



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INDUCCION Y ESTUDIO DE MUTANTES RESPIRATORIO
DEFICIENTES EN LA LEVADURA "PETITE NEGATIVA"

Kluyveromyces Lactis

TESIS

Que para obtener el titulo de
Quimico farmaceutico biologo

Presenta

YOLANDA A. SILVA AGUIRRE

MEXICO, D. F.

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

J U R A D O :


Presidente	Q.F.B. Guadalupe Velez Pratt
Vocal	Quím. Lilia Vierna García
Secretario	Dra. Aurora Brunner Liebshard
1er. Suplente	Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas
2do. Suplente	Biól. Gerardo Kono Yaico

Este trabajo de tesis se realizó en los laboratorios del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular.

Suscriptante


Yolanda Alicia Silva Aguirre

Asesor de tesis


Dra. Aurora Brunner Liebshard

A mis Padres:

Enrique T. Silva D.

Alicia Aguirre de Silva

Porque con su amor
han colmado mi existencia.

A mis hermanos:

Sara Victoria,

Martha Patricia y

Enrique Tirso

Por los maravillosos momentos
que nos unen.

A la Srita. Profra. Blandina Aviña Arroyo

Por cimentar mi vida con sus enseñanzas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México
y a la Facultad de Química
por el cariño que como ALMA MATER les tengo.

A la Dra. Aurora Brunner
Por su labor de dirección y asesoría
en la realización de este trabajo.

A la Sra. Alba Tuena de Cobos
Por la ayuda desinteresada y gentil
que me brindó.

A los profesores:
Dra. Victoria Chagoya,
Dr. Edgardo Escamilla y
Dr. Alfredo Muñoz Rivas
Por la orientación, facilidades
y equipo proporcionado.

INTRODUCCION	3
GENERALIDADES .	4
Clasificación de las Mutantes Extracromosómicas en Levaduras.	4
Clasificación de las Levaduras en "Petite Positivas" y "Petite Negativas".	6
Análisis Genético de las Mutantes.	6
Generalidades sobre Mitocondria.	8
 MATERIALES Y METODOS	 10
1. Plan de Trabajo.	10
2. Cepas de la Levadura <i>Kluyveromyces lactis</i> Empleadas.	11
3. Reactivos y Medios de Cultivo.	11
4. Reactivos y Medios de Cultivo para Fusión de Protoplastos.	15
5. Reactivos para Determinación del DNA	17
6. Esterilización.	18
7. Inducción, Aislamiento y Purificación de Mutantes Respiratorio-Deficientes.	18
8. Estudios Fenotípicos Realizados en las Cepas Mutantes	20
9. Estudios Genotípicos Efectuados en las Mutantes.	24

RESULTADOS Y DISCUSION	31
1. Inducción y Aislamiento de Mutantes Respiratorio Deficientes.	31
1.1 Mutagénesis con Sales de Manganeso.	31
1.2 Mutagénesis con Radiaciones Ultravioleta.	37
1.3 Relación de las Mutantes Estudiadas.	41
2. Estudios Fenotípicos Realizados en las Cepas <u>Mu</u> tantes.	44
2.1 Determinación de las Curvas de Crecimiento.	44
2.2 Concentración Optima de Glucosa.	51
2.3 Medición de la Respiración.	53
2.4 Estimación del Contenido de Citocromos	55
3. Estudios Genotípicos Efectuados en las Mutantes.	65
3.1 Entrecruzamientos.	65
3.2 Fusión de Protoplastos.	66
3.3 Medición del DNA.	68
REFERENCIAS	70

INTRODUCCION:

A principios de siglo, Correns y Baur, trabajando con plantas superiores, descubrieron un tipo de herencia que no iba de acuerdo con las leyes genéticas dadas por Mendel. Este comportamiento no Mendeliano o extracromosómico ha sido investigado y encontrado en muchos organismos 1/ como algas, protozoarios, hongos y mamíferos, sin embargo su estudio se ha realizado con éxito en levaduras 2/, - debido a que, además de ser eucariontes afines con las células de mamíferos, poseen ventajas como las de presentarse en forma unicelular, con un ciclo vital breve y comportamiento sexual que permite la aplicación de las leyes de la genética clásica para la elucidación de la recombinación y segregación de caracteres hereditarios.

Al parecer, las primeras evidencias de herencia citoplasmica en levaduras fueron reportadas por Winge y Laustsen, pero la evidencia inequívoca fue dada por Ephrussi y colaboradores 3/, quienes trabajando con *Saccharomyces cerevisiae*, - encontraron un tipo de mutante extracromosómica que denominaron "petite", por el tamaño reducido de las colonias que originaba en condiciones normales de cultivo.

La mutación "petite" es una lesión pleiotrópica que provoca una deficiencia respiratoria, es decir, una incapacidad para crecer en ausencia de sustratos fermentables, con alteraciones o desaparición de algunos citocromos, deshidrogenasas y otras proteínas de la membrana interna de la mitocondria, de aquí su empleo en estudios de mecanismos mitocondriales que dependen del DNA de este organelo, en la investigación de funciones de origen bigenómico y su contribución al mapeo del genoma mitocondrial.

El objetivo buscado en este trabajo de tesis es el de inducir, aislar y caracterizar, en la levadura "petite negativa" *Kluyveromyces lactis*, mutantes con deficiencias respiratorias de origen preferentemente mitocondrial, comparando su comportamiento con aquellas respiratorio-deficientes de origen nuclear.

GENERALIDADES:

Clasificación de las Mutantes Extracromosómicas en Levaduras:

En un principio las mutantes "petite", en levaduras, se obtuvieron en forma espontánea, pero en trabajos subsecuentes se investigó la acción de varios mutágenos 4/, por ejemplo, Ephrussi empleó euflavina; Slonimski, el bromuro de etidio; Perlman y Mahler, el berenil; Marcovich, proflavina y auflavina; Moustacchi y Lacroute, 5-fluorouracilo; Laskowski, el 2,3,5-trifeniltetrazolio; Ycas y - Sherman, temperaturas elevadas; Pittman, las radiaciones ultravioleta y Putrament, algunas sales de manganeso.

La diversidad de tratamientos mutagénicos condujo, entre otras, a la obtención de mutantes respiratorio-deficientes, con genotipos y fenotipos distintos, lo que llevó a una reclasificación de las mutantes 4/, así, se acordó emplear el término rho (ρ) para denominar el factor citoplásmico o mitocondrial y el prefijo "PET" para las mutaciones de origen nuclear. La tabla 1 nos muestra dicha clasificación.

Tabla No. 1.- Clasificación de las mutaciones respiratorio-deficientes.

Mutación	<u>Genotipo</u>		
	Nuclear	Mitocondrial	DNA mitocondrial
Tipo Silvestre	PET	ρ^+	Normal
Petite Vegetativa Neutral	PET	ρ^0	Ausente
Petite Vegetativa Neutral o Supresora	PET	ρ^-	Alterado
Petite Segrega-ional	pet	ρ^+	Normal
Doble mutación	pet	ρ^- ó ρ^0	Alterado o Ausente

Las mutantes "petite" del tipo neutral, supresoras o segregacionales presentan, al cruzarse con cepas silvestres, diferentes patrones de segregación 4/; en el caso de las "petite segregacionales", los diploides obtenidos son respiratorio-competentes y, en las ascosporas, el carácter mutante segrega 2:2, es decir, corresponde a una mutación nuclear. En el caso de las "petite neutrales" la progenie diploide también es respiratorio-competente pero la segregación de la mutación es de 0:4. Los cigotos procedentes de la cruce de "petite supresora" y cepa silvestre, pueden originar, dependiendo del nivel de supresividad de la mutación, una progenie de tipo silvestre, de tipo "petite" o una mezcla de ambas; esto se debe a que pueden existir cigotos respiratorio-competentes y del tipo "petite", los primeros originarán diploides de tipo silvestre que esporularán segregando 0:4 el carácter mutante, mientras que los segundos, si son de inmediato llevados a esporular, pueden producir esporas "petite" con segregación 4:0.

Además de las mutaciones "petite vegetativas", se conocen cinco clases generales de fenotipos mitocondriales 4/, estas son:

- 1) En las que se afecta la polaridad de la transmisión y recombinación de genes mitocondriales; para su representación se han utilizado los símbolos: ω^+ , ω^- , ω^N .
- 2) En las que existe una alteración en el transporte de los productos mitocondriales, se simboliza por "var".
- 3) En donde la capacidad respiratoria se encuentra afectada, para lo cual se emplea la siguiente nomenclatura:

Función normal	mit ⁺
Función deficiente	mit ⁻
Pérdida del gen en el DNA mitocondrial	mit ⁰

4) En las que está involucrada la síntesis de proteínas mitocondrial, comprendiendo:

Función normal	syn ⁺
Función deficiente	syn ⁻
Pérdida del gen en el DNA mitocondrial	syn ⁰

5) Las que contienen sensibilidad o resistencia a antibióticos, - designándolas como:

Resistencia a antibióticos	ant ^r
Sensibilidad a antibióticos	ant ^s
Pérdida del gen en el DNA mitocondrial	ant ⁰

Clasificación de las Levaduras en "Petite Positivas" y "Petite Negativas":

Bulder 4/, estudiando los efectos de la acriflavina (compuesto que induce la mutación "petite" con alta frecuencia en *S. cerevisiae*) sobre diversas especies de levadura, encontró que en algunos géneros las mutaciones "petite" era difíciles o imposibles de aislar, denominándolas entonces levaduras "petite negativas", a las que pertenecen varios grupos aeróbicos obligados, no sujetos a represión catabólica, tales como: *Kluyveromyces spp.*, *Hansenula spp.*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Candida spp.*, *Trichospora fermentans* y *Torulopsis utilis*. Dentro de las "petite positivas" se agrupan los géneros de levaduras en donde la mutación "petite" es viable, comprendiendo, entre otras, *Saccharomyces spp.*, *Dabaryomyces globosa*, *Torulopsis spp.*, *Nematospora coryli* y *Brettanomyces lambicus*.

Análisis Genético de Mutantes:

Se han utilizado tres métodos principales para el estudio de la

segregación y recombinación de los genes mitocondriales en levaduras 4/, estos son:

1) Genealogía de las yemas diploides producidas por los cigotos y la progenie diploide vegetativa. Este nos proporciona información detallada de la segregación paterna y recombinación de los orgánitos celulares en las primeras divisiones posteriores a la formación del cigoto. La desventaja de este estudio es que es tardado y su metodología resulta muy complicada.

2) Análisis de clonas cigóticas. Es factible realizar la investigación de manera cualitativa o cuantitativa, por replicación de las clonas en medios selectivos donde se aprecie el genotipo mitocondrial de la clona. Este método es más rápido y da mayor información que el anterior, indicando, no sólo el genotipo mitocondrial, sino determina también si el cigoto produce recombinantes recíprocos y la frecuencia de éstos, pero no muestra los eventos de recombinación y segregación paterna.

3) Cruzas estándares. No proporciona datos significativos sobre la recombinación y el ligamento de genes. En este método la masa mezcla se esparce en medio no selectivo y los cigotos y diploides vegetativos se hacen crecer unas veinte generaciones hasta que constituyen un grupo de células confluentes, éstas son recogidas y esparcidas a concentraciones apropiadas, en medio no selectivo; las colonias aquí logradas se replican en medios selectivos. Este método informa sobre la composición genotípica de la población procedente de un cigoto primario y resulta ser el más eficiente para obtener gran cantidad de información cuantitativa y para establecer comparaciones entre diferentes cruzas.

Generalidades sobre Mitocondria:

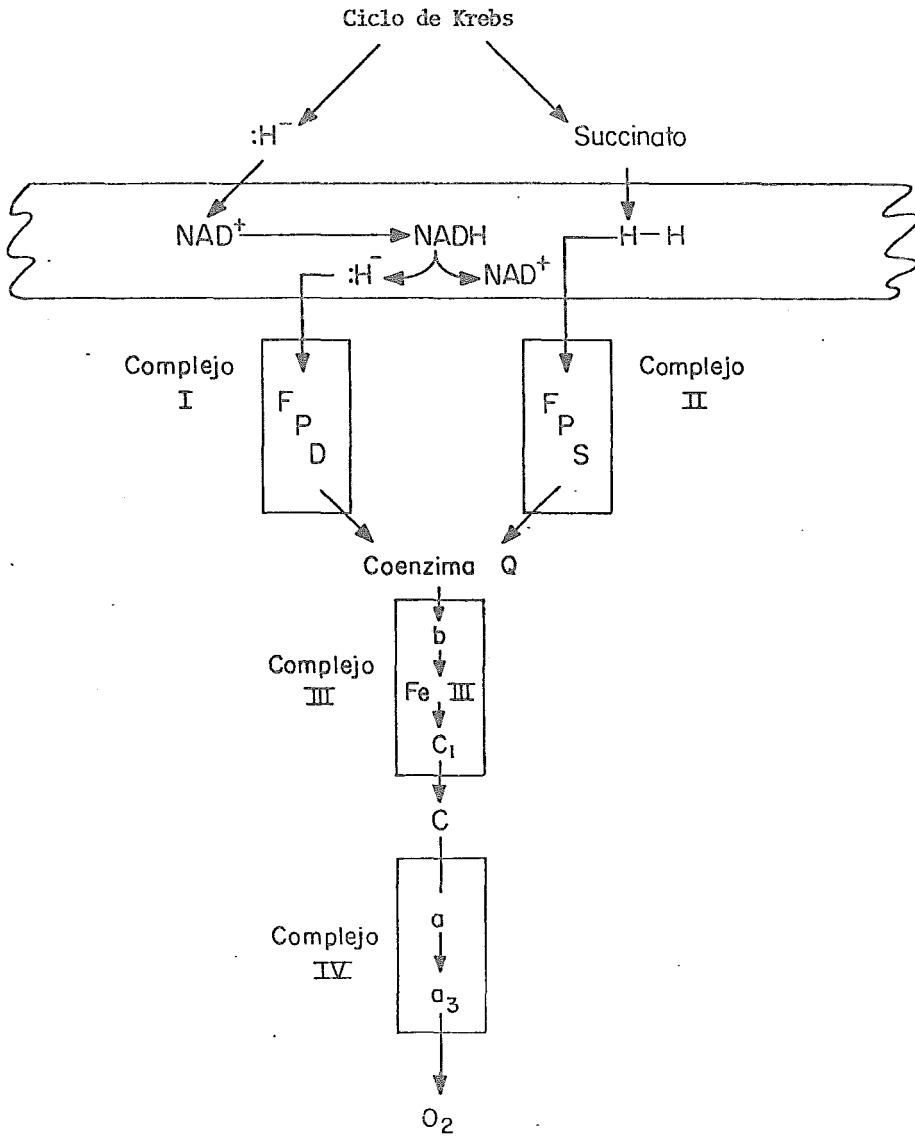
En los organismos eucariontes, a diferencia de los procariontes, encontramos estructuras membranales que lo compartimentan en organelos, de éstos, son las mitocondrias y los cloroplastos a los que se les ha conferido mayor importancia por el contenido de DNA de doble hélice distinto al presente en el resto de la célula 4/ y -- por poseer un sistema de síntesis de proteínas más parecido al de los procariontes que al existente en citoplasma.

La información del DNA mitocondrial se transcribe en mRNA y es traducida en secuencias de aminoácidos para constituir una proteína específica. Esto implica la existencia de todo un sistema para la transcripción dentro del organelo. Se sabe que mRNA, rRNA y -- probablemente todos los tRNA de la mitocondria, están codificados por el genoma de este organelo, mientras que algunos polipéptidos de la membrana externa y las enzimas del espacio intermedio y de la matriz mitocondrial son controlados, al menos en gran parte, -- por genes nucleares 4/.

Las mitocondrias son los "dínamos" de la célula, cubriendo del 70% al 90% de las necesidades energéticas. Su membrana interior, altamente especializada, contiene las partículas de Fernández-Morán, y está constituida por cuatro complejos fisicoquímicos que intervienen en el mecanismo respiratorio, el cual se muestra en la figura 1, y cuya construcción es de origen bigenómico 4/. En este sistema, el complejo I recibe electrones del NADH y el complejo II del succinato. Un catalizador no proteico, la coenzima Q (ubiquinona), lleva los electrones de los complejos I y II al complejo III. El transporte del complejo III al complejo IV se hace por vía del citocromo "c". En cada etapa, mediante el factor F_1 , se libera energía

gía suficiente que, de una manera todavía no esclarecida, se utiliza el la fabricación de ATP a partir de ADF y fosfato.

Figura No. 1.- Diagrama del transporte de electrones en mitocondria.



MATERIALES Y METODOS:

1. Plan de Trabajo:

Se empleó la levadura *Kluyveromyces lactis*, por su característica de ser "petite negativa", ya que se intenta investigar el por qué en este tipo de levaduras no son posibles las mutaciones ρ^- ó ρ^o estables, lesiones que resultan fáciles de lograr y mantener en las llamadas levaduras "petite positivas", y cómo, sin embargo, si es posible la obtención de mutaciones "petite nucleares", fenotípicamente idénticas a las "petite mitocondriales".

El primer paso fue la elección de mutágenos que alteraran primordialmente el DNA mitocondrial; Putrament 5/ , 6/ ya había reportado, en levaduras, daños a este nivel por la acción del manganeso, que, al parecer, interacciona con la DNA polimerasa mitocondrial, inhibiendo la replicación del DNA de este organelo.

Otro mutágeno empleado fue la luz ultravioleta, de la que se sabe que induce fundamentalmente mutaciones nucleares, pero bajo -- ciertas condiciones, constituye el agente causal de daño extracromosómico 7/.

