

R. 4045



MUTACION Y COMUTACION INDUCIDAS POR NITROSOGUANIDINA
EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al Grado de Doctor en Ciencias, por la Licenciada

ISABEL LOPEZ CALDERON

Sevilla, Diciembre de 1979

Director y Ponente

Prof. Enrique Cerdá Olmedo

Codirector

Dr. Jaime Conde Zurita

T.D. 20

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
SECRETARIA

21-12-79

ENTRADA N.º A54

T.D.20

RESUMEN

En este trabajo se han estudiado diversos factores que influyen en la letalidad y la mutagenicidad producidas por nitrosoguanidina en *Saccharomyces cerevisiae*. Con las condiciones consideradas como óptimas se ha investigado la existencia de comutación en este organismo y se ha hecho una estimación del número de genes que posee. Se concluye que:

1. El mecanismo de inducción de mutantes petites difiere grandemente del de inducción de mutantes resistentes a la canavanina. Se presume que la inhibición de la síntesis de proteínas por nitrosoguanidina o la alteración de las proteínas ya formadas puede provocar cambios irreversibles en las mitocondrias que darían lugar al fenotipo petite. Por el contrario, la resistencia a canavanina se originaría por mutación específica y reversible del gen *can1*.
2. Los cultivos exponenciales y los estacionarios se comportan de distinta manera frente a la mutagénesis por nitrosoguanidina. Así, en cultivos estacionarios, utilizados en la mayoría de los experimentos de esta Tesis, existen subpoblaciones celulares de distinta susceptibilidad a los efectos letales y mutagénicos de la nitrosoguanidina; sin embargo los exponenciales parecen ser bastante homogéneos. La inducción de mutaciones *can1* es mayor en los cultivos exponenciales, pero su expresión inmediata está muy favorecida en los estacionarios.

3. Como condiciones óptimas para obtener un gran número de mutantes en *S. cerevisiae* se recomienda: tratar suspensiones que contengan 10^8 células/ml en tampón tris-maleato, 50 mM, pH 7.8, con 20 μ g de nitrosoguanidina/ml durante 15 minutos a 30°C con agitación esporádica. Se deben obtener mayores frecuencias de mutantes si se tratan células en fase exponencial y se permite que las mutaciones se expresen antes de seleccionar los mutantes.

4. No se ha encontrado comutación entre genes próximos en ninguno de los casos explorados, *his4ABC* y *cdc15-ade1*.

5. Parece haber comutación entre genes que son replicados al mismo tiempo. Así, se ha determinado que en el brazo L del cromosoma III existen al menos dos puntos de replicación simultáneos cuando se replica *can1*. La sincronía entre ambos no es perfecta, pero es suficiente para poder aplicar la comutación en la cuantificación e identificación de las regiones del genomio que se replican simultáneamente.

6. Se ha estimado, mediante un método original, que *S. cerevisiae* tiene unos 5000 genes. El mismo método, aplicado a *E. coli*, estima para este organismo unos 500 genes. Dado que este número está claramente subestimado, se sospecha que *S. cerevisiae* debe tener más de 5000 genes.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION	1
1. POR QUÉ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	1
2. POR QUÉ NITROSOGUANIDINA	4
2.1. <i>Efectos biológicos de la nitroso-</i> <i>guanidina</i>	4
2.2. <i>Comutación</i>	7
3. OBJETO Y FUNDAMENTOS DE ESTE TRABAJO	8
3.1. <i>El gen can1</i>	9
3.2. <i>El fenotipo petite</i>	10
3.3. <i>Comutación entre genes próximos</i>	12
3.3.1. <i>El gen his4</i>	12
3.3.2. <i>Los genes cdc15 y adel</i>	14
RESULTADOS	17
1. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE MUTA- GENESIS CON NITROSOGUANIDINA	17
1.0. <i>Generalidades</i>	17
1.1. <i>Ensayos preliminares</i>	18
1.1.1. <i>Mutagénesis en medio sólido</i>	18
1.1.2. <i>Mutagénesis en tampón</i>	20
1.1.3. <i>Título de células durante el</i> <i>tratamiento</i>	21
1.1.4. <i>Efecto de la densidad de siembra</i> <i>en la detección de mutantes y via-</i> <i>bles de un cultivo</i>	23
1.2. <i>Influencia del pH</i>	23
1.2.1. <i>Letalidad a distintos pH y en</i> <i>distintos tampones</i>	24
1.2.2. <i>Letalidad y mutagenicidad en</i> <i>función del pH</i>	26

1.3.	<i>Efecto de la incubación tras el tratamiento con nitrosoguanidina en la expresión de las mutaciones</i>	28
1.4.	<i>Influencia del estado fisiológico del cultivo</i>	33
1.4.1.	Letalidad y mutagenicidad en células hambrientas	33
1.4.2.	Letalidad y mutagenicidad en células procedentes de distintas fases del crecimiento de un cultivo	37
2.	COMUTACION	42
2.1.	<i>Sistema his4</i>	42
2.1.1.	Comprobación del genotipo de las cepas	43
2.1.2.	Reversión de la mutación <i>his4C</i> y búsqueda de comutantes	43
2.1.3.	Naturaleza de la reversión	48
2.2.	<i>Sistema cdc15-ade1</i>	48
2.2.1.	Selección de una cepa con el genotipo adecuado	49
2.2.2.	Distancia entre <i>cdc15</i> y <i>ade1</i>	49
2.2.2.1.	Análisis de tétradas	49
2.2.2.2.	Análisis de esporas en masa	51
2.2.3.	Capacidad de detección de colonias rosas entre colonias blancas	51
2.2.4.	Inducción por nitrosoguanidina de mutantes rosas en la cepa LC103 ...	52
2.2.5.	Inducción por nitrosoguanidina de mutantes rosas en la cepa S288C can ^R	55
2.3.	<i>Localización en el genomio de mutaciones inducidas simultáneamente</i>	56
2.3.1.	Aislamiento de mutantes Can ^R Ts	56
2.3.2.	Localización en el genomio de las mutaciones <i>tss</i>	57

2.3.3. Complementación entre mu- tantes <i>tss</i>	61
3. ESTIMACION DEL NUMERO DE GENES DE <i>S. CEREVISIAE</i>	61
3.1. Aislamiento de termosensibles en <i>S. cerevisiae</i> y caracterización de los termosensibles auxótrofos	62
3.2. Aislamiento de termosensibles en <i>E. coli</i> y caracterización de los termosensibles auxótrofos	63
DISCUSION	65
1. LETALIDAD Y MUTAGENICIDAD PRODU- CIDAS POR NITROSOGUANIDINA EN DIS- TINTAS CONDICIONES	65
2. COMUTACION	71
3. NUMERO DE GENES DE <i>S. CEREVISIAE</i>	77
APENDICE I. MATERIALES	80
1. CEPAS DE <i>S. CEREVISIAE</i>	80
1.1. Nomenclatura genética	80
1.2. Cepas haploides no originales	82
1.3. Cepas haploides originales	82
2. PRODUCTOS QUIMICOS	84
3. TAMPONES	84
3.1. Tampón tris-maleato	84
3.2. Tampón acetato	85
3.3. Tampón citrato-tris-maleato	85
3.4. Tampón tris-sales	85
4. MEDIOS LIQUIDOS	86
4.1. Medio mínimo usual (SD)	86
4.2. Medio mínimo sin fuente de nitrógeno	86
4.3. Medio nutritivo (YPD)	87
5. MEDIOS SOLIDOS	87

5.1. Medios con canavanina	87
5.2. Medio de preesporulación	87
5.3. Medio de esporulación	88
5.4. Medio para fermentación (YPG)	88
APENDICE II. METODOS	89
1. CRECIMIENTO	89
2. ENUMERACION DE CELULAS VIVAS	89
3. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA	89
3.1. En medio sólido	90
3.2. En tampón	90
4. CARACTERIZACION DE AUXOTROFOS	91
5. CONJUGACION	92
5.1. Conjugación de pocas (una a tres) cepas de un sexo por pocas (una a tres) cepas del otro sexo	92
5.2. Conjugación de muchas (más de tres) cepas de un sexo por muchas (más de tres) cepas del otro sexo	92
5.3. Conjugación de muchas cepas de un sexo por una del otro sexo	93
6. SELECCION DE DIPLOIDES	93
6.1. Por siembra de la mezcla conjugante en medio selectivo para el diploide	93
6.2. Por micromanipulacion de cigotos	94
7. ESPORULACION	94
8. SELECCION DE ASCOSPORAS	94
8.1. Análisis de esporas en masa	95
8.2. Análisis de tétradas por micro- manipulación	95
APENDICE III. BIBLIOGRAFIA	96
AGRADECIMIENTOS	107

INTRODUCCION

1. POR QUÉ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha estado desde siempre entre los organismos eucarióticos más estudiados, tanto desde el punto de vista bioquímico como del genético. Originariamente esto se debía a que era fácil de conseguir en grandes cantidades acudiendo a las industrias cervecera, vinícola y panificadora. Actualmente sigue siendo muy popular porque puede ser cultivada y manipulada con la misma facilidad que las bacterias.

Entre la extensísima literatura sobre *S. cerevisiae* merecen destacarse como introducciones a los aspectos tratados en esta Tesis los libros The Yeasts (Rose y Harrison, eds., 1969, 1970, 1971) y los volúmenes IX y X de Methods in Cell Biology (Prescott ed., 1975) y las revisiones de Fink (1970); Hartwell (1970, 1974); Sherman y Lawrence (1974); Carter (1975) y Sherman et al. (1977).

Su ciclo de vida aparece ilustrado en infinidad de libros de texto y monografías especializadas. La Figura 1 presenta una visión original del mismo. Las células de *S. cerevisiae* se dividen por mitosis tanto en fase haploide como diploide. La gran estabilidad de ambas fases presenta grandes ventajas desde el punto de vista genético: así, se pueden inducir mutaciones en células haploides y estudiar su complementación en células diploides. Estas pueden esporular, dando

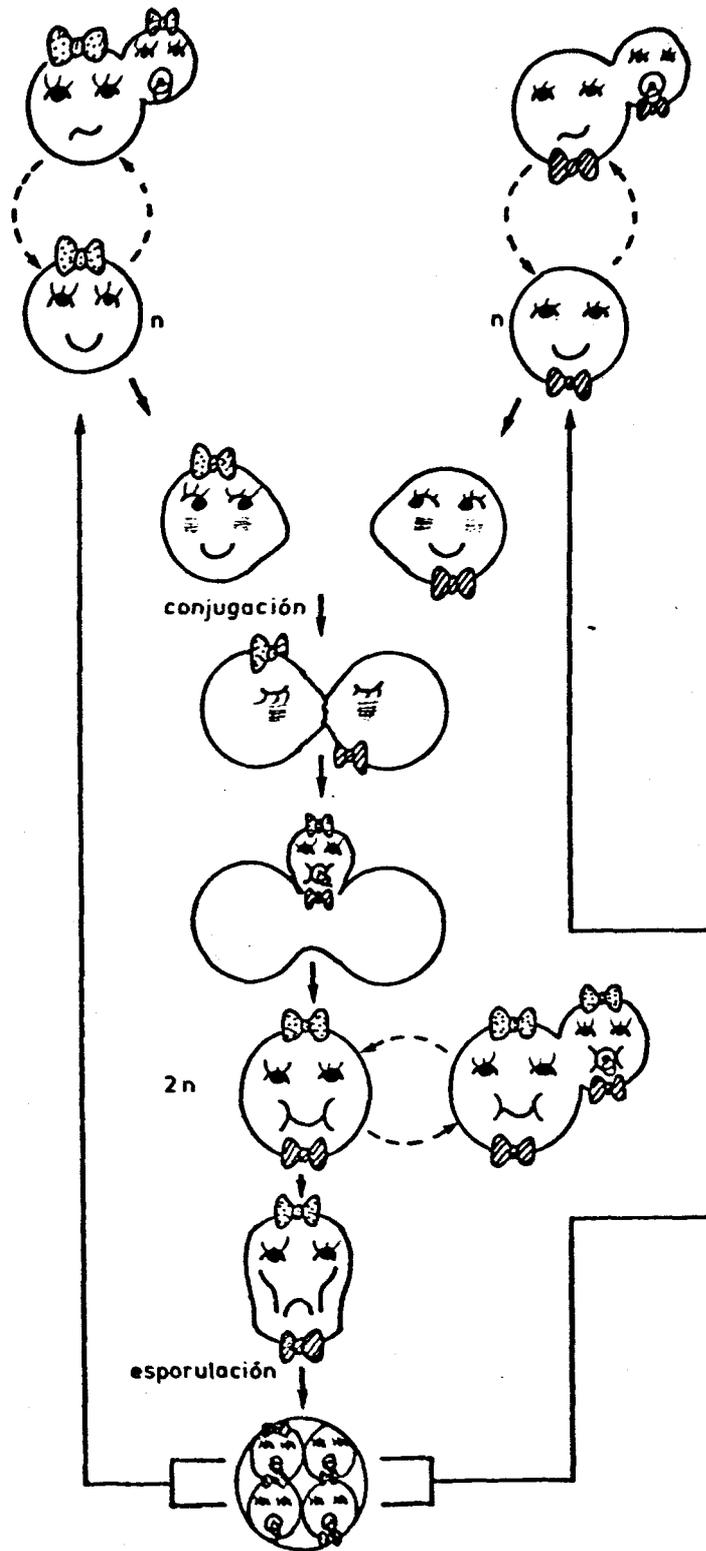


Figura 1. Ciclo de vida de *S. cerevisiae*.

lugar a ascas que contienen los cuatro productos de una meiosis. El análisis de las ascosporas permite situar las mutaciones o los genes en estudio, respecto de otros de localización conocida. Otra propiedad interesante de las células diploides de *S. cerevisiae* es que sufren recombinación mitótica con una frecuencia relativamente alta, lo que también se puede utilizar para construir mapas genéticos.

