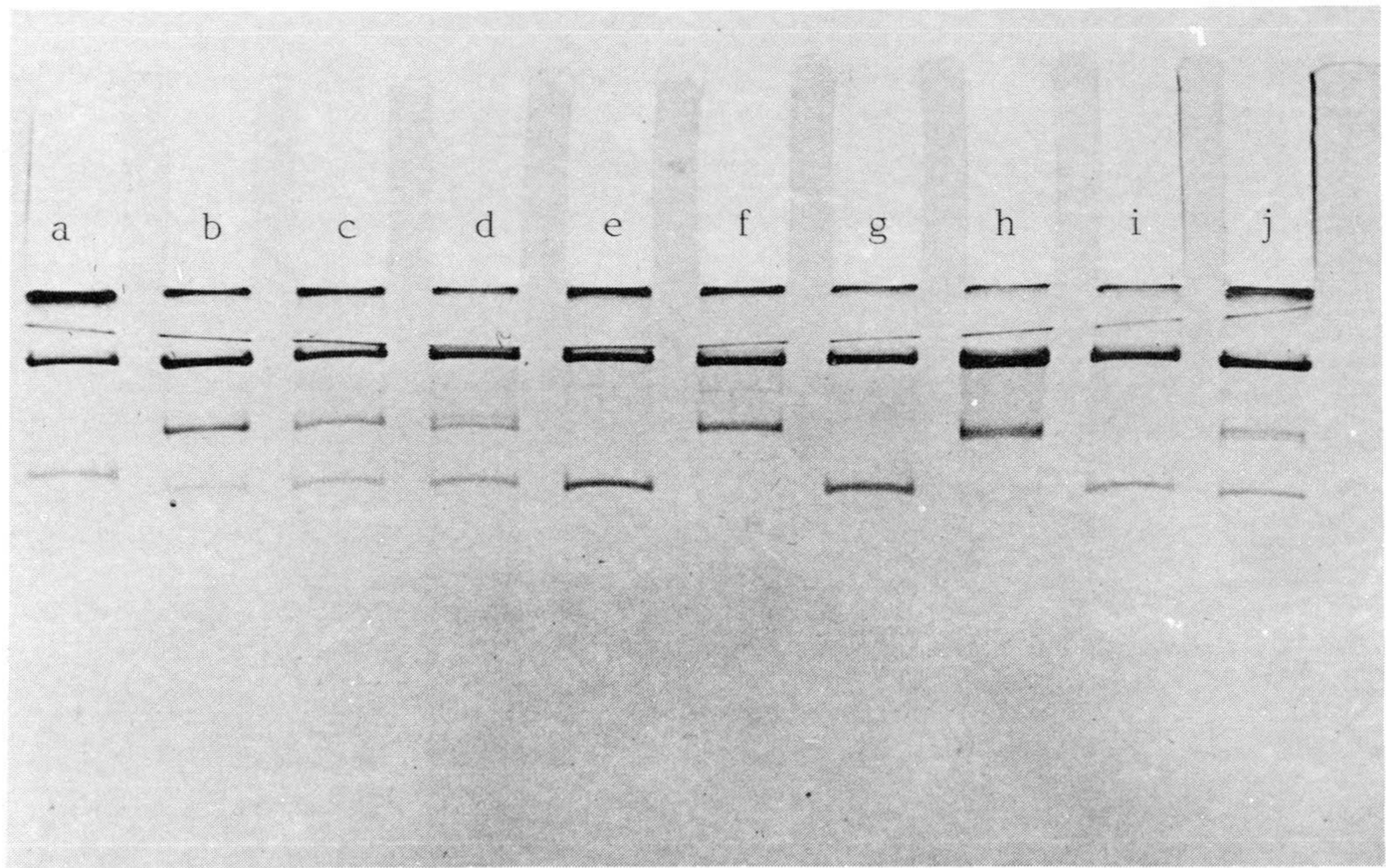


Figura 2

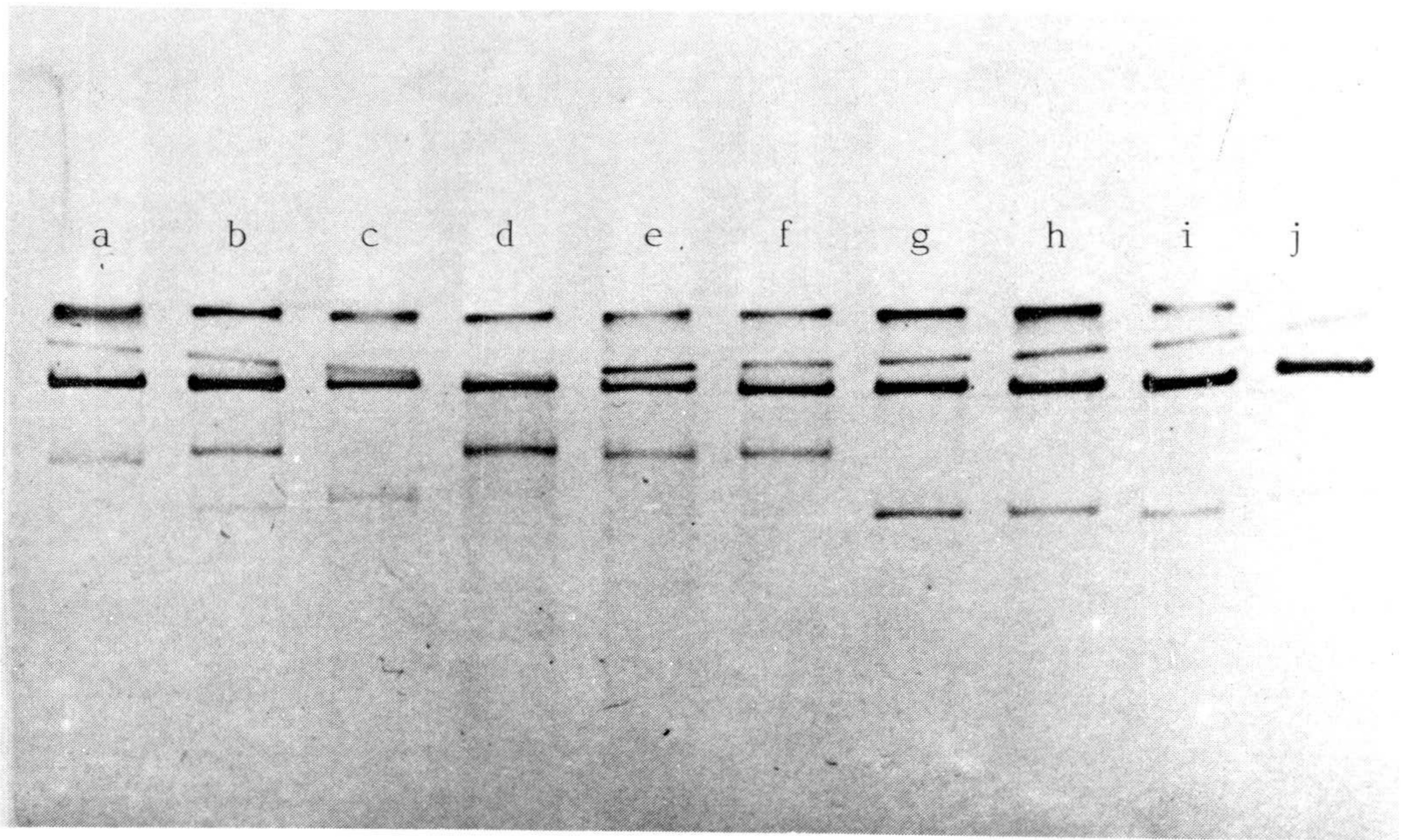


Figura 3

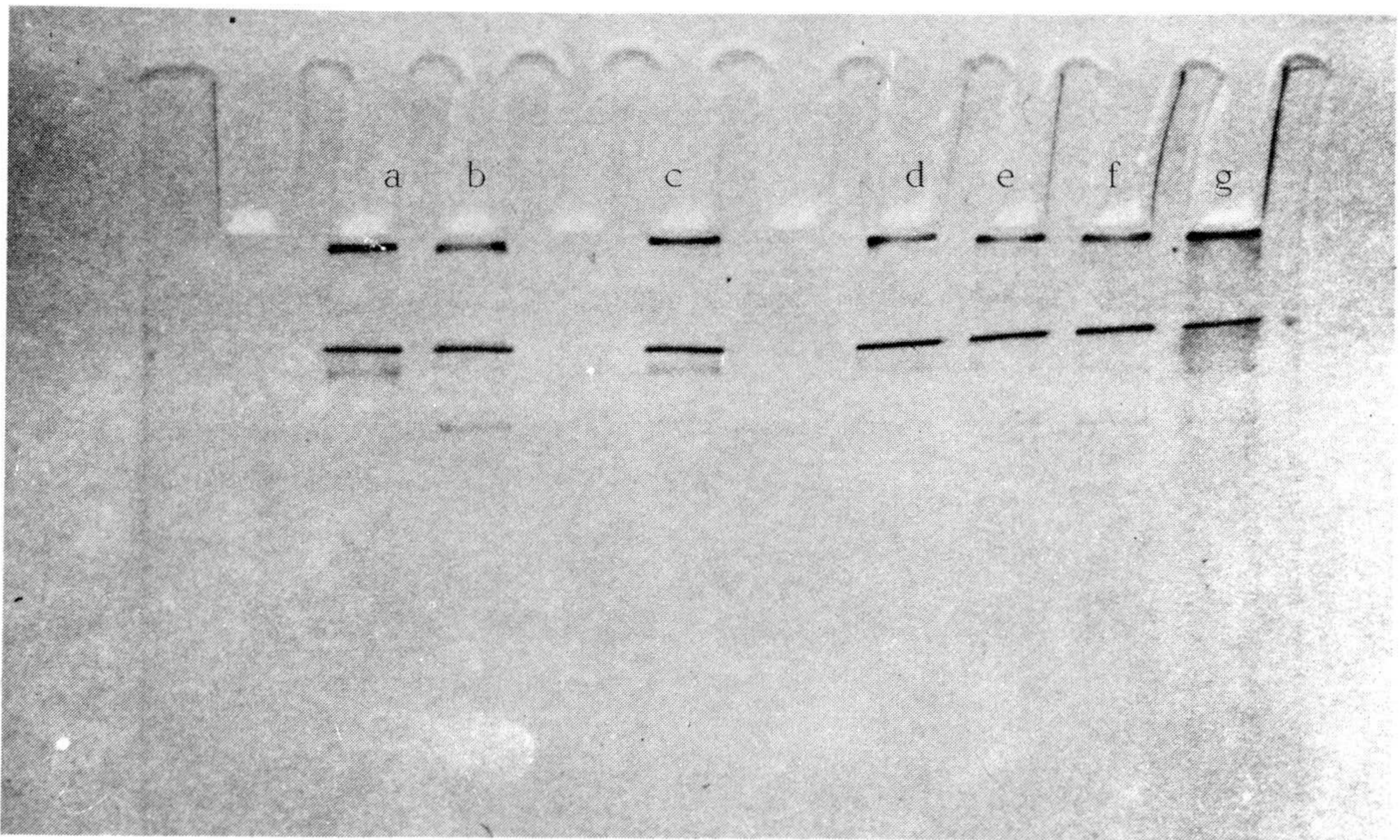


Figura 4

Figura 3 .- Electroforesis en gel de poliacrilamida de los ARN de doble cadena pertenecientes a estirpes matadoras heterotálicas del segundo sistema.

Designación	Estirpe	Fenotipo	Genotipo
a	K ₁ 1	K ₁ ⁺ R ₁ ⁺	[K IL - k ₁]
b	K ₂ 1	K ₂ ABR ₂ AB ⁺	[K IL - k _{2A}] [K IL - k _{2B}]
c	S ₁₆	K ⁻ R ⁻	[K IL - o]
d	K ₂ 11	K ₂ A ⁺ R ₂ A ⁺	[K IL - k _{2A}]
e	K ₂ 12	K ₂ A ⁺ R ₂ A ⁺	[K IL - k _{2A}]
f	K ₂ 13	K ₂ A ⁺ R ₂ A ⁺	[K IL - k _{2A}]
g	K ₂ 14	K ₂ B ⁺ R ₂ B ⁺	[K IL - k _{2B}]
h	K ₂ 15	K ₂ B ⁺ R ₂ B ⁺	[K IL - k _{2B}]
i	K ₂ 16	K ₂ B ⁺ R ₂ B ⁺	[K IL - k _{2B}]
j	K ₂ 17	K ₂ B ⁺ R ₂ B ⁺	[K IL - k _{2B}]

Figura 4 .- Electroforesis en gel de poliacrilamida de los ARN de doble cadena pertenecientes al cigoto K₂13 x K₂17 y esporas.

Designación	Estirpe	Fenotipo	Genotipo
a	K ₂ 13	K ₂ A ⁺ R ₂ A ⁺	[K IL - k _{2A}]
b	K ₂ 17	K ₂ B ⁺ R ₂ B ⁺	[K IL - k _{2B}]
c	K ₂ 13 x K ₂ 17	K ₂ ABR ₂ AB ⁺	[K IL - k _{2A}] [K IL - k _{2B}]
d	1A (K ₂ 13 x K ₂ 17)	K ₂ A ⁺ R ₂ AB ⁺	[K IL - k _{2A}] [K IL - k _{2B}]
e	1B (K ₂ 13 x K ₂ 17)	K ₂ A ⁺ R ₂ AB ⁺	[K IL - k _{2A}] [K IL - k _{2B}]
f	1C (K ₂ 13 x K ₂ 17)	K ₂ A ⁺ R ₂ AB ⁺	[K IL - k _{2A}] [K IL - k _{2B}]
g	1D (K ₂ 13 x K ₂ 17)	K ₂ A ⁺ R ₂ AB ⁺	[K IL - k _{2A}] [K IL - k _{2B}]

6.- ESTUDIO DE LOS DIVERSOS TIPOS DE ARN DE DOBLE CADENA PRESENTES EN DISTINTAS ESPECIES HOMOTÁLICAS DEL GENERO SACCHAROMYCES PRODUCTORAS DE LA TOXINA MATADORA DEL SEGUNDO SISTEMA

Tras realizar el análisis de los ARNs de doble cadena de las estirpes matadoras homotálicas y heterotálicas del segundo sistema matador y comprobar que producían dos tipos diferentes de toxinas matadoras (YKT_{2A} e YKT_{2B}), con el fin de conocer si estos resultados pueden hacerse extensivos a otras especies homotálicas del género Saccharomyces, existentes en nuestro laboratorio y aisladas de mostos de uva en fermentación, hemos realizado un estudio de los fenotipos de dichas especies con respecto al carácter matador así como un análisis mediante electroforesis en gel de poli-acrilamida de los ARNs de doble cadena responsables de dichos fenotipos.

6.1.- Estudio de los fenotipos

Mediante la técnica descrita en el apartado 3.1 del capítulo de Material y Métodos se han analizado los fenotipos con respecto al carácter matador de las siguientes especies S.heterogénicus, S.fermentati, S.italicus, S.veronae, S.uvarum, S.fructum, S.stenieri, S.chevalieri, S.oviformis, S.exiguus, y S.cerevisiae así como de Torula utilis. La estirpe Torula utilis no es de vinificación

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 14 y 15.

Tabla 14.- Determinación de la toxina producida por las distintas especies matadoras homotáticas del género Saccharomyces.

Muestras de las estirpes	Pulverizadas con						Toxinas que producen
	K ₁ ¹	K ₂ ¹	K ₂ ¹¹	K ₂ ¹⁷	K ₂ ²⁴	S1	
<u>S.heterogenicus</u>	+	-	-	+	+	+	YKT _{2A}
<u>S.fermentati</u>	+	-	+	-	-	+	YKT _{2B}
<u>S.italicus</u>	-	-	-	-	-	-	
<u>S.veronae</u>	+	-	+	-	-	+	YKT _{2B}
<u>S.uvarum</u>	+	-	-	+	+	+	YKT _{2A}
<u>S.fructum</u>	+	-	+	-	-	+	YKT _{2B}
<u>S.stenieri</u>	+	-	+	-	-	+	YKT _{2B}
<u>S.chevalieri</u>	+	-	+	-	-	+	YKT _{2B}
<u>S.oviformis</u>	+	-	+	-	-	+	YKT _{2B}
<u>S.exiguus</u>	+	-	-	+	-	+	YKT _{2A}
<u>S.cerevisiae</u>	+	-	+	-	-	+	YKT _{2B}
<u>Torula utilis</u>	-	-	-	-	-	-	

Tabla 15 .- Resistencia de las distintas especies matadoras homotálicas del género Saccharomyces frente a las toxinas matadoras del primero y segundo sistema.