En las mutantes aquí logradas se investigaron características como la estabilidad de la mutación, velocidad de crecimiento, capacidad respiratoria, apreciación cualitativa de citocromos y algunos estudios genotípicos intentando su caracterización.

2. Cepas de la Levadura *Kluyveromyces lactis* Empleadas:

KA5-4C:	a, ade ₂
KA5-11B:	α, ade ₁
KC2-12D:	α, +
KC5-2D:	a, leu ₁ met ₁
KF65-R :	α, ura ₂ his ₁ met ₁
KF73-9C:	α, ade ₁ ura ₂
KT-6:	α, lis ₁
KT-13:	a, arg ₁
KT-19:	α, trp ₂
W600B:	α, ade ₁ ade ₂ leu ₁
WM-27:	α, lis ₁
WM-37:	a, his ₁

3. Reactivos y Medios de Cultivo:

3.1 Soluciones amortiguadoras:

a) Amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0:

KH ₂ PO ₄	2.62 g
K ₂ HPO ₄	7.00 g
Agua destilada	c.b.p. 1000 ml

b) Amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 4.5

KH ₂ PO ₄	2.72 g
Agua bidestilada	c.b.p. 100 ml

3.2 Medios de cultivo:

a) Medio mínimo con glucosa (MD):

Base nitrogenada de levadura
libre de aminoácidos (Difco) 0.67% (p/v)

- | | |
|---|---------------|
| Dextrosa | 2.0% (p/v) |
| Agua destilada | |
| b) Medio mínimo con glucosa y ácido δ -aminolevulínico (MD-aL): | |
| ácido δ -aminolevulínico* | 0.5 mM |
| Medio de cultivo MD | |
| c) Medio mínimo con glucosa y ácidos grasos (MD-TE): | |
| Tween 80** | 1.0% (v/v) |
| Ergosterol*** | 10 μ g/ml |
| Medio de cultivo MD | |
| d) Medio con extracto de malta (ME): | |
| Extracto de malta | 5.0% (p/v) |
| Agua destilada | |
| e) Medio con extracto de malta y ácido δ -aminolevulínico (ME-aL): | |
| ácido δ -aminolevulínico* | 0.5 mM |
| Medio de cultivo ME | |
| f) Medio con extracto de malta y ácidos grasos (ME-TE): | |
| Tween 80** | 1.0% (v/v) |
| Ergosterol*** | 10 μ g/ml |
| Medio ME | |

* Se prepara una solución 0.05 M de ácido δ -aminolevulínico, disolviendo 83.8 mg de éste en 10 ml de agua destilada estéril; por cada 100 ml de medio de cultivo estéril, se adiciona 1.0 ml de esta solución.

** El volumen de tween 80 requerido se adiciona directamente al medio de cultivo estéril.

*** Se prepara una solución de 1mg/ml de ergosterol en etanol absoluto estéril, adicionando 1.0 ml de ésta a cada 100 ml de medio de

cultivo estéril.

g) Medio mínimo con glicerol (MG):

Base nitrogenada de levadura libre de aminoácidos (Difco)	0.67% (p/v)
Glicerol	3.0% (v/v)
Agua destilada	

h) Medio sintético de glucosa y aminoácidos (SD+aa)

Base nitrogenada de levadura libre de aminoácidos (Difco)	0.67% (p/v)
Dextrosa	2.0% (p/v)
Soluciones "stock" de aminoácidos*	
Sulfato de adenina 20 mg/ml	0.1% (v/v)
L-arginina 10 mg/ml	0.1% (v/v)
L-histidina 20 mg/ml	0.1% (v/v)
L-leucina 20 mg/ml	0.1% (v/v)
Hidrocloruro de lisina 40mg/ml	0.1% (v/v)
L-metionina 20 mg/ml	0.1% (v/v)
L-triptofano 10 mg/ml	0.1% (v/v)
L-uracilo 20 mg/ml	0.1% (v/v)
Agua destilada	

* Las soluciones "stock" pueden o no adicionarse al medio según sean las necesidades, de esta manera es posible preparar medios -- con uno o varios aminoácidos, o bien, medios completos con carencia de un aminoácido dado.

i) Mezcla sin fuente de carbono para medios completos (YPA):

Extracto de levadura	1.0% (p/v)
Peptona de gelatina	1.0% (p/v)
Sulfato de adenina	80 µg/ml
Agua destilada	

j) Medio completo con glucosa (YPAD):

Dextrosa 2.0% (p/v)

Mezcla YPA

k) Medio completo con glucosa y amortiguador (YPADA):

Solución 1 M de Na_2HPO_4 1.0% (v/v)

Solución 1 M de KH_2PO_4 4.0% (v/v)

Dextrosa 2.0% (v/v)

Mezcla YPA

l) Medio completo de glucosa con cloranfenicol (YPAD-CAP):

Dextrosa 2.0% (p/v)

Cloranfenicol* 0.4% (p/v)

Mezcla YPA

* El antibiótico se adiciona directamente al medio estéril caliente.

m) Medio completo con glucosa y glicerol (YPADG):

Dextrosa 0.2% (p/v)

Glicerol 3.0% (v/v)

Mezcla YPA

n) Medio completo con etanol (YPAE):

Etanol absoluto** 3.0% (v/v)

Mezcla YPA

** El etanol se esterilizó por filtración, adicionándose al resto del medio una vez que éste estuvo estéril y a una temperatura inferiores a los 45°C.

o) Medio completo con glicerol (YPAG):

Glicerol 3.0% (v/v)

Mezcla YPA

p) Medio completo con lactato (YPAL):

Solución al 50% de lactato de sodio 2.0% (v/v)

Mezcla YPA

q) Medio completo con lactosa (YPA-LO):

Lactosa 1.0% (p/v)

Mezcla YPA

r) Medio completo de glucosa sin adenina (YPD):

Extracto de Levadura 1.0% (p/v)

Peptona de gelatina 1.0% (p/v)

Dextrosa 2.0% (p/v)

Agua destilada

4. Reactivos y Medios de Cultivo para Fusión de Protoplastos:

a) Amortiguador de Tris-HCl, pH 7.4, para protoplastos:

Tris base 0.05 M

KCL 0.6 M

MgSO₄ 7H₂O 0.01 M

Agua destilada

El pH se ajustó con ácido clorhídrico concentrado.

b) Medio completo con bromuro de etidio (BE):

Extracto de levadura 0.5% (p/v)

MgSO₄ 7H₂O 0.2% (p/v)

(NH₄)HPO₄ 1.0% (p/v)

Bromuro de etidio* 25 µg/ml

Agua destilada

* El medio de cultivo se esteriliza sin bromuro de etidio, el cual se adiciona a partir de una solución 5mM del colorante en agua estéril. De aquí en adelante el medio se protege de la luz.

c) Medio completo con glucosa para protoplastos (CPD):

Extracto de levadura 1.0% (p/v)

Peptona de gelatina 1.0% (p/v)

KCl	4.5% (p/v)
Dextrosa	2.0% (p/v)
Agua destilada	

d) Medio completo con glicerol para protoplastos (CPG):

Extracto de levadura	1.0% (p/v)
Peptona de gelatina	1.0% (p/v)
KCl	4.5% (p/v)
Glicerol	1.4% (v/v)
Agua destilada	

e) Medio para formación de protoplastos (MFP):

Tris base	0.025 mM
KCl	3.60 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.06 mM
2-mercaptoetanol	0.10 mM
β-glucuronidasa	6.5% (v/v)
Agua destilada	

El pH se ajustó a 7.4 con ácido clorhídrico concentrado.

f) Medio mínimo con glucosa para protoplastos (MPD):

Base nitrogenada de levadura libre de aminoácidos (Difco)	0.15% (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05% (p/v)
KCl	4.5% (p/v)
Dextrosa	2.0% (p/v)
Agua destilada	

g) Medio mínimo con glicerol para protoplastos (MPG):

Base nitrogenada de levadura libre de aminoácidos (Difco)	0.15% (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05% (p/v)
KCl	4.5% (p/v)

Glicerol	1.4% (v/v)
Agua destilada	

h) Medio de fusión de protoplastos (PEG):

Polietilén glicol 4 000	25% (p/v)
CaCl ₂	75 mM
Agua destilada	

Nota: En la preparación de placa o cultivos sólidos se adiciona - agar en proporción de 1.5 a 2.5%, excepto en el medio de extracto de malta, donde se utiliza agar al 3%.

5. Reactivos para Determinación de DNA:

a) Reactivo de color (Solución de difenilamina):

Difenilamina	1.5% (p/v)
Acido sulfúrico concentrado	1.5% (v/v)
Acido acético glacial	

Esta solución se almacena en la oscuridad a 4°C y el día de su empleo se le adiciona 0.5% (v/v) de una solución con 16% mg/ml de acetaldehído.

b) Soluciones de DNA:

b.1 Solución "stock" de DNA.- Se disuelven 4.0 mg de - DNA (Sigma) en 10 ml de NaOH 5 mM, conservándola en congelación hasta su empleo.

b.2 Solución "patrón" de DNA.- Se mezclan partes igua-- les de solución "stock" de DNA y ácido perclórico - 2 M, calentando a 70°C en un baño de agua durante 20 minutos.

6. Esterilización:

La esterilización del material y reactivos en los que no se indica un método especial, se llevó a cabo en un autoclave a 120°C y 20 lb de presión durante veinte a treinta minutos.

7. Inducción, Aislamiento y Purificación de Mutantes Respiratorio-Deficientes:

7.1 Inducción de Mutantes:

Para la inducción de mutantes se utilizaron dos procedimientos: el primero a base de sales de manganeso, ya que se ha comprobado que este catión induce mutaciones preferentemente mitocondriales 5/, 6/, debido quizá a la interacción con la DNA polimerasa de este organelo 9/. Y el segundo, mediante radiaciones ultravioleta que, durante la fase exponencial de crecimiento y seguido de un reposo en medio sin nutrientes y en oscuridad, origina mutaciones "petite vegetativas" (ρ) 7/.

7.1.1 Mutagénesis con Sales de Manganeso.- Una asada de la cepa a tratar se suspendió en 10 ml de medio YPAD contenidos en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, se incubó en -- agitación a 30°C durante 24 horas, para alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. A partir de este cultivo se inocularon, en concentración aproximada de 10^6 cel/ml, matrices conteniendo medio de YPAD o YPADA adicionado con cantidades conocidas de $MnCl_2$ o $MnSO_4$, incubando en agitación a 30°C y recogiendo alícuotas a tiempos determinados (2, 4, 6, 24 y 48 horas), de donde se seleccionarían más tarde las mutantes buscadas.

7.1.2 Mutagénesis con Radiaciones Ultravioleta.- A partir de un cultivo de 24 horas de la cepa a tratar, se hi-

zo una suspensión de, aproximadamente, 10^8 cel/ml en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7, que se vertió, hasta -- formar una capa poco profunda, en una caja de Petri pro-- vista de agitación continua, en donde se irradió con una lámpara de luz UV germicida, a una dosis de $19 \text{ erg}/\text{mm}^2/\text{seg}$. A tiempos determinados se retiraron alícuotas, de las que más tarde se aislarían las mutantes respiratorio-deficientes.

7.2 Aislamiento y Purificación de Mutantes Respiratorio-Deficientes.

K. lactis es un organismo aeróbico facultativo 2/ que puede crecer, por glucolisis, en un sustrato fermentable en ausencia de oxígeno; pero para la utilización de otras fuentes de carbono como glicerol, etanol o lactato, se requiere la presencia de oxígeno y una mitocondria funcional, de manera que cualquier alteración o modificación en este organelo impedirá su desarrollo en medios que contengan, como fuente de energía, estos compuestos.

Para el aislamiento de las mutantes deseadas, las muestras - obtenidas durante la mutagénesis se diluyeron con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7, hasta aproximadamente 10^3 cel/ml, de - aquí se tomaron 0.2 ml y se esparcieron sobre placas de YPAD, - incubándose a 30°C durante 48 horas. Las colonias logradas se cuantificaron y replicaron en placas de YPAG, que se incubaron a 30°C durante 72 horas, mientras que los cultivos en YPAD se - mantuvieron a temperatura ambiente. Después de registrar el ti - po de desarrollo de cada colonia en ambos medios, se aislaron - las cepas que, manifestándose en medio de YPAD, fueron incapa--

ces de crecer en medio de YPAG; éstas se consideraron como "posibles" mutantes respiratorio-deficientes.

Cada "posible" mutante aislada se suspendió en agua y una gota de ésta se colocó sobre placas de YPAD, YPADG, YPAE, YPAG e YPAL, observando los cultivos después de 48 y 72 horas de incubación a 30°C, reconociendo las cepas respiratorio-deficientes por su desarrollo lento en las placas de YPAD e YPADG y por su incapacidad para crecer en el resto de los medios probados.

Prueba de Reducción del Rojo de Tetrazolio.- Otro estudio que nos lleva a comprobar el carácter respiratorio-deficiente de las cepas aisladas, es la prueba de reducción del rojo de tetrazolio. Para efectuarla se preparó un medio conteniendo por cada litro de agua, 5.1 g de dextrosa, 15 g de agar y, después de su esterilización, 500 mg de rojo de tetrazolio. Unos 20 ml de este medio, a unos 35°C, se vertió suavemente sobre el cultivo de la placa de YPADG, incubando a temperatura ambiente y en oscuridad durante 3 a 5 horas. Las células mutantes aparecieron levemente teñidas de color rosa o, en una minoría, sin teñirse, mientras las respiratorio-competentes redujeron el colorante, acumulando el formazán que las tiñó de rojo.

8. Estudios Fenotípicos Realizados en las Cepas Mutantes:

8.1 Métodos para Comprobar la Cepa Trabajada:

Durante la manipulación del material vivo, es fácil contraer contaminaciones que alteren los resultados del estudio, para evitar esto, fue necesario comprobar que se estaba trabajando con la cepa deseada, para ello se llevaron a cabo dos pruebas:

8.1.1 Prueba de Fermentación de la Lactosa.- *K. lactis*, a diferencia de *S. cerevisiae* y otras levaduras, es capaz de fermentar la lactosa, así un resultado positivo de este estudio nos indicaba, con una gran posibilidad, el estar -trabajando con *K. lactis*. Para realizar la prueba se inoculó la cepa en cuestión en 10 ml de medio YPAD-LO contenidos en un tubo de fermentación de Dunham, incubando a 30°C y observando, a las 48 horas, la producción de gas característica de dicha fermentación.

8.1.2 Determinación de los Marcadores de Auxotrofia.- Los marcadores de auxotrofia son importantes, no sólo por su ayuda en los estudios de cruza y segregación, sino que además, contribuyen a eliminar la posibilidad de estar trabajando con una cepa diferente a la esperada. Para realizar esta prueba, las cepas bajo investigación se suspendieron, en concentración aproximada de 10^8 cel/ml, en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7. Una gota de cada suspensión se colocó sobre placas de YPAD, MD y de los ocho diferentes medios sintéticos preparados por adición de siete -distintas combinaciones de aminoácidos a medio mínimo -- (SD+aa). Los cultivos se incubaron a 30°C durante 48 horas; en el medio YPAD desarrollaron todas las cepas viables, sobre la placa MD sólo crecieron las cepas sin marcadores auxotróficos y, al revisar el comportamiento en los medios sintéticos con aminoácidos se pudo determinar su carácter de auxotrofia.

8.2 Determinación del Peso Seco Celular:

Para relacionar cualquier medición efectuada en las mutantes con el peso de las mismas, se determinó su peso seco, para lo cual, una alícuota de 0.5 a 1.0 ml de la suspensión celular en estudio, se colocó sobre planchetas taradas a peso constante; la muestra se secó con el calor de una lámpara de luz infrarroja de 250 watts, hasta peso constante.

8.3 Estimación de la Lesión:

Ya que en las mutantes respiratorio-deficientes el sistema generador de ATP está alterado y es la glucólisis el sistema que proporciona la energía 2/, el consumo de oxígeno y el desarrollo, aún en presencia de glucosa, son deficientes, por lo que se pensó que al cuantificarlos se tendría una idea del grado de la lesión.

8.3.1 Curvas de crecimiento.- Para esta determinación se colocaron 25 ml de mezcla YPA o mezcla YPA adicionada con 4 mg/ml de cloranfenicol en matraces nefelométricos; la glucosa se adicionó en forma de una solución "stock" al 40-50%, previamente esterilizada, hasta lograr concentraciones finales de 2, 3, 4, 5 y 6%. Todos los matraces se inocularon con idénticos volúmenes de una suspensión de, aproximadamente, 10^6 cel/ml de la cepa en estudio, incubando en agitación a 30°C y registrando la turbidez en un fotocolorímetro Klett-Summerson provisto de filtro rojo (640-700 nm). Las lecturas se efectuaron cada 60 minutos desde el tiempo cero hasta el inicio de la fase logarítmica, después de la cual se hicieron lecturas cada 30 minutos hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo.

La medición de la velocidad de crecimiento, además de -
mostrar el grado de deficiencia respiratoria, nos permitió
buscar una concentración de glucosa óptima.