Aunque *S. cerevisiae* pueda manipularse experimentalmente como las bacterias, no hay que olvidar que es un organismo eucariótico. Como tal presenta un núcleo verdadero rodeado de una membrana que lleva asociadas placas organizadoras del huso mitótico, nucléolo, mitocondrias, retículo endoplásmico, vacuolas y aparato de Golgi (Matile et al., 1974). Su ADN está asociado a histonas en cantidad y variedad similares a eucariotes superiores (Nelson et al., 1977). El genomio haploide contiene probablemente 17 cromosomas, según se ha determinado genéticamente (Mortimer y Hawthorne, 1973) y citológicamente (Byers y Goetsch, 1975). La síntesis de ADN tiene lugar en un período S restringido dentro del ciclo de división celular y separado de la mitosis.

A pesar de la gran complejidad que tienen *S. cerevisiae* y su ciclo de vida, su genomio es más pequeño que el de otros eucariotes y sólo un poco mayor que el de las bacterias. Se ha estimado que el genomio haploide de *S. cerevisiae* consta de unos 1.9×10^7 pares de nucleótidos (Ciferri et al., 1969), o sea, aproximadamente el triple que el cromosoma de *E. coli*. Estudios de reasociación del ADN indican una complejidad unas 3.3 veces mayor que *E. coli* y muy poco ADN redundante (Britten y Kohne, 1968; Christiansen et al., 1971).

Es cierto que para el estudio de algunos aspectos comunes para células pro- y eucarióticas, resulta adecuado trabajar con bacterias. Pero es igualmente obvio que sólo trabajando con organismos eucarióticos pueden resolverse cuestiones que conciernen exclusivamente a los eucariontes, como pueden ser relaciones núcleo-citoplásmicas, factores que intervienen en mitosis y meiosis, multiplicación de las mitocondrias, etc. *S. cerevisiae*, con sus características a caballo entre unos y otros, es el organismo ideal para la transferencia de conocimientos entre ambos.

2. POR QUÉ NITROSOGUANIDINA

La N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (nitrosoguanidina) es conocida por los químicos desde hace más de 30 años (McKay y Wright, 1947). Desde el descubrimiento de sus propiedades mutagénicas (Mandell y Greenberg, 1960), se ha empleado rutinariamente en la búsqueda de mutantes en el laboratorio, debido a su capacidad para inducir mutaciones con alta frecuencia sin causar una letalidad elevada (Adelberg *et al.*, 1965; Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968; Yoshida y Yuki, 1968). Existe una revisión reciente de Neale (1976) sobre este compuesto y otros relacionados.

2.1. Efectos biológicos de la nitrosoguanidina

El mejor estudiado, después de la mutagénesis, es la letalidad. La letalidad está influida, como era de esperar, por la concentración del mutágeno y

el tiempo de tratamiento. También depende de factores externos, como el pH (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968; Velemínský y Gichner, 1970) y la temperatura (Kasahara et al., 1971), o internos como la capacidad de reparación (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967a; Ishii y Kondo, 1975; Schendel et al., 1978) y el estado celular de crecimiento (Adelberg et al., 1965; Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967b; Dugle et al., 1973).

Hay bastantes pruebas que apoyan que el efecto letal de la nitrosoguanidina se debe a su acción directa sobre los cromosomas (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967b). A nivel molecular, la letalidad podría ser debida a incisiones en el ADN que, como demostraron Dugle et al. (1973), se reparten aleatoriamente por todo el cromosoma.

La actividad mutagénica de la nitrosoguanidina ha sido principalmente estudiada mediante inducción de revertientes de algún requerimiento de la estirpe en estudio, de auxótrofos en estirpes protótrofas o de resistentes a una droga. Generalmente los resultados obtenidos por diferentes autores son muy poco comparativos debido a que la producción de mutaciones puede ser modificada por factores internos de la célula (como los mecanismos de reparación) y externos (variaciones físicas del tratamiento y de la detección de mutantes).

No se han realizado aún estudios sistemáticos que permitan la integración de toda la información recogida hasta ahora sobre la nitrosoguanidina, pero en general podemos decir que los mismos factores que intervienen en la estabilidad del compuesto, influyen

en su acción mutagénica, si bien de forma diferente que en la letalidad. También la dosis (producto de la concentración por el tiempo de tratamiento) de nitrosoguanidina influye de forma diferente en la letalidad y en la mutagenicidad. A mayores dosis se obtienen menos supervivientes pero no necesariamente más mutantes. En bacterias (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968; Kondo et al., 1975; Jiménez Sánchez y Cerdá Olmedo, 1975) y en otros organismos (Kasahara et al., 1971) la proporción de mutantes entre los supervivientes alcanza un máximo que se mantiene aunque la letalidad continúe aumentando. Aparentemente no ocurre así en levaduras, como veremos más adelante.

La producción de mutaciones depende también del estado fisiológico del cultivo. Adelberg et al. (1965) encontraron que en *E. coli* se inducen de 5 a 10 veces más mutantes en cultivos exponenciales que en estacionarios. Esto unido al hecho de que la frecuencia máxima de mutaciones de un gen se obtiene cuando éste se está replicando (Cerdá Olmedo et al., 1968), sugiere que la nitrosoguanidina actúa en la región en replicación. Esta hipótesis ha sido confirmada en muchos organismos, entre los cuales se encuentra *S. cerevisiae* (Burke y Fangman, 1975; Dawes y Carter, 1974).

Son muchos los trabajos publicados que tratan de esclarecer el mecanismo de acción de la nitrosoguanidina. De ellos puede deducirse que es muy complejo ya que intervienen varias acciones químicas directas sobre el ADN y las maquinarias de replicación y reparación de la célula (Jiménez Sánchez, 1976). Es capaz, además, de inhibir la síntesis de proteínas y de inactivar proteínas ya formadas (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967a).

Actualmente y tras la importante aportación de Ruiz Vázquez (1979), que ha descubierto una nueva función celular de *E. coli* indispensable para la inducción de mutantes por nitrosoguanidina, vuelve a estar vigente la hipótesis de que la nitrosoguanidina interfiere con la maquinaria de replicación.

Sea cual sea el mecanismo exacto de la mutagénesis, el hecho de que ésta tenga lugar preferencialmente en las zonas en replicación constituye, sin duda alguna, la propiedad más interesante que tiene la nitrosoguanidina y que la habilita para un uso más elegante y preciso que la producción indiscriminada de mutantes.

2.2. Comutación

Directamente relacionado con la mutagénesis preferencial del punto de replicación está la inducción simultánea de mutaciones en genes que están estrechamente ligados ("comutación"). En *E. coli* se ha encontrado que el 1% de las células seleccionadas como mutantes en un cierto gen, han perdido simultáneamente la función de otro gen, próximo al primero (Guero-la et al., 1971). Esta proporción es mayor que la esperada por azar. En *Streptomyces coelicolor* los fragmentos sensibles son más largos siendo la frecuencia de comutación entre genes contiguos de hasta 4% (Ranzazzo et al., 1976).

La comutación constituye ya un método de trabajo para abordar problemas que quizás podrían resolverse de otra manera, pero con mayor dificultad. Se ha utilizado ampliamente en la búsqueda de mutantes difíciles de conseguir, particularmente aquéllos que no pue-

den ser seleccionados (Hillman y Fraenkel, 1975) o no se desea seleccionar (Del Castillo, Tesis doctoral en preparación); para alterar genes reguladores estrechamente ligados a genes estructurales (Cohn y Crawford, 1976) para explorar zonas cromosómicas específicas donde existe al menos un gen en el que se pueden seleccionar mutantes (Oescheger y Berlyn, 1974); para distinguir los estados autónomo e integrado de un episoma (Lloveres y Cerdá Olmedo, 1973); para detectar cambios en la forma de replicación (uni- o bidireccionalidad) en los organismos en que esto es posible (Edlund et al., 1976) e incluso para comparar los genomios de diferentes especies (Randazzo et al., 1977).

La comutación puede afectar a genes distantes que se estén replicando simultáneamente. Esto ha sido demostrado en *E. coli* (Edlund et al., 1976) y *Bacillus subtilis* (Siccardi et al., 1976) y aplicado a levaduras (Dawes et al., 1977).

3. OBJETO Y FUNDAMENTOS DE ESTE TRABAJO

En esta Tesis se van a abordar dos tipos de problemas. Se pretende en primer lugar hacer un estudio sistemático de las condiciones óptimas para el tratamiento con nitrosoguanidina en *S. cerevisiae*, ya que los métodos utilizados hasta ahora difieren tanto de un autor a otro, que no permiten sacar conclusiones generales a este respecto. Se va a estudiar, pues, la influencia de algunos factores en la letalidad y mutagenicidad producidas por nitrosoguanidina. Esta última va a medirse por la frecuencia de aparición de mutantes en el gen *can1* y de mutantes petites.

En segundo lugar se va a investigar la existencia de comutación entre genes próximos en *S. cerevisiae* y a aplicarla al estudio y localización de genes que correplican.

3.1. *El gen can1*

La L-canavanina, un análogo natural de la L-arginina, es capaz de inhibir el crecimiento en bacterias (Volcani y Snell, 1948) y hongos (Srb, 1954, 1955). En *S. cerevisiae* la resistencia a canavanina se debe a inactivación de la permeasa específica para la arginina, codificada por el gen *can1* (Grenson et al., 1966). Maas (1961) estableció que en *E. coli* la canavanina compete con la arginina en la incorporación a las proteínas, dando lugar en muchos casos a enzimas inactivas que causan la muerte de la célula. La inactivación de la permeasa por mutación evita que la canavanina entre en la célula y por tanto ésta se vuelve resistente a canavanina (Can^R).

Se ha estudiado con ayuda de rayos X (Whelan et al., 1979), la estructura fina del gen *can1* y resulta ser uno de los más largos conocidos hasta ahora en levaduras, calculándose que la permeasa debe tener unos 2500 aminoácidos.

El gen *can1* es de gran utilidad en los estudios de mutagénesis debido, principalmente, a la facilidad con que se seleccionan tanto mutaciones directas, como reversiones (Whelan et al., 1979).

3.2. *El fenotipo petite*

Las levaduras son anaerobios facultativos, carácter muy poco común entre los eucariontes. Por mutación pueden obtenerse cepas incapaces de crecer en medios que contengan una fuente de carbono no fermentable (glicerol, etanol, lactato o acetato), lo que significa que no pueden respirar o lo hacen muy dificultosamente. Estas cepas mutantes, llamadas "petites", poseen mitocondrias anormales (Smith et al., 1969). Su nombre se debe a que sus colonias son pequeñas comparadas con las de las cepas normales a las que se denomina "grandes".

El fenotipo petite puede ser causado por muchas mutaciones distintas que afectan a las funciones relacionadas con la respiración o las mitocondrias. La mayoría se deben a alteraciones en el ADN mitocondrial y se denominan petites citoplásmicos.

Los petites citoplásmicos ($[Rho^-]$) presentan una serie de características comunes: (1) son irreversibles, (2) hay una pérdida simultánea de los citocromos *a*, *a5* y *b* y de algunas enzimas asociadas a funciones mitocondriales, principalmente la oxidasa del citocromo *c*, y (3) se heredan de forma no mendeliana. Estas deficiencias múltiples reflejan una alteración en la organización general de las mitocondrias.

Muchos de los petites citoplásmicos son supresivos, que significa que son capaces de producir alteraciones irreversibles en mitocondrias normales convirtiéndolas a su vez en petites. Los petites supresivos poseen ADN mitocondrial de distinta densidad y

contenido (G+C) (Mounolou et al., 1966) que las grandes, debido a deleciones de algunas regiones y duplicaciones de otras (Faye et al., 1973).

Los petites citoplásmicos que carecen de propiedades supresivas se llaman neutrales. La mayoría de ellos han perdido por completo su ADN mitocondrial (Mounolou et al., 1966).

La frecuencia de petites citoplásmicos espontáneos en *S. cerevisiae* es muy alta, del 1-10%, por razones hasta ahora desconocidas. Esta frecuencia puede aumentarse, e incluso llegar al 100%, tratando con productos químicos, como acriflavina, cafeína, nitrosoguanidina, bromuro de etidio, etc. (Nagai et al., 1961; Nordström, 1967; Slonimski et al., 1968; Goldring et al., 1970), o con rayos ultravioleta (Wilkie, 1963).

Como muchas funciones mitocondriales dependen de genes situados en el núcleo, no sorprende que se hayan identificado más de 45 genes nucleares (designados *pet*) cuya mutación provoca el fenotipo petite (Beck et al., 1970; Hawthorne y Mortimer, 1976).

Los petites nucleares no son supresivos y su ADN tiene la misma densidad que los grandes (Mounolou et al., 1966). La mayoría de ellos son defectivos en la cadena transportadora de electrones, como ocurre en los citoplásmicos. El resto deben su fenotipo petite a causas muy variadas que van desde la incapacidad de las $Pet3^-$ de replicar el ADN mitocondrial (Beck et al., 1968), a la ausencia de fosforilación oxidativa de los $Pet9^-$ (Kováč et al., 1967).

3.3. Comutación entre genes próximos

El método más fácil para estudiar comutación entre dos genes próximos consiste en primer lugar en elegir un par de genes de los que se sepa que están muy ligados. Se toma una cepa que tenga una mutación reversible por nitrosoguanidina en uno de los dos genes. A continuación se revierte esa mutación y se estima qué proporción de los revertientes presentan fenotipo mutante para el otro gen. Se considera que hay comutación si esta proporción es mayor que la encontrada entre los supervivientes al tratamiento que no han sido seleccionados como revertientes.

La Figura 2 muestra los grupos de genes que podrían ser útiles para este trabajo y su situación en el mapa genético, según datos de Mortimer y Hawthorne (1975).

De entre todos ellos elegimos dos, el *his4ABC* y el *cdc15 adel1*, porque están muy cercanos (los *his4ABC* incluso contiguos) y porque los fenotipos de los revertientes y los comutantes son fácilmente seleccionables.