Muestras de las estirpes	Tipo de toxina	<u>S. heterogenicus</u>	<u>S. fermentati</u>	<u>S. italicus</u>	<u>S. veronae</u>	<u>S. uvarum</u>	<u>S. fructum</u>	<u>S. steineri</u>	<u>S. chevalieri</u>	<u>S. oviformis</u>	<u>S. exiguus</u>	<u>S. cerevisiae</u>	<u>Torula utilis</u>
K ₁ 6	YKT ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
K ₂ 1	YKT _{2A} YKT _{2B}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
K ₂ 13	YKT _{2A}	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
K ₂ 16	YKT _{2B}	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
K ₂ 24	YKT _{2B}	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
S1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

6.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

La extracción de los ARNs de doble cadena se realizó mediante la técnica descrita en el apartado 6 del capítulo de Material y Métodos. Los ácidos ribonucleicos fueron sometidos posteriormente a electroforesis en gel de poliacrilamida, tal como se indica en el citado apartado.

Una vez teñidos y desteñidos los correspondientes geles, se observan distintos tipos de bandas, debidas a los distintos tipos de ARN presentes en las muestras sometidas a electroforesis.

Las especies ensayadas, muestran en la electroforesis uno o varios plásmidos de ARN bicatenario, pero producen un solo tipo de toxina matadora de tipo YKT_{2A} o YKT_{2B} . Los resultados se muestran en las figuras 5 y 6.

7.- ESTUDIO DE LAS PARTICULAS SIMILARES A VIRUS (VLP) PRESENTES EN ESTIRPES MATADORAS DE AMBOS SISTEMAS

La existencia de partículas similares a virus (VLP) en estirpes con diferentes fenotipos pertenecientes al primer sistema matador, era un hecho conocido. Se desconocía en cambio si dichas partículas estaban presentes en las estirpes correspondientes al segundo sistema y por ello se realizaron estas experiencias de aislamiento de VLP.



Figura 5 .- Electroforesis en gel de poliacrilamida de los ARN de doble cadena pertenecientes a diversas especies homotáticas del género Saccharomyces .

Designación	Estirpe	Fenotipo	Genotipo
a	<u>S. cerevisiae</u> K ₁ 1	K ₁ ⁺ R ₁ ⁺	[KIL - k ₁]
b	<u>S. cerevisiae</u> K ₂ 24	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
c	<u>S. cerevisiae</u> S ₁₆	K ⁻ R ⁻	[KIL - o]
d	<u>S. cerevisiae</u> K ₂ 1	K _{2AB} ⁺ R _{2AB} ⁺	[KIL - k _{2A}] [KIL - k _{2B}]
e	<u>S. stenieri</u>	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
f	<u>S. veronae</u>	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
g	<u>S. fructum</u>	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
h	<u>S. oviformis</u>	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
i	<u>S. uvarum</u>	K _{2A} ⁺ R _{2A} ⁺	[KIL - k _{2A}]
j	<u>S. itálicus</u>	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]

Figura 6 .- Electroforesis en gel de poliacrilamida de los ARN de doble cadena pertenecientes a diversas especies homotáticas del género Saccharomyces

Designación	Estirpe	Fenotipo	Genotipo
a	<u>S. cerevisiae</u> K ₁ 1	K ₁ ⁺ R ₁ ⁺	[KIL - k ₁]
b	<u>S. cerevisiae</u> K ₂ 24	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
c	<u>S. cerevisiae</u> K ₂ 1	K _{2AB} ⁺ R _{2AB} ⁺	[KIL - k _{2A}] [KIL - k _{2B}]
d	<u>S. cerevisiae</u> S ₁₆	K ⁻ R ⁻	[KIL - o]
e	<u>S. fermentati</u>	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
f	<u>S. heterogénicus</u>	K _{2A} ⁺ R _{2A} ⁺	[KIL - k _{2A}]
g	<u>S. chevalieri</u>	K _{2B} ⁺ R _{2B} ⁺	[KIL - k _{2B}]
h	<u>S. exiguus</u>	K _{2A} ⁺ R _{2A} ⁺	[KIL - k _{2A}]
i	<u>Torula utilis</u>		

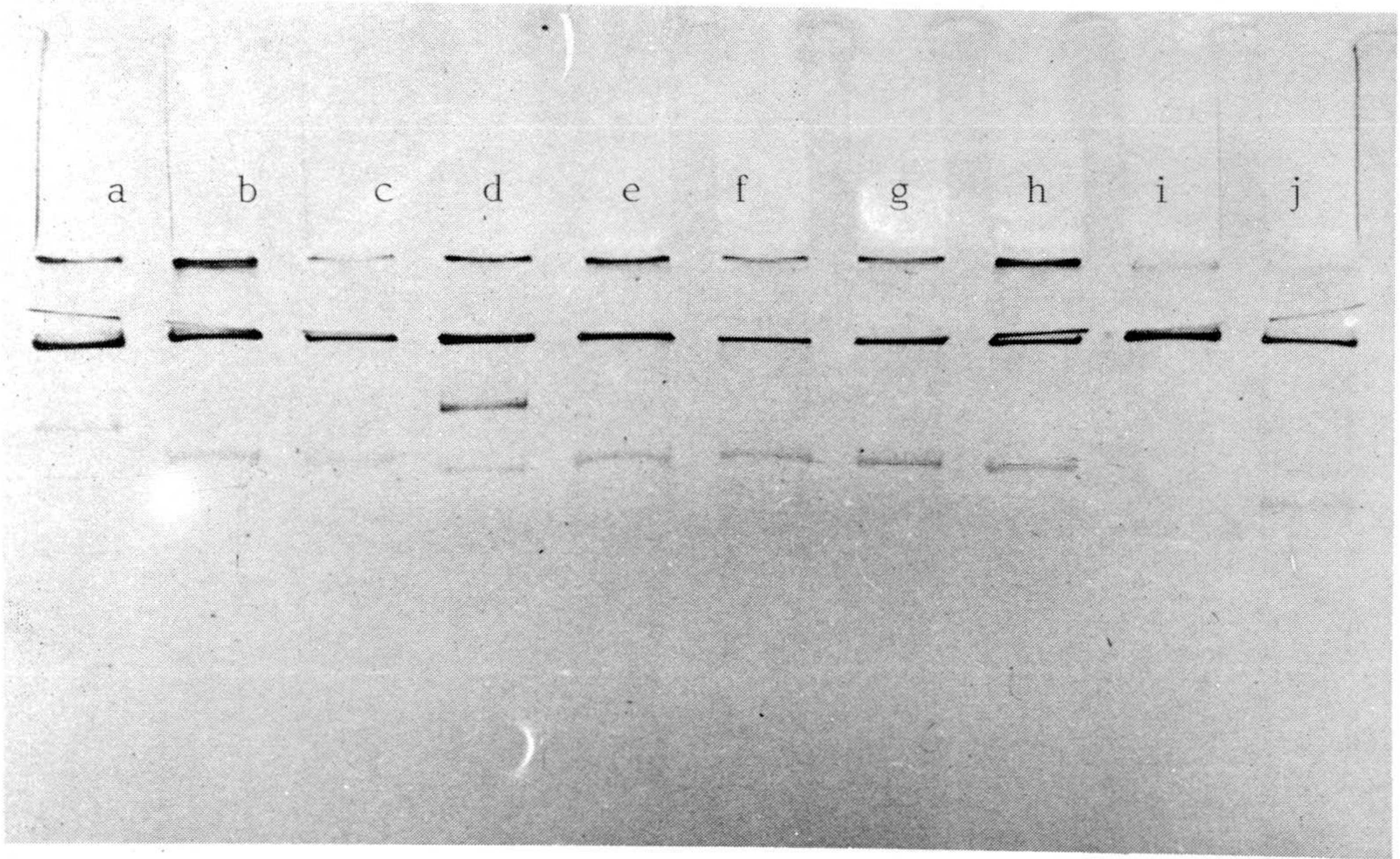


Figura 5

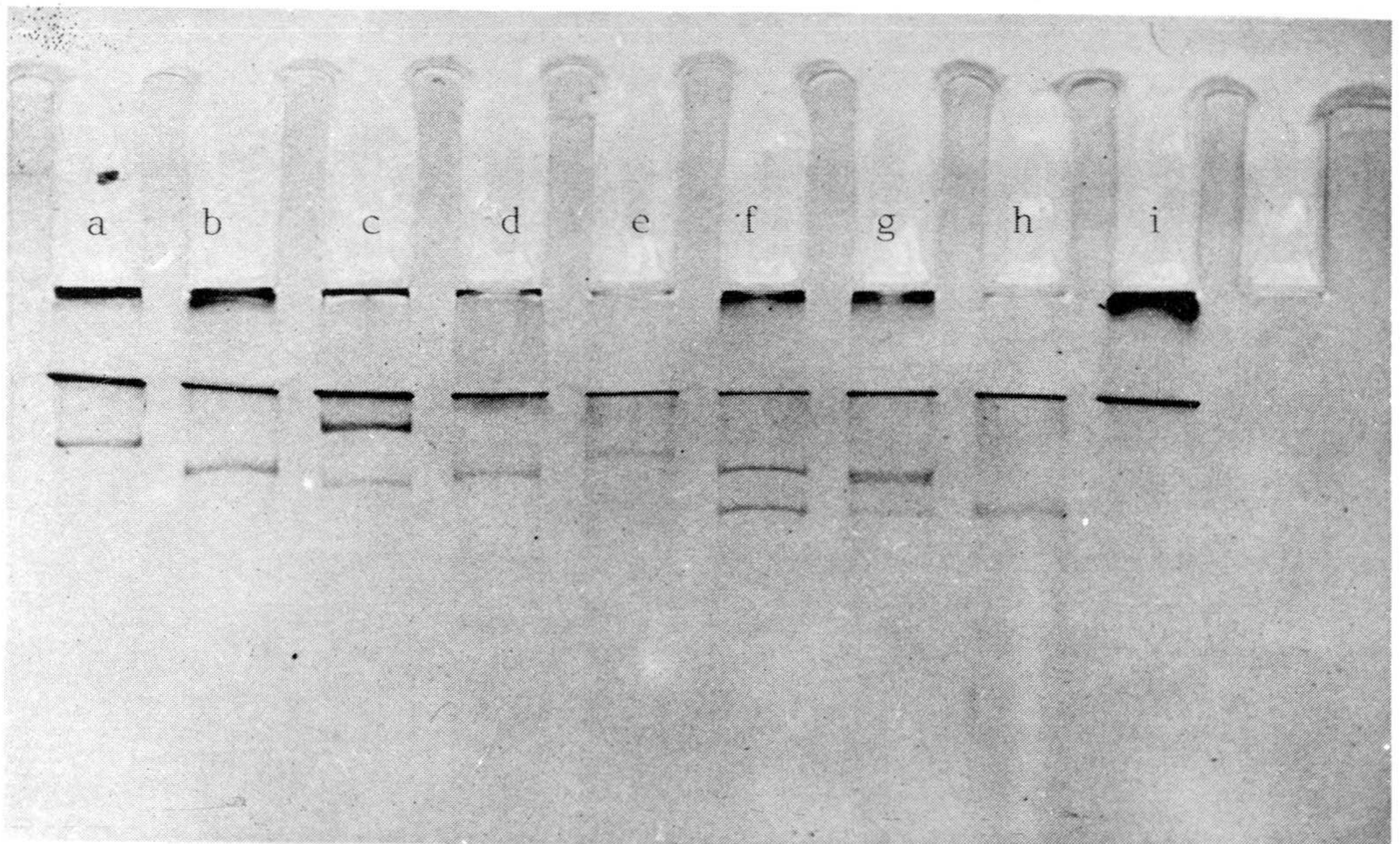


Figura 6

Para poder llevar a cabo un estudio comparativo de estas partículas se extrajeron las VLP de las estirpes $K_1 1$, $K_2 1$, $K_2 11$ y $K_2 16$, cuyos fenotipos son: matadora del primer sistema, productora por tanto del YKT_1 , matadora homotática del segundo sistema, produce los $YKT_2 A$ y B , matadora heterotática del segundo sistema: productora de YKT_{2A} y matadora heterotática del segundo sistema productora de YKT_{2B} , respectivamente.

El método de extracción se describe detalladamente en el apartado 7.1. del capítulo de Material y Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 7, 8, 9 y 10.

Las partículas en todos los casos son de forma icosaédrica y presentan diferentes tamaños, las mas pequeñas son las contenidas en las estirpes matadoras heterotáticas del segundo sistema y las de mayor tamaño corresponden a estirpes matadoras homotáticas del mismo.

La presencia de partículas ha sido observada también en estirpes del primer sistema matador con fenotipos no matadores. El tamaño y el número de las mismas es muy similar al encontrado en las estirpes matadoras.

Figura 7.- VLP de la estirpe $K_1 1$.

Figura 8.- VLP de la estirpe $K_2 1$.

Figura 9.- VLP de la estirpe $K_2 11$.

Figura 10.- VLP de la estirpe $K_2 16$.