8.3.2 Medición de la Respiración.- Este estudio nos per-
mitió cuantificar el consumo de oxígeno en cada una de las
cepas mutantes; para ello, se inocularon 25 ml de medio --
YPAD con la cepa en cuestión, incubando en agitación a --
30°C durante 24 horas. Las células se recogieron por cen-
trifugación a 2500-3000 rpm durante 8-10 minutos y se lava
ron tres veces con agua bajo condiciones estériles. La --
respiración se midió con un electrodo de Clarck, en un oxí
metro provisto de un graficador; la determinación se llevó
a cabo colocando 20 microlitros de una suspensión al 50% -
de células en 3 ml de amortiguador de fosfato-glucosa, --
pH 4.5, preparado con 8.74 partes de KH_2PO_4 0.2 M, pH 4.5
y 100 partes de solución de glucosa 117 mM.

Para poder relacionar el consumo de oxígeno medido con
la cantidad de células empleadas, una alícuota de la sus--
pensión celular preparada se destinó a la determinación -
del peso seco.

8.4 Apreciación Cualitativa de Citocromos:

Para calcular la alteración que produce la deficiencia respi
ratoria y puesto que es posible confundir una mutante respirato
rio-deficiente con cepas que estén sufriendo represión catabóli
ca (aunque en *K. lactis* no parece existir este fenómeno), un es
tudio de los citocromos respiratorios podía ayudarnos, ya que -

todos ellos se abatirán frente a una represión catabólica, mientras que por inhibición de la síntesis de proteínas mitocondriales 4/, 10/ no se afectará el citocromo "c", alterándose únicamente los citocromos "a + a₃" y "b", que son de origen bigenómico.

Para este estudio se preparó un cultivo de 24 horas de la cepa en cuestión, empleando para ello medio YPD líquido, excepto en el caso de cepas con requerimiento de adenina, en donde se utilizó medio YPAD. Las células se colectaron por centrifugación a 2500-3000 rpm durante 8-10 minutos, lavándolas dos veces con agua en condiciones estériles, y suspendiéndolas al 50% en agua. Se guardaron en congelación toda la noche. Al día siguiente se descongelaron, una alícuota se destinó a la determinación del peso seco y el resto se diluyó en proporción 1:5 con agua destilada para correr los espectros de absorción dentro del rango de 480 a 650 nm, para lo cual se empleó indistintamente un Espectrofotómetro Pye Unicam SP-1800 o un Espectrofotómetro Perkin-Elmer de doble rayo, empleando como blanco diluciones 1:5 y/o 2:5 de una suspensión de leche Difco en agua (1.35 g de leche en 9.4 ml de agua).

9. Estudios Genotípicos Efectuados en las Mutantes:

Sabiendo que al estudiar la segregación de la mutación podíamos determinar el origen de la lesión, se procedió a hacer estudios genéticos. *K. lactis* al igual que *S. cerevisiae*, tiene un ciclo vital 8/ que comprende un estadio de conjugación en la que dos células con factor de compatibilidad opuesto: "a" y "α", se fusionan para formar un cigoto que dará paso a una clona diploide, la cual,

a diferencia de *S. cerevisiae*, es inestable. De cada uno de estos diploides, por meiosis, emerge una tétrada de ascosporas haploides.

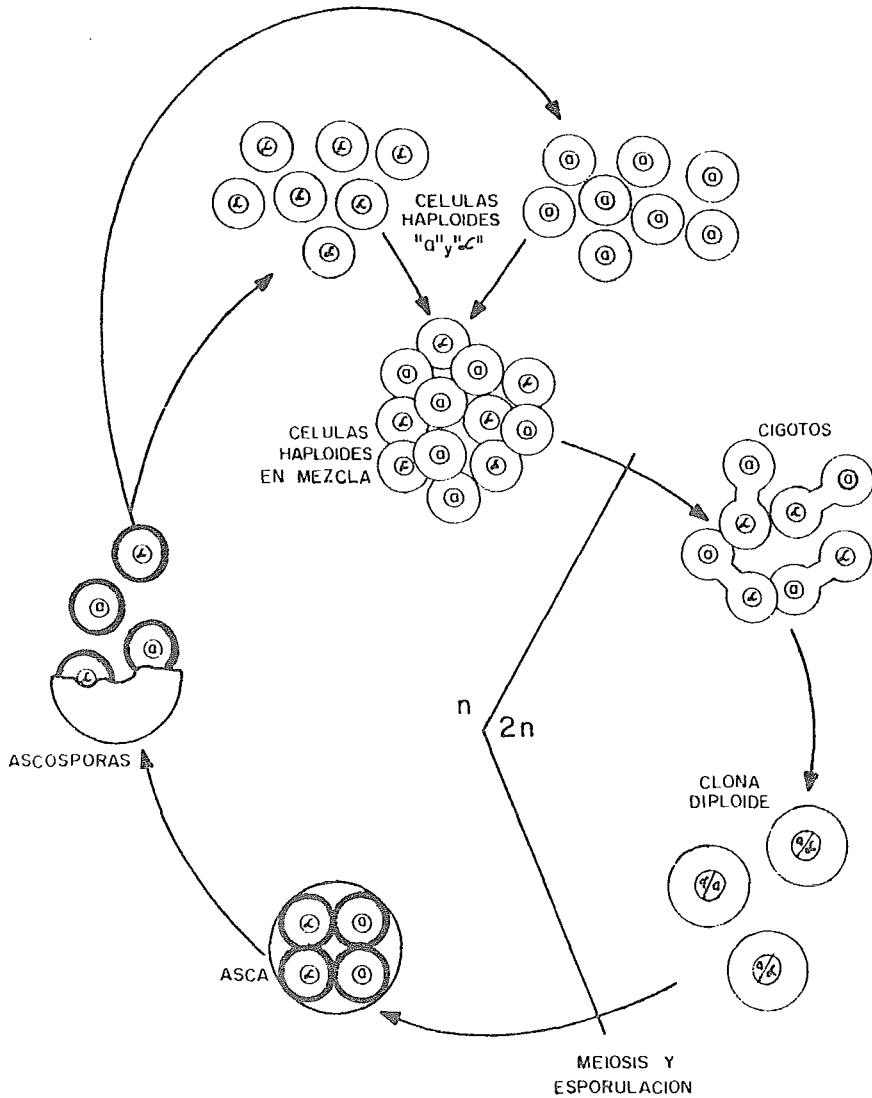


Figura No. 2.- Ciclo vital de *Kluyveromyces lactis*.

9.1 Entrecruzamientos:

Se eligió para cada cepa respiratorio-deficiente una serie de cepas respiratorio-competentes de factor de compatibilidad y marcadores auxotróficos, complementarios.

Cultivos frescos de las cepas a cruzar, se prepararon sobre placas de YPAD, de aquí se tomaron las células para mezclarse sobre placas con medio MD, MD-aL, MD-TE, ME, ME-aL y ME-TE, a razón de dos partes de células respiratorio-deficientes por una de respiratorio-competentes. Las placas se incubaron a 30°C, haciendo observaciones al microscopio a las 24, 48, 72 y 96 horas, en busca de células cigóticas, ante la presencia de éstas, o después de 96 horas, las células de la mezcla de cruce se suspendieron en amortiguador de fosfatos 0.05 M, pH 7, a una concentración adecuada para esparcir una alícuota sobre placas de medio mínimo (MD), de donde se aislaron prototroficamente los diploides formados, los cuales se colocaron en placas de YPAD e YPAG para apreciar la segregación mitótica de la mutación y en placas de ME para inducir la esporulación.

9.2 Disección de Tétradas:

Para observar las características transmitidas a las ascoporas, se aislaron las tétradas y se hizo germinar, por separado, cada una de sus esporas. Esta disección se realizó siguiendo la técnica descrita por Mortimer y Hawthorne 11/ de manera que las ascas se digirieron con una solución al 50% de β glucuronida en proporción 3:1, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Las esporas de una misma tétrada fueron separadas bajo el microscopio, utilizando un micromanipulador Leitz, y colocadas

sobre placas de YPAD para su germinación y posterior investigación de los caracteres heredados.

9.3 Fusión de Protoplastos:

Allmark y Morgan 12/, 13/, describieron una técnica para demostrar la naturaleza extracromosómica de mutantes en *K. lactis*. El método consiste en la fusión de protoplastos procedentes de la cepa mutante con protoplastos de células "petite" inducidas con bromuro de etidio en cepas respiratorio-competentes con el mismo factor de compatibilidad y marcadores nucleares complementarios. Las células resultantes se comportan como diploides, - permitiendo el estudio tanto de la segregación mitótica como de la meiótica de la mutación.

Este estudio se realizó teniendo como base las experiencias reportadas por Morgan 14/, de manera que para cada cepa respiratorio-deficiente, se eligió otra respiratorio-competente con el mismo factor de compatibilidad y marcadores auxotróficos complementarios. La cepa mutante se hizo crecer en 300 ml de YPAD en agitación a 30°C durante 30 horas, mientras que la cepa respiratorio-competente fue tratada con bromuro de etidio para transformarla en "petite vegetativa" 15/, para ello, las células se suspendieron en una concentración de 10^5 cel/ml en 25 ml de medio completo con bromuro de etidio (medio BE), incubando en la oscuridad y con agitación a 30°C durante 24 horas; ocho mililitros de este cultivo se transfirieron a 50 ml de medio BE, incubando bajo las mismas condiciones durante 20 horas.

Tanto las células respiratorio-deficientes como las "petite vegetativas" inducidas con bromuro de etidio se colectaron cen-

trifugando a 2500-3000 rpm por 10 minutos, seguida de dos lavados con agua en condiciones estériles. Las células así preparadas se suspendieron en 5 ml de agua y se contaron en una cámara de Neubauer. En cada caso, 10^9 células se colocaron en un tubo de ensayo con 4 ml de medio de formación de protoplastos (MFP), incubando a 30°C en un baño maría con agitación suave hasta formación de los protoplastos.

El proceso de formación de protoplastos se siguió por medición de la absorción a 600 nm de alícuotas diluidas en agua destilada y comparando las lecturas con aquellas correspondientes a células muertas por calentamiento a 70°C durante 50 minutos. Conjuntamente se realizaron observaciones al microscopio de las células procesadas, suspendiendo una muestra en agua destilada y otra en amortiguador para protoplastos.

Al observar un 80% de protoplastos, las células se colectaron por centrifugación a 2000-3000 rpm durante 5 minutos, lavando tres veces con amortiguador para protoplastos y suspendiéndolos en un mililitro de este mismo amortiguador para contarlos en una cámara de Neubauer.

Aproximadamente 10^7 protoplastos de la cepa respiratorio-deficiente se colocaron en un tubo de ensayo con igual número de protoplastos procedentes de la cepa "petite vegetativa" inducida con bromuro de etidio. La mezcla se centrifugó a 2000-2500 rpm durante 15 minutos, eliminando el sobrenadante y sustituyéndolo por dos mililitros de medio PEG, se agitó suavemente con una varilla de vidrio hasta resuspender bien las células y se incubó en el baño maría a 30°C con agitación suave durante 120 minutos. Finalmente, se prepararon diluciones de 10^5 y 10^3 protoplastos por mililitro, sembrando, aproximadamente 200 células,

en 15 ml de medio CPD, CPG, MPD y MPG líquidos y sobre placas - de estos mismos medios, en donde, después de esparcir las células, se vertieron unos 10 ml del medio correspondiente fundido y a unos 40°C, de manera que las células quedaron totalmente rodeadas del medio de cultivo. Todos los medios inoculados se incubaron a 30°C durante ocho días; las colonias capaces de cre--cer al cabo de este tiempo en medio MPD y/o MPG fueron conside--radas como diplotipos (ya que no son verdaderos diploides), los cuales, para provocar cruzamiento con células respiratorio-competentes, fueron tratados como organismos haploides, aplicando el método antes descrito para este fin.

8.4 Aislamiento y Medición del DNA.

Con la finalidad de comprobar el carácter diploide de las cé--lulas logradas en la fusión de protoplastos, se extrajo 13/, 16/ y midió 17/, 18/ el contenido de DNA, ya que este debía ser, en los diploides, aproximadamente el doble del existente en los ha--ploides.

La extracción del DNA se realizó esencialmente bajo las indi--caciones descritas por Kuo y Yamamoto 13/, para ello se prepara--ron cultivos de 24 horas de las cepas haploides y diploides en estudio, colocando 5×10^5 células en 25 ml de medio YPAD e in--cubando en agitación a 30°C. Las células se recolectaron cen--trifugando a 2500-3000 rpm durante 8-10 minutos, lavando dos ve--ces con agua destilada y suspendiéndolas en 5 ml para contarlas en una cámara de Neubauer.

En forma conjunta se trataron igual número de células haploi--des y diploides (10^9 - 10^{10} células de cada cepa), colocándolas -

en sendos tubos de ensayo, donde se efectuaron lavados sucesivos con:

- 2 a 4 ml de etanol frío al 70%
- 2 a 4 ml de etanol frío adicionado de HCL_{4} (0.1%)
- 2 a 4 ml de etanol-eter (3:1), hirviendo suavemente en un baño de agua a 70°C durante tres minutos.
- 1 a 2 ml de ácido perclórico 0.2 M, frío
- 1 a 2 ml de ácido perclórico 1 M, frío

El precipitado obtenido después del último lavado se trató con un mililitro de ácido perclórico 1 M, calentando a 70°C en un baño de agua, agitando ocasionalmente, durante 20 minutos. Se centrifugó a 5000 rpm por espacio de diez minutos para separar el sobrenadante o extracto de DNA, del precipitado, este último se reextrajo bajo las mismas condiciones tratando con otro mililitro de ácido perclórico 1 M.

Los dos extractos de DNA obtenidos se mezclaron y aforaron a 2 ml con ácido perclórico 1 M, de aquí se tomó 1.0 ml y se mezcló con dos mililitros de solución de difenilamina, que es el reactivo de color.

Simultáneamente a las muestras, se hizo una curva estándar de DNA, preparando diluciones de una solución patrón conteniendo 2 mg/ml de DNA en ácido perclórico 1 M y poniendo a reaccionar un mililitro de cada concentración con dos volúmenes del reactivo de color.

Los tubos problema y los de la curva estándar se incubaron en la oscuridad a 25-30°C durante 16-25 horas, para, finalmente, leer el color desarrollado a 600 nm en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II.

RESULTADOS Y DISCUSION:

1. Inducción y Asilamiento de Mutantes Respiratorio-Deficientes.

1.1 Mutagénesis con Sales de Manganeso:

Durante los procesos de mutagenización se trató de encontrar las condiciones óptimas que coadyuvaran al logro de un número máximo de mutantes respiratorio-deficientes, especialmente de origen extracromosómico. En primer lugar, en el caso -- del manganeso, se probaron los efectos de dos sales: cloruro y sulfato, cuyos resultados sobre la cepa WM-37 en medio completo con glucosa (YPAD), se muestran en la tabla No. 2, pudiendo notar que el $MnSO_4$, en seis horas de tratamiento no indujo mutantes respiratorio-deficientes, mientras que el $MnCl_2$ originó, principalmente en concentraciones de 100 a 250 mM, varias de - éstas, de las cuales un 33% presentaron mutaciones letales, un 50% fueron reversas y sólo el 17% se aisló como mutantes respi- ratorio-deficientes estables.

Cuando en tratamiento mutagénico se prolongó a 24 horas, co- mo lo reporta la misma tabla 2, la proporción de colonias inca- paces de crecer en glicerol aumentó al utilizar como mutágeno al $MnSO_4$, pero disminuyó con el $MnCl_2$; en ambos casos la rever- sibilidad de las lesiones originadas fue del cien por ciento.

En cuanto a la sobrevivencia, ésta fue en general muy baja; en seis horas de tratamiento la mortalidad alcanzada con ambos mutágenos fué similar, con pérdidas de más del 90%. Después - de 24 horas de tratamiento, los cultivos con concntraciones - entre 5 y 10 mM de mutágeno mostraron una sobrevivencia parale- la a la existente en el cultivo testigo, mientras que en los - cultivos procesados con 15 y 20 mM de mutágeno, la disminución

de la población fué notoria pero no tan marcada como lo habíamos registrado en el tratamiento de seis horas. La sobrevivencia frente a tratamientos entre 25 y 100 mM de mutágeno, en 24 horas, fue tan baja que no pudo ser cuantificada y en concentraciones superiores a 150 mM de mutágeno, se observó una lisis total del cultivo.

En general, apreciamos una mayor sobrevivencia después de los tratamientos con $MnCl_2$ que, al parecer, es menos nocivo que la sal sulfatada.

La acción mutagénica del manganeso se probó en medio completo con glucosa en presencia y ausencia de un amortiguador de fosfatos (medios YPADA e YPAD) para ello se trató una misma cepa con cantidades equivalentes de $MnCl_2$ o $MnSO_4$ en ambos medios (tablas 2 y 3).

Comparando los datos de las tablas 2 y 3, observamos que la sobrevivencia, en general, fue mayor cuando la mutagenización se realizó en presencia de amortiguador que en su ausencia, por lo que es posible que el pH del medio sea fundamental para la viabilidad de las células en tratamiento. Además, se observó a simple vista que el mutágeno, fundamentalmente el $MnSO_4$, se precipita en presencia de amortiguador, probablemente por formación del $Mn_3(PO_4)_2$, por lo que la concentración del ion Mn^{++} pudiera ser menor y a ello obedeciera el incremento en la viabilidad de las células.