3.3.1. El gen *his4*

En el cromosoma III, brazo L, se encuentra un gen policistrónico, llamado *his4*, que codifica enzimas de la ruta biosintética de la histidina y que ha sido estudiado en profundidad por Fink (1966). Comprende 3 segmentos contiguos, *his4A*, *his4B* e *his4C*, que

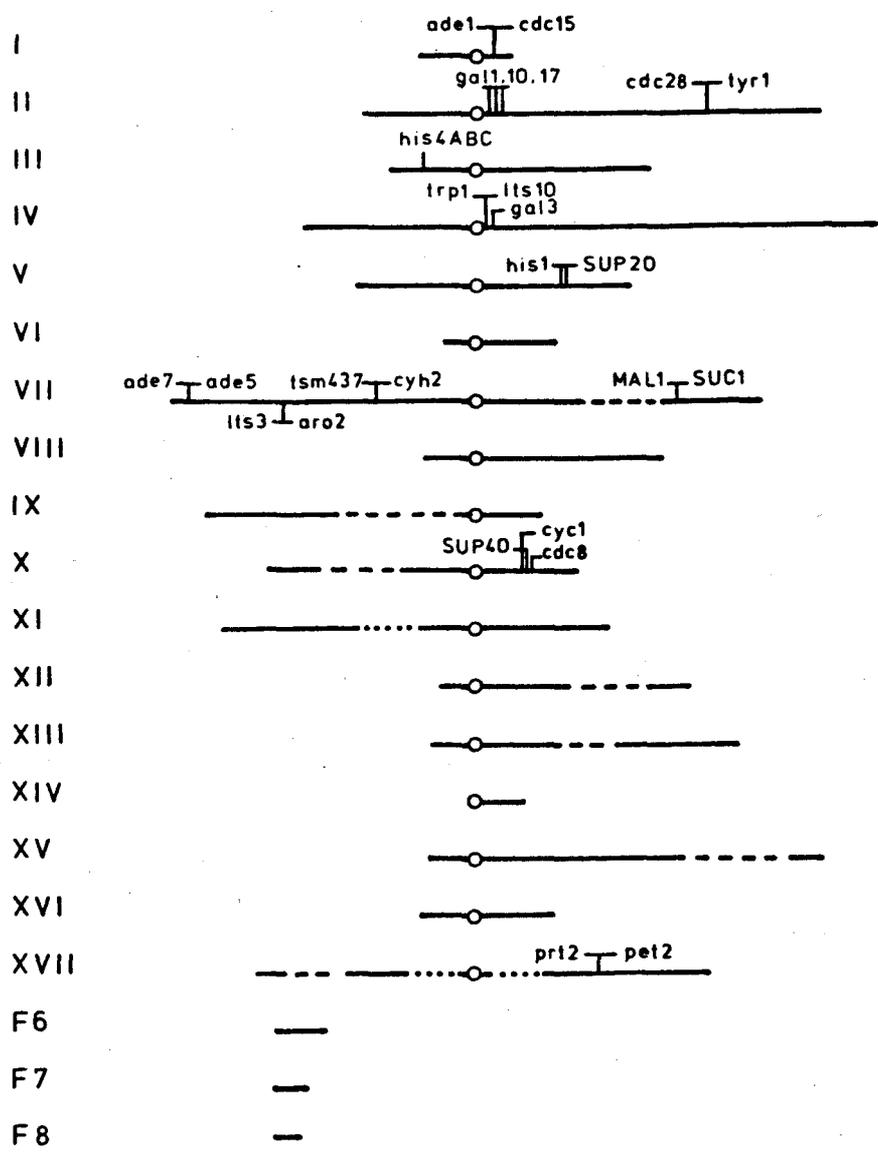


Figura 2. Situación en el mapa genético de *S. cerevisiae* de los grupos de genes que podrían ser útiles para estudiar comutación entre genes ligados. Los cromosomas se denominan I, II, ..., XVII; F6, F7 y F8 son fragmentos que todavía no han podido ser asignados a ningún cromosoma. Los brazos cromosómicos se denominan arbitrariamente L los dibujados a la izquierda del centrómero y R los dibujados a la derecha. (—) indica ligamiento establecido por recombinación meiótica; (---), por recombinación mitótica; (...), por análisis de trisómicos.

dirigen los pasos de la ruta biosintética esquematizados en la Figura 3.

Muchos mutantes *his4* muestran polaridad en complementación y recombinación, dando lugar a fenotipos B^-C^- y $A^-B^-C^-$, lo que indica la transcripción de los tres segmentos en un sólo ARN. Se cree, además, que las tres enzimas están físicamente asociadas en un complejo con las tres actividades (Keeseey et al., 1979). En *Neurospora crassa* se ha encontrado una situación similar en la cual una sola proteína cataliza estas tres reacciones (Ahmed, 1968).

3.3.2. Los genes *cdc15* y *ade1*

S. cerevisiae se reproduce asexualmente por gemación, de modo que el tamaño de la yema es indicativo del momento del ciclo mitótico en que se encuentra cada célula. Este hecho se ha utilizado para buscar, entre una serie de mutantes termosensibles, los que a temperatura restrictiva son incapaces de proseguir el ciclo y se acumulan en una cierta etapa del mismo (mutantes Cdc^-) (Hartwell et al., 1970).

cdc15 es uno de los 32 genes *cdc* definidos hasta ahora y su producto interviene concretamente en la síntesis de ADN (Culotti y Hartwell, 1971).

El producto del gen *ade1* cataliza el 7º paso de la ruta biosintética de la adenina. Los mutantes *ade1* acumulan productos intermedios, de uno de los cuales deriva un pigmento de color rosa constituido por una molécula de polirribosilaminoimidazol unida a una serie de aminoácidos (Smirnov et al., 1967).

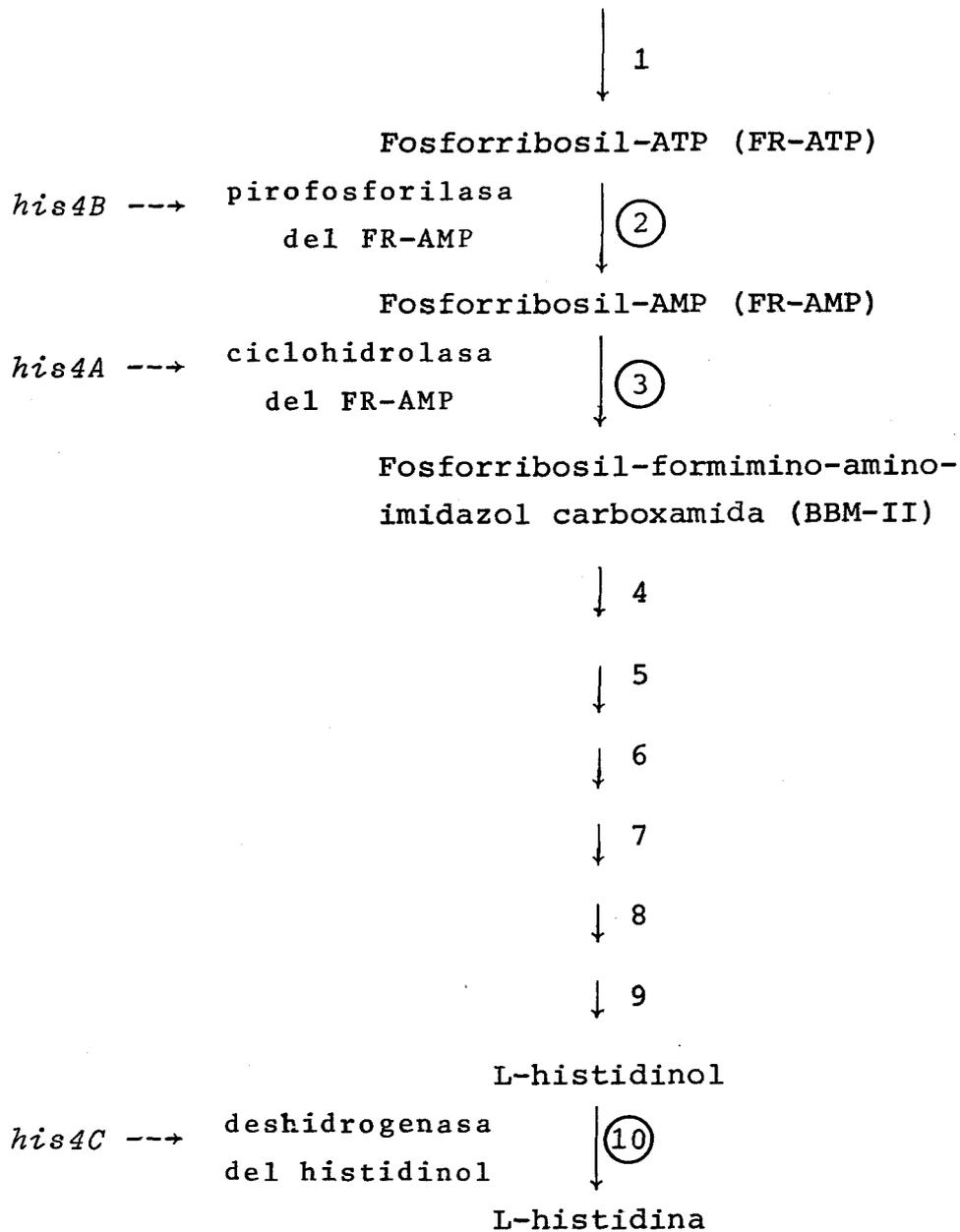


Figura 3. Ruta biosintética de la histidina. Se indican los pasos dirigidos por los genes *his4A*, *4B* y *4C* y las enzimas correspondientes.

Este fenotipo rosa es común con los mutantes *ade2* bloqueados en el 6^a paso de la ruta.

Los genes *cdc15* y *ade1* están situados muy próximos en el brazo R del cromosoma I de *S. cerevisiae*. Mortimer y Hawthorne (1973) trataron de establecer la frecuencia de recombinación entre ambos, pero en 30 tétradas analizadas, no apareció ningún recombinante, lo que de por sí indica que están muy ligados.

RESULTADOS

1. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE MUTAGENESIS CON NITROSOGUANIDINA

1.0. *Generalidades*

En este apartado se pretende establecer cuáles son las condiciones óptimas y más prácticas para obtener mutantes con NG en *S. cerevisiae*. Para ello se ha estudiado la influencia de algunos factores en la letalidad, medida como proporción de células capaces de crecer en medio nutritivo después del tratamiento, y mutagenicidad, medida por la aparición de mutantes resistentes a canavanina.

La estirpe utilizada es la X30/3C cuyas colonias presentan un color rosa debido a la presencia del alelo *ade2*. Observamos la frecuente aparición de colonias blancas entre las colonias de color rosa, tanto espontáneamente como tras mutagénesis. Se investigó la naturaleza de 327 colonias blancas provenientes de 14 tratamientos con nitrosoguanidina y de 65 colonias blancas aparecidas espontáneamente. Los resultados se resumen en la Tabla I.

La frecuencia de colonias blancas que en medio nuevo son capaces de desarrollar color, disminuye, al menos en un 80%, incubando durante una semana más. De esta forma al menos el 93.7% de las colonias blancas inducidas resultan ser "petite".

TABLA I. Clasificación de las colonias blancas según su capacidad de crecer en cajas con glicerol como fuente de carbono (YPG).

	<u>Col.blancas probadas</u>	<u>Desarrollan color rosa en medio nuevo</u>	<u>Clasificación de las blancas</u>	
			<u>"petites"</u>	<u>"grandes"</u>
Espontáneas	65	4 (6.2%)	61 (93.8%)	0 (0%)
Inducidas	327	69 (21.1%)	251 (76.8%)	7 (2.1%)

Adicionalmente, pues, se utilizó la frecuencia de aparición de colonias blancas en medio nutritivo como medida de mutagenicidad.

Conviene advertir que en la presentación de estas experiencias se sigue más bien un orden lógico que cronológico.

1.1. Ensayos preliminares

1.1.1. Mutagénesis en medio sólido

La Figura 4 muestra la capacidad de un cultivo de formar colonias en medios que contienen distintas concentraciones de nitrosoguanidina. Se observa cierta inhibición a partir de 1 μ g de nitrosoguanidina/caja, acompañada de un aumento del número de mutantes. En la misma figura se compara la frecuencia de mutantes con la obtenida en condiciones similares en *E. coli*; puede notarse el parecido de las formas de las curvas.

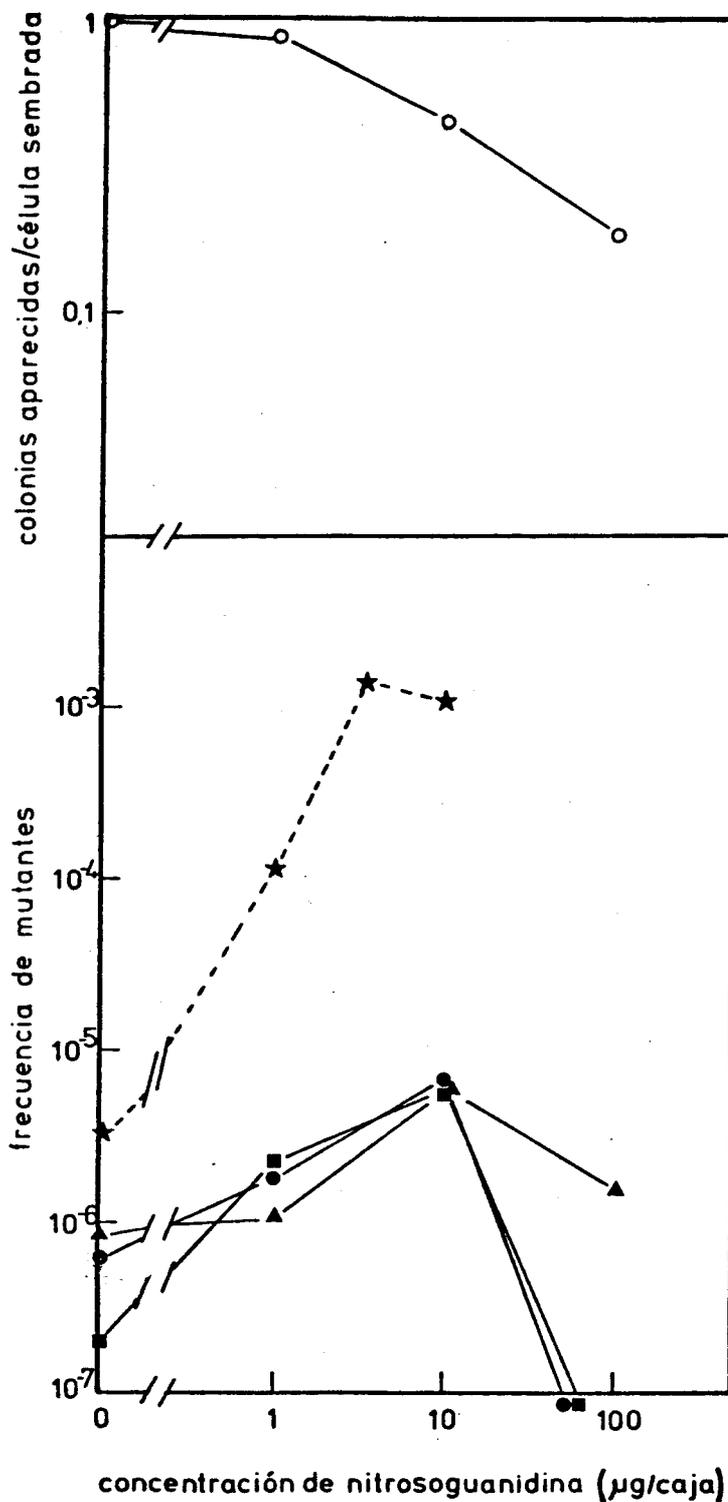


Fig. 4. Capacidad de un cultivo de formar colonias en medios que contengan distintas concentraciones de nitrosoguanidina y frecuencia de mutantes Can^R aparecidos sembrando 4.4×10^6 (■), 6.2×10^7 (●) ó 4.2×10^8 (▲) células/caja. Se compara con la frecuencia de mutantes resistentes a la arabinosa (★) obtenidos en condiciones similares en la estirpe SV3 de *E. coli* (Ruiz Vázquez et al., 1978).