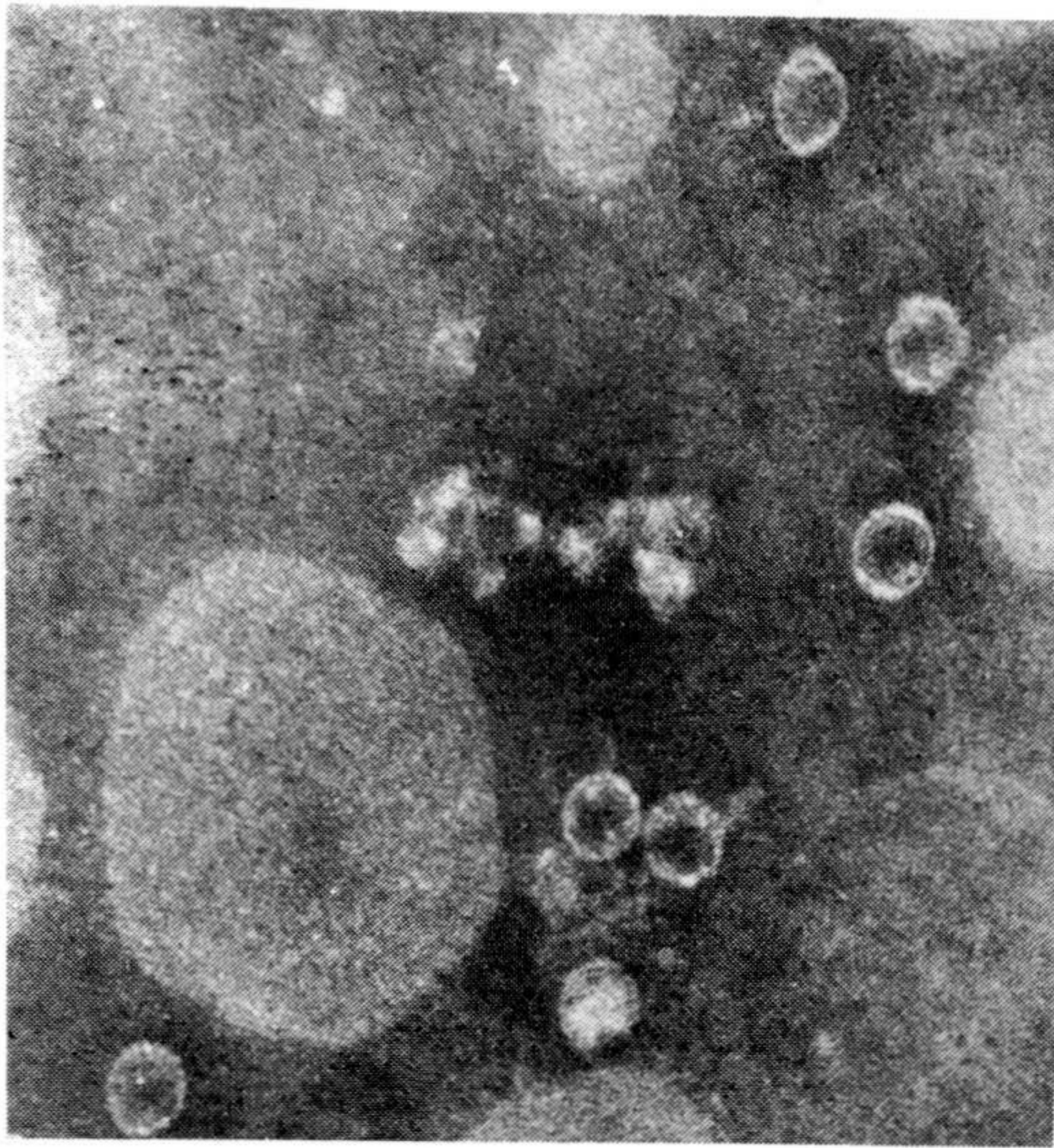


Figura 7

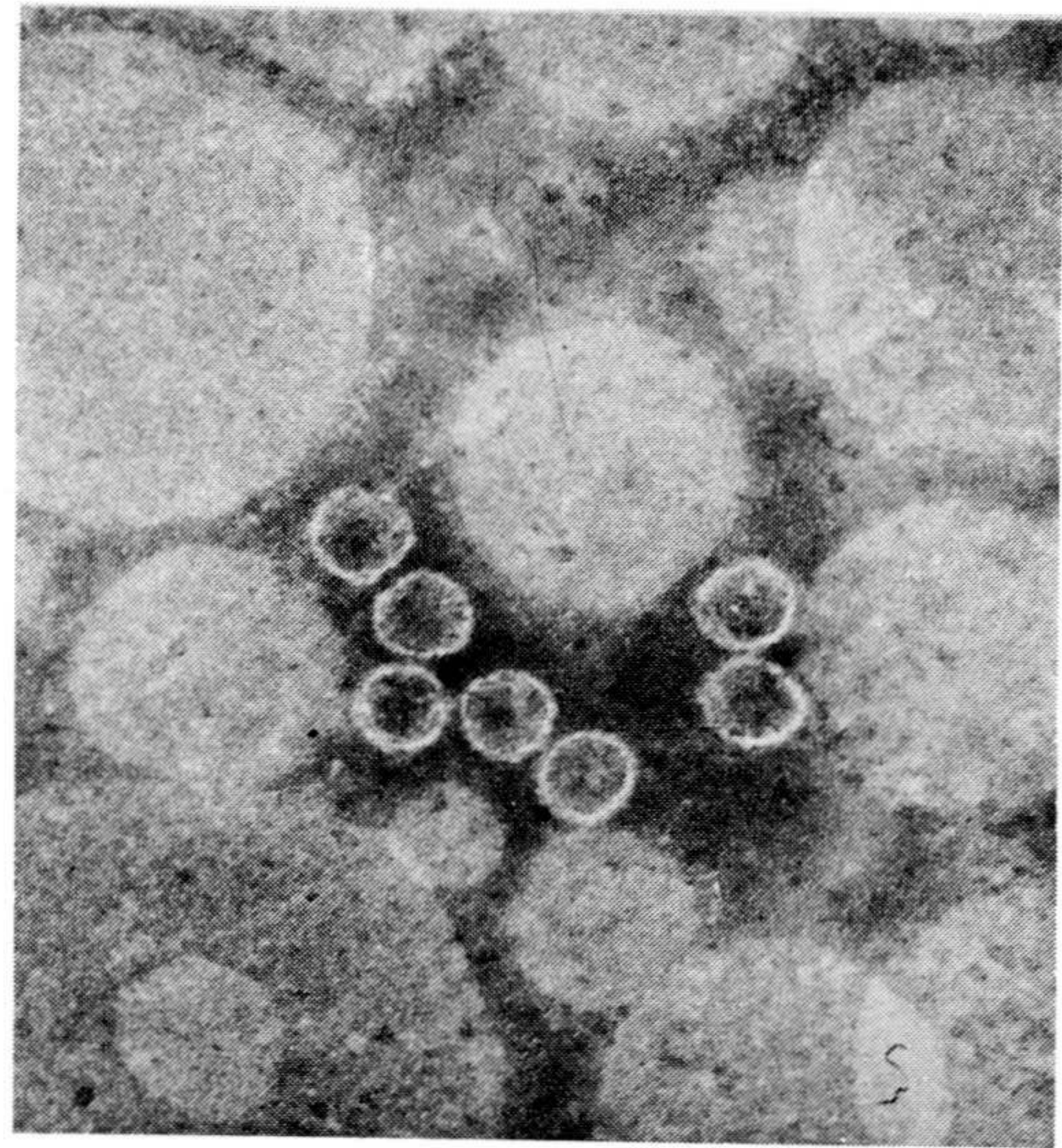


Figura 8

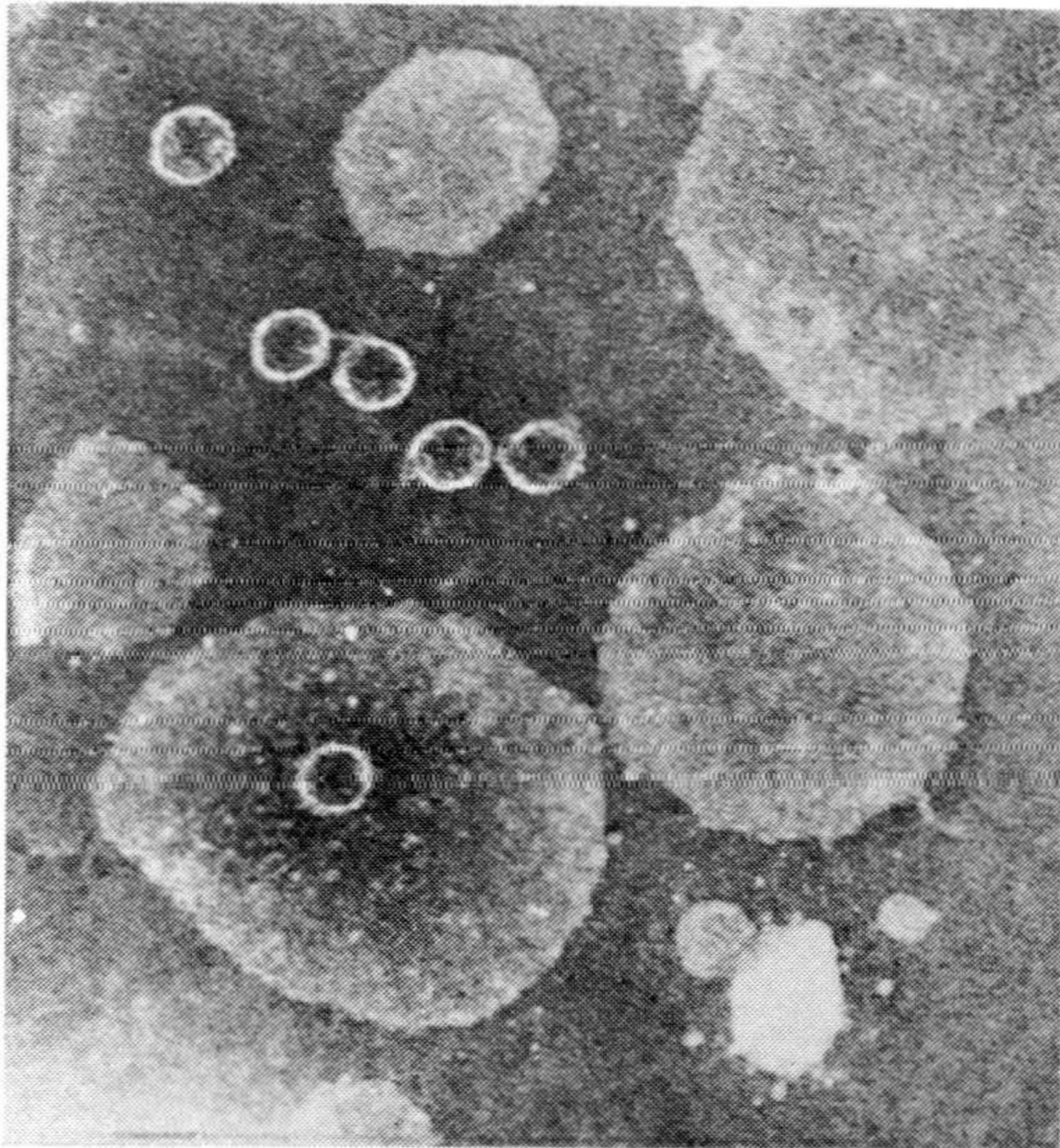


Figura 9

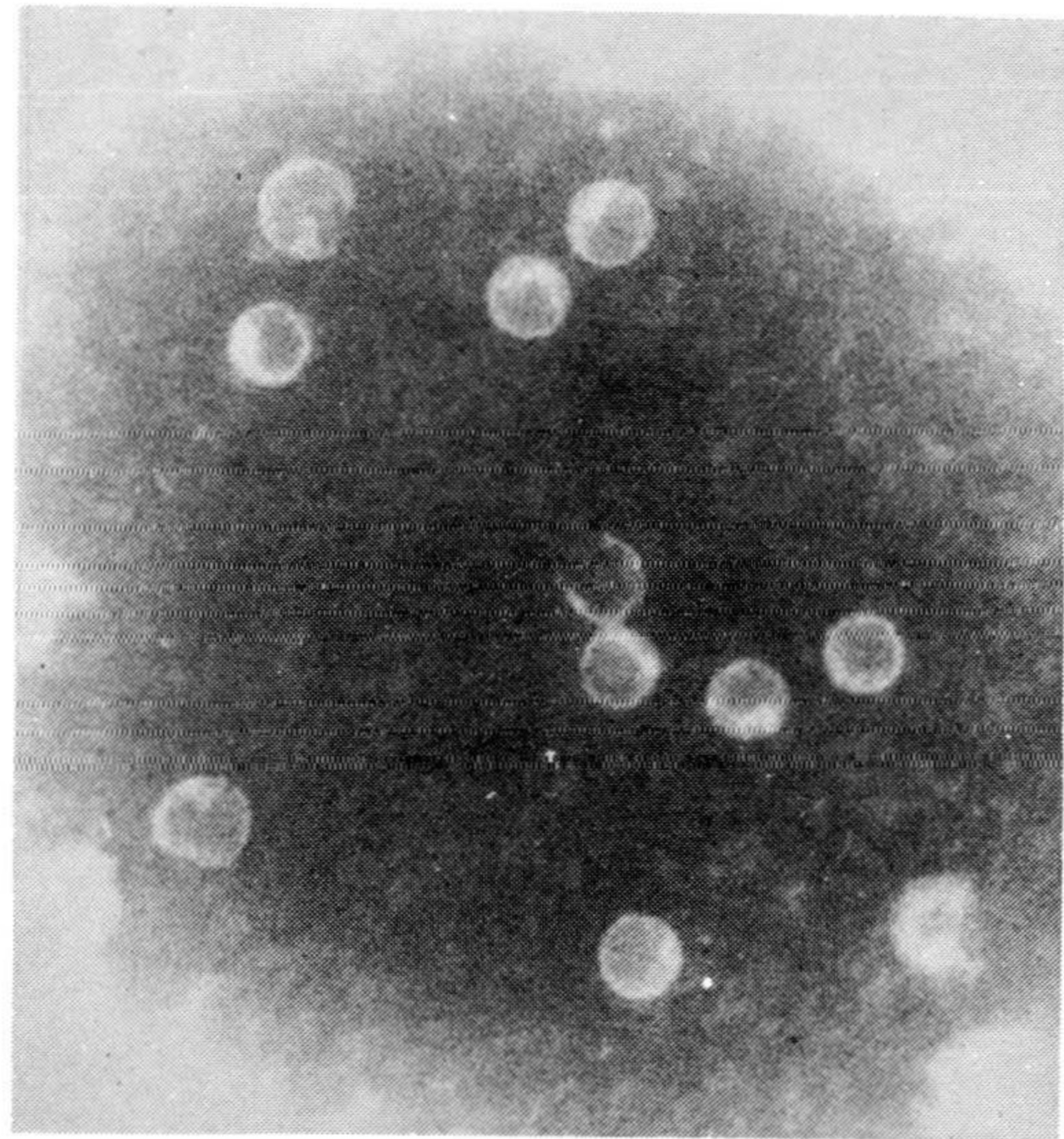


Figura 10

8.- ANTAGONISMO ENTRE ESTIRPES MATADORAS DE AMBOS -
SISTEMAS Y SENSIBLES EN DISTINTAS CONDICIONES
DE CULTIVO

Como ya señalábamos en la Introducción del presente trabajo, las estirpes pertenecientes al primer sistema matador - están ampliamente difundidas entre colecciones de laboratorio, mientras que las correspondientes al segundo sistema son levaduras típicas de vinificación y están más extendidas en la naturaleza.

Con el fin de estudiar la competencia entre las estirpes de ambos sistemas, hemos llevado a cabo diversas experiencias de crecimiento conjunto entre estirpes con distintos fenotipo respecto al carácter matador. Se utilizaron estirpes diploides y protótrofas para conferir mayor uniformidad a los cultivos ya que así se evita - un posible retardo en el crecimiento, causado por la presencia de - marcadores.

La tabla 16 muestra las estirpes que han sido utilizadas.

Cultivos de 12 horas, de las estirpes $K_1 24$, $K_2 1$, $K_2 23$ y S28 fueron recrecidos inoculando con un ml., matraces para nefelómetros que contenían 19 ml. de medio YEPG-T e incubados a 28° en agitación hasta que alcanzaron una densidad óptica medida a 650 nm de 0,5. En ese momento se hicieron los lotes correspondientes, inoculando con 0,1 ml de las estirpes adecuadas, tubos que contenían 5 ml del mismo medio. Las mezclas realizadas fueron las siguientes:

Tabla 16 .- Estirpes utilizadas en las experiencias de crecimiento conjunto.

Estirpe	Genotipo	Origen
K ₁ 24	<u>a</u> α , <u>tyr</u> /+, <u>his</u> /+, <u>ade</u> /+, <u>lys</u> /+, [KIL-k ₁]	K ₁ 1 x K ₁ 6
K ₂ 1	<u>a</u> α , protótrofa [KIL-k ₂]	Homotática de vinificación
K ₂ 23	<u>a</u> α , <u>ade</u> /+, <u>arg</u> /+, [KIL-k ₂]	K ₂ 12 x K ₂ 16
S28	<u>a</u> α , <u>ade</u> /+, <u>lys</u> /+, <u>try</u> /+, <u>his</u> /+, [KIL-o]	S12 x S13

- 1.- Estirpes matadoras del primer sistema y sensibles (K_1 24 y S28)
- 2.- Estirpes matadoras homotáticas del segundo sistema y sensibles (K_2 1 y S28).
- 3.- Estirpes matadoras heterotáticas del segundo sistema y sensibles (K_2 23 y S28).
- 4.- Estirpes matadoras del primer sistema y matadoras homotáticas del segundo sistema (K_1 24 y K_2 1).
- 5.- Estirpes matadoras del primer sistema y matadoras heterotáticas del segundo sistema (K_1 24 y K_2 23).

Todos los cultivos se incubaron a 22° en reposo, - excepto el 3 que también lo fue a 28° (El YKT₂ se mantiene activo a esa temperatura).

De todos los cultivos realizados se tomaron muestras a intervalos regulares de 6 horas y con 0,1 ml. de las diluciones - apropiadas se inocularon cajas de Petri que contenían medio YEFG-T-AM, manteniéndolas en incubación a 28° durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo las cajas de Petri se pulverizaron con suspensiones salinas de las estirpes adecuadas. Una estirpe sensible fue utilizada para pulverizar las cajas inoculadas con la mezcla de estirpes matadoras y sensibles, mientras que las cajas - que contenían la mezcla de dos estirpes matadoras se pulverizaron - con una de las matadoras. Una vez pulverizadas se mantuvieron incubando durante 48 horas a 22° procediéndose posteriormente al recuento de las colonias que producían halos de inhibición del crecimiento y

muerte a su alrededor y de las que no los producían. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 17, 18, 19, 20, 21 y 22 en las figuras 11, 12, 13, 14, 15 y 16.

Con el fin de conseguir mayor similitud con el hábitat natural de las estirpes matadoras del segundo sistema, se hicieron nuevos lotes en tubos con 5 ml. de medio YEPG-T al que una vez - esterilizado se adicionó etanol al 5 y al 10%, antes de mezclarlas, las estirpes se hicieron crecer separadamente en este medio para - conseguir una adaptación previa, las mezclas en esta ocasión fueron las siguientes:

- 6.- Estirpes matadoras del primer sistema y matadoras homotáticas del segundo en presencia de etanol al 5% (K_1 24 y K_2 1).
- 7.- Estirpes matadoras del primer sistema y matadoras heterotáticas del segundo en presencia de etanol al 5% (K_1 24 y K_2 23).
- 8.- Estirpes matadoras del primer sistema y matadoras homotáticas del segundo en presencia de etanol al 10% (K_1 24 y K_2 1).
- 9.- Estirpes matadoras del primer sistema y matadoras heterotáticas del segundo en presencia de etanol al 10% (K_1 24 y K_2 23).

Los cultivos se incubaron a 22^o en reposo en todos los casos, siguiendo posteriormente el procedimiento descrito para los otros lotes.

Las tablas 23, 24, 25 y 26, y las figuras 17, 18, 19 y 20 muestran los resultados obtenidos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, observamos que tanto las estirpes matadoras del primer sistema como las del segundo, eliminan rápidamente de los cultivos a las estirpes sensibles, siendo el efecto letal más acusado en las primeras; de igual manera, las estirpes matadoras homotálicas del segundo sistema eliminan a las sensibles con mayor rapidez que las matadoras heterotálicas.