En lo que respecta a la inducción de mutantes respiratorio-deficientes, las sales de manganeso en medio con amortiguador permitieron un incremento en su número, fundamentalmente debido a la acción del $MnSO_4$ que en estas condiciones formó muta--

MUTAGENO EMPLEADO	CONCENTRACION SAL MUTAGENICA (m M)	TRATAMIENTO MUTAGENICO DE 6 HORAS					TRATAMIENTO MUTAGENICO DE 24 HORAS				
		SOBREVIVENCIA (%)	MICROCOLONIAS Nº /PLACA	MUTANTES LETALES	MUTANTES REVERSAS	MUTANTES ESTABLES	SOBREVIVENCIA (%)	MICROCOLONIAS Nº /PLACA	MUTANTES LETALES	MUTANTES REVERSAS	MUTANTES ESTABLES
	TESTIGO	100.00	0				100.00	0			
MnCl ₂	5	0.74	0				100.00	0			
	10	1.30	0				93.19	6	0	6	0
	15	1.01	0				62.80	3	0	3	0
	20	0.83	0				-				
	25	0.80	0				-				
	50	1.01	0				-				
	100	1.74	3	0	2	YC ₁₂	-				
	150	1.62	0					LISIS		TOTAL	
	200	1.33	0					LISIS		TOTAL	
250	1.30	9	1	7	YC ₁		LISIS		TOTAL		
MnSO ₂	5	1.60	0				81.89	1	0	1	0
	10	1.09	0				8.23	0			
	15	1.37	0				-				
	20	1.09	0				1.18	0			
	25	0.77	0				-				
	50	2.19	0				-				
	100	2.09	0				-				
	150	2.12	0					LISIS		TOTAL	
	200	0.96	0					LISIS		TOTAL	
250	1.30	0					LISIS		TOTAL		

Tabla No. 2.- Resultados de la mutagénesis con Mn⁺⁺ en la cepa WM-37 en medio YPAD y tratamiento de 6 y 24 horas.

Tabla No. 3.- Resultados de la mutagénesis con Mn^{++} de la cepa WM-37 en medio YPADA y tratamiento de 6, 24 y 48 horas.

MUTAGENO EMPLEADO	CONCENTRACION Mn^{++} (mM)	TRATAMIENTO DE 6 HORAS					TRATAMIENTO DE 24 HORAS					TRATAMIENTO DE 48 HORAS				
		SOBREVIVENCIA (%)	"POSIBLES" MUTANTES	MUTANTES LETALES	MUTANTES REVERSAS	MUTANTES ESTABLES	SOBREVIVENCIA (%)	"POSIBLES" MUTANTES	MUTANTES LETALES	MUTANTES REVERSAS	MUTANTES ESTABLES	SOBREVIVENCIA (%)	"POSIBLES" MUTANTES	MUTANTES LETALES	MUTANTES REVERSAS	MUTANTES ESTABLES
TESTIGO		100.00	0				100.00	0				100.00	0			
$MnCl_2$	5	59.28	0				89.40	0				51.26	0			
	10	31.27	0				99.84	0				84.04	0			
	15	33.42	1	0	1	0	12.81	1	0	1	0	-				
	20	33.42	0				6.83	2	0	0	FMC-6,FMC-8	-				
	25	22.18	2	0	2	0	1.92	0				0.215	0			
	50	20.69	0				1.32	1	1	0	0	0.014	7	2	5	0
	100	20.80	0				1.38	3	1	2	0	0.009	11	4	6	FMC-35
	150	19.39	0				0.96	1	0	1	0	0.012	4	2	2	0
	200	18.10	0				0.58	0				0.007	3	3	0	0
	250	15.52	0				-					0.006	4	4	0	0
$MnSO_4$	5	80.41	0				140.55	2	1	1	0	54.80	0			
	10	27.39	0				59.53	0				83.84	1	1	0	0
	15	25.24	0				3.80	1	0	1	0	51.72	0			
	20	25.66	0				5.07	0				0.53	-			
	25	23.94	0				3.75	1	1	0	0	0.25	3	1	2	0
	50	-					-					-				
	100	27.59	0				1.99	1	1	0	0	0.04	5	5	0	0
	150	25.00	0				0.93	2	0	2	0	0.013	4	3	1	0
	200	22.84	2	0	2	0	0.68	1	1	0	0	0.009	4	4	0	0
	250	22.22	0				0.47	0				0.007	2	2	0	0

ciones más estables que aquellas obtenidas con este mismo mutágeno en medio sin amortiguador. Por otra parte, las mutaciones logradas mediante $MnCl_2$ en medio con amortiguador revirtieron fácilmente, de manera que el tratamiento con esta sal en ausencia de amortiguador dió mejores resultados.

Como puede notarse en la tabla 3, las concentraciones de mutágeno superiores a 100 mM fueron, nuevamente, mejores inductores de mutaciones respiratorio-deficientes.

En la tabla No. 4 observamos los resultados procedentes de la mutagénesis efectuada en la cepa KF65-R₁, la cantidad de colonias respiratorio-deficientes lograda después del tratamiento con $MnSO_4$ fué, en general, semejante a la lograda por acción del $MnCl_2$, sin embargo, debido a una proporción menor de lesiones letales, el número de mutantes viables inducidas con $MnCl_2$ fue mucho mayor.

Comparando los datos de las tablas 3 y 4, que muestran los resultados de procedimientos mutagénicos idénticos realizados en dos cepas distintas (WM-37 y KF65-R₁) observamos que la sobrevivencia fue similar en ambas cepas, aunque ligeramente más elevada en el caso de la cepa KF65-R₁. En cuanto a la cantidad de "posibles" mutantes aisladas, los logros, a partir de la cepa KF65-R₁ fueron, en 6 y 24 horas de tratamiento, menores que los obtenidos en la cepa WM-37; pero en tratamiento de 48 horas, el número de mutantes respiratorio-deficientes en la cepa KF65-R₁ fue superior.

Estudiando el porcentaje de mutaciones estables, reversas o letales aisladas después del tratamiento de 6 y 24 horas con sales de manganeso, encontramos comportamientos similares en -

Tabla No. 4.- Resultados de la mutagénesis con Mn^{++} de la cepa WR-37 en medio YPADA durante 2, 4, 6, 24 y 48 horas.

MUTAGENO Y CONCENTRACION (mM)	TIEMPO DE TRATAMIENTO MUTAGENICO:					
	2 HORAS	4 HORAS	6 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	
TESTIGO	100.00 0	100.00 0	100.00 0	100.00 0	100.00 0	
MnCl ₂	5	16.20 0	7.70 2 0 2 0	2.90 5 0 4 YC ₁₅	0.001 0	—
	10	18.80 1 0 1 0	13.00 1 0 1 0	5.23 0	0.001 2 0 2 0	—
	15	32.40 2 0 2 0	7.60 1 0 1 0	3.80 3 0 3 0	—	—
	25				0.001 3 1 2 0	—
	50				0.30 0	—
	100				0.13 0	—
MnSO ₄	5	22.90 3 0 2 YS ₅	16.90 0	1.80 4 2 2 0	0.001 6 0 5 0	—
	10	22.60 0	13.60 1 1 0 0	1.00 2 0 2 0	0.001 4 1 2 YS ₆₁	—
	15	42.80 2 0 2 0	7.90 0	0.75 1 0 1 0	—	—
	25				0.14 0	—
	50				1.70 0	—
	100				0.34 0	—
MnCl ₂	5	17.00 0	13.30 7 3 4 0	13.30 7 3 4 0	75.60 0	95.60 0
	10	5.70 0	5.70 0	5.70 0	11.70 5 3 1 0	70.00 0
	15	1.70 0	1.70 0	5.90 15 6 7 0	5.90 15 6 7 0	66.00 1 0 1 0
	20	0.60 0	0.60 0	7.90 2 2 0 0	7.90 2 2 0 0	13.30 5 2 3 0
	25	5.60 0	5.60 0	22.40 3 0 3 0	22.40 3 0 3 0	12.30 4 2 2 0
	50	22.80 0	22.80 0	49.00 0	49.00 0	—
MnSO ₄	5	27.50 0	27.50 0	27.50 0	49.00 0	102.00 0
	10	22.80 0	22.80 0	22.80 0	33.30 0	49.70 2 0 2 0
	15	5.60 0	5.60 0	5.60 0	50.00 1 0 1 0	50.00 1 0 1 0
	20	0.60 0	0.60 0	0.60 0	11.00 2 0 2 0	11.00 2 0 2 0
	25	0.30 0	0.30 0	0.30 0	1.30 4 1 3 0	1.30 4 1 3 0
	50	102.00 0	102.00 0	102.00 0	102.00 0	—

las cepas WM-37 y KF65-R₁, presentando una elevada proporción de mutantes reversas y muy poca estabilidad. Después de 48 horas de mutagenización, en la cepa WM-37 existió un incremento de la reversibilidad, disminuyendo la estabilidad de las mutantes; en cambio, en la cepa KF65-R₁, la estabilidad y letalidad se incrementó, decreciendo la reversibilidad.

1.2 Mutagénesis con Radiaciones Ultravioleta.

Además del manganeso, se probó la acción mutagénica de la luz UV que, como ya se había reportado 1/, era capaz de inducir mutaciones "petite" mitocondriales. De esta manera se sometieron al tratamiento las cepas WM-37 y KF65-R₁, pudiendo establecer comparaciones, no sólo del comportamiento de este agente en las diferentes células, sino de la eficiencia de los mutágenos hasta aquí empleados para la inducción de las mutantes respiratorio-deficientes.

En la tabla No. 5 observamos que, mediante radiaciones UV, la cepa WM-37 origina algunas colonias respiratorio-deficientes, fundamentalmente en dosis de 60 a 240 segundos de tratamiento, pero estas fueron en gran parte inviables o alcanzaron a revertir, dejando un saldo de cero mutantes respiratorio-deficientes. Resultados similares se obtuvieron durante dos experiencias más realizadas con luz UV en esta misma cepa, concluyendo que, debido a la letalidad originada por el mutágeno, este tratamiento no es el indicado para trabajar con las células WM-37.

En contraste con estos datos, en la cepa KF65-R₁, como lo muestra la tabla No. 6, existe una gran inducción de mutantes

respiratorio-deficientes por radiaciones UV en tiempos de 40 a 60 segundos; además la sobrevivencia, que en la cepa WM-37 había sido muy baja se incrementa.

Comparando el porcentaje de mutantes estables, feversas y letales, derivadas de las cepas WM-37 y KF65-R₁ (tablas 5 y 6), observamos en ambas cepas igual proporción de reversas; en la cepa KF65-R₁ la letalidad de las mutaciones fue ligeramente menor, permitiendo el logro de cuatro cepas respiratorio-deficientes.

Todos estos resultados hacen pensar que la cepa KF65-R₁, -- siendo igualmente sensible a la acción mutagénica del manganeso, es menos susceptible que WM-37 a las radiaciones UV.

Tabla No. 5.- Resultados del tratamiento con luz U.V. de la cepa - WM-37. Una suspensión de 1.28×10^8 cel/ml fue irradiada con luz ultravioleta en dosis de $19 \text{ erg/mm}^2/\text{seg}$, retirando alícuotas cada 20 segundos durante un periodo de cuatro minutos.

TIEMPO DE RADIACION (seg)	SOBREVIVENCIA (%)	"POSIBLES" MUTANTES (#/placa)	"POSIBLES" MUTANTES (%)	MUTANTES LETALES	MUTANTES REVERSAS	MUTANTES ESTABLES
0	100.00	0	0.00			
20	31.55	2	1.36	0	2	0
40	11.90	0	0.00			
60	8.06	12	2.90	8	4	0
80	7.76	0	0.00			
100	0.49	1	0.44	0	1	0
120	0.48	9	4.00	7	2	0
140	0.26	4	3.33	3	1	0
160	0.14	8	12.50	4	4	0
180	0.06	8	2.79	2	6	0
200	0.06	6	2.11	5	1	0
220	0.05	3	1.19	2	1	0
240	0.03	10	6.75	4	6	0

Tabla No. 6.- Resultados del tratamiento con luz U.V. de la cepa - KF65-R₁. Una suspensión de 8.2×10^7 cel/ml fue irradiada con luz ultravioleta en dosis de 19 erg/mm²/seg, retirando alícuotas cada - veinte segundos en un lapso de tres minutos.

TIEMPO DE RADIACION (seg)	SOBREVIVENCIA (%)	"POSIBLES" MUTANTES (#/placa)	"POSIBLES" MUTANTES (%)	MUTANTES LETALES	MUTANTES REVERSAS	MUTANTES ESTABLES	
0	100.00	0	0.00				
20	46.80	0	0.00				
40	14.91	34	6.98	27	7	1	F ₆
60	3.21	16	15.24	7	9	0	
80	-	-	-				
100	1.19	6	15.38	2	3	1	F ₂₂
120	0.16	3	5.77	3	0	0	
140	0.89	0	0.00				
160	0.64	4	1.91	0	2	2	F ₄₆ , F ₄₇
180	0.39	1	0.79	0	1	0	

1.3 Relación de las Mutantes Estudiadas.

Para tener una mayor visión y apreciar las condiciones óptimas de mutación, en la tabla No. 7 se han ordenado las mutantes respiratorio-deficientes aquí logradas así como las mutantes derivadas de las cepas KF73-9C y KC2-12D, aisladas por -- otras personas, indicando los tratamientos mutagénicos lleva-- dos a cabo para su obtención.

Primeramente podemos observar la presencia de una sola mu-- tante espontánea, la cepa N, derivada de la cepa WM-37, que -- por ser única en su especie, deja entrever la dificultad de *K. lactis* para originar mutaciones "petite" estables.

La cepa WM-37 dió mejores resultados cuando el tratamiento se llevó a cabo por períodos cortos de tiempo y concentracio-- nes altas de mutágeno, mientras que en el caso de KF73-9C se - obtuvieron mejores resultados con períodos largos de tratamiento y concentraciones relativamente bajas de mutágeno (25mM).

También es de considerarse el hecho de que el $MnCl_2$ parece mejor inductor de mutaciones respiratorio-deficientes que el $MnSO_4$, aunque hay que pensar en la posibilidad de que se re--- quieran concentraciones menores de este último mutágeno, dicha idea surge de la observación de que todas las mutantes logra-- das por acción del $MnSO_4$ fueron inducidas en un medio con amortiguador, en donde, debido a la presencia de fosfatos, el mutágeno se precipita.

En cuanto a la acción de la luz UV observamos que, sin dar buenos efectos en la cepa WM-37, permitió resultados satisfactorios con la cepa KF65-R₁, donde originó, principalmente en-- tre 100 y 160 segundos de tratamiento, mutantes respiratorio--

deficientes viables.

La inestabilidad de las mutantes obtenidas por tratamiento con sales de manganeso, al igual que las logradas mediante radiaciones UV, con excepción de la cepa F₂₂ (que por su estabilidad suponemos sufrió una delección), hizo necesaria una continua purificación de estas cepas. En un principio la frecuencia de reversión fue muy elevada, pero después de 30 a 40 purificaciones, disminuyó notablemente hasta lograr, en la mayoría de los casos, mutantes estables. Pensemos que es factible que el índice de reversión en estas cepas no sea tan elevado como se registró, sino que estos resultados se deban a que cuando alguna célula llega a revertir, al ser respiratorio-competente, podrá crecer más rápidamente y dominar en poco tiempo en el medio.

Tabla No. 7. Resúmen de las cepas respiratorio-deficientes estudiadas y el tratamiento mutagénico empleado para su inducción.

CEPA MUTANTE	CEPA PROGENITORA	TRATAMIENTO MUTAGENICO REALIZADO.			
		MUTAGENO	MEDIO	TIEMPO	
N	WM-37	MUTANTE	ESPONTÁNEA		
YC ₁	WM-37	MnCl ₂ 250 mM	YPAD	6 hrs	
YC ₁₂	WM-37	MnCl ₂ 100 mM	YPAD	6 hrs	
YC ₁₃	WM-37	MnCl ₂ 100 mM	YPADA	6 hrs	
YS ₅	WM-37	MnSO ₄ 100 mM	YPADA	2 hrs	
YS ₆₁	WM-37	MnSO ₄ 150 mM	YPADA	24 hrs	
* 8As	KF73-9C	MnSO ₄ 25 mM	YPADA	72 hrs	
* 11As	KF73-9C	MnSO ₄ 25 mM	YPADA	72 hrs	
* 45	KC2-12D	NMG 20 µg/ml	**	15 min	
* 52	KC2-12D	NMG 20 µg/ml	**	30 min	
F ₆	KF65-R ₁	Radiaciones UV	***	40 seg	
F ₂₂	KF65-R ₁	Radiaciones UV	***	100 seg	
F ₄₆	KF65-R ₁	Radiaciones UV	***	160 seg	
F ₄₇	KF65-R ₁	Radiaciones UV	***	160 seg	
FMC-6	KF65-R ₁	MnCl ₂ 20 mM	YPADA	24 hrs	
FMC-8	KF65-R ₁	MnCl ₂ 20 mM	YPADA	24 hrs	
FMC-35	KF65-R ₁	MnCl ₂ 100 mM	YPADA	48 hrs	

* Las mutantes respiratorio-deficientes derivadas de las cepas KF73-9C y - - KC2-12D, no se obtuvieron en el desarrollo de este trabajo, fueron inducidas y obsequiadas por el Dr. Alfredo Muñoz y la Bióloga Ma. del Carmen Cruz.