1.1.2. Mutagénesis en tampón

La Tabla II muestra los resultados de algunas mutagénesis realizadas con células suspendidas en tampón Tris-maleico de pH = 7.5.

TABLA II. Supervivencia y frecuencia de mutantes en tratamientos con nitrosoguanidina realizados en distintas condiciones.

Nitroso- guanidina ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo exposición (min)	Agitación ocasional	Superviven- cia %	Can ^R 10 ⁵ super- vivientes
500	10	no	0.87	21.2
100	30	no	13.8	35.6
100	30	sí	0.33	12.5
20	30	sí	4.78	112.0

En todos los organismos, la supervivencia y la frecuencia de mutantes depende de la concentración del mutágeno y el tiempo de exposición. En bacterias, sin embargo, no se había observado el efecto de la agitación durante el tratamiento, debido quizás a que por su menor volumen se mantienen en suspensión durante todo el tiempo de tratamiento. La sedimentación rápida de las células de *S. cerevisiae* las concentra y las hace menos accesibles a la nitrosoguanidina, disminuyendo, por tanto, la letalidad y la mutagenicidad. La sedimentación

introduce además una falta de homogeneidad entre células de un mismo cultivo y, por tanto, una variación experimental no deseable. Se decidió pues, en adelante, agitar ocasionalmente durante los tratamientos.

Con agitación y 100 $\mu\text{g/ml}$ de nitrosoguanidina la supervivencia desciende muy rápidamente; para obtener niveles prácticas de supervivencia hay que tomar intervalos de tiempo muy cortos, lo que es experimentalmente dificultoso y poco fiable. Se escogió, pues, para experimentos posteriores la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$.

1.1.3. Título de células durante el tratamiento

Ya que la accesibilidad de la nitrosoguanidina a las células parecía tener importancia, se investigó la influencia del número de células existente en la suspensión que se estaba mutagenizando. Para ello se trataron con nitrosoguanidina suspensiones de células de X30/3C que contenían 10^7 , 10^8 y 10^9 células/ml respectivamente, provenientes todas del mismo cultivo.

Los resultados, que se presentan en la Figura 5 muestran que los títulos muy altos (10^9 células/ml) influyen en la letalidad. La mutagenicidad sin embargo, parece depender exclusivamente de la supervivencia. En el caso de la aparición de mutantes Can^R se insinúa una curva en campana cuyo máximo estaría hacia el 30% de supervivencia. En cambio, la aparición de blancos aumenta monótonamente con la letalidad. Estas observaciones fueron confirmadas en experimentos posteriores.

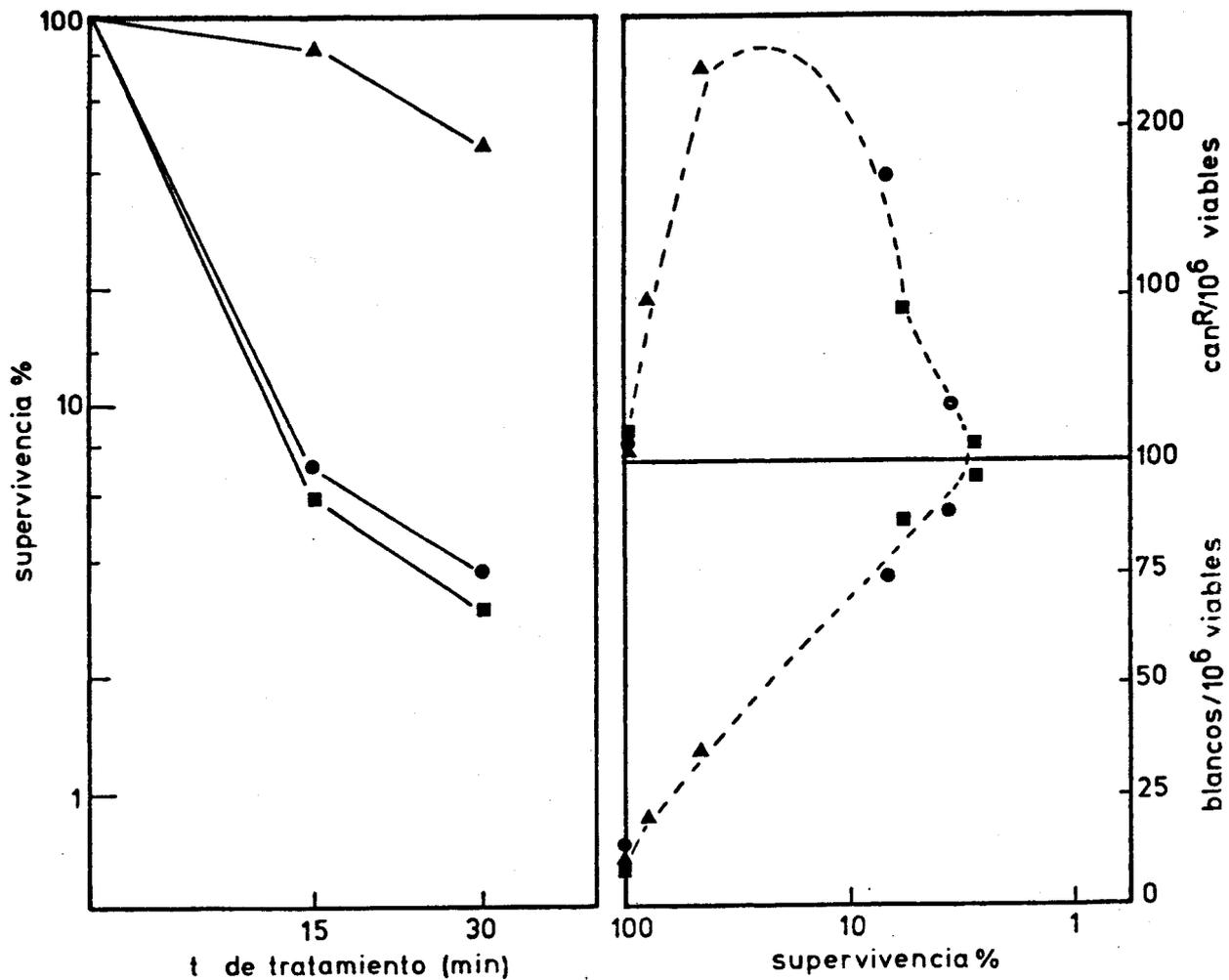


Figura 5. Influencia del título de células durante el tratamiento con nitrosoguanidina en la letalidad y la mutagenicidad. Las suspensiones tratadas contenían 10^7 (■), 10^8 (●) ó 10^9 (▲) células/ml.

En adelante, para mutagenizar se prepararon suspensiones de aproximadamente 10^8 células/ml con lo que se pretendió minimizar las diferencias debidas a este factor que se pudieran encontrar.

1.1.4. Efecto de la densidad de siembra en la detección de mutantes y viables de un cultivo.

En bacterias se da el caso de que en la detección de una serie de mutantes influye la cantidad de células sembradas por caja (Ruiz Vázquez et al., 1978).

Para determinar los títulos de células viables y mutantes después de mutagenizar se sembraron diversas alícuotas del cultivo, utilizando diluciones apropiadas. Como se refleja en la Tabla III hemos constatado que también en *S. cerevisiae* tiene importancia la densidad de siembra, tanto para la estimación de la frecuencia de mutación, como para la de la supervivencia. A altas densidades de siembra parece haber una inhibición del crecimiento. A muy bajas densidades la varianza es tan grande que habría que sembrar un número de cajas muy alto para obtener una determinación fiable. Procuramos, por tanto, en adelante emplear factores de dilución que nos dieran alrededor de 100 colonias por caja.

1.2. Influencia del pH

Los efectos de la nitrosoguanidina en muchos organismos dependen del pH y de la presencia en el medio de ciertos compuestos.

TABLA III. Efecto de la densidad de siembra en las estimaciones de supervivencia y frecuencia de mutación.

Alícuota sembrada (ml)	colonias caja	Supervivencia estimada (%)	Frec. mut. estimada (Can ^R /10 ⁶ superv.)
Siembra en medio nutritivo:			
10 ⁻⁵	1542	4	-
10 ⁻⁶	339	8.7	-
10 ⁻⁷	33.5	9.1	-
10 ⁻⁸	5	12.8	-
Siembra en medio mínimo con canavanina:			
10 ⁻¹	5291	-	81
10 ⁻²	1644	-	252
10 ⁻³	190	-	292

1.2.1. Letalidad a distintos pH y en distintos tampones

Se utilizaron tampones acetato y tris-maleato a distintos valores de pH, por ser éstos los más frecuentemente usados en los tratamientos mutagénicos en bacterias. En ellos se resuspendieron células procedentes de un mismo cultivo y se añadió nitrosoguanidina. A 30 y 60 minutos se tomaron muestras que se lavaron por dos veces y se sembraron con las diluciones adecuadas en cajas de medio nutritivo. Los resultados están representados en la Figura 6. En ella llaman la atención dos

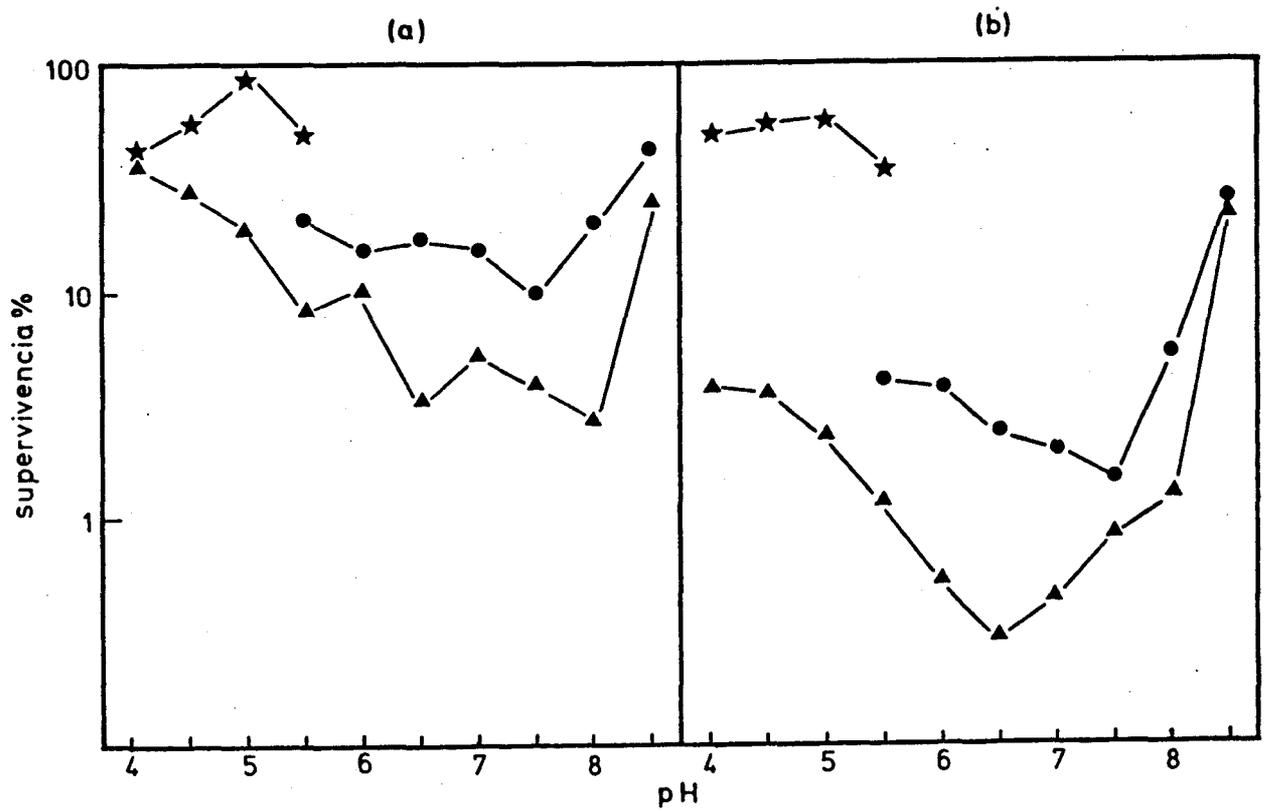


Figura 6. Letalidad producidas por tratamientos de 30 minutos (a) y 60 minutos (b), con nitrosoguanidina, en tampón acetato (★), en tampón tris-maleato (●), o en tampón citrato-tris-maleato (▲).

hechos: la diferencia de letalidad en los dos tampones, claramente visible a pH 5.5, y que las más altas supervivencias se den a pH extremos. Ambos hechos se acentúan cuando el tiempo de tratamiento es más largo.