Cuando se cultivan conjuntamente estirpes matadoras de ambos sistemas, siempre son eliminadas las estirpes matadoras del segundo y esto ocurre independientemente de que dichas estirpes sean homotálicas o heterotálicas. Dicha eliminación se acelera al adicionar etanol a los medios de cultivo.

Tabla 17.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁24 y S28 a 22°.

Tiempo (horas)	K ₁ 24, [KIL-k ₁]		S28, [KIL-o]	
	Nº cel/ml	%	Nº cel/ml	%
0	2,2 x 10 ³	55,0	1,8 x 10 ³	45,0
6	4,1 x 10 ³	73,2	1,5 x 10 ³	26,8
12	3,1 x 10 ⁴	96,2	1,2 x 10 ³	3,8
18	1,6 x 10 ⁵	100	0	0
24	8,1 x 10 ⁵	100	0	0
30	2,8 x 10 ⁶	100	0	0
36	4,3 x 10 ⁶	100	0	0
42	4,8 x 10 ⁶	100	0	0
48	4,9 x 10 ⁶	100	0	0
54	5,0 x 10 ⁶	100	0	0
60	5,1 x 10 ⁶	100	0	0
66	5,3 x 10 ⁶	100	0	0
72	6,1 x 10 ⁶	100	0	0
78	7,0 x 10 ⁶	100	0	0

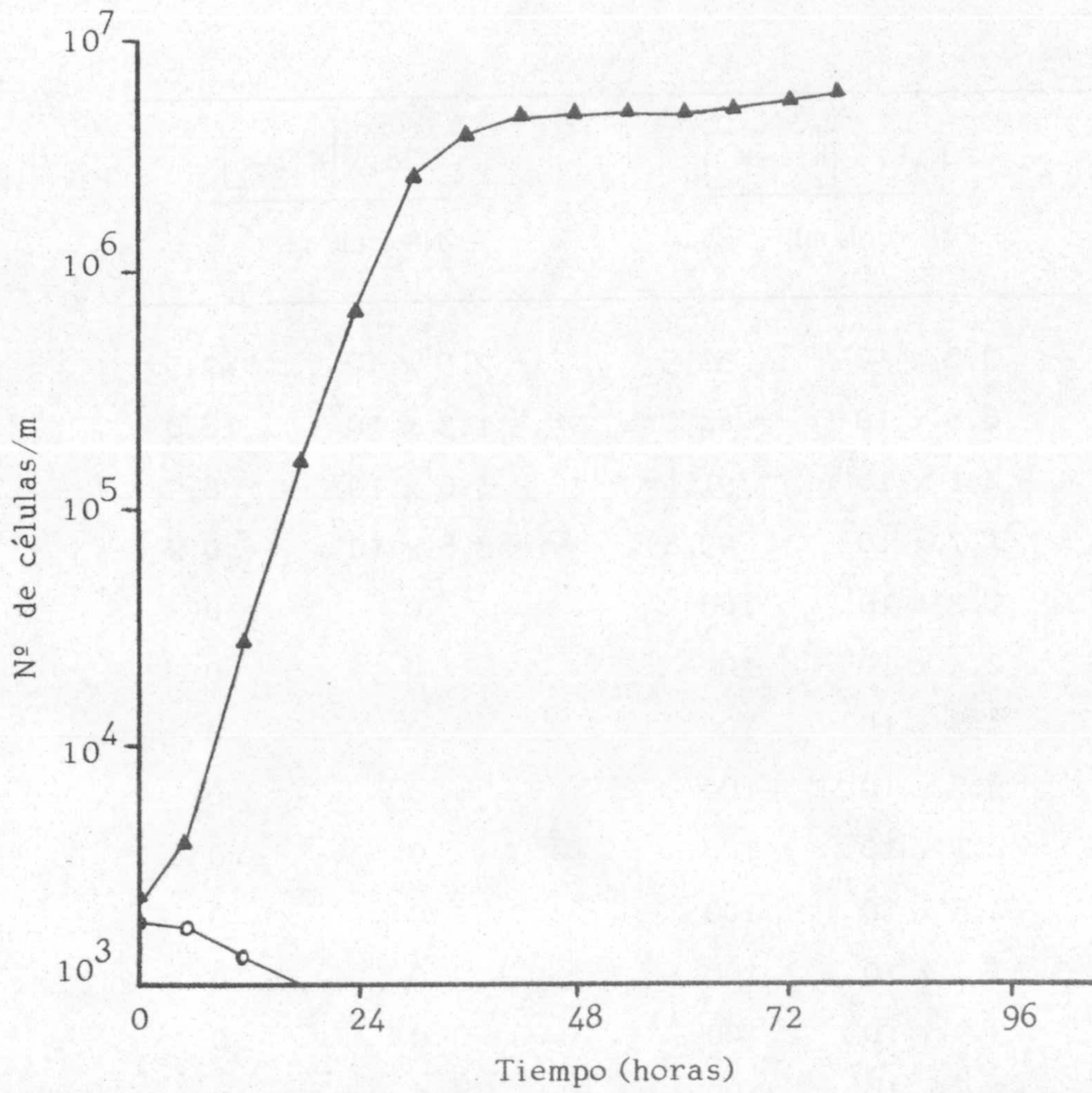


Figura 11.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁ 24 y S28 a 22°.

○—○ S28

▲—▲ K₁ 24

Tabla 18.- Efecto antagónico entre las estirpes K₂1 y S28 a 22°.

Tiempo (horas)	K ₂ 1, [KIL-k ₂]		S28, [KIL-o]	
	Nº cel/ml	%	Nº cel/ml	%
0	3,2 x 10 ³	52,5	2,0 x 10 ³	47,5
6	6,8 x 10 ⁴	84,0	1,3 x 10 ⁴	16,0
12	4,1 x 10 ⁵	91,1	4,0 x 10 ⁴	8,9
18	1,7 x 10 ⁶	99,8	3,8 x 10 ³	0,2
24	1,2 x 10 ⁷	100	0	0
30	2,4 x 10 ⁷	100	0	0
36	4,8 x 10 ⁷	100	0	0
42	5,5 x 10 ⁷	100	0	0
48	4,7 x 10 ⁷	100	0	0
54	4,5 x 10 ⁷	100	0	0
60	4,2 x 10 ⁷	100	0	0
66	3,9 x 10 ⁷	100	0	0
72	3,6 x 10 ⁷	100	0	0
78	3,3 x 10 ⁷	100	0	0

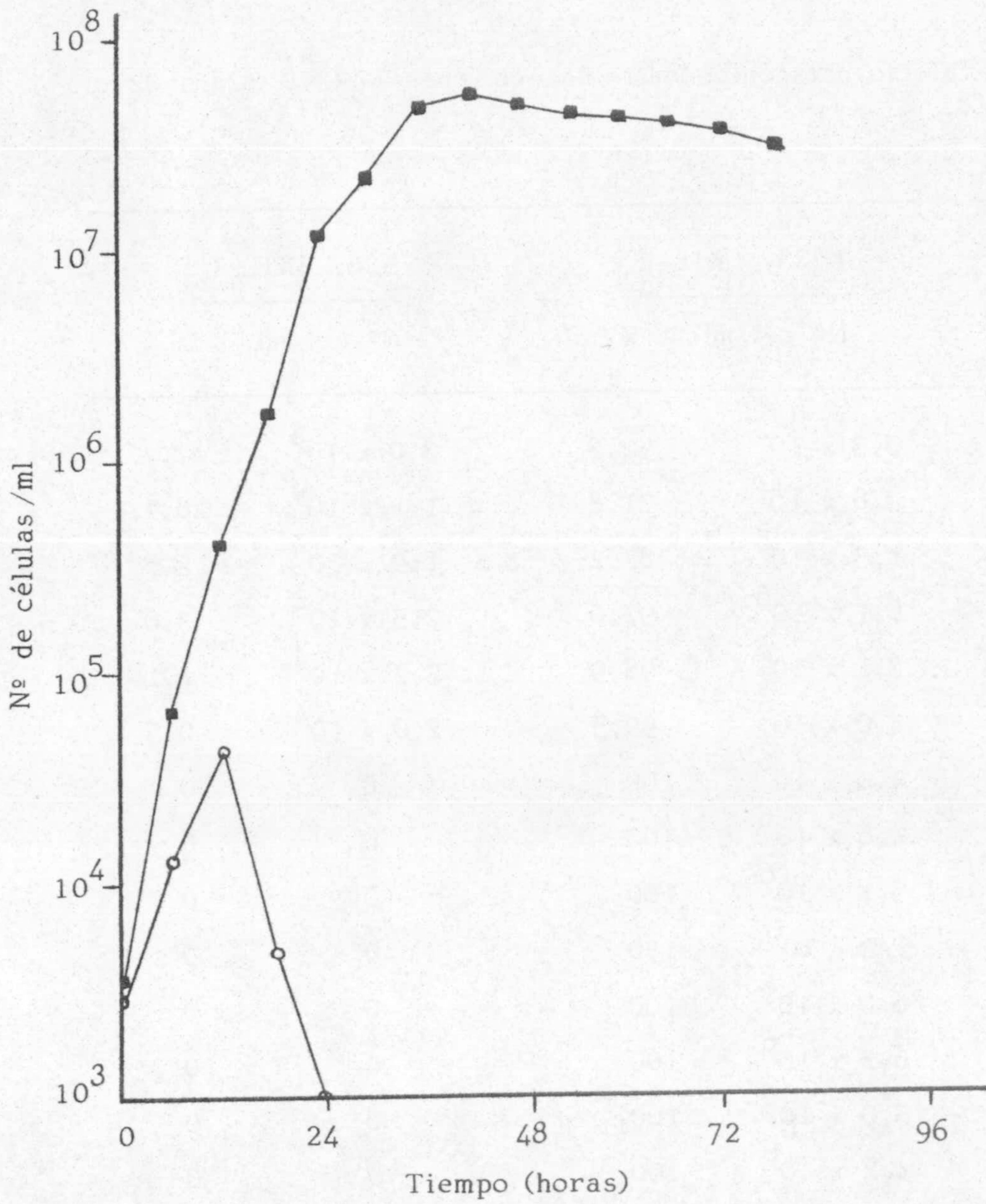


Figura 12.- Efecto antagónico entre las estirpes K₂1 y S28 a 22°.

○—○ S28

■—■ K₂1

Tabla 19.- Efecto antagónico entre las estirpes K₂23 y S28 a 22°.

Tiempo (horas)	K ₂ 23, [KIL-k ₂]		S28, [KIL-o]	
	Nº cel/ml	%	Nº cel/ml	%
0	3,3 x 10 ³	52,3	3,0 x 10 ³	47,7
6	3,8 x 10 ⁴	71,8	1,1 x 10 ⁴	28,2
12	1,3 x 10 ⁵	87,2	1,9 x 10 ⁴	12,8
18	8,1 x 10 ⁵	97,0	2,5 x 10 ⁴	3,0
24	3,1 x 10 ⁶	98,9	3,7 x 10 ⁴	1,1
30	4,0 x 10 ⁶	99,5	2,0 x 10 ⁴	0,5
36	4,4 x 10 ⁶	100	0	0
42	4,8 x 10 ⁶	100	0	0
48	5,1 x 10 ⁶	100	0	0
54	5,7 x 10 ⁶	100	0	0
60	6,0 x 10 ⁶	100	0	0
66	6,2 x 10 ⁶	100	0	0
72	5,0 x 10 ⁶	100	0	0
78	4,2 x 10 ⁶	100	0	0

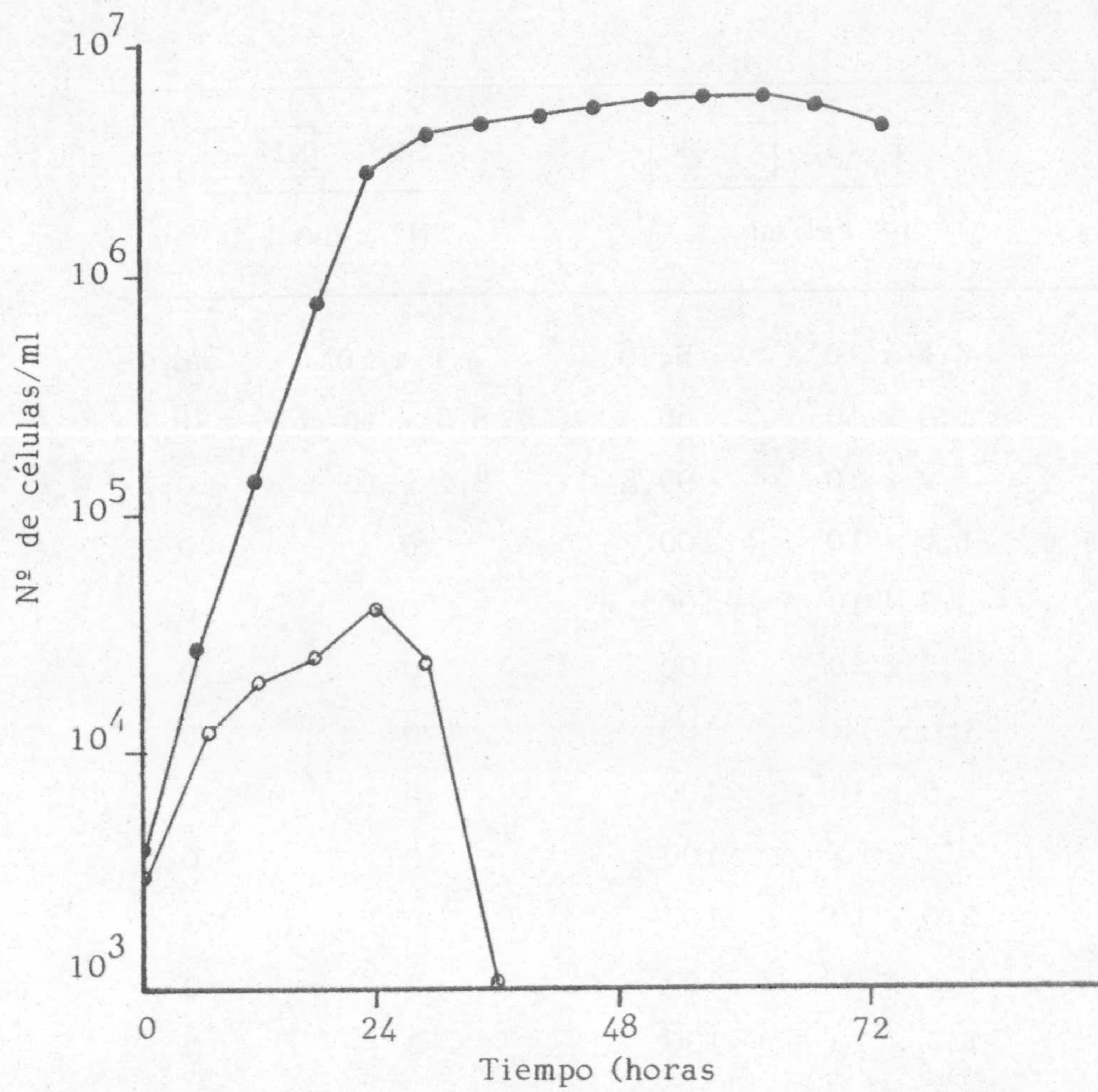


Figura 13.- Efecto antagónico entre las estirpes K₂23 y S28 a 22°.

○—○ S28

●—● K₂23

Tabla 20.- Efecto antagónico entre las estirpes K₂23 y S28 a 28°.

Tiempo (horas)	K ₂ 23, [KIL-k ₂]		S28, [KIL-o]	
	Nº cel/ml	%	Nº cel/ml	%
0	4,8 x 10 ³	54,0	4,1 x 10 ³	46,0
6	1,9 x 10 ⁵	68,3	8,8 x 10 ⁴	31,7
12	1,2 x 10 ⁶	99,3	8,2 x 10 ³	0,7
18	1,6 x 10 ⁷	100	0	0
24	3,3 x 10 ⁷	100	0	0
30	4,5 x 10 ⁷	100	0	0
36	3,1 x 10 ⁷	100	0	0
42	2,5 x 10 ⁷	100	0	0
48	2,2 x 10 ⁷	100	0	0
54	2,0 x 10 ⁷	100	0	0
60	1,8 x 10 ⁷	100	0	0
66	1,4 x 10 ⁷	100	0	0
72	1,3 x 10 ⁷	100	0	0
78	1,2 x 10 ⁷	100	0	0

Tabla 21.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁24 y K₂1 a 22°.