** Se utilizó un amortiguador de fosfatos 0.2 M y de citratos 0.1 M, pH 7.7

*** La mutagénesis se realizó en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.0

2. Estudios Fenotípicos Realizados en las Cepas Mutantes:

2.1 Determinación de las Curvas de Crecimiento.

Con el fin de conocer el grado de alteración del crecimiento en las diversas mutantes, se siguió turbidimétricamente el desarrollo de las células en medio completo con glucosa (YPAD), graficando, como lo muestran las figuras 3 a 8, la zona logarítmica de su crecimiento, cuyas pendientes pueden compararse con el comportamiento de la cepa progenitora en este mismo medio en ausencia y en presencia de 4 mg/ml de cloranfenicol (medios YPAD e YPAD-CAP respectivamente), antibiótico que, como demostró Linnane 4/, en cultivos conteniendo una fuente de carbono fermentable, inhibe la síntesis de proteínas mitocondrial formando organismos fenotípicamente similares a las mutantes "petite" vegetativas esto nos permitió establecer analogías entre las células progenitoras artificialmente transformadas en respiratorio-deficientes y las cepas mutantes. Así, por ejemplo, comparando las gráficas de las figuras 3 y 4, correspondientes al desarrollo de la cepa WM-37 y sus mutantes, observamos un comportamiento muy similar entre las cepas respiratorio-deficientes y su progenitora desarrollada en presencia de cloranfenicol.

Por otro lado, en la figura 5, apreciamos que la cepa respiratorio-deficiente 11As, en medio YPAD, crece con gran lentitud y en forma paralela a su progenitora en presencia de cloranfenicol. Sin embargo, la mutante 8As posee una velocidad de crecimiento levemente inferior a la registrada en la cepa progenitora en condiciones normales de cultivo.

En cuanto al comportamiento de la cepa KC2-12D y su mutante

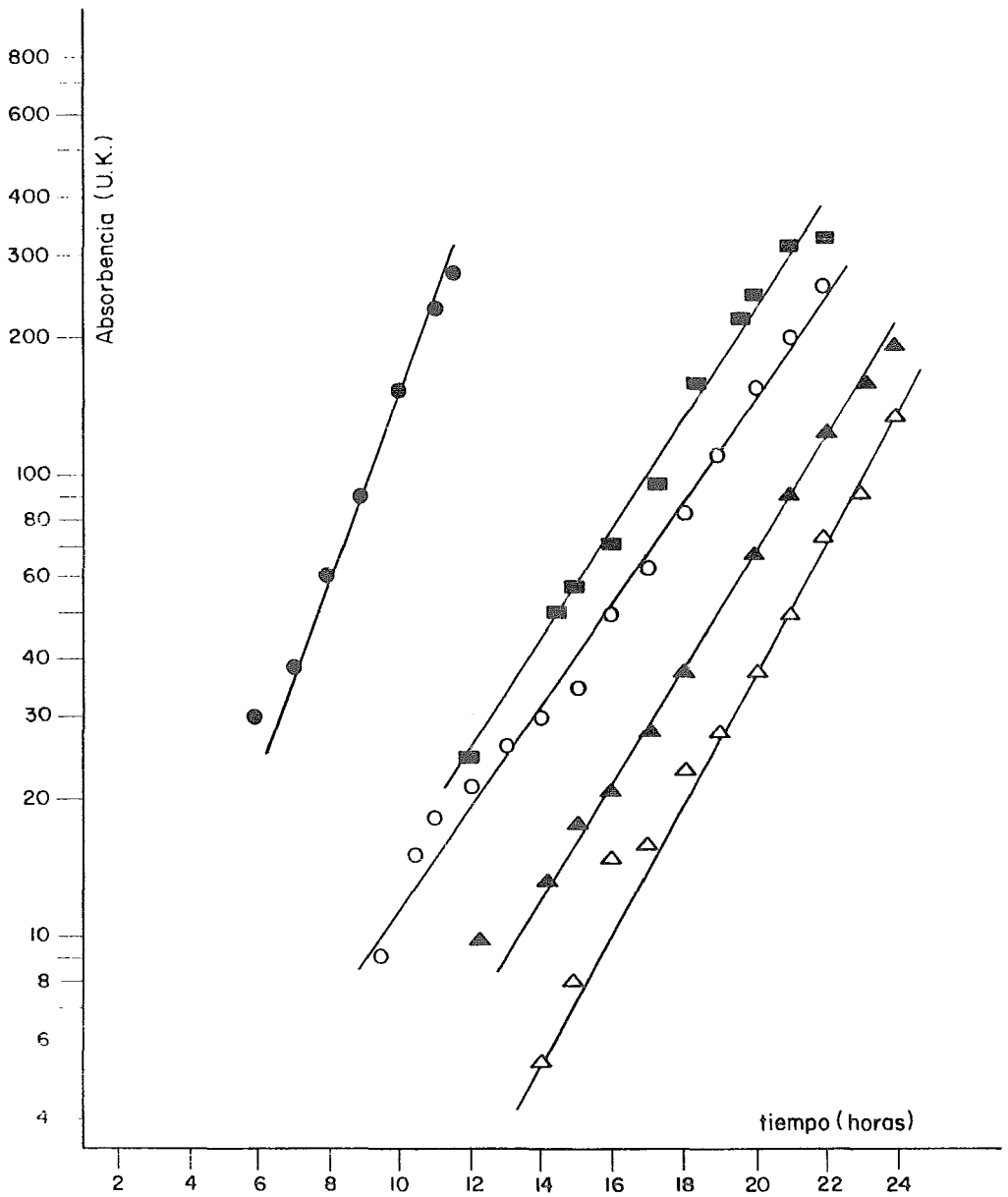


Figura No. 3.- Curvas de crecimiento de WM-37 y algunas de sus mutantes respiratorio-deficientes. (●) WM-37; (○) WM-37 + cloranfenicol (4mg/ml)
 (△) N; (▲) YC₁; (■) YC₁₂

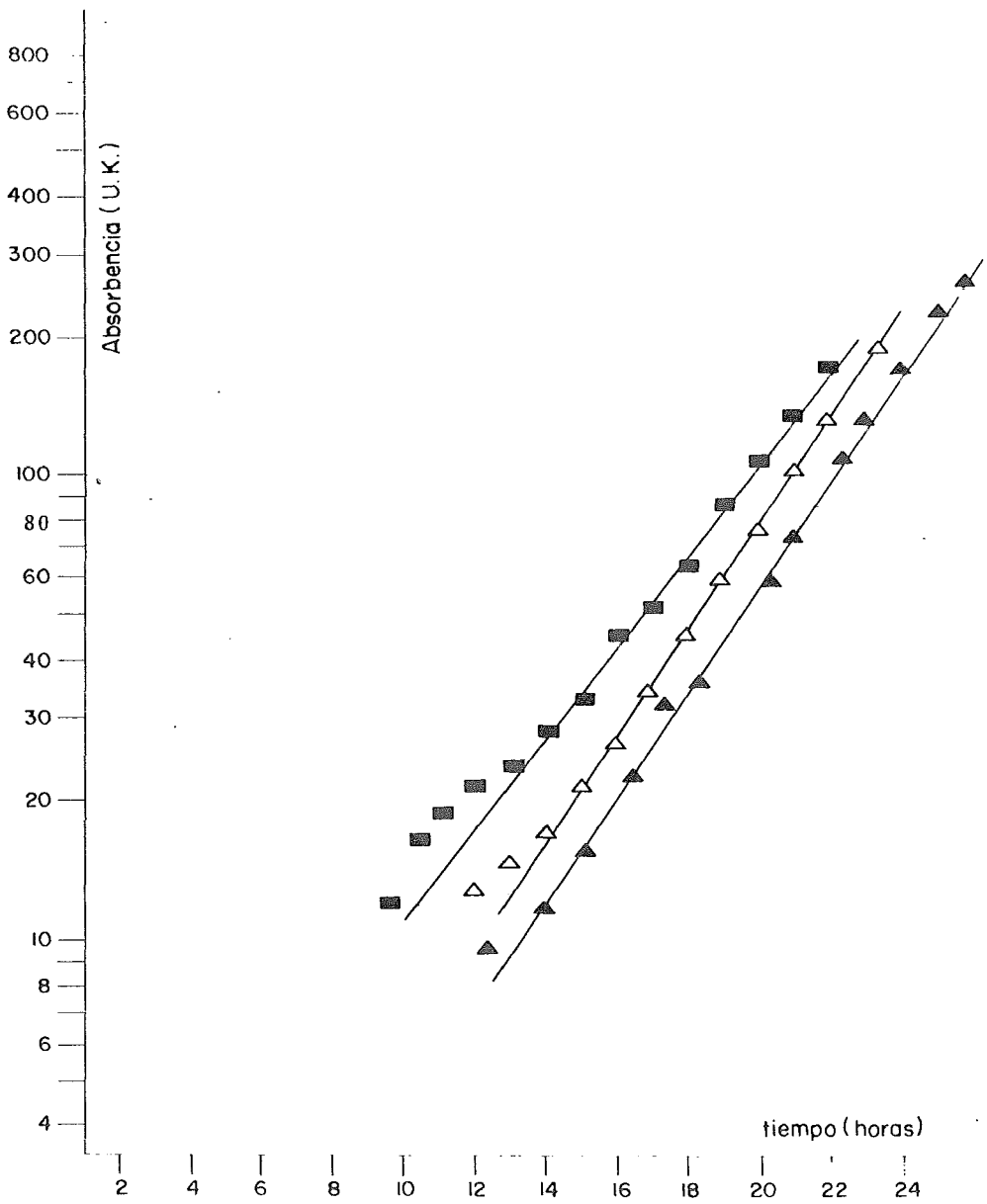


Figura No. 4.- Curvas de crecimiento de algunas mutantes respiratorio-deficientes derivadas de la cepa WM-37. (▲) YC₁₃; (△) YS₅; (■) YS₆₁

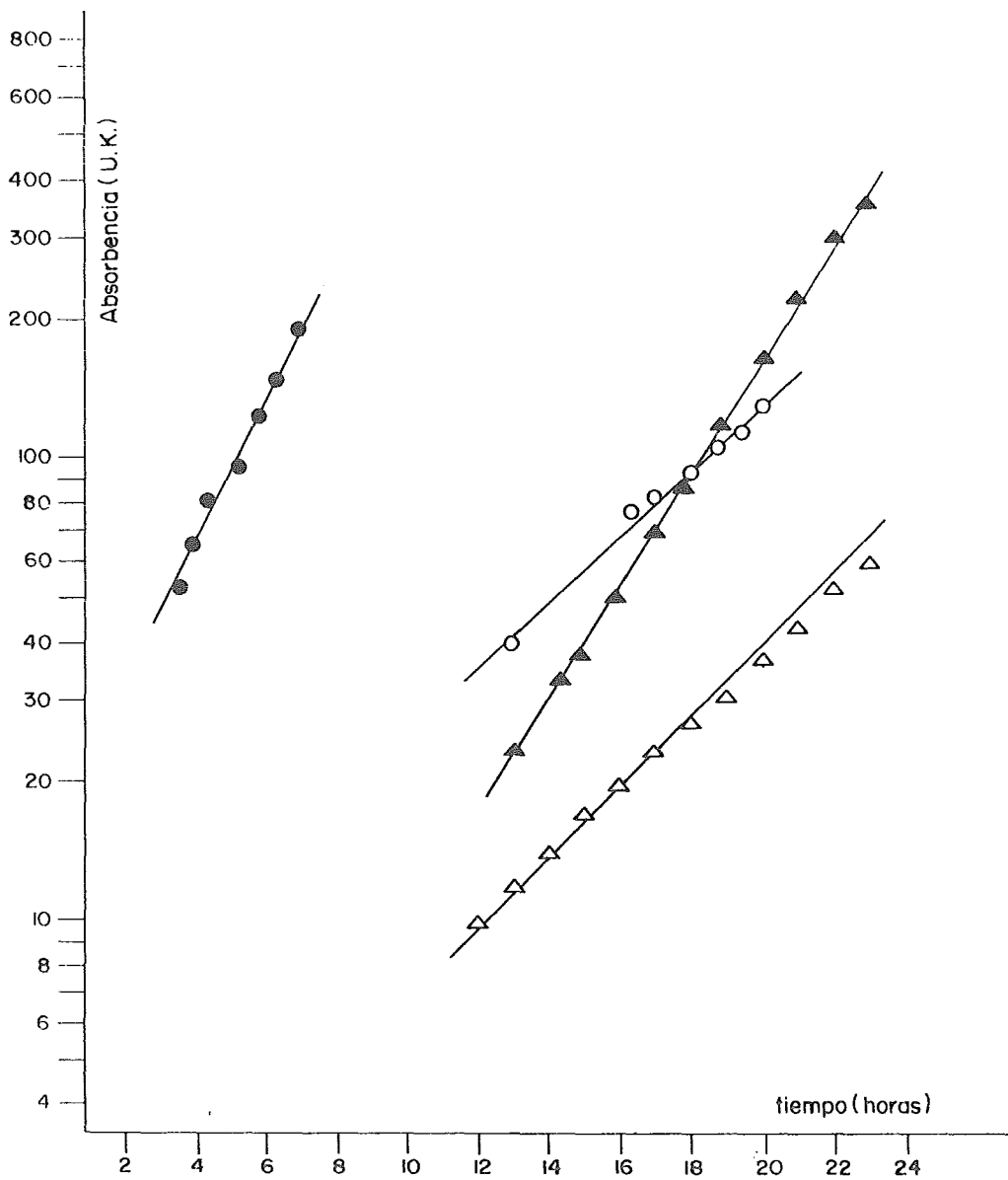


Figura No. 5.- Curvas de crecimiento de KF73-9C y sus mutantes respiratorio-deficientes. (▲) 8As; (△) 11As; (○) KF73-9C + cloranfenicol (4 mg/ml) (●) KF73-9C.

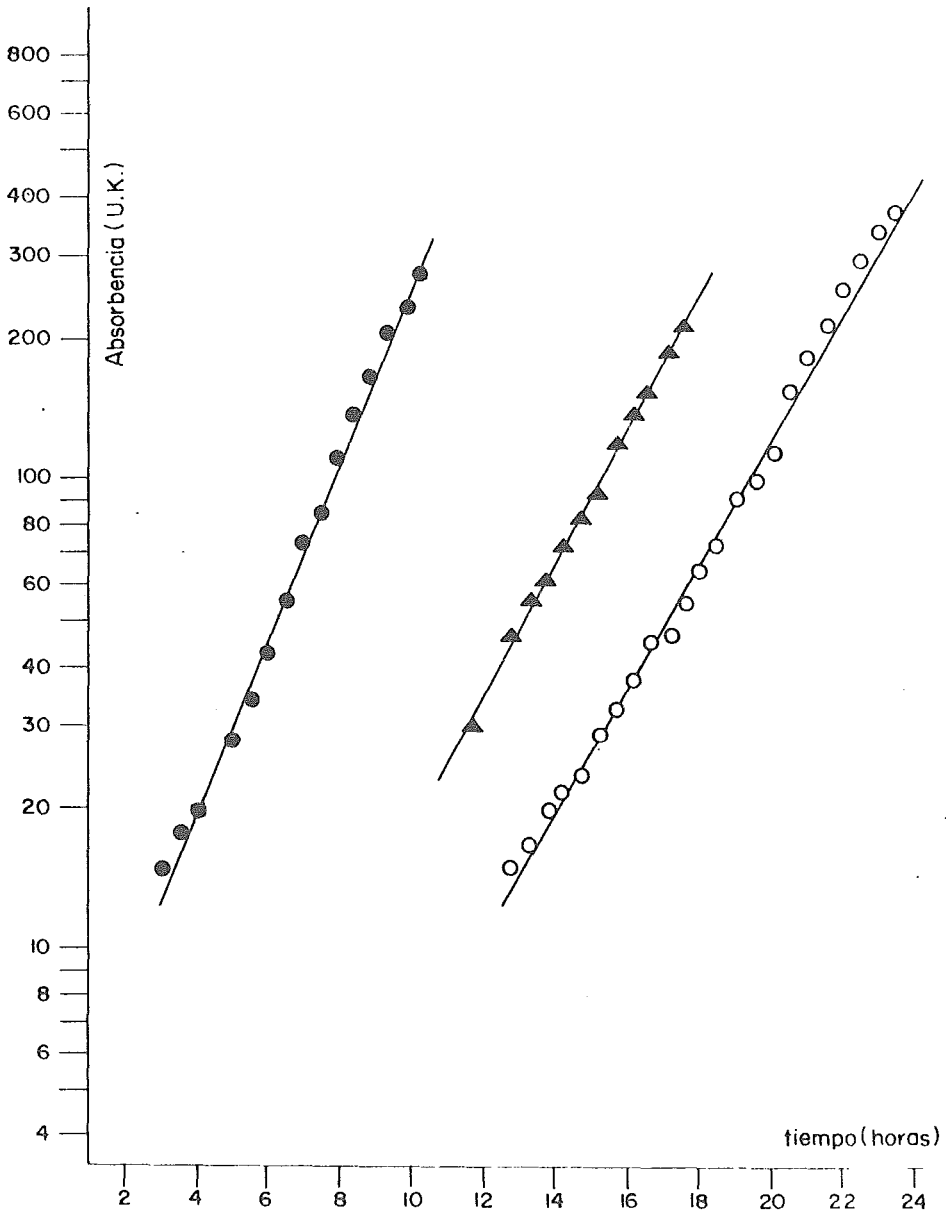


Figura No. 6.- Curvas de crecimiento de las cepas KC2-12D y 52. (▲) 52, mutante respiratorio-deficiente; (●) KC2-12D; (○) KC2-12D + Cloranfenicol.