En la misma figura se representan también los resultados de un experimento similar pero utilizando un solo tampón citrato-tris-maleato que abarca todo el intervalo de pH estudiado. Con él se confirma lo expuesto.

La molaridad de cada uno de los componentes de cada tampón es la misma a los distintos pH. No así su estado de ionización, que depende del pH. Por tanto, el que la nitrosoguanidina mate más o menos a un pH determinado podría achacarse bien directamente a la concentración de H^+ o bien a la fuerza iónica del tampón a ese pH.

Las diferencias observadas entre los tampones a un mismo pH podrían ser debidas a diferencias en la fuerza iónica o a la naturaleza de las sustancias tamponantes.

1.2.2. Letalidad y mutagenicidad en función del pH

Se realizaron experimentos más detallados en tampón tris-maleato a pH 5.5, 6.5, 7.8 y 8.5, estudiando simultáneamente letalidad y mutagenicidad (Fig. 7). A los pH intermedios, 6 y 7.8, se vuelven a encontrar tipos de curvas diferentes para la aparición de mutantes Can^R y blancos, como en el apartado 1.1.3. La fre-

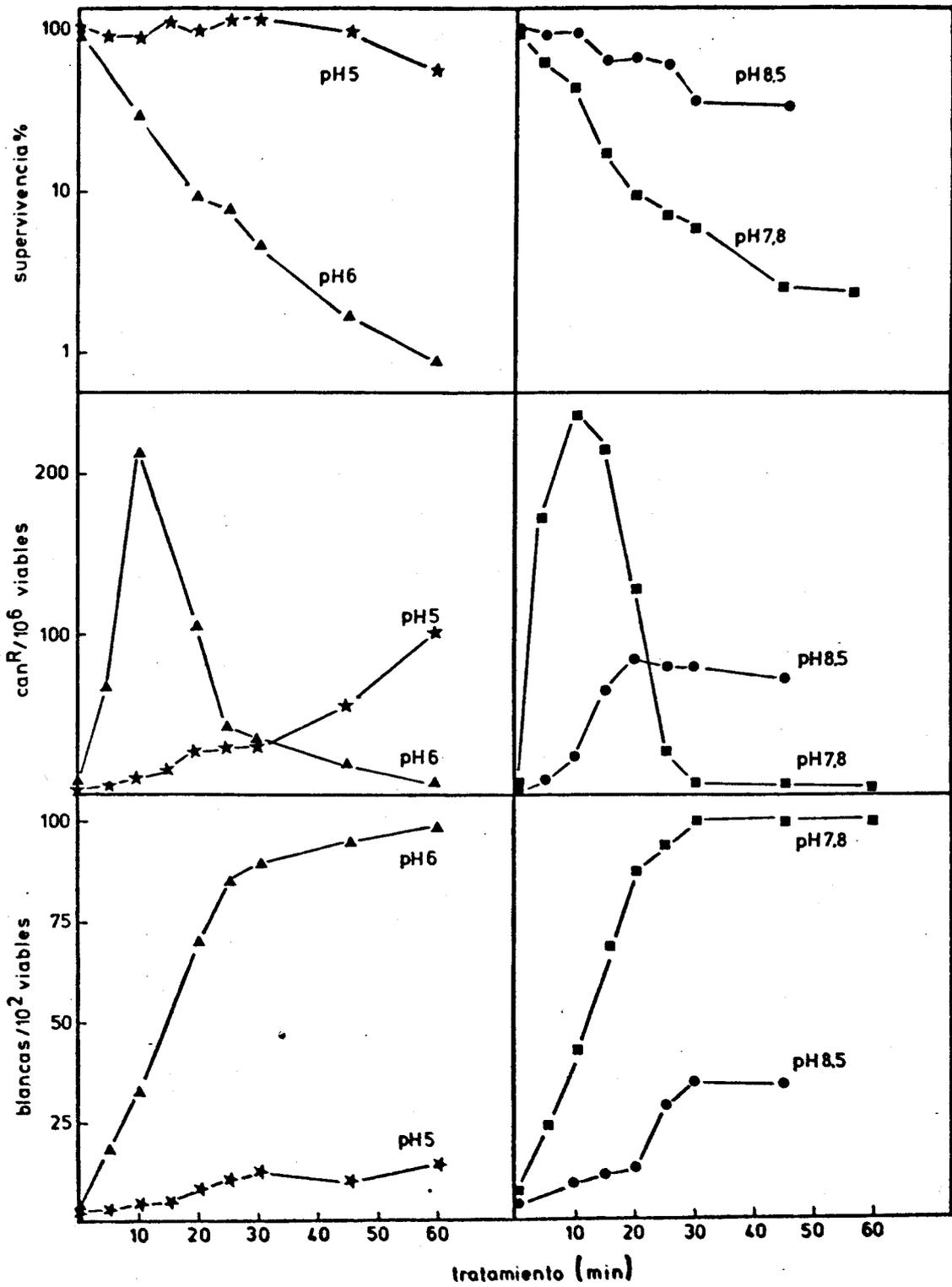


Figura 7. Variación con el tiempo de tratamiento de la letalidad y la mutagenicidad producidas por nitrosoguanidina en tampón tris-maleato a varios valores de pH.

cuencia máxima de mutantes Can^R aparece a los 10 ó 15 minutos de tratamiento. Sin embargo, la inducción de blancos aumenta monótonamente durante los primeros 20 ó 30 minutos de tratamiento y parece estacionarse cuando la frecuencia es cercana al 100%.

Aparentemente no se encuentra el mismo resultado a los pH extremos 5 y 8.5, pero la diferencia desaparece si se representa la frecuencia de mutantes en función de la supervivencia (Fig. 8). Para ambos tipos de mutantes se cumple que su aparición en menor o mayor cantidad depende exclusivamente de la supervivencia.

Aunque será más ampliamente comentado en la Discusión, se puede adelantar que la forma de campana de la curva de frecuencia de mutantes Can^R se achaca a la existencia en el cultivo expuesto a la nitrosoguanidina de subpoblaciones celulares de distinta susceptibilidad a ser mutagenizadas y muertas por nitrosoguanidina. A dosis bajas observamos la respuesta de las poblaciones más sensibles, en las que la nitrosoguanidina induce muchos mutantes. A dosis mayores se va exterminando a estas poblaciones más sensibles y, consecuentemente, la frecuencia de mutantes disminuye.

1.3. *Efecto de la incubación tras el tratamiento con nitrosoguanidina en la expresión de las mutaciones*

Kaudewitz (1955) encontró que la frecuencia de revertientes inducidos por luz ultravioleta en una

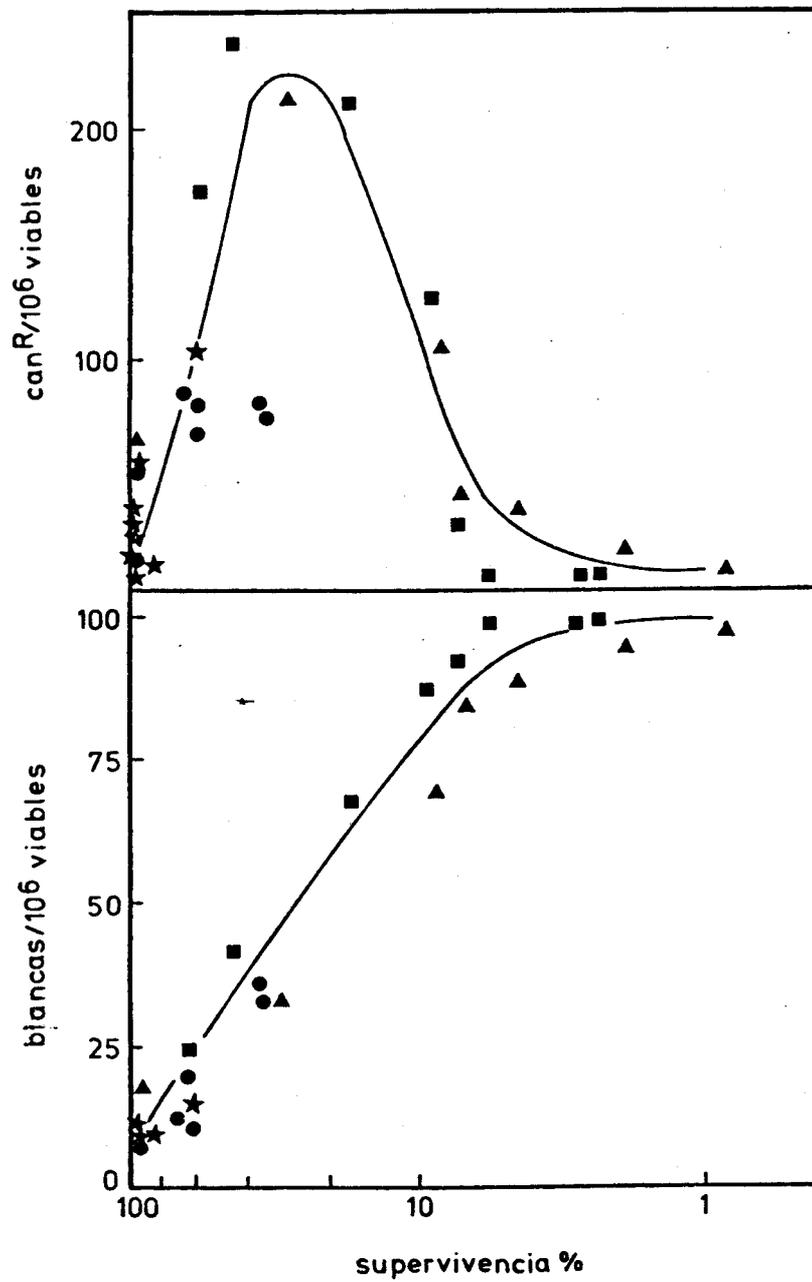


Figura 8. Frecuencia de mutantes Can^R y blancos en función de la supervivencia tras exposición a nitrosoguanidina en tampón tris-maleato a pH 5 (★), 6 (▲), 7.8 (■) y 8.5 (●).

estirpe auxótrofa para la lisina de *S. typhimurium* era mayor si se les permitía crecer varias generaciones antes de sembrar en medio selectivo. El mismo efecto se ha encontrado en otros organismos.

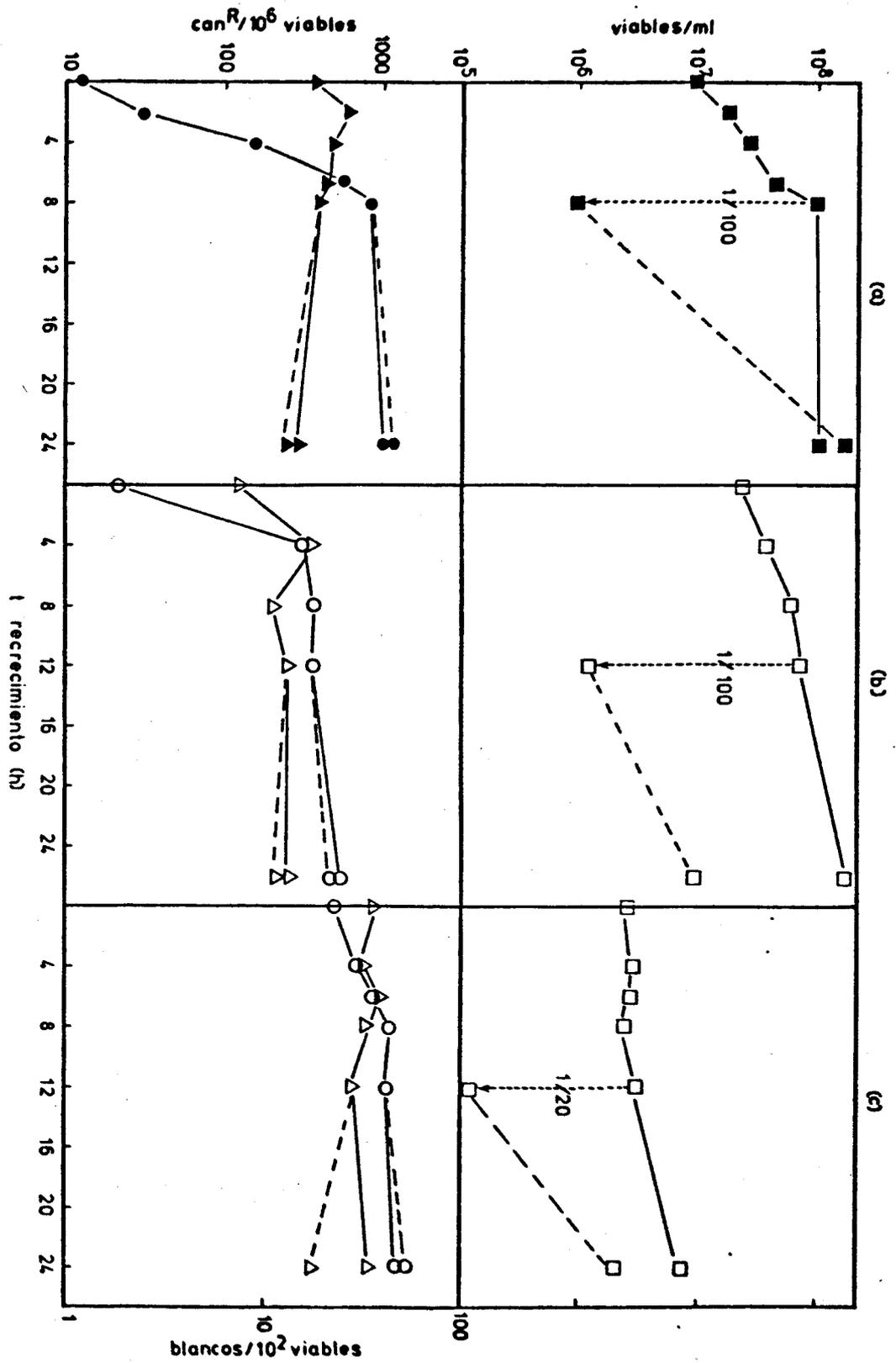
Se prepararon cultivos en medio nutritivo y medio mínimo, se trataron con nitrosoguanidina, se resuspendieron en el mismo medio del que procedían y se incubaron durante unas 24 horas con aireación. A los tiempos que se señalan en la Figura 9 se tomaron muestras para estimar el número de células viables y la frecuencia de mutantes. Además se hicieron diluciones a medio fresco en los momentos que indican las flechas.