Tiempo (horas)	K ₁ 24, $\overline{[KIL-k_1]}$		K ₂ 1, $\overline{[KIL-k_2]}$	
	Nº cel/ml	%	Nº cel/ml	%
0	$3,0 \times 10^3$	46,1	$3,5 \times 10^3$	53,9
6	$8,2 \times 10^3$	42,7	$1,1 \times 10^4$	57,3
12	$2,2 \times 10^4$	42,3	$3,0 \times 10^4$	57,7
18	$5,0 \times 10^4$	37,9	$8,2 \times 10^4$	62,1
24	$2,2 \times 10^5$	38,6	$3,5 \times 10^5$	61,4
30	$7,8 \times 10^5$	48,7	$8,2 \times 10^5$	51,3
36	$2,4 \times 10^6$	68,6	$1,1 \times 10^6$	31,4
42	$5,0 \times 10^6$	87,7	$1,0 \times 10^6$	12,3
48	$1,0 \times 10^7$	97,8	$2,0 \times 10^5$	2,2
54	$1,4 \times 10^7$	98,9	$1,5 \times 10^5$	1,1
60	$1,8 \times 10^7$	99,3	$1,2 \times 10^5$	0,7
66	$1,7 \times 10^7$	99,4	$1,0 \times 10^5$	0,6
72	$1,5 \times 10^7$	100	0	0
78	$1,1 \times 10^7$	100	0	0
84	$1,5 \times 10^7$	100	0	0
96	$2,2 \times 10^7$	100	0	0
120	$2,5 \times 10^7$	100	0	0

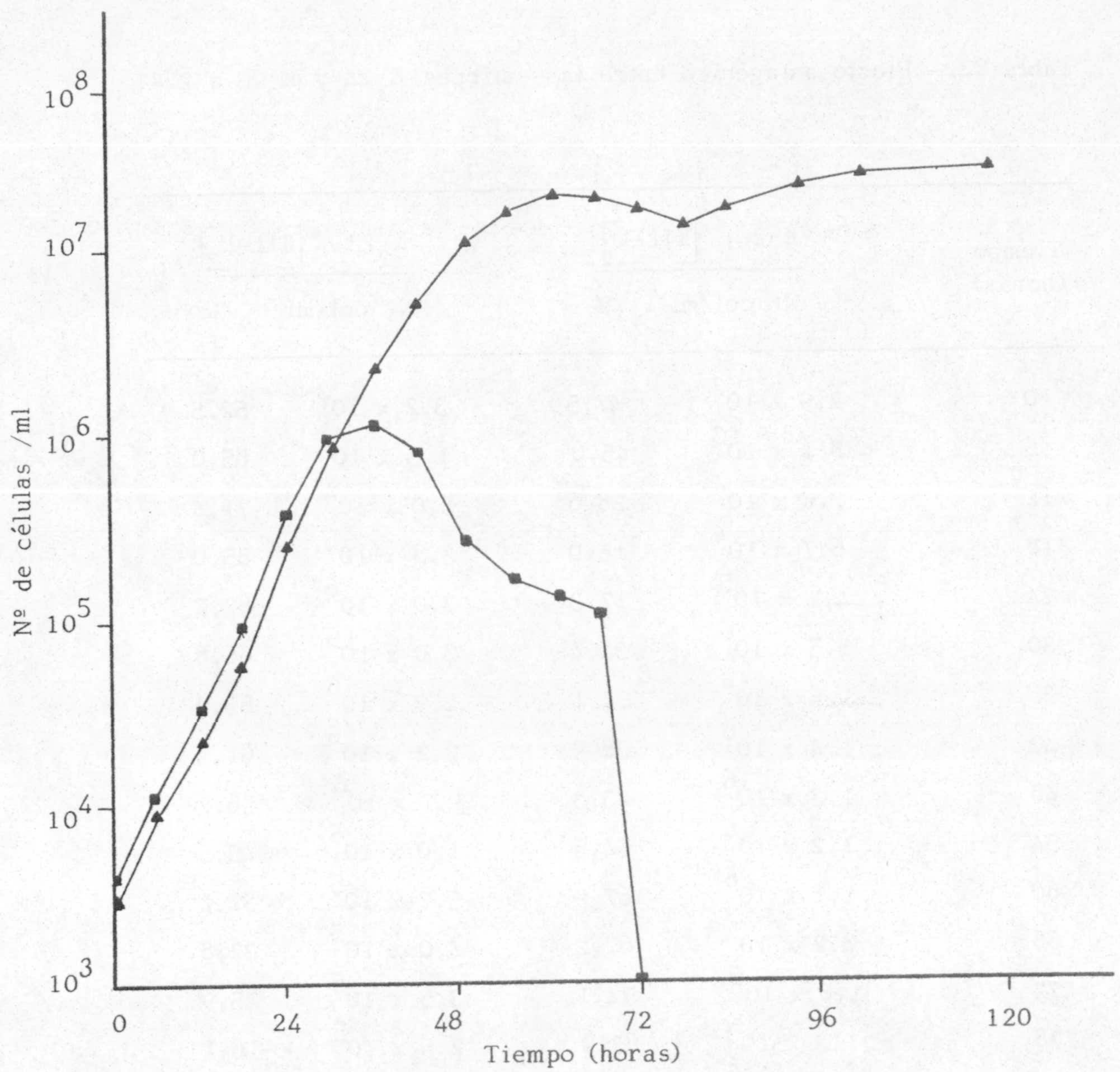


Figura 15.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁ 24 y K₂ 1 a 22°.

▲ — ▲ K₁ 24

■ — ■ K₂ 1

Tabla 22.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁24 y K₂23 a 22°.

Tiempo (horas)	K ₁ 24, [KIL-k ₁]		K ₂ 23, [KIL-k ₂]	
	Nº cel/ml	%	Nº cel/ml	%
0	2,9 x 10 ³	47,5	3,2 x 10 ³	52,5
6	8,1 x 10 ³	45,0	1,5 x 10 ⁴	65,0
12	2,0 x 10 ⁴	28,6	5,0 x 10 ⁴	71,4
18	6,7 x 10 ⁴	15,0	3,8 x 10 ⁵	85,0
24	4,2 x 10 ⁵	17,3	2,0 x 10 ⁶	82,7
30	1,5 x 10 ⁶	33,4	3,0 x 10 ⁶	66,6
36	1,5 x 10 ⁶	34,1	2,9 x 10 ⁶	65,9
42	1,4 x 10 ⁶	38,9	2,2 x 10 ⁶	61,1
48	1,3 x 10 ⁶	43,3	1,7 x 10 ⁶	56,7
54	1,2 x 10 ⁶	54,5	1,0 x 10 ⁶	45,5
60	1,1 x 10 ⁶	67,9	5,2 x 10 ⁵	32,1
66	8,2 x 10 ⁵	67,2	4,0 x 10 ⁵	32,8
72	1,0 x 10 ⁶	74,1	3,5 x 10 ⁵	25,9
78	1,3 x 10 ⁶	83,9	2,5 x 10 ⁵	16,1
96	4,0 x 10 ⁶	100	0	0
120	4,3 x 10 ⁶	100	0	0

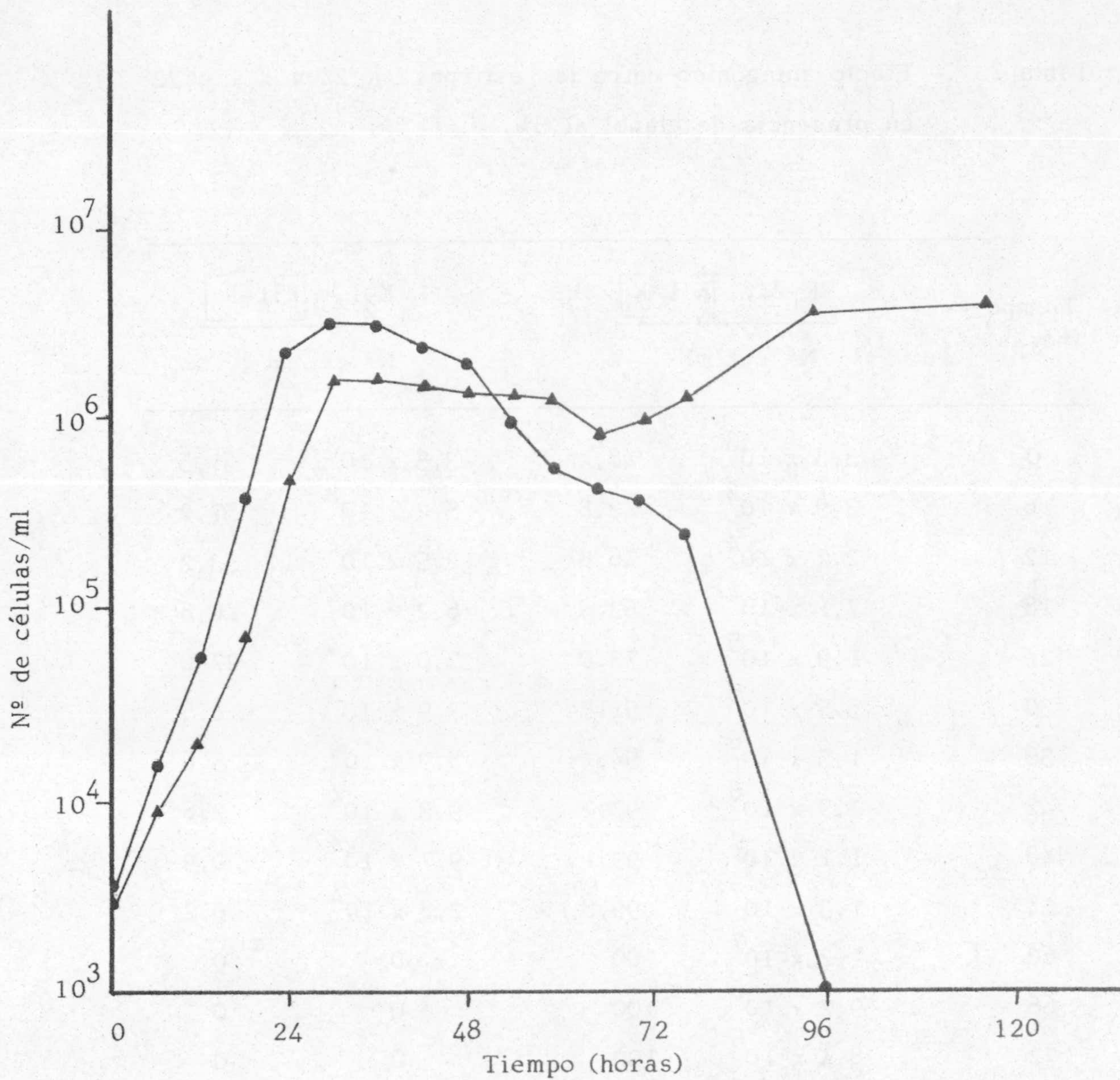


Figura 16.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁ 24 y K₂ 23 a 22°.

▲ — ▲ K₁ 24

● — ● K₂ 23

Tabla 23 .- Efecto antagónico entre las estirpes $K_1 24$ y $K_2 1$ a 22° en presencia de etanol al 5%.

Tiempo (horas)	$K_1 24, \overline{[KIL-k_1]}$		$K_2 1, \overline{[KIL-k_2]}$	
	Nº cel/ml	%	Nº cel/ml	%
0	$3,3 \times 10^3$	48,5	$3,5 \times 10^3$	51,5
6	$3,9 \times 10^3$	42,8	$5,2 \times 10^3$	57,2
12	$2,2 \times 10^4$	46,8	$2,5 \times 10^4$	53,2
18	$7,1 \times 10^4$	53,4	$6,2 \times 10^4$	46,6
24	$1,9 \times 10^5$	73,0	$7,0 \times 10^4$	27,0
30	$5,5 \times 10^5$	91,5	$7,9 \times 10^4$	8,5
36	$1,5 \times 10^6$	94,4	$8,9 \times 10^4$	5,6
42	$3,9 \times 10^6$	97,2	$9,3 \times 10^4$	2,8
48	$1,1 \times 10^7$	99,1	$9,7 \times 10^4$	0,9
54	$1,3 \times 10^7$	99,8	$2,8 \times 10^4$	0,2
60	$1,2 \times 10^7$	100	0	0
66	$9,2 \times 10^6$	100	0	0
72	$8,4 \times 10^6$	100	0	0
78	$7,6 \times 10^6$	100	0	0
84	$5,6 \times 10^6$	100	0	0
96	$4,9 \times 10^6$	100	0	0
120	$3,7 \times 10^6$	100	0	0

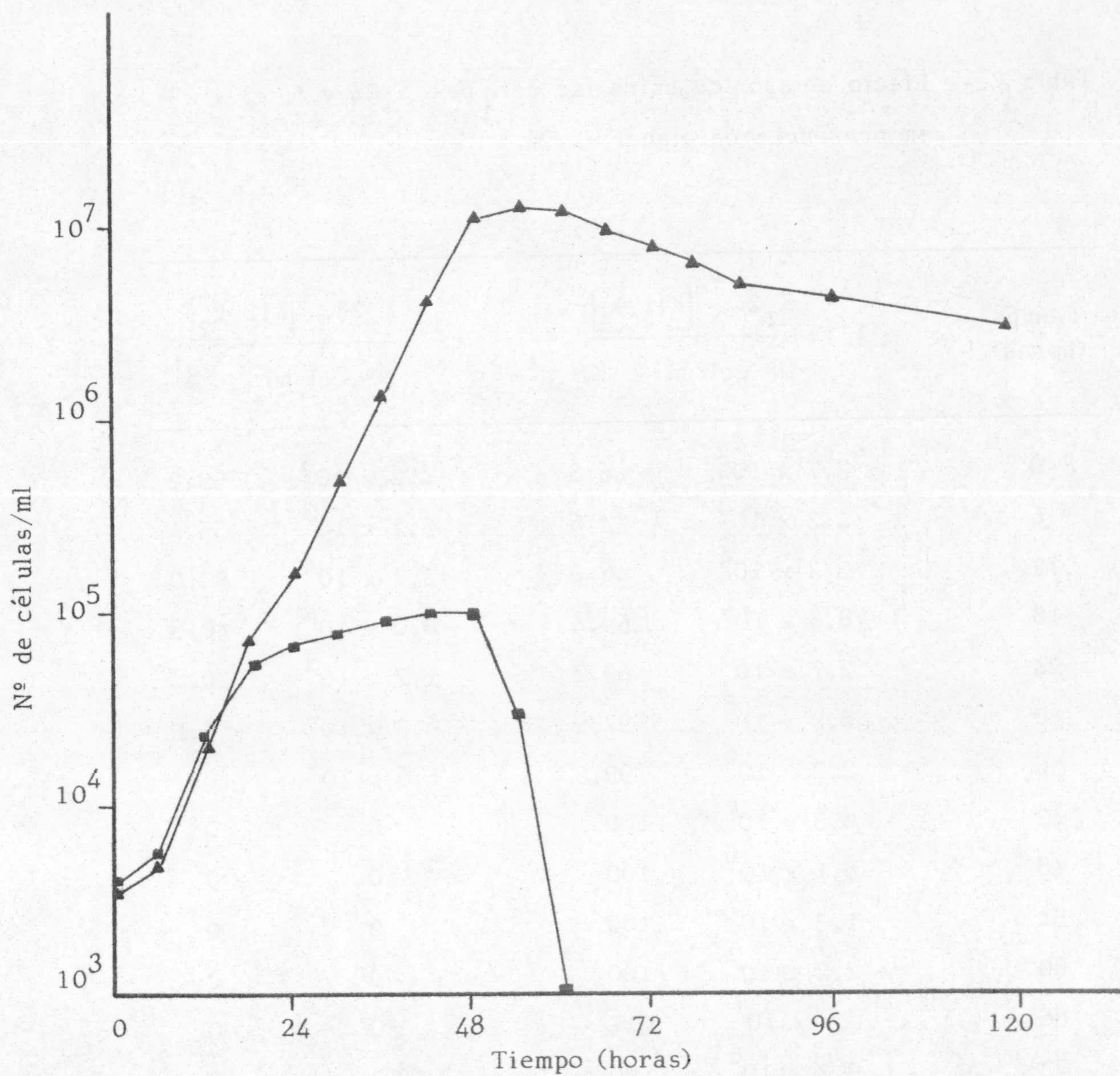


Figura 17.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁ 24 y K₂ 1 a 22° en presencia de etanol al 5%.

▲—▲ K₁ 24

■—■ K₂ 1

Tabla 24.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁24 y K₂23 a 22° en presencia de etanol al 5%.