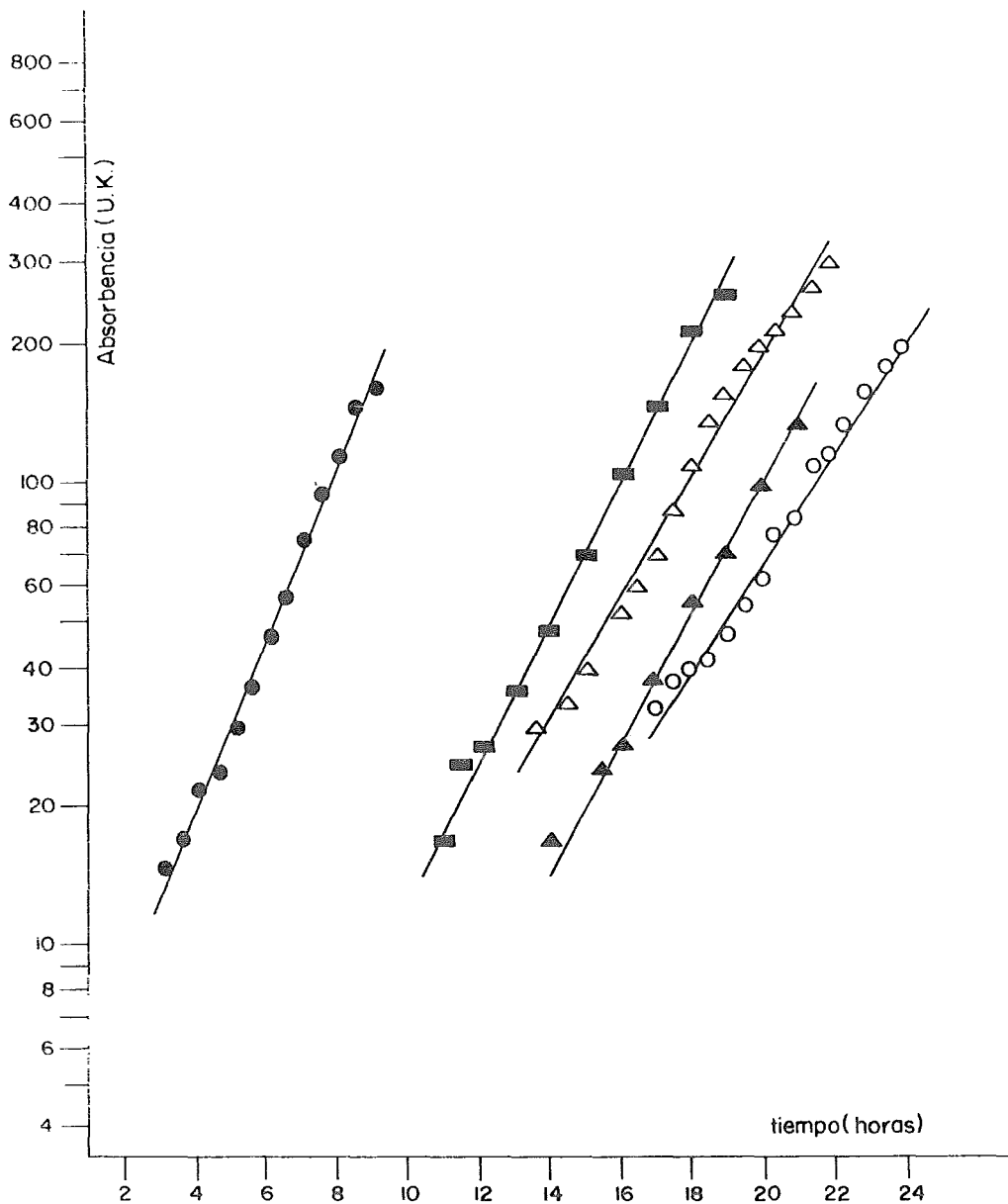


Figura No. 7.- Curvas de crecimiento de KF65-R₁ y algunas de sus mutantes respiratorio-deficientes. (▲) FMC-6; (■) FMC-8; (△) FMC-35; (●) KF65-R₁; (○) KF65-R₁ + cloranfenicol (4 mg/ml).

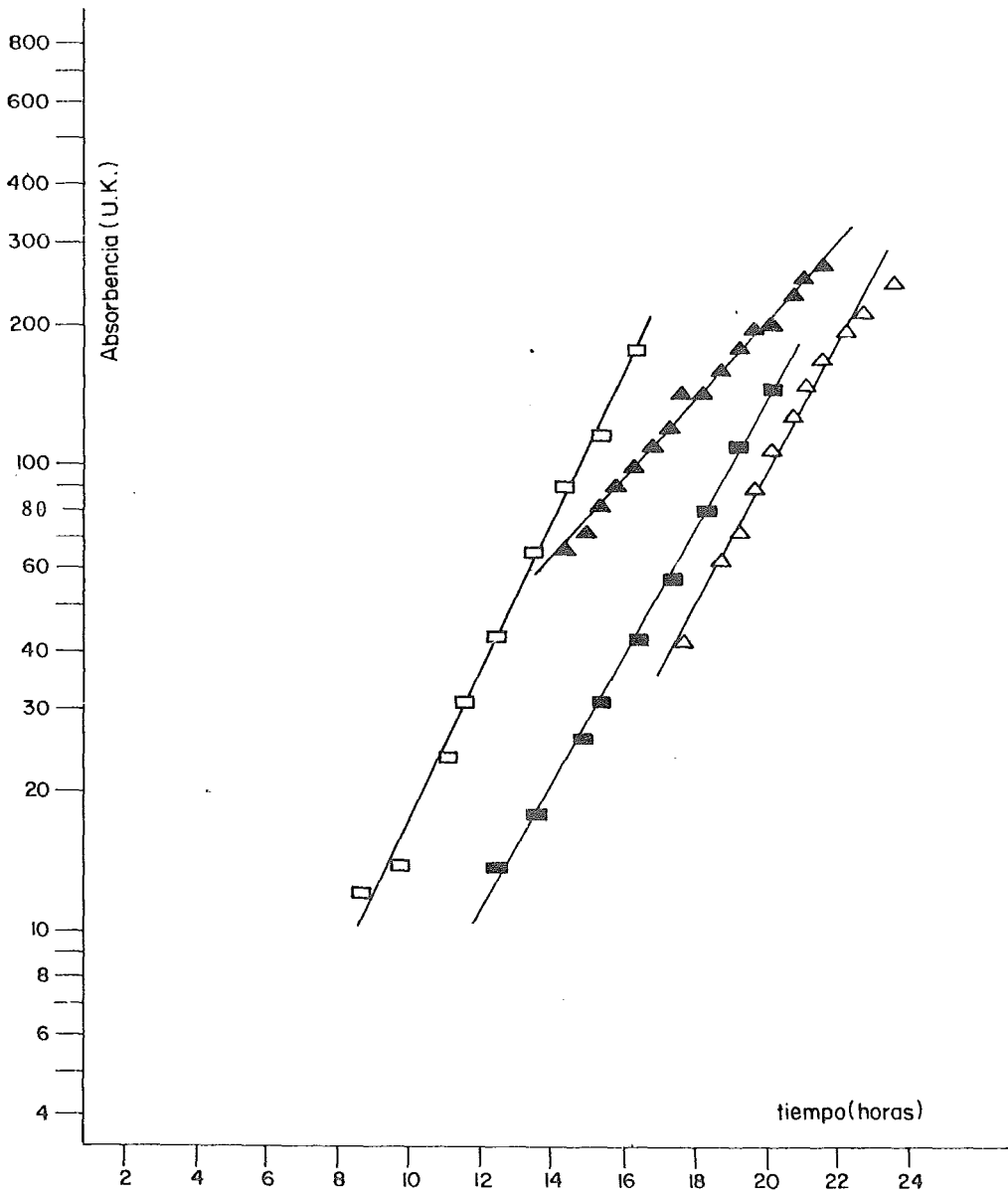


Figura No. 8.- Curvas de crecimiento de las mutantes respiratorio-deficientes inducidas con luz U.V. en la cepa KF65-R₁. (▲) F₆; (△) F₂₂
 (■) F₄₆; (□) F₄₇

figura 6, existe una ligera diferencia entre la velocidad de crecimiento de la cepa respiratorio-competente en medio con cloranfenicol y la mutante en medio sin antibiótico, aún cuando y como es de esperarse, la diferencia entre la mutante y la progenitora en medio sin cloranfenicol, es aparente.

Finalmente, en las gráficas de las figuras 7 y 8, observamos que el desarrollo de las mutantes obtenidas por radiaciones UV fue semejante al de la cepa progenitora en presencia de cloranfenicol, con excepción de la cepa F_{47} , que, al igual que la mutante FMC-8, posee una velocidad de crecimiento ligeramente inferior a la registrada en la progenitora en medio sin antibiótico.

2.2 Concentración Óptima de Glucosa.

Las células respiratorio-deficientes obtienen la energía necesaria para su sobrevivencia a través de glucolisis a partir de un compuesto fermentable como la glucosa; esto hizo pensar que la concentración de dicho sustrato podía influir en el desarrollo de las mutantes, así se buscó la concentración óptima de glucosa requerida por cada cepa, determinando, como lo muestra la tabla 8, el tiempo medio de generación de las células mutantes y progenitoras cultivadas en medio completo con 2, 3, 4, 5 y 6% de dextrosa y los datos obtenidos en la cepa progenitora en medio con 2% de glucosa y 4 mg/ml de cloranfenicol.

Como puede observarse, no existen grandes diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento de una misma cepa en las distintas concentraciones de glucosa, especialmente con las cepas YC_1 , YC_{12} , 52, F_{22} , F_{47} , FMC-8 y FMC-35, esto, además de

Tabla No. 8.- Tiempo medio de generación (minutos/generación), determinado en las cepas mutantes y progenitoras en medio completo -- adicionado con cantidades crecientes de glucosa, en comparación con la progenitora desarrollada en medio con 4mg/ml de cloranfenicol.

CEPA	TIEMPO MEDIO DE GENERACION (MINUTOS/GENERACION)						GLUCOSA OPTIMA
	MEDIO YPAD-CAP	PROPORCION DE GLUCOSA EN LA MEZCLA YPA					
		2%	3%	4%	5%	6%	
WM-37	165	92	90	83	88	93	4%
N		128	111	106	113	128	4%
YC ₁		144	144	144	143	140	6%
YC ₁₂		152	152	152	149	146	6%
YC ₁₃		160	147	140	147	157	4%
YS ₅		158	155	151	137	142	5%
YS ₆₁		175	148	135	157	166	4%
KF73-9C	255	119	118	129	129	122	3%
8As		147	147	145	137	136	6%
11As		263	243	248	261	257	3%
KC2-12D	132	98	92	90	96	97	4%
52		129	129	130	125	130	5%
KF65-R ₁	153	97	94	94	106	102	3, 4%
F ₆		135	141	153	151	153	2%
F ₂₂		137	145	142	141	141	2%
F ₄₆		137	139	138	149	149	2%
F ₄₇		118	119	122	122	121	
FMC-6		130	125	138	133	135	3%
FMC-8		119	108	108	108	108	3, 4, 5, 6%
FMC-35		140	141	142	139	141	5%

comprobar la inexistencia de un fenómeno de represión catabólica, nos permitió observar la pobre influencia de la glucosa en el desarrollo de las células estudiadas.

Observaciones detalladas de la tabla 8 indican que en las mutantes YC_1 , YC_{12} y 8As, la velocidad de crecimiento aumentó a medida que se incrementó la concentración de azúcar, mientras que en el resto de las cepas se alcanzó un valor máximo de crecimiento a partir del cual la velocidad decrece al aumentar la concentración de glucosa.

Podemos notar, en forma general, que las cepas progenitoras WM-37 y KC2-12D y sus mutantes derivadas, fijan su óptimo por arriba del 4% de glucosa. en contraste con las células respiratorio-deficientes - procedentes de la cepa KF65-R₁, que prefieren un medio con 2 a 3% del azúcar, con excepción de las cepas FMC-8 y FMC-35, donde las diferentes concentraciones de glucosa no ejercen influencia.

2.3 Medición de la Respiración.

Con intenciones de relacionar la velocidad de crecimiento - con la capacidad respiratoria y cuantificar la extensión del daño en el sistema de respiración, cotejándolo con las alteraciones en los citocromos, se determinó en cada cepa el consumo de oxígeno, - reportando, como lo muestra la tabla 9, los nanoátomos de este elemento consumidos cada segundo por un miligramo (peso seco) de células.

Observamos que el consumo de oxígeno en cualquiera de las - cepas respiratorio-deficientes es muy inferior al presentado por su - progenitora, existiendo dos mutantes, las cepas YS_5 y 52, en las - que no se detectó consumo de este gas.

Comparando las tablas 8 y 9, para estudiar la corresponden-

Tabla No. 9.- Magnitud del consumo de oxígeno a 30 °C.

CEPA	CAPACIDAD RESPIRATORIA	
	nanoátomos O_2 /seg/mg	(%)
WM-37	2.584	100.00
N	1.305	50.50
YC ₁₂	0.165	6.39
YS ₅	0.000	0.00
YS ₆₁	0.063	2.44
KC2-12D	2.482	100.00
52	0.000	0.00
KF65-R ₁	1.613	100.00
F ₆	0.106	6.57
F ₂₂	0.117	7.25
F ₄₆	0.132	8.18
F ₄₇	0.417	25.85
FMC-6	0.109	6.76
FMC-8	0.262	16.24
FMC-35	0.148	9.18

cia entre el oxígeno consumido y la velocidad de crecimiento, apreciamos que la cepa WM-37 consume gran cantidad de oxígeno y cuando por lesiones diversas éste no es utilizado con eficiencia, como en las mutantes YS_5 e YS_{61} , el crecimiento se torna difícil, lento y precisa de concentraciones mayores de glucosa.

Al comparar las mutantes YS_5 y 52, derivadas de las cepas WM-37 y KC2-12D, respectivamente, observamos que sin aparente consumo de oxígeno y necesidades de glucosa semejantes, la cepa 52 desarrolla con menor dificultad. Resultados similares obtenemos al relacionar el comportamiento de YC_{12} con cualquiera de las mutantes procedentes de la cepa KF65-R₁, donde, independientemente de la eficiencia respiratoria, siempre registramos un tiempo medio de generación inferior.

Sobresalen los resultados de las mutantes N, F_{47} y FMC-8, con una capacidad respiratoria y consecuente velocidad de crecimiento superior al resto de las células respiratorio-deficientes.

2.4 Estimación del Contenido de Citocromos.

Para continuar la caracterización de las cepas respiratorio-deficientes aisladas se determinó el contenido de citocromos de las mismas.

Los citocromos mitocondriales son compuestos de origen bigenómico (con excepción del citocromo "c" que tiene un origen nuclear) que forman parte del sistema de acarreo de electrones de la mitocondria; la ausencia o ineficiencia de cualquiera de ellos dará como resultado una alteración en los procesos respi

ratorios.

En la tabla 10 se resumen los resultados obtenidos al hacer este estudio y en las figuras 9 a 13 se reproducen los espectros citocrómicos de algunas de las cepas trabajadas. En la mayor parte de los casos se obtuvo una desaparición del citocromo "a+a₃", en pocos casos la desaparición conjunta de "a+a₃" y "b", en ningún caso se observó la ausencia única de "b" o "c", este último siempre estuvo presente.

La ausencia de los citocromos "a" y "b" pudiera deberse a una alteración en el sistema de síntesis de proteínas mitocondrial. El hecho de que en ningún caso faltaron los tres citocromos nos indica que ninguna mutación afectó la síntesis del grupo hemo, común a esta proteína.

También hay que hacer notar que en varios casos la desaparición del citocromo "a" va acompañado de un incremento en los citocromos "b" y/o "c".

La presencia de todos los citocromos no sólo se encontró en las cepas respiratorio-competentes, sino también en las mutantes N y F₈, de las cuales, la primera tuvo un comportamiento paralelo al de su progenitora WM-37, mientras que la segunda manifestó, frente a su progenitora KF65-R₁, una concentración de citocromos disminuída.

Para estudiar y comparar las características de las cepas mutantes y progenitoras, se recopilaron los datos encontrados hasta ahora, pudiendo observar en la tabla 11 los resultados de las determinaciones de concentración óptima de glucosa, capacidad respiratoria, presencia de citocromos y el tiempo medio de generación cuantificado al desarrollar las células en -

Tabla No. 10.- Estimación cualitativa de los citocromos en las cepas respiratorio-deficientes, en relación con los determinados en la cepa progenitora respectiva. Se han tabulado los datos que emergen de los espectros de absorción mostrados en las figuras 9 a 13, y la concentración celular de la suspensión empleada para dicho trazo.

Cepa	Suspensión celular Peso Seco (mg/ml)	APRECIACION CUALITATIVA DE CITOCROMOS		
		a + a ₃	b	c
WM-37	16.75	++	++	++
N	17.08	++	++	++
YC ₁	14.05	0	0	++
YC ₁₂	16.25	0	+	+++
YC ₁₃	11.47	0	++	+++
YS ₅	19.97	0	0	++
YS ₆₁	10.23	0	+	++
KF73-9C	-	+	+	+
8As	-	0	++	++
11As	-	0	+	+
KC2-12D	21.60	++	++	++
45	17.32	0	+	++
52	20.60	0	+	++
KF65-R ₁	22.54	++	++	++
F ₆	21.28	+	+	+
F ₂₂	19.67	0	+	+++
F ₄₆	19.83	0	0?	++
F ₄₇	19.29	0	+	+++
FMC-6	17.04	0	0	++
FMC-8	19.29	0	0	++
FMC-35	18.04	0	0	++

Figura No. 9.- Espectros de absorción de citocromos en la cepa WM-37 y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" presenta una absorción máxima a 550 nm, mientras el citocromo "b" lo hace a 560 nm y el "a + a₃" a 605 nm.