Como cabría esperar, el crecimiento tras la exposición a nitrosoguanidina es más lento en medio mínimo que en medio nutritivo, y es particularmente lento tras el tratamiento más severo.

La frecuencia de mutantes Can^R aumenta a medida que transcurre el tiempo de recrecimiento y alcanza un máximo, que se mantiene durante el resto del experimento, incluso tras dilución en medio fresco, donde el crecimiento es más activo.

El recrecimiento tiene un inconveniente: nunca se puede estar seguro de que dos mutantes se han originado independientemente. Para evitar este efecto, en general no se han recrecido las células antes de sembrarlas en medio selectivo, salvo en algunas ocasiones, convenientemente indicadas en el texto.

Figura 9. Efecto de la incubación tras el tratamiento con nitrosoguanidina en la expresión de las mutaciones. En los casos a y b la dosis del mutágeno fue de 20 $\mu\text{g/ml}$ durante 15 minutos que dió lugar a una supervivencia de 89 y 87% respectivamente; en el caso c fue de 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos y dió una supervivencia de un 2.5%. A los distintos tiempos se estimaron las células viables/ml (\blacksquare, \square), la frecuencia de mutantes Can^{R} (\bullet, \circ) y la de mutantes blancos ($\blacktriangle, \triangle$). Los signos llenos indican que el recrecimiento se realizó en medio nutritivo; los vacíos, que se hizo en medio mínimo. Las flechas indican los momentos en los que se diluyó a medio fresco; (---) indica la evolución del n° de células viables y de las frecuencias de mutantes en estas diluciones.



La frecuencia de mutantes blancos se mantiene aproximadamente igual durante el recrecimiento. Téngase en cuenta que el medio donde se detecta este tipo de mutantes no es selectivo.

1.4. *Influencia del estado fisiológico del cultivo*

Actualmente se acepta que la nitrosoguanidina ejerce su acción preferentemente en las regiones cromosómicas que se encuentran en replicación. Es, por tanto, lógico pensar que las más altas frecuencias de mutantes deben obtenerse tratando cultivos en fase exponencial de crecimiento y de hecho así ocurre en *E. coli* (Adelberg et al., 1965).

1.4.1. Letalidad y mutagenicidad en células hambrientas

Con estos experimentos se trató de investigar la capacidad de la nitrosoguanidina de matar y mutar células de *S. cerevisiae* que han estado suspendidas durante un cierto tiempo en un medio carente de nutrientes.

Como experiencia previa se recogieron por centrifugación las células de un cultivo. La mitad de ellas se resuspendieron en medio mínimo sin fuente de nitrógeno (YCB) y la otra mitad en tampón tris-maleato. Se incubaron a 30°C con aireación. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de ambos y se sembraron en medio nutritivo para contar viables. Los resultados se pre-

sentan en la Figura 10. Tanto en YCB como en tampón se aprecia un cese del crecimiento y al final, incluso un descenso en el número de células viables. Para los experimentos posteriores se decidió incubar las células durante 2 horas y en tampón.

Se tomó un cultivo y se dividió en dos partes que se centrifugaron. Las células de cada uno se resuspendieron en medio nutritivo y en tampón respectivamente y se incubaron durante 2 horas con aireación a 30°C. Transcurrido este tiempo se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en tampón tris-maleato de pH 7.8 al que se añadió nitrosoguanidina. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se sembraron en los medios correspondientes para estimar la frecuencia de viables y la de mutantes.

Se realizaron dos experimentos de este tipo cuyos datos damos por separado ya que los títulos de células durante la mutagénesis fueron diferentes: 5×10^7 en el experimento 1, y 2×10^8 en el experimento 2. Los resultados aparecen en la Tabla IV y la Figura 11. El crecimiento en medio nutritivo durante el pretratamiento fue mayor que en tampón, como era de esperar. Aunque la letalidad no fue la misma en ambos experimentos, las frecuencias de mutantes se solapan cuando se representan frente a la supervivencia, dando lugar a las curvas ya comentadas en apartados anteriores. Se concluye que la carencia de nutrientes no afecta a las frecuencias de mutantes.

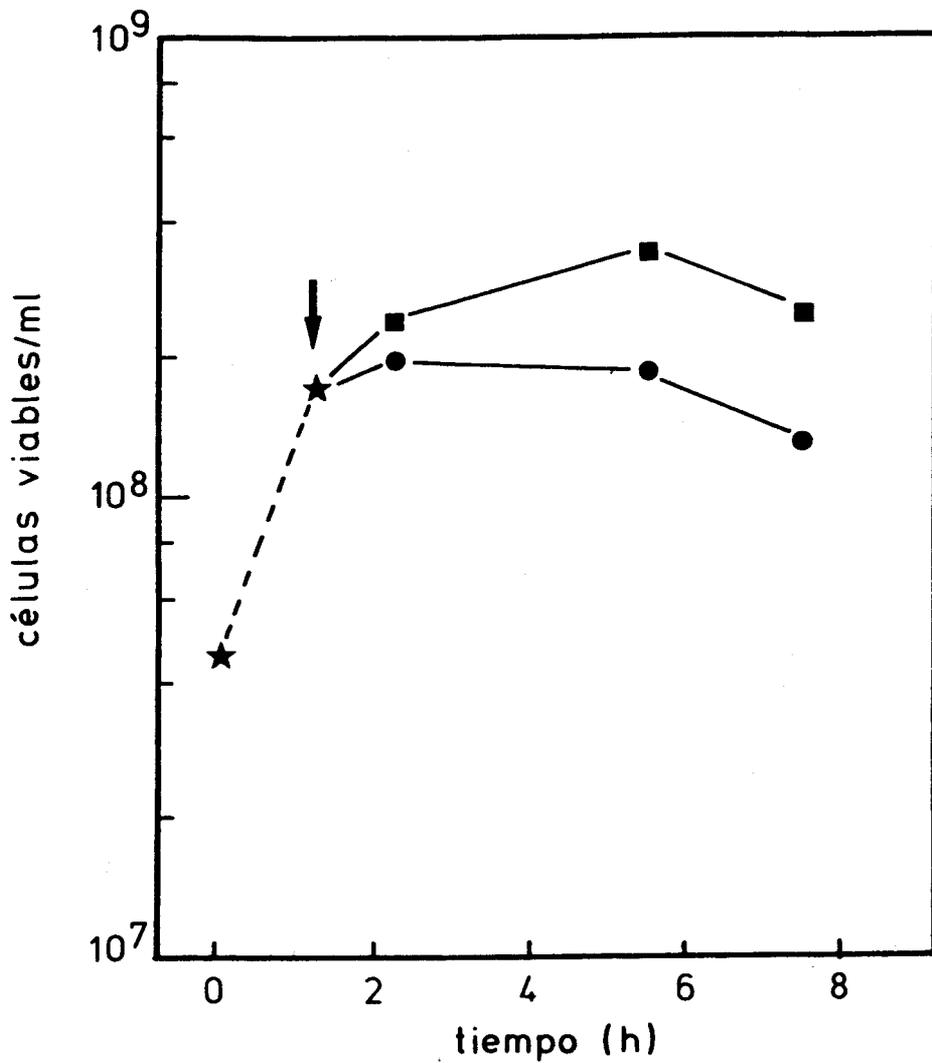


Figura 10. Crecimiento de células suspendidas en tampón (●) y en YCB, medio mínimo sin fuente de nitrógeno (■). La flecha indica el momento de la transferencia de células que crecían en medio nutritivo (★).

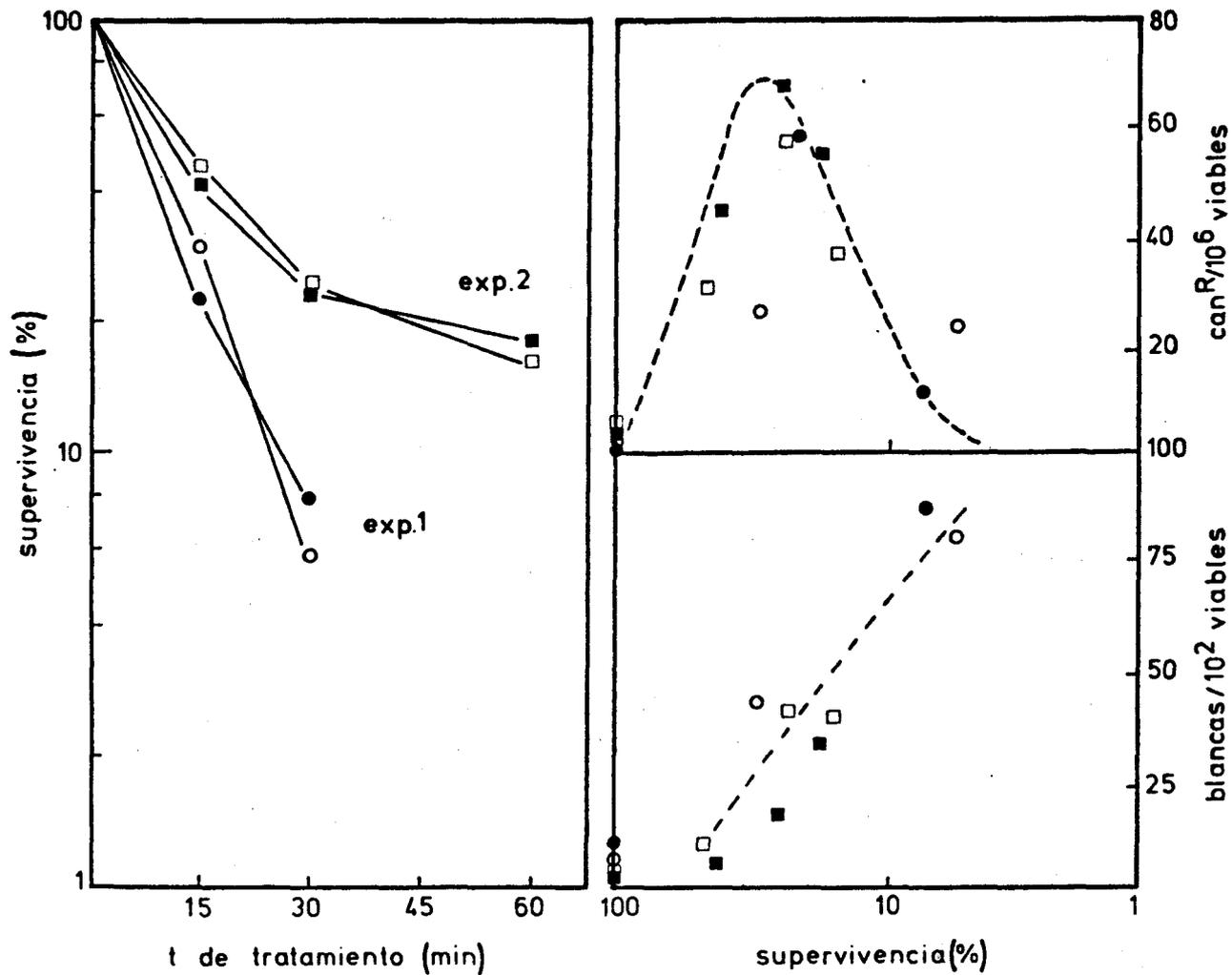


Figura 11. Letalidad y mutagenicidad producida por nitroguanidina en células que han sido preincubadas en medio nutritivo (●,▲) o en tampón (○,△).

TABLA IV. Evolución del número de células viables durante la incubación previa al tratamiento con nitrosoguanidina.

Experimento	Medio	Nº de células/ml	
		t = 0	t = 2 h
1	tampón	5.2×10^7	7.5×10^7
	medio nutritivo	2.3×10^7	4.5×10^7
2	tampón	1.53×10^8	2.2×10^8
	medio nutritivo	8.9×10^7	2.2×10^8

1.4.2. Letalidad y mutagenicidad en células procedentes de distintas fases del crecimiento de un cultivo

Un cultivo que había estado creciendo durante una noche en medio nutritivo, y que tenía 3×10^8 células/ml, se dividió en tres partes: A, B y C. A se trató inmediatamente con nitrosoguanidina; se consideró que sus células estaban en estado estacionario temprano. B se diluyó con medio nutritivo hasta una concentración de 4×10^6 células/ml, se incubó a 30°C con aireación durante el tiempo preciso para observar un aumento de ocho veces en el número de células medido por conteo en cámara Petroff-Hausser, y se trató con nitrosoguanidina. Se consideró que las células de B estaban, en el momento del tratamiento, en plena fase exponencial.

C se siguió incubando durante 24 horas más para que alcanzara la fase estacionaria tardía antes de tratar con nitrosoguanidina.

Los resultados (Fig. 12) indican que no hay diferencias apreciables en la letalidad producida por nitrosoguanidina entre los tres tipos de células. Tampoco la hay en la aparición de mutantes blancos. Sin embargo, y al contrario de lo que se esperaba, se obtuvieron muchos menos mutantes Can^R en el cultivo exponencial que en los cultivos estacionarios. Como explicación de este sorprendente resultado se pensó que la diferencia entre los tres cultivos podría no estar en la inducción de mutaciones, sino en su expresión, y se realizó el siguiente experimento para comprobarlo.

Un cultivo en medio nutritivo se diluyó en medio fresco hasta una concentración aproximada de 10^7 células/ml. El crecimiento del cultivo está representado en la Figura 13. En los momentos señalados se tomaron alícuotas que se trataron con nitrosoguanidina. Se determinaron las frecuencias de mutantes después de los tratamientos y tras 24 horas de incubación en medio nutritivo a 30°C con aireación.

Los resultados (Fig. 14) muestran que, efectivamente, hay diferencias en la expresión de las mutaciones entre las células en fase exponencial y las que están en fase estacionaria.