Tiempo (horas)	K ₁ 24, $\overline{[KIL-k_1]}$		K ₂ 23, $\overline{[KIL-k_2]}$	
	Nº cel/ml	%	Nº cel/ml	%
0	3,7 x 10 ³	46,8	4,2 x 10 ³	53,2
6	4,2 x 10 ³	44,6	5,2 x 10 ³	55,4
12	2,3 x 10 ⁴	46,0	2,7 x 10 ⁴	54,0
18	8,8 x 10 ⁴	59,4	6,0 x 10 ⁴	40,6
24	2,7 x 10 ⁵	69,2	1,2 x 10 ⁵	30,8
30	8,2 x 10 ⁵	92,9	6,3 x 10 ⁴	7,1
36	2,2 x 10 ⁶	99,3	1,6 x 10 ⁴	0,7
42	6,3 x 10 ⁶	100	0	0
48	8,1 x 10 ⁶	100	0	0
54	1,3 x 10 ⁷	100	0	0
60	2,2 x 10 ⁷	100	0	0
66	1,1 x 10 ⁷	100	0	0
72	9,2 x 10 ⁶	100	0	0
78	8,7 x 10 ⁶	100	0	0
84	8,5 x 10 ⁶	100	0	0
96	6,2 x 10 ⁶	100	0	0
120	4,7 x 10 ⁶	100	0	0

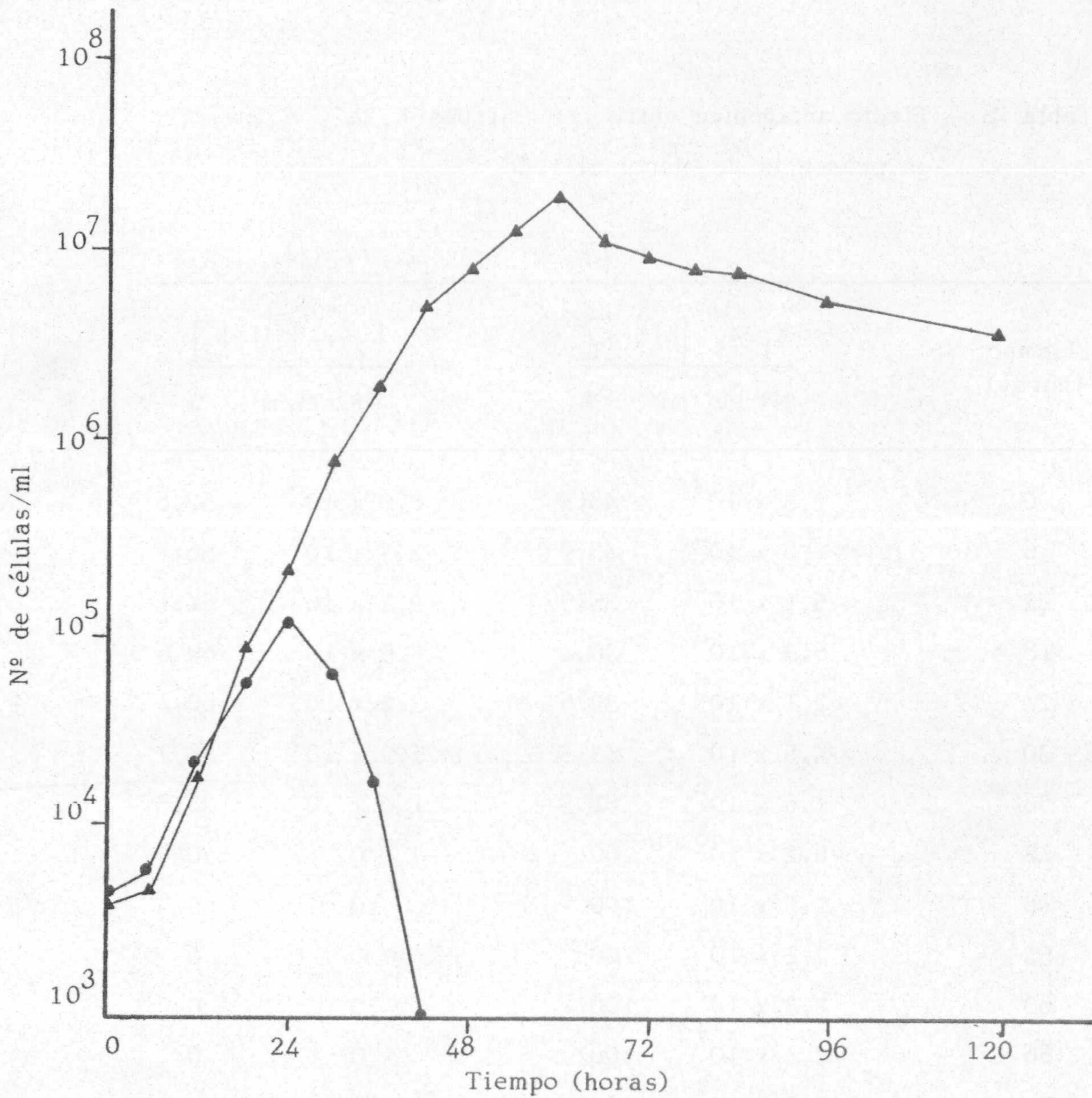


Figura 18.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁ 24 y K₂ 23 a 22° en presencia de etanol al 5%.

▲ — ▲ K₁ 24

● — ● K₂ 23

Tabla 25.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁24 y K₂1 a 22° en presencia de etanol al 10%.

Tiempo (horas)	K ₁ 24, $\overline{[KIL-k_1]}$		K ₂ 1, $\overline{[KIL-k_2]}$	
	Nº cel/ml	%	Nº cel/ml	%
0	7,3 x 10 ³	48,4	8,0 x 10 ³	52,6
6	1,8 x 10 ⁴	43,9	2,3 x 10 ⁴	56,1
12	5,1 x 10 ⁴	35,9	9,1 x 10 ⁴	64,1
18	8,3 x 10 ⁴	30,4	1,9 x 10 ⁵	69,6
24	2,1 x 10 ⁵	39,6	3,2 x 10 ⁵	60,4
30	4,5 x 10 ⁵	43,3	5,9 x 10 ⁵	56,7
36	1,6 x 10 ⁶	61,5	1,0 x 10 ⁵	38,5
42	6,2 x 10 ⁶	100	0	0
48	1,5 x 10 ⁷	100	0	0
54	2,2 x 10 ⁷	100	0	0
60	2,3 x 10 ⁷	100	0	0
66	2,4 x 10 ⁷	100	0	0
72	2,3 x 10 ⁷	100	0	0
78	2,1 x 10 ⁷	100	0	0
84	1,6 x 10 ⁷	100	0	0
120	2,1 x 10 ⁶	100	0	0

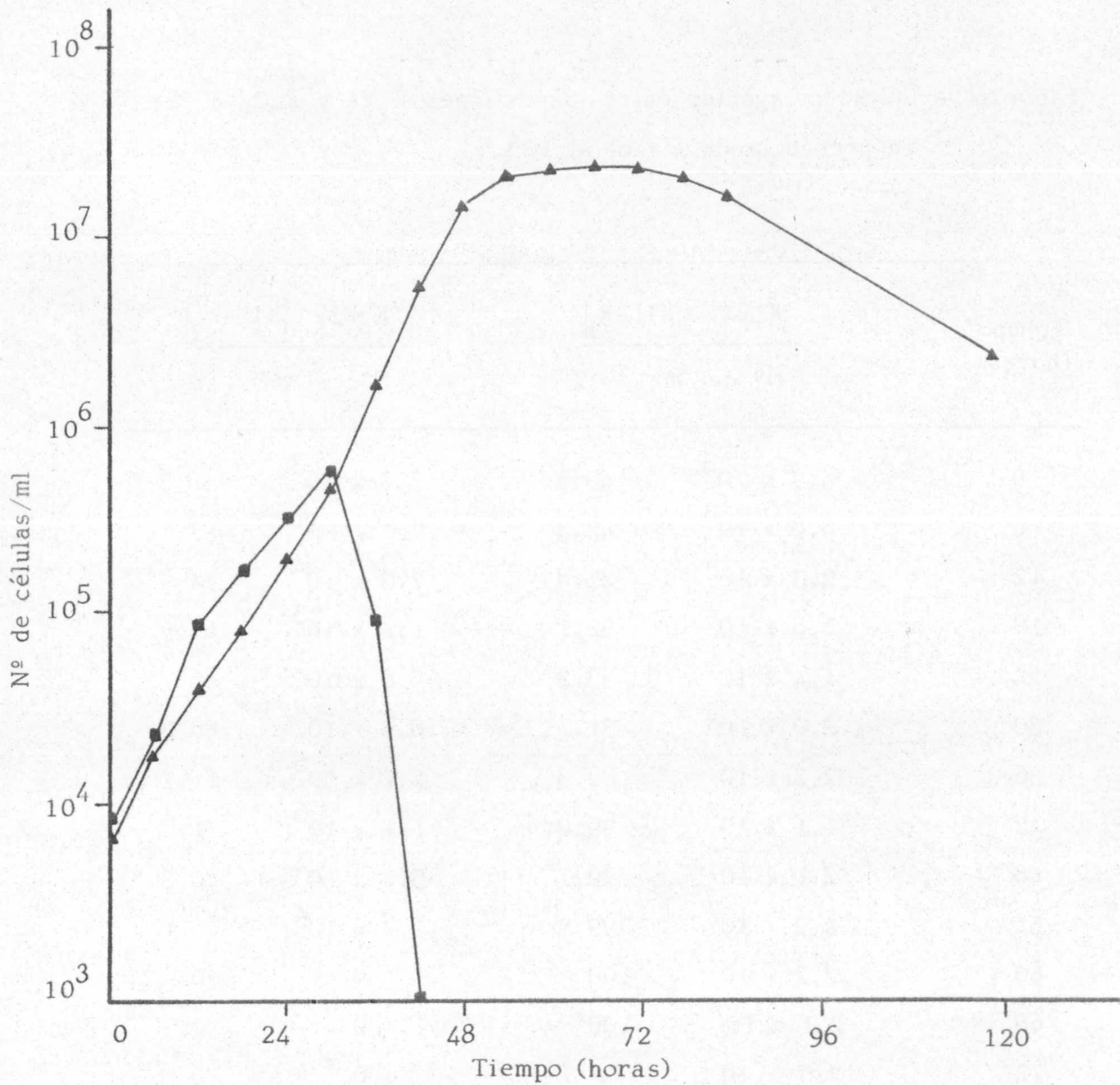


Figura 19. - Efecto antagónico entre las estirpes K₁ 24 y K₂ 1 a 22° en presencia de etanol al 10%.

▲ — ▲ K₁ 24

■ — ■ K₂ 1

Tabla 26 .- Efecto antagónico entre las estirpes K₁24 y K₂23 a 22° en presencia de etanol al 10%.

Tiempo (horas)	K ₁ 24, $\overline{[KIL-k_1]}$		K ₂ 23, $\overline{[KIL-k_2]}$	
	Nº cel/ml	%	Nº cel/ml	%
0	4,9 x 10 ³	49,5	5,0 x 10 ³	50,5
6	8,8 x 10 ³	42,3	1,2 x 10 ⁴	57,7
12	2,3 x 10 ⁴	25,8	7,3 x 10 ⁴	74,2
18	6,8 x 10 ⁴	32,1	1,4 x 10 ⁵	67,9
24	1,4 x 10 ⁵	33,3	2,8 x 10 ⁵	66,7
30	3,0 x 10 ⁵	31,7	6,9 x 10 ⁵	68,3
36	2,2 x 10 ⁶	88,3	2,7 x 10 ⁵	11,7
42	1,1 x 10 ⁷	99,0	1,1 x 10 ⁵	1,0
48	2,1 x 10 ⁷	99,7	5,1 x 10 ⁴	0,3
54	2,2 x 10 ⁷	99,9	1,7 x 10 ⁴	0,1
60	2,2 x 10 ⁷	100	0	0
66	2,1 x 10 ⁷	100	0	0
72	1,7 x 10 ⁷	100	0	0
78	1,3 x 10 ⁷	100	0	0
84	1,1 x 10 ⁷	100	0	0
120	3,8 x 10 ⁶	100	0	0

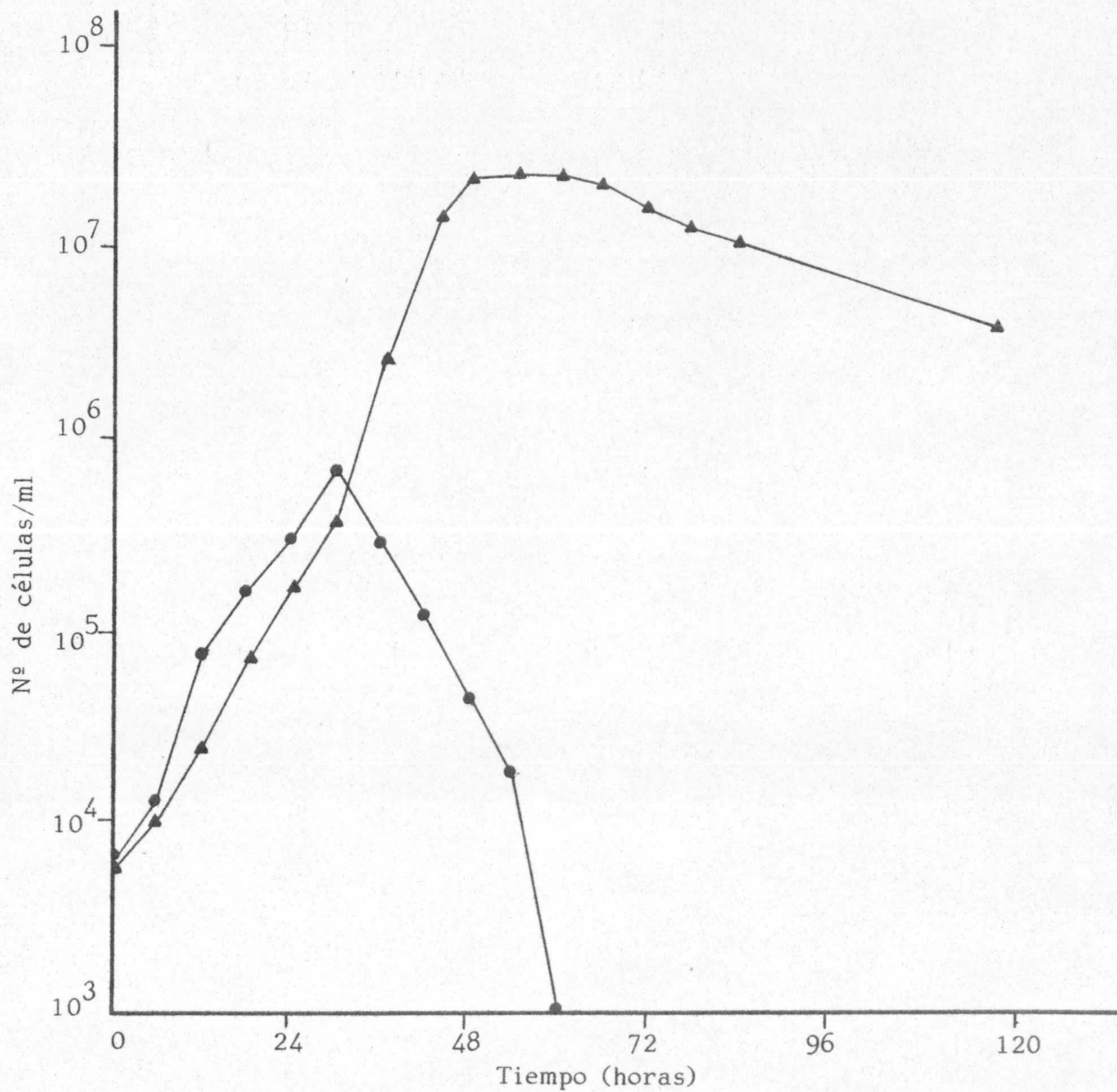


Figura 20.- Efecto antagónico entre las estirpes K₁ 24 y K₂ 23 a 22° en presencia de etanol al 10%.

▲ — ▲ K₁ 24

● — ● K₂ 23

DISCUSSION

Al iniciar el presente trabajo existía en nuestro - laboratorio una amplia colección de estirpes con distintos fenotipos respecto al carácter matador: matadoras, neutrales y sensibles, - así como de mutantes nucleares y extranucleares previamente descri- tos (kex, mak, pets y supresivos) procedentes de otros laboratorios y pertenecientes, todas al primer sistema. Igualmente trabajos rea- lizados con anterioridad en nuestro Departamento condujeron al ais- lamiento de una estirpe de levadura homotática de vinificación del - segundo sistema K_21 , cuya toxina fue parcialmente purificada, estu- diándose asimismo algunas de sus propiedades fisicoquímicas (Extre- mera, 1978; Extremera y Montoya, 1980).