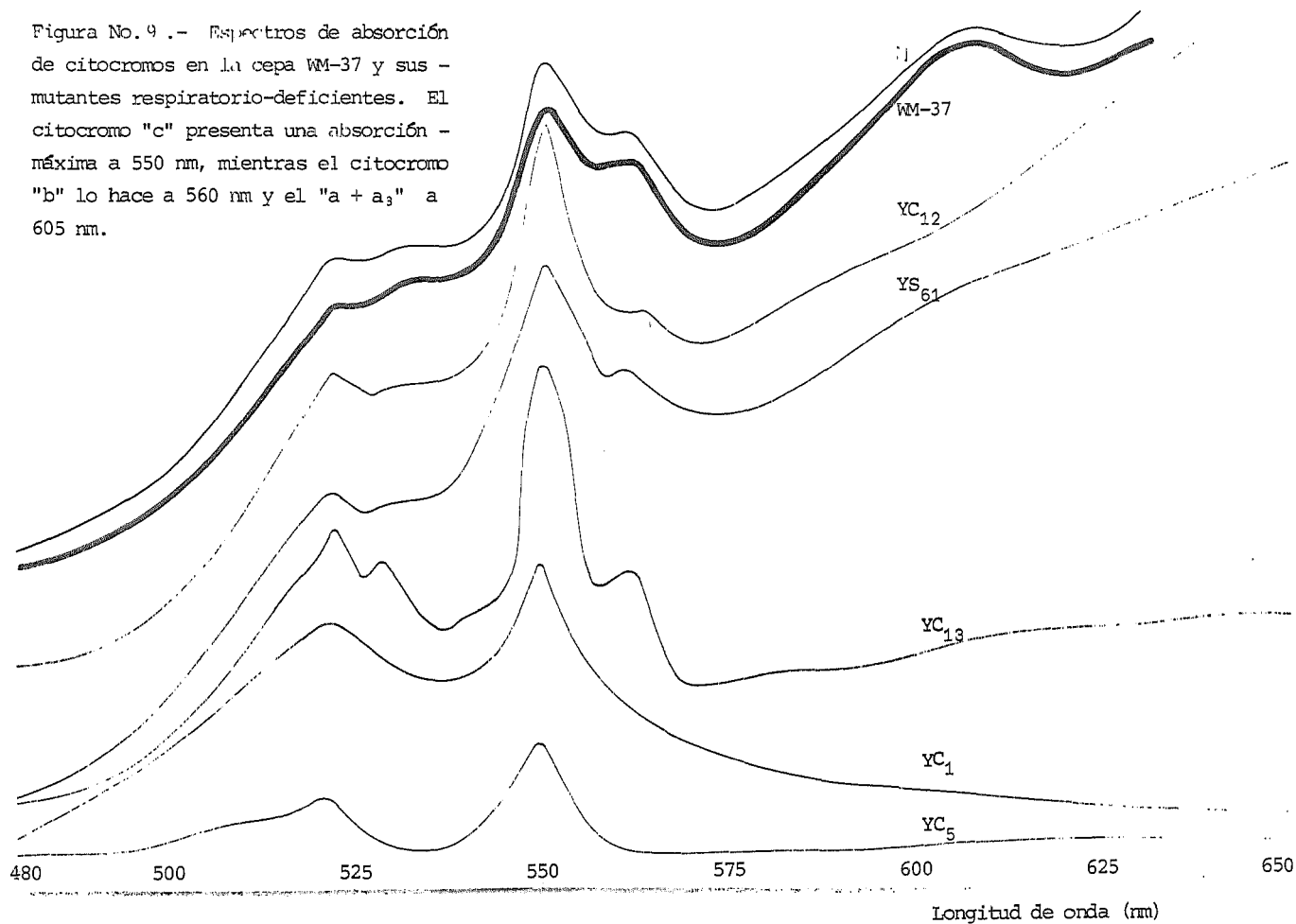
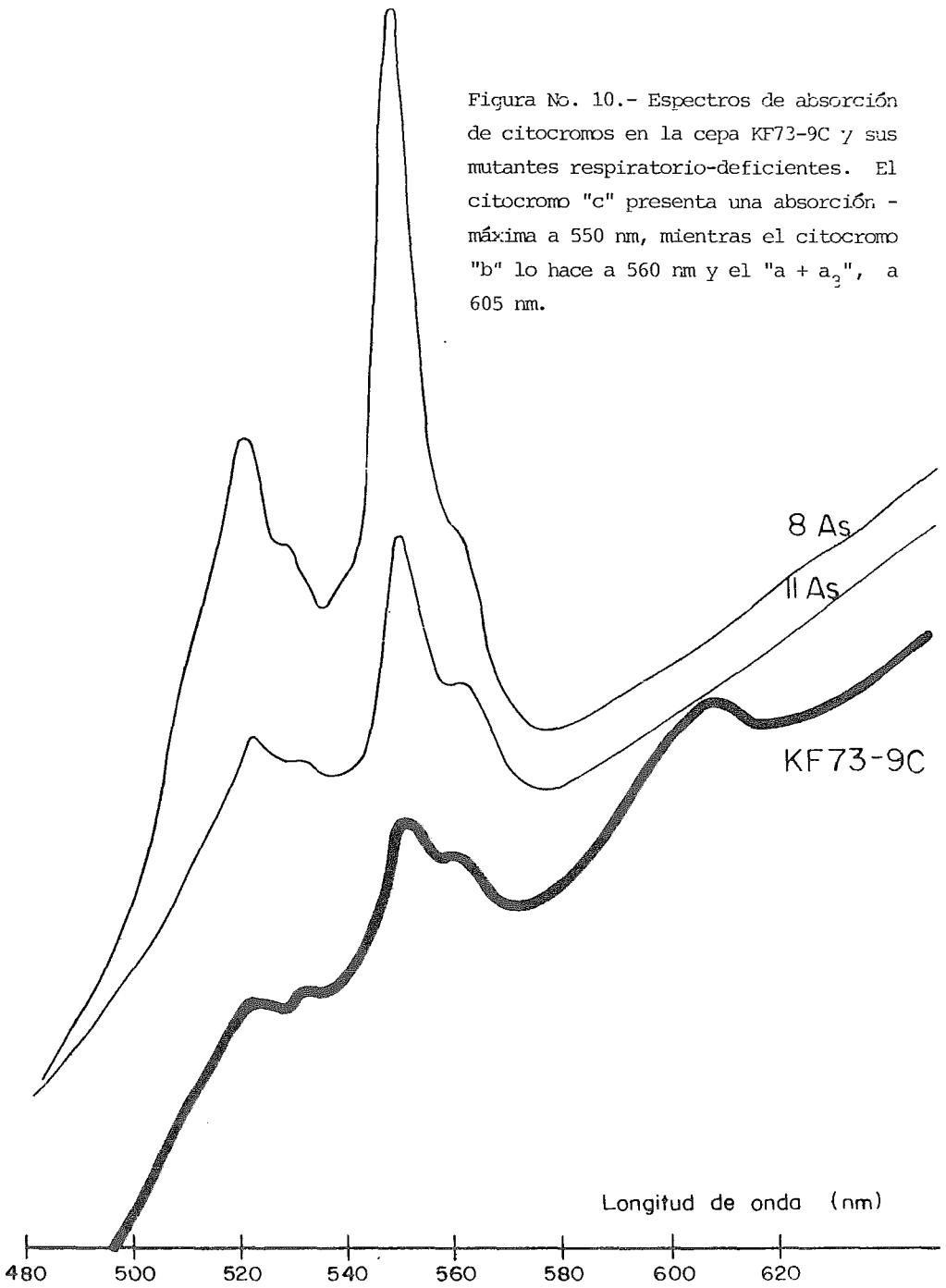


Figura No. 10.- Espectros de absorción de citocromos en la cepa KF73-9C y sus mutantes respiratorio-deficientes. El citocromo "c" presenta una absorción - máxima a 550 nm, mientras el citocromo "b" lo hace a 560 nm y el "a + a₂", a 605 nm.



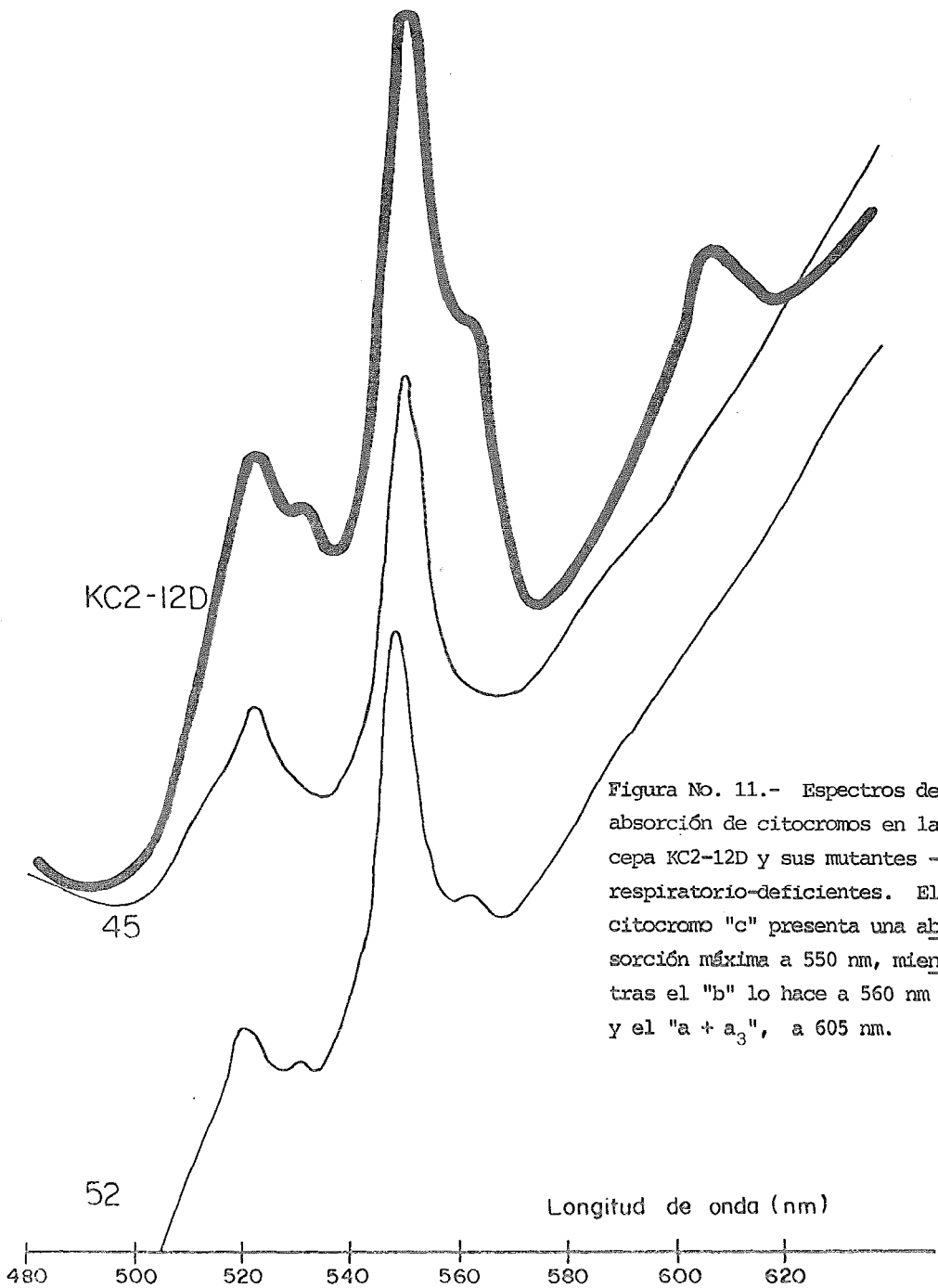


Figura No. 11.- Espectros de absorción de citocromos en la cepa KC2-12D y sus mutantes - respiratorio-deficientes. El citocromo "c" presenta una absorción máxima a 550 nm, mientras el "b" lo hace a 560 nm y el "a + a₃", a 605 nm.

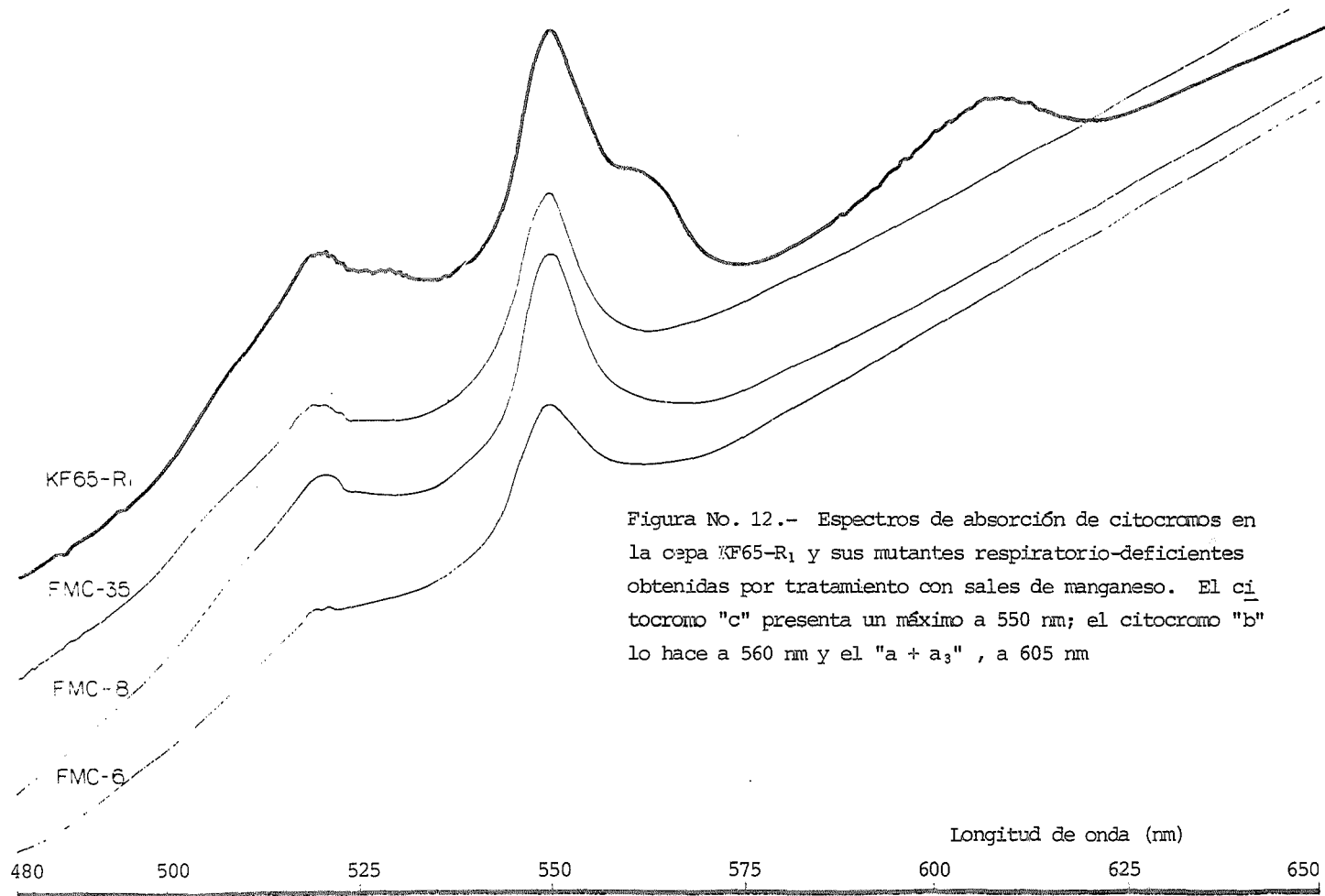
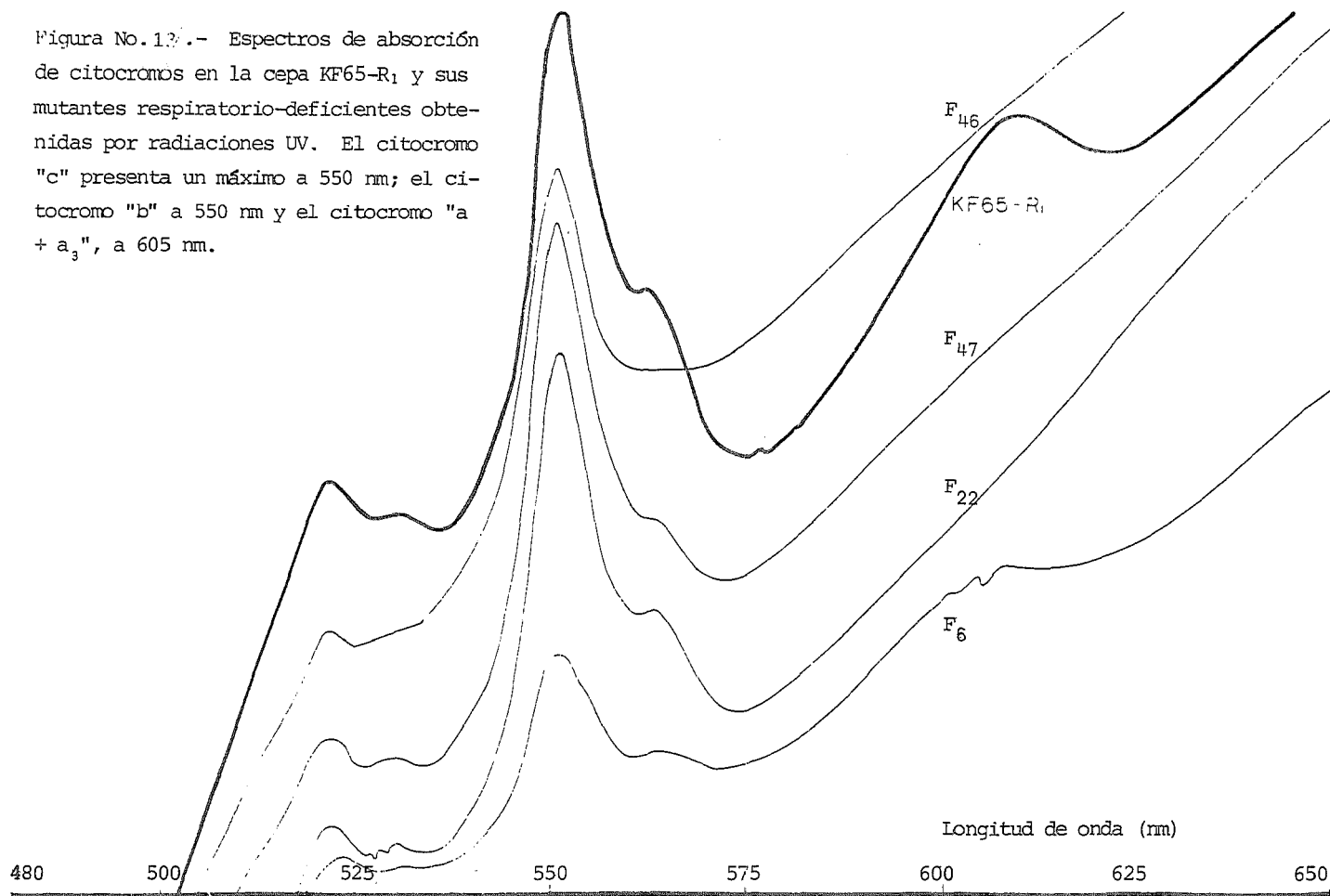