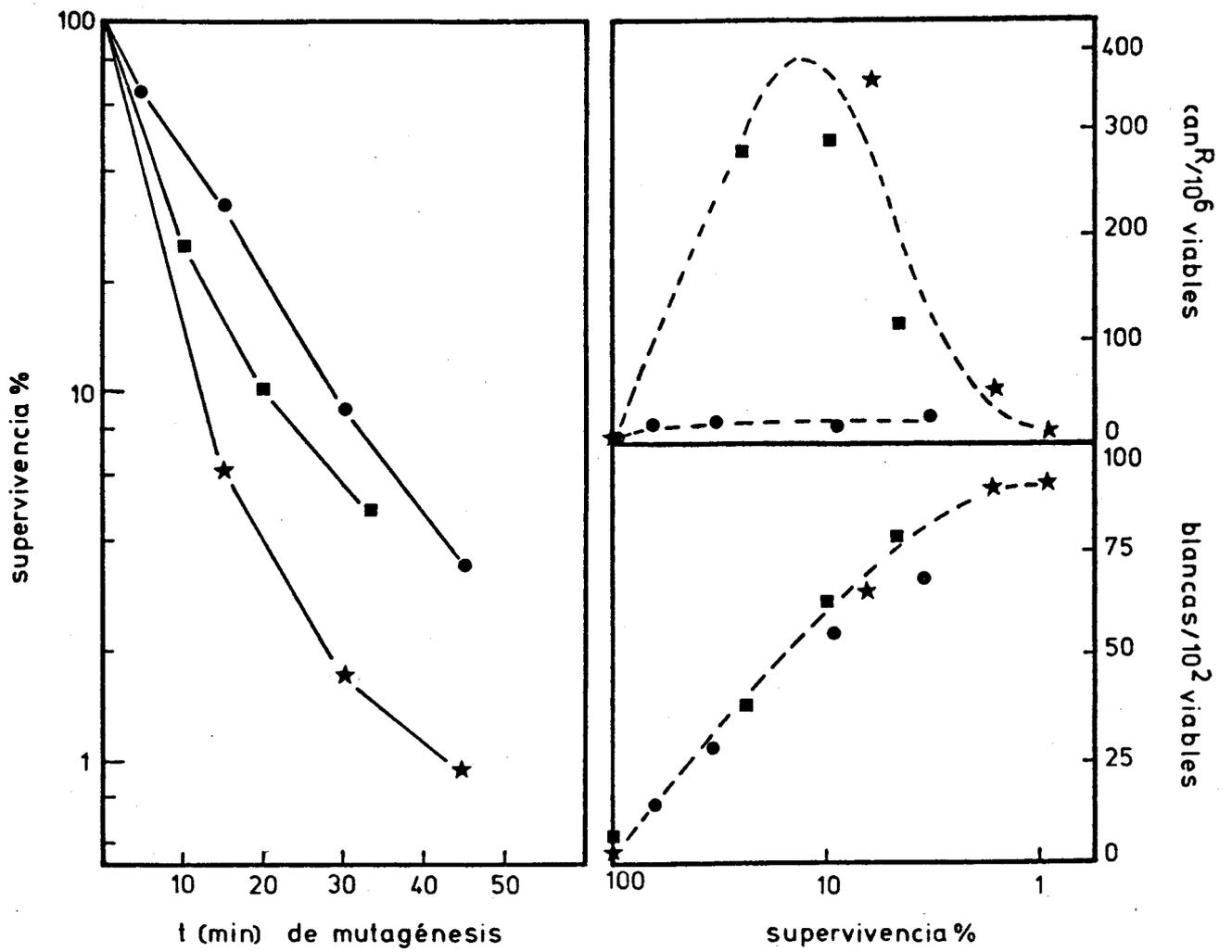


Figura 12. Letalidad y mutagenicidad en cultivos en distintas fases de crecimiento: exponencial (●); estacionario temprano (■) y estacionario tardío (★).

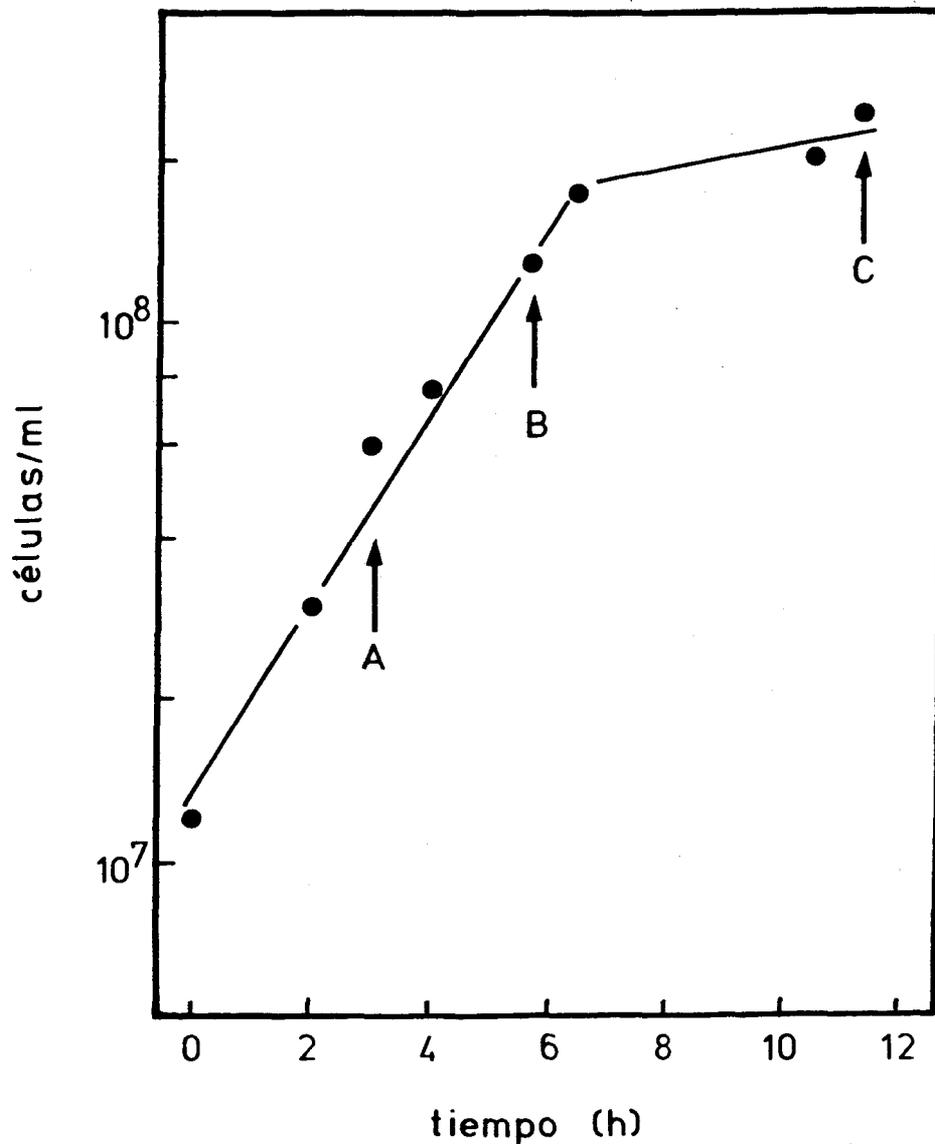


Figura 13. Evolución del número de células de un cultivo en medio nutritivo. Las flechas indican los momentos en que se tomaron las muestras para los tratamientos con nitrosoguanidina.

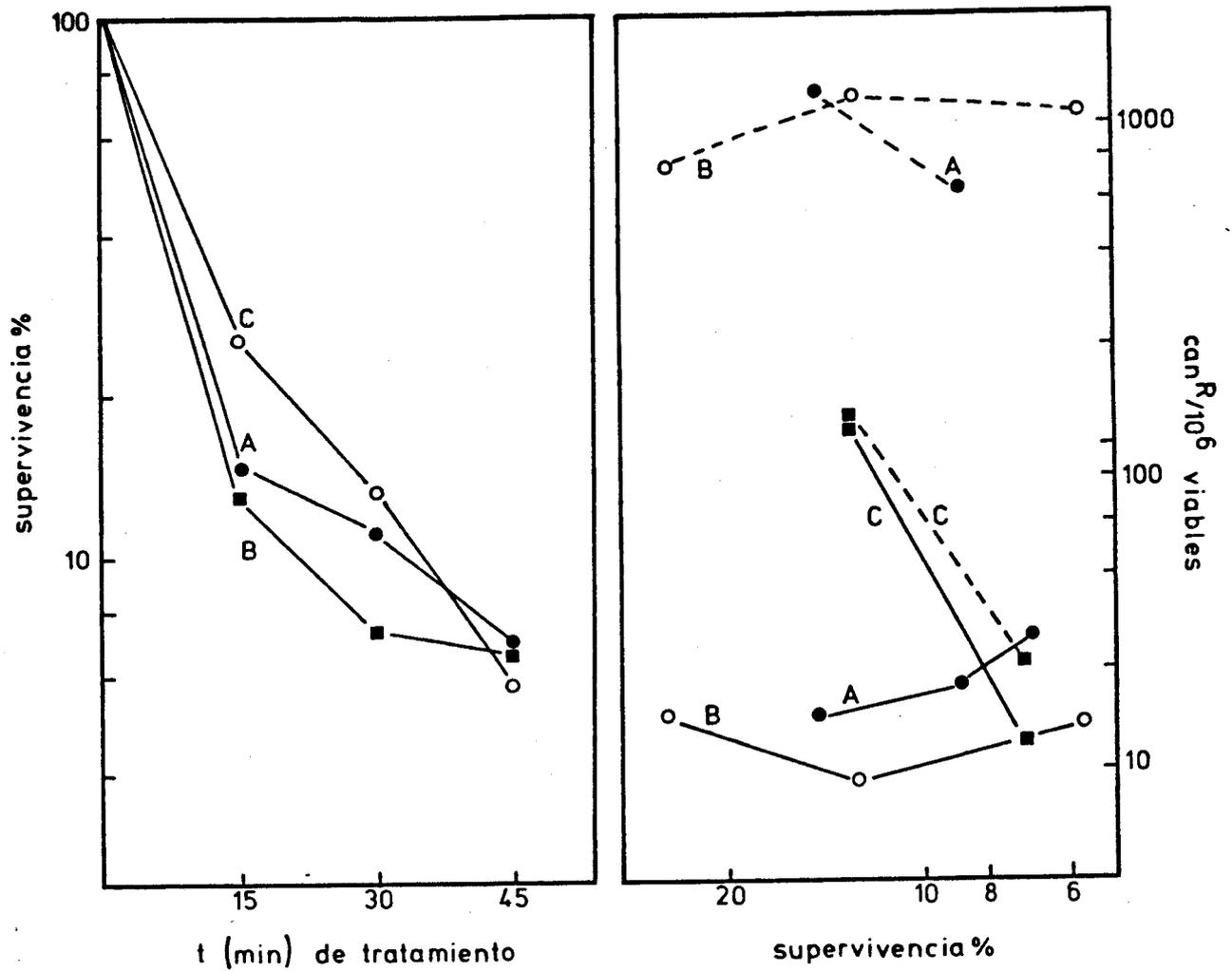


Figura 14. Letalidad y mutagenicidad en cultivos en distintas fases de crecimiento, obtenidos según se indica en la Fig. 13. La frecuencia de mutantes Can^R se midió sembrando en cajas de medio selectivo inmediatamente después del tratamiento (—) o tras 24 horas de recrecimiento (---).

2. COMUTACION

Con esta serie de experimentos se trató de comprobar si en *S. cerevisiae* se da, como en otros organismos, el fenómeno de la comutación. Para ello se hicieron dos tipos de estudios:

1. Inducción simultánea de mutaciones en genes que están muy próximos.

De entre los grupos de genes próximos que se conocen elegimos dos, el grupo *his4* (3 genes) y el par *ade1 - cdc15*, porque sus mutantes son fácilmente seleccionables y las cepas adecuadas para estos experimentos eran bastante accesibles.

2. Localización en el genomio de mutaciones termosensibles inducidas al mismo tiempo que otra cuyo fenotipo sea seleccionable. Para este apartado se eligió la resistencia a canavanina, porque este fenotipo se asocia unívocamente a mutaciones en el gen *can1*.

2.1. Sistema *his4*

Los mutantes *his4C* son auxótrofos para la histidina por ser incapaces de realizar la conversión de histidinol en histidina; son por tanto His⁻Hol⁻. Si se diera comutación, se esperaría que entre los revertientes His4C⁺ se encontraran mutaciones en *his4A* o *his4B*, contiguos a *his4C*. Los revertientes His4C⁺ serían protótrofos. Los dobles mutantes His4C⁺ His4A⁻ o His4C⁺ His4B⁻ serían auxótrofos para histidina o histidinol (His⁻ Hol⁺).

2.1.1. Comprobación del genotipo de las cepas

Además de la comprobación rutinaria de fenotipo que se realizó a todas las cepas, en este caso se estimó conveniente asegurarse de la presencia del alelo *HOL1-1*, indispensable para la utilización de histidinol. Para ello realizamos los cruzamientos descritos en la Tabla V siguiendo el protocolo 5.1. de Materiales y Métodos. Los diploides se seleccionaron en medio mínimo, en el que no crecen los parentales y, a continuación, se esporularon. En la Tabla V se muestran los resultados de los correspondientes análisis de tétradas.

La presencia del alelo *HOL1-1* en las cepas *His4C⁻* estudiadas queda demostrada por la aparición de recombinantes *His⁻ hol⁺*, por su frecuencia y por las frecuencias relativas de los tres tipos de segregaciones (Tabla VI).

2.1.2. Reversión de la mutación *his4C* y búsqueda de comutantes

Nos interesaba trabajar con un mutante *his4C* que revirtiera bien con nitrosoguanidina. Para reconocerlo, se extendieron unas 10^7 células de cada una de las cepas portadoras de mutaciones *his4C* en cajas de medio mínimo, se colocaron unos cristales de nitrosoguanidina en el centro de las cajas y se incubaron durante 4 días a 30°C. Se seleccionó la cepa 4828-2B por presentar el mejor halo de colonias protótrofas.

TABLA V. Comprobación de la presencia del alelo *HOL1-1* en varias cepas *His4C⁻*.