No obstante a la hora de abordar un estudio genético más profundo sobre la naturaleza y características de los determinan- tes extranucleares responsables de la producción de toxina matadora en esta estirpe y sobre la posible influencia que los genes nucleares y plásmidos descritos para el primer sistema pudieran ejercer sobre los plásmidos de la estirpe K_21 , nos encontramos con una seria difi- cultad: el hecho de que esta estirpe matadora de vinificación es homo- tática.

Las estirpes homotáticas no son adecuadas para estu- dios genéticos y aunque existían en nuestro laboratorio varios mutan- tes auxótrofos obtenidos por tratamiento de K_21 con nitrosoguanidina, al cruzar dichas estirpes con otras haploides se producen cigotos tri- ploides con un bajo rendimiento; que como es sabido presentan una se- gregación meiotica errática y anormal. Este hecho nos impedía de en- trada desarrollar algunos puntos de los previstos en nuestro plan de trabajo. Por lo tanto fue necesario, como paso previo, transferir la

capacidad de producir la toxina de las estirpes K_2 1 a cepas heterotáticas de S.cerevisiae. Mediante las experiencias que se detallan en el apartado correspondiente se obtuvieron siete estirpes heterotáticas matadoras, que se designaron como K_2 11 a K_2 17.

Cuando se analizó el fenotipo de estas estirpes, con respecto al carácter matador, se encontró que presentaban distinto comportamiento. Por las razones previamente expuestas se pensó que existían dos toxinas matadoras diferentes, hipótesis que pudo ser posteriormente comprobada. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se confirmó igualmente la existencia de dos ARNs bicatenarios con distinta movilidad electroforética, denominados $[KIL-k_{2A}]$ y $[KIL-k_{2B}]$, y responsables de la producción de las citadas toxinas matadoras con diferente especificidad, que hemos designado como YKT_{2A} e YKT_{2B} respectivamente. No se ha conseguido aislar ninguna estirpe heterotática que presente los dos plásmidos y produzca ambas toxinas.

Para intentar esclarecer el hecho de que se hayan aislado estirpes heterotáticas portadoras de uno u otro tipo de ARN bicatenario, hay que buscar las causas en las estirpes homotáticas de que proceden. Dado que estas estirpes homotáticas fueron cruzadas, en estado de ascospora, con células sensibles, que por lo tanto carecen de cualquier ARN responsable de la producción de toxina matadora, cabe pensar que el diferente patrón de plásmidos obtenido, se debe a alguna característica de la estirpe homotática. Entonces se estudió la composición en ARNs bicatenarios de las estirpes homotá-

licas progenitoras de las heterotáticas.

Como puede observarse en la figura correspondiente, existen estirpes homotáticas portadoras del plásmido $[KIL-k_{2A}]$, del $[KIL-k_{2B}]$ y de ambos. Así, puede comprobarse que la estirpe $K_2 8$, progenitora de $K_2 11$, $K_2 12$ y $K_2 13$ es portadora sólo del plásmido $[KIL-k_{2A}]$, la $K_2 4$, de la que proceden las $K_2 14$, $K_2 15$, $K_2 16$ y $K_2 17$ alberga el plásmido $[KIL-k_{2B}]$ exclusivamente, mientras que la primitiva estirpe $K_2 1$ presenta los dos plásmidos y de acuerdo con ello produce los dos tipos de toxina.

La aparición de las citadas estirpes homotáticas portadoras de un sólo plásmido, sólo puede ser consecuencia del tratamiento con nitrosoguanidina a que fue sometida la estirpe $K_2 1$ con el fin de obtener mutantes con marcadores nucleares. Dicho tratamiento, debió alterar algún gen nuclear responsable del mantenimiento o replicación de uno u otro de los plásmidos $[KIL-k_2]$, o bien destruir uno u otro de los mismos. No obstante lo anteriormente expuesto no ha sido comprobado experimentalmente.

De otra parte, no puede olvidarse que las estirpes heterotáticas, debido a su peculiar procedimiento de obtención, presentan una mezcla de genes nucleares de ambos sistemas relacionados con el carácter matador. Además, como se demuestra en el apartado correspondiente, las estirpes homotáticas presentan genes nucleares capaces de mantener y expresar a los plásmidos $[KIL-k_1]$; asimismo, de las experiencias que condujeron a la obtención de las estirpes heterotáticas, se puede inferir que los genes nucleares del primer sistema pueden permitir la expresión y replicación de los -

plásmidos $\overline{[KIL-k_2]}$; Todos estos hechos deben ser tenidos en consideración a la hora de interpretar las interacciones entre los genes nucleares y plásmidos de ambos sistemas.

Una vez solucionado el problema que planteaba el homotalismo y disponiendo de varias estirpes heterotáticas productoras de dos tipos diferentes de toxina, se comenzó a estudiar la compatibilidad o incompatibilidad de los plásmidos matadores encontrados en ambos sistemas, y el papel que los genes nucleares desempeñan en su mantenimiento y expresión.

Para ello se llevaron a cabo dos series de cruces entre, estirpes del primer sistema con distintos genotipos y las heterotáticas, portadoras de los plásmidos $\overline{[KIL-k_{2A}]}$ ó $\overline{[KIL-k_{2B}]}$. Como referencia, y a efectos comparativos, previamente se realizaron cruces similares entre estirpes que albergan los plásmidos $\overline{[KIL-k_1]}$ y diversos mutantes del primer sistema matador. Los resultados obtenidos, en este último caso, fueron los esperados.

Por lo que se refiere a los cruces entre estirpes matadoras del primero y segundo sistema, con independencia de que estas últimas sean portadoras de los plásmidos $\overline{[KIL-k_{2A}]}$ ó $\overline{[KIL-k_{2B}]}$ hay que destacar el hecho de que tanto el cigoto como las cuatro ascosporas son portadoras solamente del ARN bicatenario $\overline{[KIL-k_1]}$, siendo eliminados los plásmidos del segundo sistema. Estos resultados se obtienen tanto si la estirpe del primer sistema es matadora, como si es neutral o kex, es decir, siempre que el plásmido $\overline{[KIL-k_1]}$ esté presente y sea cual sea el genomio nuclear de la célula. La -

coexistencia de plásmidos matadores de uno y otro sistema, es pues imposible, hecho que demuestra que todos ellos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad. La electroforesis de los ARNs bicatenarios extraídos, tanto del cigoto como de las cuatro ascosporas de una misma asca confirma, de modo concluyente, que los plásmidos $[\overline{\text{KIL-k}}_2]$ son eliminados por los $[\overline{\text{KIL-k}}_1]$.

La incompatibilidad entre los plásmidos se ha intentado explicar desde diversos puntos de vista. Según el modelo del "replicón" (Jacob et al, 1963), la duplicación de los plásmidos se lleva a cabo en puntos específicos de la membrana citoplasmática. Aunque la replicación de un plásmido pueda depender de la concentración celular de sustancias activadoras, el número de copias del mismo viene determinado, en opinión de los citados autores, por el número de puntos de replicación que existen. Los plásmidos incompatibles compiten por los mismos sitios específicos de replicación. La incompatibilidad entre los plásmidos $[\overline{\text{KIL-k}}_1]$ y $[\overline{\text{KIL-k}}_2]$ puede, pues, explicarse de acuerdo con este modelo, ya que, aunque están contenidos en estructuras de tipo virásico, ambos son de idéntica naturaleza (ARN de doble cadena).

Pritchard (1969), en su modelo de "dilución del inhibidor" admite que cada plásmido produce inhibidores para la replicación de los otros plásmidos. En sucesivas divisiones celulares, la dilución de dichos inhibidores originaría una desproporción en el número de copias de cada plásmido, desapareciendo finalmente uno de ellos. Este modelo puede ser aplicado al caso de los plásmidos $[\overline{\text{KIL-k}}_1]$ y $[\overline{\text{KIL-k}}_2]$, admitiendo que el represor producido por los segundos,

se diluye más rápidamente que el sintetizado por los plásmidos - $[\overline{\text{KIL-k}}_1]$.

El tercer modelo (Hashimoto - Gotoh and Ishii, 1979) propone que el conjunto de las copias de dos tipos de plásmidos incompatibles es considerado por la célula como una población; su distribución al azar durante la división celular, daría lugar a un reparto desigual de los mismos en las células hijas, hecho que conduce a la aparición de células con un sólo tipo de plásmido. Este modelo, por sí solo, no permite explicar es nuestro caso, por qué es siempre el ARN plasmídico tipo $[\overline{\text{KIL-k}}_1]$ el que predomina sobre los $[\overline{\text{KIL-k}}_2]$.

De las experiencias genéticas realizadas se deduce - asimismo que los plásmidos supresivos descritos en el primer sistema, $[\overline{\text{KIL-s}}]$, eliminan también a los ARN bicatenarios $[\overline{\text{KIL-k}}_{2A}]$ y $[\overline{\text{KIL-k}}_{2B}]$, tanto en los cigotos como en la descendencia. Aunque no se exponen en la presente Memoria, las electroforesis de los ARNs bicatenarios confirman los resultados obtenidos. Igualmente se deduce que los genes nucleares mak son necesarios, en estado silvestre, para el mantenimiento de los plásmidos $[\overline{\text{KIL-k}}_{2A}]$ y $[\overline{\text{KIL-k}}_{2B}]$. No ocurre lo mismo con el gen pets, el cual, no es necesario para mantener y expresar tanto los plásmidos $[\overline{\text{KIL-k}}_{2A}]$ como los $[\overline{\text{KIL-k}}_{2B}]$. En cuanto al gen kex, las experiencias realizadas no permiten aclarar si desempeña - algún papel en relación con la expresión de los plásmidos $[\overline{\text{KIL-k}}_2]$, - ya que como ha sido dicho, tanto en el cigoto como en las ascosporas, estos últimos son eliminados por los $[\overline{\text{KIL-k}}_1]$.

Para estudiar las interacciones entre los plásmidos $[\overline{\text{KIL-k}}_{2\text{A}}]$ y $[\overline{\text{KIL-k}}_{2\text{B}}]$ debe tenerse en cuenta que ambos ARNs bicatenarios coexisten y se expresan en la levadura homotálica K_2^1 . Sin embargo, cuando se cruzan dos estirpes heterotálicas productoras de distinto factor matador, el correspondiente cigoto produce y es resistente a las dos toxinas, pero las ascosporas sintetizan sólo la $\text{YKT}_{2\text{A}}$, aunque son inmunes a ésta y a la $\text{YKT}_{2\text{B}}$. En este caso no se debe tratar de un fenómeno de eliminación, como ocurría entre los plásmidos del primer y segundo sistema. En efecto, tras extracción y análisis mediante electroforesis de los ARNs bicatenarios, se observó que ambos plásmidos estaban presentes tanto en el cigoto como en sus correspondientes ascosporas. Luego el plásmido $[\overline{\text{KIL-k}}_{2\text{A}}]$, en células haploides, impide la expresión del $[\overline{\text{KIL-k}}_{2\text{B}}]$, pero sólo en lo que concierne a la producción de $\text{YKT}_{2\text{B}}$, ya que la resistencia a la toxina sí se pone de manifiesto fenotípicamente.

El hecho de que ambos plásmidos puedan coexistir y expresarse en células diploides, pero no en haploides, sugiere la existencia de algún gen nuclear, necesario en estado diploide para la producción de la toxina $\text{YKT}_{2\text{B}}$.

El plásmido que hemos denominado $[\overline{\text{KIL-k}}_{2\text{B}}]$ codifica y dirige la síntesis de una toxina con la misma especificidad que la producida por la estirpe rusa de vinificación M 437 (denominada K_2^{24} en la presente Memoria). Sin embargo, los correspondientes plásmidos presentan una movilidad electroforética ligeramente diferente: el ARN bicatenario de la levadura descrita por Naumov es mayor, y posible-

mente contiene más información genética, que el plásmido $[KIL-k_{2B}]$ de nuestra estirpe K_2^1 . El plásmido $[KIL-k_{2A}]$, por el contrario, codifica un nuevo fenotipo matador; por la movilidad electroforética de dicho plásmido y por la especificidad de la toxina que produce, se trata de un sistema no descrito previamente.

Con el fin de averiguar si estos resultados podían hacerse extensivos a otras especies homotéticas del género Saccharomyces existentes en nuestro laboratorio y aisladas de mostos de uva en fermentación y velos de vinos, hemos realizado un análisis de los ARNs bicatenarios presentes en las mismas, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Estas especies presentan uno o dos plásmidos, que por su movilidad electroforética se corresponden con los $[KIL-k_{2A}]$ y $[KIL-k_{2B}]$. Hay que destacar que ninguna de las especies examinadas, aún conteniendo los dos plásmidos, produce los dos tipos de toxina matadora.

Finalmente, como es sabido, los ARNs bicatenarios el primer sistema matador se encuentran en el interior de partículas similares a virus (VLP), cuya cápsida está formada por una proteína mayoritaria codificada por la fracción L de dicho ARN plasmídico. En las electroforesis realizadas se puso de manifiesto que las estirpes del segundo sistema presentan asimismo una banda de ARN con la misma movilidad electroforética que la fracción L. Al examinar al microscopio electrónico, extractos celulares purificados se han encontrado partículas similares a virus en las estirpes matadoras del segundo sistema, que es de suponer alberguen los plás

midos correspondientes. Las VLP aisladas difieren, sólo en cuanto a tamaño de las previamente descritas. Por el momento desconocemos si las proteínas de dichas cápsidas son estructuralmente semejantes a las descritas en el caso de los plásmidos [KIL-k].

La última parte de la presente Memoria está dedicada al estudio de los fenómenos de antagonismo, en condiciones de laboratorio, entre levaduras matadoras. Para ello se llevaron a cabo experiencias de crecimiento conjunto, cuyos resultados se exponen en el capítulo correspondiente.

En primer lugar cabe destacar el distinto comportamiento de los dos tipos de estirpes matadoras frente a una misma sensible. Esta última es eliminada rápidamente del cultivo mixto por las matadoras del primer sistema, mientras que las del segundo, ya sean homotálicas o heterotálicas, tardan un tiempo mayor en ejercer su acción letal sobre la población sensible. En este último caso, el número de células sensibles aumentó durante las primeras horas de incubación, para caer después bruscamente, mientras que la estirpe matadora de laboratorio eliminó rápidamente y desde el primer momento a las células sensibles.

De mayor interés son los cultivos mixtos de células matadoras. En todos los casos se ha podido comprobar que son las estirpes de laboratorio las que eliminan a las de vinificación tras un periodo más o menos largo de coexistencia. La adición de etanol al medio de cultivo no alteró sensiblemente los resultados obtenidos. Estos hechos pueden ser interpretados admitiendo que la toxina YKT₁

se sintetiza más rápidamente que las YKT_{2A} e YKT_{2B} o que estas últimas necesitan una mayor concentración para ejercer su efecto letal. Paradójicamente, sin embargo, las estirpes matadoras del segundo sistema están mucho más extendidas en la naturaleza que las del primero. La sola explicación para estos hechos sería admitir que la toxina del primer sistema, mucho menos estable que la del segundo (Extremera 1978), se inactiva rápidamente en los procesos naturales de fermentación, probablemente porque en los mismos se alcancen temperaturas superiores a la empleada en los ensayos de antagonismo.

CONCLUSIONES

- 1.- La estirpe K_2^1 , matadora homotática del segundo sistema, produce dos toxinas matadoras diferentes para las que se propone el nombre de YKT_{2A} e YKT_{2B} , correspondiendo la segunda a la descrita por Naumov. La capacidad de producir dichas toxinas reside en dos plásmidos con diferente movilidad electroforética, denominados respectivamente $[KIL-k_{2A}]$ y $[KIL-k_{2B}]$.
- 2.- Se ha conseguido transferir dichos plásmidos a estirpes heterotáticas haploides; estas estirpes pueden albergar los plásmidos separadamente y producen la toxina correspondiente. En células diploides pueden coexistir ambos plásmidos, produciéndose los dos tipos de toxina; por el contrario, en células haploides, aunque coexisten, sólo se produce la YKT_{2A} .
- 3.- Las estirpes matadoras de ambos sistemas poseen los genes nucleares necesarios para mantener indistintamente los plásmidos de uno u otro sistema. Los genes nucleares \underline{mak}^+ , necesarios para el mantenimiento de los plásmidos matadores del primer sistema son también indispensables para los del segundo. Por el contrario, los genes nucleares \underline{pets}^+ no son precisos para mantener y expresar los plásmidos $[KIL-k_{2A}]$ y $[KIL-k_{2B}]$, aunque su presencia sí es necesaria para los plásmidos $[KIL-k_1]$.
- 4.- El plásmido $[KIL-k_1]$ excluye a los plásmidos $[KIL-k_{2A}]$ y $[KIL-k_{2B}]$ con independencia del genomio nuclear de la célula. Los plásmidos matadores de ambos sistemas pertenecen, pues, al mismo grupo -

de incompatibilidad y son incapaces de coexistir en la misma célula .