Figura No. 12.- Espectros de absorción de citocromos en la cepa KF65-R₁ y sus mutantes respiratorio-deficientes obtenidas por tratamiento con sales de manganeso. El citocromo "c" presenta un máximo a 550 nm; el citocromo "b" lo hace a 560 nm y el "a + a₃" , a 605 nm

Figura No. 17.- Espectros de absorción de citocromos en la cepa KF65-R₁ y sus mutantes respiratorio-deficientes obtenidas por radiaciones UV. El citocromo "c" presenta un máximo a 550 nm; el citocromo "b" a 550 nm y el citocromo "a + a₃", a 605 nm.



medio completo con 2% de glucosa. De esta manera encontramos que el comportamiento de la cepa N, en cuanto a citocromos y requerimientos de glucosa, es muy semejante al de su progenitor WM-37, pero como la velocidad de crecimiento es menor y la capacidad respiratoria está disminuída en un 50%, es factible que exista una alteración a nivel de fosforilación oxidativa; daño similar podría esperarse en la cepa F₆, aunque en ésta la cantidad de citocromos y la capacidad respiratoria están disminuídas.

Por otro lado, comparando la cepa F₂₂ con la mutante F₄₆, - apreciamos velocidades de crecimiento y capacidad respiratoria paralelas, pero diferencias notorias en el contenido de citocromos; sin embargo, al establecer la comparación entre las mutantes F₂₂ y F₄₇, encontramos similitud en el contenido de citocromos pero diversidad en la velocidad de desarrollo y en la capacidad respiratoria. Observaciones del mismo tipo surgen - al comparar las mutantes FMC-6, FMC-8 y FMC-35.

En forma general notamos que la capacidad respiratoria está relacionada con la velocidad de crecimiento, más no así con el contenido de citocromos.

Tabla No. 11.- Resumen de las características fenotípicas encontradas en las cepas mutantes y progenitoras.

CEPA	FENOTIPO RESPIRATORIO	OPTIMO DE GLUCOSA	CAPACIDAD RESPIRATORIA (%)	APRECIACION DE CITOCROMOS			TIEMPO MEDIO DE GENERACION EN YPAD (min)
				+	b	c	
WM-37	Competente	4%	100.00	++	++	++	92
N	Deficiente	4%	50.50	++	++	++	128
YC ₁	Deficiente	6%	-	0	0	++	144
YC ₁₂	Deficiente	6%	6.39	0	+	+++	152
YC ₁₃	Deficiente	4%	-	0	++	+++	160
YS ₅	Deficiente	5%	0.00	0	0	++	158
YS ₆₁	Deficiente	4%	2.44	0	+	++	175
KF73-9C	Competente	3%	-	+	+	+	119
8As	Deficiente	6%	-	0	++	++	147
11As	Deficiente	3%	-	0	+	+	263
KC2-12D	Competente	4%	100.00	++	++	++	98
45	Deficiente	-	-	0	+	++	-
52	Deficiente	5%	0.00	0	+	++	129
KF65-R ₁	Competente	3,4%	100.00	++	++	++	97
F ₆	Deficiente	2%	6.57	+	+	+	135
F ₂₂	Deficiente	2%	7.25	0	+	+++	137
F ₄₆	Deficiente	2%	8.18	0	0?	++	137
F ₄₇	Deficiente	2%	25.85	0	+	+++	118
FMC-6	Deficiente	3%	6.76	0	0	++	130
FMC-8	Deficiente	3 a 6%	16.24	0	0	++	108
FMC-35	Deficiente	5%	9.18	0	0	++	140

3. Estudios Genotípicos Efectuados en las Mutantes.

Las mutaciones extracromosómicas mitocondriales se caracterizan por:

- a) Segregar durante la mitosis en diploides.
- b) Presentar segregación no-Mendeliana en los productos de la meiosis.
- c) Y desaparición del carácter mutante por tratamiento prolongado con bromuro de etidio.

3.1 Entrecruzamientos.

Para determinar el origen de la mutación mediante el estudio de la segregación meiótica del carácter respiratorio-deficiente inducido, se intentó la formación de diploides a partir de cruza entre mutantes y células respiratorio-competentes de sexo y requerimientos auxotróficos complementarios. Dichas cruza se realizaron sobre placas de extracto de malta 8/ (medio ME), ordenando los pares de cepas entrecruzadas, como lo muestra la tabla No. 12 permitiéndonos encontrar las cepas compatibles.

Esta tabla nos orientó para la elección de los subsiguientes pares de cepas a cruzar, de manera que todas las mutantes derivadas de WM-37 fueron cruzadas con las cepas KA5-11B, KC2-12D, KF65-R₁, KF73-9C, KT-6, W600B y WM-27; las mutantes procedentes de la cepa KF73-9C, fueron mezcladas con las células KA5-4C y WM-37; las mutantes surgidas a partir de KF65-R₁, con las cepas KA5-4C, KC5-2D, KT-13 y WM-27 y, finalmente, las mutantes logradas en la cepa silvestre KC2-12D, con las cepas

KA5-4C, KC5-2D, KT-13 y WM-37, pero en ningún caso se registró entrecruzamiento.

Tabla No. 12.- Pares de cepas cruzadas en medio de extracto de malta.

KC2-12D x KA5-4C	KF73-9C x KA5-4C
KC2-12D x KC5-2D	KF73-9C x WM-37
KC2-12D x KT-13	WM-37 x KA5-11B
KC2-12D x WM-37	WM-37 x KT-13
KF65-R ₁ x KA5-4C	WM-37 x W600B
KF65-R ₁ x KC5-2D	WM-37 x WM-27
KF65-R ₁ x KT-13	WM-37 x KF65-R ₁

Más tarde, sabiendo que la meiosis y la esporulación de *S. cerevisiae* requieren un metabolismo aeróbico y que el crecimiento anaeróbico de este organismo en glucosa causa gran decremento de ácidos grasos y lípidos importantes que forman parte de la membrana mitocondrial y cuya síntesis depende de oxígeno 4/, se añadió al medio de cruce ácido δ -aminolevulínico, ergosterol y ácido oleico (medios ME-aL y ME-TE). En estos medios las cepas respiratorio-deficientes mezcladas con respiratorio-competentes tampoco se cruzaron.

Finalmente, con el propósito de forzar el cruzamiento, se utilizaron medio mínimo con dextrosa (MD) y medio mínimo con dextrosa adicionado de ácidos grasos (MD-aL y MD-TE), pero fueron vanos todos los intentos por cruzar las mutantes.

3.2 Fusión de Protoplastos.

De acuerdo con los estudios de Allmark y Morgan 12/, 13/, - 14/, es posible efectuar un estudio de la segregación mitótica y meiótica del carácter mutante de una levadura realizando trabajos en diplotipos, de manera que se indujo la formación de - éstos mediante la fusión de protoplastos respiratorio-deficientes con protoplastos respiratorio-competentes.

La tabla 13 nos permite observar los pares de cepas utilizadas en la búsqueda de diplotipos, las células resultantes del tratamiento y algunas de sus características.

Como puede notarse, sólo en el caso de la cepa YC₁ no se logró el heterocarion, debido posiblemente a la inviabilidad de los protoplastos. Por otro lado, se detectó la presencia de - un único diplotipo respiratorio-deficiente, obtenido a partir de la mutante YS₅, tal característica nos hace pensar que la - cepa "petite" contiene, o bien, una mutación mitocondrial, o - una nuclear dominante.

Tabla No. 13.- Características y origen de los diplotipos obtenidos por fusión de protoplastos.

Diplotipo	Cepa Resp. Defi.	Cepa Resp. Comp.	Factor de Compatibilidad	Capacidad Respiratoria
8As-P	8As	KT-19	α	Competente
11As-P	11As	KT-19	α	Competente
-	YC ₁	KA5-4C	-	-
YC ₁₂ ^{-P}	YC ₁₂	KA5-4C	a	Competente
YC ₁₃ ^{-P}	YC ₁₃	KA5-4C	a	Competente
YS ₅ ^{-P}	YS ₅	KA5-4C	a	Deficiente
YS ₆₁ ^{-P}	YS ₆₁	KA5-4C	a	Competente

3.3 Medición del DNA.

Para comprobar el carácter "diploide" de las células resultantes de la fusión de protoplastos, se cuantificó el contenido de DNA tanto en las cepas haploides como en los "posibles" diplotipos, estos datos pueden observarse en la tabla No. 14, notando la duplicidad del DNA, principalmente en las cepas -- 8As-P, YC₁₂-P, YS₅-P y YS₆₁-P, en contraste con la determina-- ción en las cepas 11As-P e YC₁₃-P, donde parece existir una -- cantidad de ácido nucleico igual a la presente en la cepa ha-- ploide.

Tabla No. 14.- Contenido del DNA cuantificado espectrofotometricamente en los diplotipos, en comparación con la cantidad de ácido nucleico en las ce-- pas haploides progenitoras.

Progenitor Resp. Comp.		Progenitor Resp. Defi.		Posible Diplotipo	
Cepa	µg DNA/cel	Cepa	µg DNA/cel	Cepa	µg DNA/cel
KT-19	12.4×10^{-9}	8As	11.6×10^{-9}	8As-P	26.4×10^{-9}
KT-19	12.4×10^{-9}	11As	13.2×10^{-9}	11As-P	16.4×10^{-9}
KA5-4C	9.2×10^{-9}	YC ₁₂	5.6×10^{-9}	YC ₁₂ -P	11.2×10^{-9}
KA5-4C	9.2×10^{-9}	YC ₁₃	Huellas	YC ₁₃ -P	Huellas
KA5-4C	13.4×10^{-9}	YS ₅	16.4×10^{-9}	YS ₅ -P	29.6×10^{-9}
KA5-4C	9.2×10^{-9}	YS ₆₁	8.8×10^{-9}	YS ₆₁ -P	18.0×10^{-9}

Con el fin de obtener esporas y estudiar en ellas la segregación del carácter "petite", se trató de inducir la cruza, al igual que en el caso de las mutantes haploides, entre los di-- plotipos y células respiratorio-competentes, pero nuevamente - la incapacidad para cruzarse impidió la obtención de cigotos y, consecuentemente, de esporas segregantes.

Los problemas implicados en la caracterización genética de estas mutantes nos conducen a la investigación del motivo que impide su cruce. Sabemos que dicha incapacidad se presenta -- conjuntamente a la mutación respiratorio-deficiente, pues comprobamos que el entrecruzamiento se logra en el momento en que, por reversión de la mutación, la capacidad respiratoria se recupera.

Por otro lado, irradiando con luz UV la cepa KC19-1D (α , -- ade_2 his_1 leu_1 met_1), se aisló una mutante aparentemente respiratorio-deficiente, ya que no desarrollaba en medios donde el glicerol se encontraba como única fuente de carbono, pero en estudios posteriores se encontró que era capaz de utilizar tanto el lactato como el etanol, manifestando sólo una inhabilidad para aprovechar el glicerol. Al intentar caracterizar genéticamente dicha mutante, nos encontramos que, al igual que -- las mutantes respiratorio-deficientes, estaba imposibilitada -- para cruzarse aún con cepas silvestres de sexo contrario.

Estos resultados nos hacen suponer que en el metabolismo -- del glicerol, en estas levaduras, pueden existir factores que toman parte en el proceso de entrecruzamiento; pero esto sólo es una hipótesis y requiere de mayor estudio para su comprobación.

REFERENCIAS:

1. Sager, R. (1972) "Cytoplasmic Genes and Organelles", Academic Press, New York.
2. Brunner, A. (1974) Obtención y Caracterización de Mutantes Mitocondriales en una Levadura "Petite Negativa". En "Los Perfiles de la Bioquímica en México". Ed. Mora, J.; Estrada Orihuela S.; Martuscelli, J. UNAM. México. pp. 91-99.
3. Ephrussi, B.; Hottinguer, H.; y Tavlitzki, J. (1949) Action de L'acriflavine sur les Levures. I. La Mutation "Petite Colonies". Ann. Inst. Pasteur Paris; 76: pp. 331-367.
4. Gillham, N. W. (1978) "Organelle Heredity", Raven Press, New York.
5. Putrament, A.; Baranowska, H.; Ejchart, A.; and Prazmo, W. (1973) Induction by Manganese of Mitochondrial Antibiotic Resistance Mutations in Yeast. Mol. Gen. Genet. 126: pp. 357-366.
6. Putrament, A.; Baranowska, H.; Ejchart, A.; and Prazmo, W. (1973) Manganese Mutagenesis in Yeast IV. The effects of Magnesium, Protein Synthesis Inhibitors and Hydroxyurea on ant^R - Induction in Mitochondrial DNA. Mol. Gen. Genet. 140: pp. 339-347.
7. Hixon, S. and Moustacchi, E. (1978) The Fate of Yeast Mitochondrial DNA after Ultraviolet Irradiation. I. Degradation During Post-U. V. Dark Liquid Holding in Non-nutrient Medium, Biochem. Biophys. Res. Commun. 81: pp. 288-296.
8. Brunner, A. (1978) Herencia Citoplásmica de la Resistencia a Oligomicina, Eritromicina y Cloranfenicol en la levadura "Petite Negativa" *Kluyveromyces lactis*. En "Temas Bioquímicos de Actualidad" Ed. Piña, E.; Peña, A.; Chagoya de Sánchez, V. y Mar

- tuscelli, J. UNAM. México. pp. 267-279.
9. Orgel, A. and Orgel L. E. (1965) Induction of Mutations in Bacteriophage T₄ with Divalent Manganese. J. Mol. Biol. 14: pp. 453-457.
 10. Sherman, F.; Stewart, J.W.; Morgoliash, E.; Parker, J. and Campbell, W. (1966) The Structural Gene for Yeast Cytochrome C. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55: pp. 1498-1504.
 11. Rose, A.H. and Harrison, J.S. (1973) "The Yeast" Vol. 1. "Biology of Yeast", Academic Press, London-New York.
 12. Allmark, B.M.; Morgan, A.J. and Wittaker, P.A. (1978) The Use of Protoplast Fusion in Demonstrating Chromosomal and Mitochondrial Inheritance of Respiratory Deficiency in *Kluyveromyces lactis*, a Petite-Negative Yeast. Mol. Gen. Genet. 159: pp. 297-299.
 13. Kuo, S.C. and Yamamota, S. (1975) Preparation and Growth of Yeast Protoplast. In "Methods in Cell Biology" Vol. XI. "Yeast Cells", D.M. Prescott, Academic Press. pp. 169-183.
 14. Morgan, A.J.; Heritage, J. and Whittaker, P.A. (1977) Protoplast Fusion Between Petite and Auxotrophic Mutants of the Petite-Negative Yeast, *Kluyveromyces lactis*. Microbios Lett 4: pp. 103-108.
 15. Slocimski, P.P.; Perrodin, G. and Croft, J.H. (1968) Ethidium Bromide Induced Mutation of Yeast Mitochondria Complete Transformation of Cell into Respiratory Deficient non Chromosomal "Petites". Biochem. Biophys. Res. Commun. 30: pp. 232-239.
 16. Ogur, M.; Rosen, G. (1950) The Nucleic Acids of Plants Tissues I. The Extraction and Estimation of Desoxyribose Nucleic Acid and Ribose Nucleic Acid. Arch. Biochem. 25: pp. 262-276.

17. Burton, K. (1955) The Relation Between the Synthesis of Deoxyribonucleic Acid and the Synthesis of Protein in the Multiplication of Bacteriophage T₂. Biochem. J. 61: pp. 473-483.
18. Burton, K. (1955) A Study of Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. Biochem. J. 62: pp. 315-323