- 5.- Los plásmidos supresivos $[\overline{\text{KIL-s}}]$, que eliminan a los $[\overline{\text{KIL-k}}_1]$, excluyen también a los plásmidos $[\overline{\text{KIL-k}}_{2A}]$ y $[\overline{\text{KIL-k}}_{2B}]$.
- 6.- Los ARNs bicatenarios de las estirpes matadoras de ambos sistemas, neutrales, sensibles y supresivas, se encuentran encapsuidados en partículas similares a virus que difieren en su tamaño.
- 7.- Las distintas especies de levadura de vinificación del género Saccharomyces ensayadas, muestran uno o varios plásmidos de ARN bicatenario, pero producen sólo una toxina matadora de tipo — YKT_{2A} o YKT_{2B} .
- 8.- En cultivos mixtos de estirpes matadoras de ambos sistemas, las del primero eliminan a las del segundo; dicha eliminación es acelerada por la adición de etanol al medio de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- ADLER, J. and MACKENZIE, D.W. 1972. "Intra hyphal localization - of Penicillium stoloniferum viruses by fluorescent anti-- body" . Abst. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. G. 229: 8.
- ADLER, J., WOOD, H.A. and BOZARTH, R.F. 1976. "Virus-like particles from killer, neutral, and sensitive strains of Saccharomyces cerevisiae". J. Virol. 17 (1): 472-476.
- AL-AIDROOS, K., SOMERS, J.M. and BUSSEY, H. 1973. "Retention of cytoplasmic killer determinants in yeast cells after removal of mitochondrial DNA by ethidium bromide". Mol. Gen. Genet. 122: 323-330.
- BANKS, G.T., BUCK, K.W., CHAIN, E.B., HIMMELWEIT, F., MARKS, J.C., TYLER, J.M., HOLLINGS, F., LAST, F.T. and STONE, O.M. 1968. "Viruses in fungi and interferon stimulation". Nature. 218 : 542-545.
- BANKS, G.T., BUCK, H.W., CHAIN, E.B., DARBYSHIRE, J.E. and HIMMELWEIT, F. 1969. "Penicillium cyaneo-fulvum virus - and interferon stimulation". Nature. 223 : 155-158.
- BANKS, G.T. BUCK, K.W., CHAIN, E.B., DARBY-SHIRE, J.E., - HIMMERLWEIT, F. and RATTI, G. 1970. "Antiviral activity of double stranded RNA from a virus isolated from - Aspergillus foetidus". Nature. 227 : 505-507.

- BERRY, E.A. and BEVAN, E.A. 1972. "A new species of double -- stranded RNA from yeast". *Nature (London) New Biol.* 239 : 279-280.
- BEVAN, E.A., HERRING, A.J. and MITCHELL, D.J. 1973. "Preliminary characterization of two species of ds-RNA in yeast - and their relationship to the killer character". *Nature (London)*. 245 : 81-86.
- BEVAN, E.A. and SOMERS, J.M. 1969. "Somatic segregation of the killer (k) and neutral (n) cytoplasmic genetic determinants in yeast". *Genet. Res.* 14 : 71-77.
- BEVAN, E.A., SOMERS, J. and THEIVENDIRAJAH, K. 1969. "Genes controlling the expression of the killer character in yeast Saccharomyces cerevisiae". XIth Int. Bot. Congr. Abstract. 14.
- BOSTIAN, K.A., HOPPER, J.E., ROGERS, D.T. and TIPPER, D.J. 1978. "Translational analysis of the ds-RNA genome of the killer associated virus-like particles of Saccharomyces cerevisiae: M ds-RNA encodes toxin polipeptide". 9th Int. Conference on yeast genetics and molecular biology. Rochester. N.Y. Abstract. 103.
- BUSSEY, H. 1972. "Effects of yeast killer factor on sensitive cells". *Nature (London) New Biol.* 235 : 73-75.

- BUSSEY, H. 1974. "Yeast killer factor-induced turbidity changes in cells and sphaeroplast of a sensitive strain". J. Gen. Microbiol. 82 : 171-179.
- BUSSEY, H. and SHERMAN, D. 1973. "Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells". Biochim. Biophys. Acta. 298 : 868-875.
- BUSSEY, H. and SKIPPER, N. 1975. "Membrane-mediated killing of Saccharomyces cerevisiae by glycoproteins of Torulopsis glabrata". J. Bacteriol. 124 : 476-483.
- BUSSEY, H. and SKIPPER, N. 1979. "Killing of Torulopsis glabrata by Saccharomyces cerevisiae killer factor". Antimicrob. Agents Chemother. 9 : 352-354.
- BUSSEY, H., SHERMAN, D. and SOMERS, J.M. 1973. "Action of -- yeast killer factor: A resistant mutant with sensitive -- Sphaeroplasts". J. Bacteriol. 113 : 1193-1197.
- CLARK-WALKER, G.D. 1973. "Isolation of a circular DNA from a mitochondrial fraction of yeast " Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69 : 388-392.
- COX, B.S. 1965. " Ψ , a cytoplasmic suppressor of supersuppressor - in yeast". Heredity 20 : 505-521.
- DAY, P.R. and ANAGNOSTAKIS, S.L. 1972. "Heterokaryon transfer of the killer factor in Ustilago maydis". Phytopathology. 62 : 494.

- DAY, P.R. and ANAGNOSTAKIS, S.L. 1973. "The killer system in Ustilago maydis: heterokaryon transfer and loss of determinants". *Phytopathology* . 63: 1017-1018.
- DUNTZE, W., STOTLER, D., BUCKING-THROM, E. and KALBITZAER, S. 1973. "Purification and partial characterization of α factor, a mating type specific inhibitor of cell reproduction in Saccharomyces cerevisiae". *Eur. J. Biochem.* 35: 357-365.
- EPHRUSSI, B., MARGUERIE-HOTTINGUER, H. de and ROMAN, M.A. 1955. "Supressiveness: a new factor in the genetic determination of the synthesis of respiration enzymes in yeast". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 41 : 1065-1070.
- ELLIS, L.F. and KLEINSCHMIDT, W.J. 1968. "Virus like particles of a fraction of statolon a mould product". *Nature.* 215: 649-650.
- EXTREMERA, A.L. 1978. "Estudios sobre los factores matadores producidos por Saccharomyces cerevisiae". Tesis doctoral. - Universidad de Granada.
- EXTREMERA, A.L. and E. MONTOYA. 1980. "The partial purification, separation, and properties of yeast killer toxins". *Microbios.* 27 : 33-40.
- FINK, G.R. and STYLES, C.A. 1972. "Curing of a killer factor in Saccharomyces cerevisiae". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*
- FOWELL, R.R. 1969. "Sporulation and hybridation of yeast. En 'The yeast' ". Ed. A.H. Rose y J.S. Harrison. Academic Press. vol 1.

- FRIED, H.M. and FINK, G.R. "Electron microscopic heteroduplex analysis of killer double stranded RNA species from yeast". Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 75 (9) :4224-4228.
- HANKIN, L. and PUHALLA, J.E. 1971. "Nature of a factor causing interstrain lethality in Ustilago maydis". Phytopathology 61 : 50-53
- HASHIMOTO-GOTOH, T. and ISHII, K. 1979. "Mechanisms of plasmid incompatibility". Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance. K.N. Timmis and Pühler ed. Elsevier North-Holland. Publ.
- HAWTHORNE, D.C. 1963. "A deletion in yeast and its bearing on the structure of the mating type locus". Genetic. 48:1727-1729.
- HAWTHORNE, D.C. and MORTIMER, R.K. 1963. "Super suppressor in yeast". Genetics 48 : 617-620.
- HERRING, A.J. and BEVAN, E.A. 1974. "Virus-like particles associated with the double-stranded RNA species found in killer and sensitive strains of the yeast Saccharomyces cerevisiae". J. Gen. Virol. 22 : 387-394.
- HERRING, A.J. and BEVAN, E.A. 1977. "Yeast virus-like particles possess a capsid-associated single-stranded RNA polymerase". Nature (London). 268 : 464-466.
- HICKS, J.B., STRATHERN, J.N. and HERSKOWITZ, I. 1977a. "Interconversion of yeast mating types. III. Action of the homothallism (HO) gene in cells homozygous for the mating type locus". Genetics. 85 : 395-405.
- HICKS, J.B., STRATHERN, J.N. and HERSKOWITZ, I. 1977 b. "The cassette model of mating-type interconversion". In : DNA

- insertion elements, plasmids and episomes, (A.I. Bukhari J.A. Shapiro y S.L. Adhya, eds). Cold. Spring Harbor Laboratory, 457-469.
- HOOPER, J.E., BOSTIAN, K.A., ROWE, L.W. and TIPPER, D.J. 1977. "Translation of the L-species ds-RNA genome of the killer - associated virus - like particles of Saccharomyces cerevisiae". J. Biol. Chem. 252 (24) : 9010-9017.
- IMMAMURA, T., KAWAMOTO, M. and TAKAOKA, Y. 1974. "Characteristic of main mash infected by killer yeast in saké brewing and the nature of its killer factor". J. Ferment. Technol. 52 : 293-299.
- JACOB, F., BRENNER, S. and CUZIN, F. 1963. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28 : 329-348.
- JACOB, F. and WOLLMAN, E. 1959. "Colicins and other bacteriocins. En Bacteriophages". Ed. por M.H. Adams N.Y. Interscience Publs.
- JOKLIK, W.K. 1974. "Reproduction of Reoviridae", Comprehensive Virology. 2 : 231-334
- KOLTIN, Y. and DAY, P.R. 1975. "Specificity of Ustilago maydis killer proteins". Appl. Microbiol. 30 : 694-696.
- LACROUTE, F. 1971. "Non mendelian mutation allowing ureido succinic acid uptake in yeast". J. Bacteriol. 106 : 519-522.
- LANCASHIRE, E.W. and GRIFFITHS, D.E. 1975. "Studies on energy-linked reactions. Genetic analysis of venturicidin-resistant mutants". Eur. J. Biochem. 51 : 403-413.

- LEUPOLD, U. 1980. "Transposable mating-type genes in yeast".
Nature. 283 : 811-812.
- LINDEGREN, C.C., NAGAI, S. and NAGAI, H. 1958. "Induction of -
respiratory deficiency in yeast by manganese, cooper, --
cobalt and nickel." Nature. 182 : 446-448.
- MAKOWER, M. and BEVAN, E.A. 1963. "The inheritance of a killer
character in yeast. (Saccharomyces cerevisiae)". Proc -
XIth Int. Congr . Genet. 1 : 202 (Abstract).
- MAULE, A.P. and THOMAS, P.D. 1973. "Strains of yeast lethal to -
brewery yeast". J.Inst. Brew. 79 : 137-141.
- MONTOYA, E. : y EXTREMERA, A.L. 1975. "Estudios preliminares
sobre la presencia de dos tipos diferentes de factores ma
tadores en Saccharomyces cerevisiae". VI. Congr. Soc.
Esp. Bioquim. (Abstract).
- MOUNOLOU, J.C., JACOB, H. and SLONIMSKI, P.P. 1966. "Mitochon-
drial DNA from yeast 'petite mutants': specific changes -
of bouyants density corresponding to different cytoplasmic
mutations". Biochem. Biophys. Res. Comm. 24 : 218-224.
- NAUMOV, G.I. and NAUMOVA, T.I. 1978. "Comparative genetic of
yeast. XVII. A new type of killer in Saccharomyces yeast".
Genetika. 14 : 136-144.
- NAUMOVA, T.I. and NAUMOV, G.I. 1973. "Comparative genetics of

- yeast. XII. "Study of antagonistic interrelations in Saccharomyces yeast". Genetika 9 : 85-90.
- NAUMOVA, T.I. and NAUMOV, G.I. 1974. "Induced elimination of killer cytogenes (k_1) and (k_2) and the cytogene of neutrality (n) of Saccharomyces yeast". Nauchn. Dokl. Vyssh. Shk. Biol. Nauki. 2 : 108-110.
- NESTEROVA, G.F., SOOM, J.O. and PEREVOSHKOV, A.P. 1976. "Double stranded RNA of homothallic Saccharomyces with different cytoplasmatic determinant of antagonistic activity". Dann. SSSR. 226 : 951-954.
- OLIVER, S.G., McCREADY, S.J., HOLH, C., SUTHERLAND, P.A., McLAUGHLIN, C.S. and COX, B.S. 1977. "Biochemical and physiological studies of the yeast virus-like particles". J. Bacteriol. 130 : 1303-1309.
- PALFREE, E.G.R. and BUSSEY, H. 1969. "Yeast killer toxin: Purification and characterization of the protein toxin from Saccharomyces cerevisiae". Eur. J. Biochem. 93 : 487-493.
- PHILLISKIRK, G. and YOUNG, T.W. 1975. "The occurrence of killer character in yeast of various genera". J. Microbiol. Serol. 41 : 147-151.
- PRITCHARD, R.H., BARTH, P.T. and Collins, J. 1969. Symp. Soc. Gen. Microbiol, 19, 263-297.
- RAWLINSON, C.J. 1973. "Virus-like particles (VLP) in fungi". 2nd Int. Congr. Plant. Pathol. Abstract. 0911.

- ROUSSEAU, P. and HALVORSON, H.O. 1969. Preparation and storage of single spores of Saccharomyces cerevisiae". J. - Bact. 100 : 1426-1427.
- SHERMAN, F. and LAWRENCE, C.W. 1974. "Saccharomyces " - Handbook of genetics. R.C. King, Ed. Plenum publishing Corp. N.Y. 1 : 359-393.
- SOMERS, J.M. 1973. "Isolation of suppressive sensitive mutants from killer and neutral strains of Saccharomyces cerevisiae ". Genetics. 74 : 571-579.
- SOMERS, J.M. and BEVAN, E.A. 1968. "The inheritance of the killer character in yeast". Genet. Res. 13 : 71-83.
- STUMM, C., HERMANS, J.M.H., MIDDELBECK, E.J., CROES, A.F. and DEVRIES, G.J.M.L. 1977. "Killer-sensitive relationships in yeasts from natural habitats". A van. Leenw. 43 : 125-128.
- TZEN, J.C., SOMERS, J.M. and MITCHELL, D.J. 1974. "A dsRNA analysis of suppressive sensitive mutants of 'Killer' Saccharomyces cerevisiae". Heredity. 33 : 132.
- VODKIN, M.H. and FINK, G.R. 1973. "A nucleic acid associated with a killer strain of yeast". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70 : 1069-1072.
- VODKIN, M., KATTERMAN, F. and FINK, G.R. 1974. "Yeast killer mutants with altered double-stranded ribonucleic acid". J. Bacteriol 117 (2) : 681-686.

- 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.
- WICKNER, R. B. 1974. "Chromosomal and non-chromosomal mutations affecting the 'killer-character' of Saccharomyces cerevisiae". Genetics. 76 : 423-432.
- WICKNER, R. B. 1974. "'Killer character' of Saccharomyces cerevisiae: curing by growth at elevated temperatures". J. Bacteriol. 117 (5) : 1356-1357.
- WICKNER, R. B. 1976. "Killer of Saccharomyces cerevisiae : a double-stranded ribonucleic acid plasmid". Bacteriol. rev. 40 (3): 757-773.
- WICKNER, R. B. 1976. "Mutants of the killer plasmid of Saccharomyces cerevisiae dependent on chromosomal diploidy for expression and maintenance". Genetics. 82 : 273-285.
- WICKNER, R. B. 1977. "Deletion of mitochondrial DNA bypassing a chromosomal gene needed for maintenance of the killer plasmid of yeast". Genetics 87 : 441-452.
- WICKNER, R. B. 1978. "Twenty-six chromosomal genes needed to maintain the killer double stranded RNA plasmid of Saccharomyces cerevisiae". Genetics. 88 (3) : 419-425.

- WICKNER, R.B. and LEIBOWITZ, M.J. 1976. "Two chromosomal genes required for killing expression in killer strains of Saccharomyces cerevisiae". Genetics. 82 : 429-442.
- WINGE, Ö. and ROBERTS, S. 1949. "A gene for diploidization in yeast". Comp. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol. 24 : 341-346.
- WOODS, D.R. and BEVAN, E.A. 1968. "Studies on the nature of the killer factor produced by Saccharomyces cerevisiae". J. Gen. Microbiol. 51 : 115-126.
- YOUNG, R.A. and PERLMAN, P.S. 1975. "Killer character does not influence the transmission of mitochondrial genes in Saccharomyces cerevisiae". J. Bacteriol. 124 : 290-295.
- YOUNG, T.W. and YAGIU, M. 1978. "A comparison of the killer character in different yeasts and its classification". Ant. van. Leew. 44 (1) : 59-77.



Biblioteca Universitaria de Granada



01053409