Cruzamiento*	Nº de tétradas			Ascosporas recombinantes His ⁻ Hol ⁺	
	Total estudiadas	Segregación Hol ⁻ :Hol ⁺ 1:1 3:1 4:0			
1	7	4	3	0	2/28
2	9	5	4	0	5/36
3	11	5	6	0	1/44

* Cruzamiento 1: { 4828-8C D286-2A
α *his4C-290* ¿*HOL1-1*? × *a ade1 his1*

Cruzamiento 2: { 4829-2B D286-2A
α *his4C-280* ¿*HOL1-1*? × *a ade1 his1*

Cruzamiento 3: { 4832-5D D273-11A
α *his4C-564* ¿*HOL1-1*? × *a ade1 his1*

TABLA VI. Segregaciones esperadas en los cruzamientos de la Tabla V.

	Proporción relativa de segregaciones Hol ⁻ : Hol ⁺			Proporción de recombinantes His ⁻ Hol ⁺
	1:1	3:1	4:0	
En presencia de HOL1-1	16	12	1	1/8
En ausencia de HOL1-1	1	4	1	0

Se trató con nitrosoguanidina durante 45 minutos un cultivo de la cepa 4829-2B que contenía 10^8 células/ml, según se describe en Materiales y Métodos, apartado 4.2. Después del tratamiento y los lavados correspondientes, la suspensión de células se concentró diez veces. Se sembraron cajas que contenían histidinol y cajas de medio nutritivo para estimar la frecuencia de revertientes Hol⁺ y de viables, respectivamente.

La frecuencia de revertientes espontáneos Hol⁺ resultó ser 2×10^{-8} ; la inducida por nitrosoguanidina en este experimento fue 135×10^{-8} , a una supervivencia del 32.5%.

Se probó el crecimiento de 2200 colonias revertientes Hol⁺, aparecidas tras el tratamiento mutagé-

nico, en cajas de medio mínimo y medio mínimo con histidina, que se incubaron durante 4 días a 30°C; 224 colonias crecieron cualitativamente peor en medio mínimo. No se encontró ninguna que no creciera en absoluto en este medio. La inmensa mayoría de estas 224 colonias crecieron, al ser probadas de nuevo, igual de mal en medio mínimo que en medio mínimo con histidinol por lo que dedujimos que eran simplemente revertientes imperfectos. Sólo quedaron 5 colonias como posibles comutantes His⁻ Hol⁺. Entre ellas se seleccionaron dos que llamaremos en adelante mutante 1 y mutante 2 y se estudió cuantitativamente su crecimiento como se describe a continuación.

Se prepararon cultivos en medio mínimo líquido con histidina de las cepas 4829-2B, S288C, mutante 1 y mutante 2. Se incubaron con aireación durante toda la noche a 30°C. A la mañana siguiente cada cultivo se dividió en tres partes, que se centrifugaron y resuspendieron, una en medio mínimo, otra en medio mínimo con histidinol y otra en medio mínimo con histidina. Cada cierto tiempo se estimó el número de células de los cultivos con ayuda de la cámara Petroff-Hausser (Fig. 15). Los mutantes 1 y 2 crecen igual en medio mínimo con y sin histidinol por lo que se les puede clasificar como revertientes imperfectos pero no como comutantes His⁻ Hol⁺.

Además de los 2200 revertientes Hol⁺ mencionados, se analizaron otros 15000 provenientes de más de 10 tratamientos mutagénicos similares al descrito. En ningún caso se obtuvieron comutantes His⁻ Hol⁺.

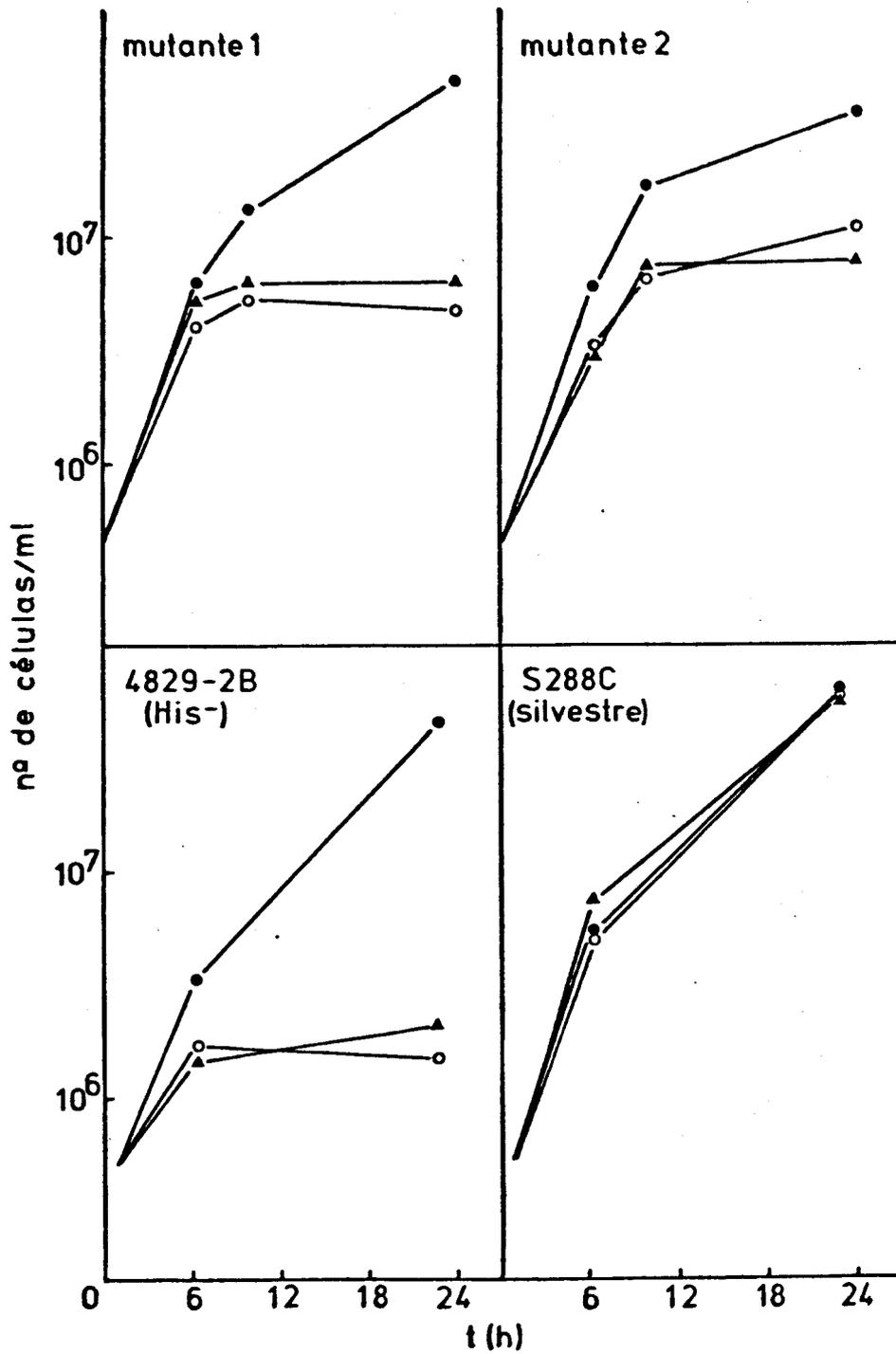


Figura 15. Evolución del número de células de distintas cepas en medios mínimo (O), mínimo con histidina (●) y mínimo con histidinol (▲).

2.1.3. Naturaleza de la reversión

Se quiso comprobar si los revertientes Hol^+ aquí estudiados lo eran por reversión verdadera de la mutación o por supresión. La prueba consistió en analizar las ascosporas del cruzamiento de revertientes Hol^+ por una cepa protótrofa para la histidina. Si los revertientes llevan una mutación supresora no ligada a *his4*, el 25% de las esporas serían de fenotipo His^- .

Se cruzaron 5 revertientes Hol^+ por la cepa XJ6/4B, de genotipo *a leu1 can1*. De cada cruzamiento se seleccionaron por micromanipulación 5 cigotos a los que seguidamente se hizo esporular. Tras la rotura de ascas, las esporas se seleccionaron en medio mínimo que contenía canavanina e histidina. Se probó la capacidad de crecer en medio mínimo de 100 esporas por cada cruzamiento. Todas ellas resultaron ser His^+ . Por tanto, la reversión Hol^- a Hol^+ se ha producido en el mismo gen *his4C* o en un lugar muy próximo a él.

2.2. Sistema *cdc15-adel*

Este estudio se inicia con el tratamiento con nitrosoguanidina de una cepa portadora de una mutación *cdc15* de fenotipo termosensible. Como *cdc15* y *adel* están muy próximos en el mapa genético, si se diera comutación, la frecuencia de colonias de color rosa (*adel* principalmente) entre los revertientes seleccionados a 37°C sería mayor que la esperada por azar.

2.2.1. Selección de una cepa con el genotipo adecuado

Se disponía de la cepa 17-17, que lleva una mutación *cdc15*, pero también mutaciones en *ade1* y *ade2*, no deseables para estos experimentos. Se procedió, pues, a la obtención de una cepa de genotipo adecuado. Para ello se cruzó 17-17 por S288C *can*^R. Se seleccionaron por micromanipulación 5 cigotos que, a continuación, se esporularon. Tras la rotura de ascas, las esporas se sembraron en cajas de medio mínimo con canavanina y se incubaron durante 5 días a 22°C. Se determinó el genotipo de 50 colonias aparecidas en este medio y se seleccionó para los experimentos posteriores una colonia de genotipo α *cdc15-1 can1*, a la que se denominó LC103.

2.2.2. Distancia entre *cdc15* y *ade1*

Mortimer y Hawthorne (1973) encontraron que la distancia entre *cdc15* y *ade1* debía ser muy pequeña, pues al analizar 30 tétradas procedentes de un cruceamiento de una cepa *ade1 cdc15* con un silvestre encontraron que todas eran ditipos parentales.

Con los experimentos que se describen a continuación se pretendió establecer la frecuencia de recombinación entre estos dos genes. Para ello se siguieron dos métodos:

2.2.2.1. Análisis de tétradas

Se cruzaron las cepas D286-2A (*a ade1 his1*) y LC103 (α *cdc15-1 can1*). Los diploides se selecciona-

ron sembrando la mezcla conjugante en cajas con medio mínimo e incubándolas a 37°C. Se indujo la esporulación de tres de las colonias diploides y se micromanipularon y analizaron 38 tétradas (Tabla VII).

Como se esperaba, todos los genes, excepto *cdc15* y *ade1*, son independientes. Al no haber encontrado ninguna tétrada que contenga esporas recombinantes *cdc15 ade1* no se puede determinar la frecuencia de recombinación. Sin embargo, se puede estimar que la frecuencia R de tétradas con esporas recombinantes (tetratipos y ditipos recombinantes) es menor de $\frac{3.84}{N + 3.84}$ con una probabilidad del 95% (Spiegel, 1969) siendo N el tamaño de la muestra (68, acumulando los datos de Mortimer y Hawthorne y los obtenidos en esta Tesis). Como además, R debe ser mayor que la frecuencia de recombinación, se puede estimar que la frecuencia de recombinación tiene una probabilidad de más del 95% de ser menor de 5,5%.

TABLA VII. Análisis de tétradas del cruzamiento D286-2A x LC103.

Par de genes	Tipo de asca		
	Ditipo Parental	Ditipo Recombinante	Tetratipo
<i>ade1 cdc15</i>	38	0	0
<i>ade1 his1</i>	7	3	28
<i>ade1 can1</i>	5	8	25
<i>cdc15 can1</i>	5	10	23
<i>his1 can1</i>	7	3	28
<i>his1 cdc15</i>	8	3	27

2.2.2.2. Análisis de esporas en masa

Del mismo diploide D286-2A/LC103 se analizaron esporas en masa. Una vez rotas las ascas, se sembraron en cajas con medio mínimo con histidina, adenina y canavanina y se incubaron a 22°C. El 57.4% de las colonias aparecidas eran de color rosa siguiendo la segregación esperada de *ade1*. De 196 colonias de color rosa, 6 resultaron ser termosensibles. Podemos, pues, estimar la frecuencia de recombinación en un 3.2% y acotarla entre un 1.11% y un 6.42% con un intervalo de confianza del 95% (Rohlf y Sokal, 1969).

2.2.3. Capacidad de detección de colonias rosas entre colonias blancas

Con este experimento se pretendió estudiar la capacidad de detectar colonias blancas. Para ello se sembró un número fijo de mutantes rosas (20 aproximadamente) y distintos números (10^2 a 10^6) de células blancas.

Como cepa de color blanco se utilizó S288C can^R; como cepa rosa, X30/3C. Se inocularon sendos medios nutritivos líquidos con cada una de las cepas y se incubaron durante la noche a 30°C con aireación. Se hicieron las diluciones apropiadas de cada uno de los cultivos. El último tubo de dilución fue común para los dos. Con él se sembraron cajas de medio nutritivo y de medio mínimo con histidina y adenina, que se incubaron durante 6 días. En las placas en la que la

densidad de siembra era muy alta, las colonias se contaron con la ayuda de una lupa binocular NIKON SMZ-6.

La Figura 16 muestra la detectabilidad de las colonias rosas en medio nutritivo; los resultados en medio mínimo fueron similares.

2.2.4. Inducción por nitrosoguanidina de mutantes rosas en la cepa LC103

Se centrifugaron células LC103 que habían estado creciendo en medio nutritivo líquido, se resuspendieron en tampón tris-maleato de pH 7.8 y se trataron con 20 µg/ml de nitrosoguanidina durante 30 minutos. Después de lavar las células por dos veces con agua estéril, se sembraron en cajas de medio nutritivo para estimar la letalidad. Para estimar las frecuencias de reversión a Cdc15⁺ y de aparición de colonias rosas, se sembraron, además, 40 cajas de medio mínimo con adenina, la mitad de las cuales se incubaron a 37°C y el resto a 22°C. Dada la alta densidad de siembra, las colonias rosas se contaron con la ayuda de una lupa binocular NIKON SMZ-6. La Tabla VIII presenta los resultados de tres experimentos de este tipo.

Entre 771 revertientes Cdc15⁺ aparecidos espontáneamente no se encontró ninguno rosa.

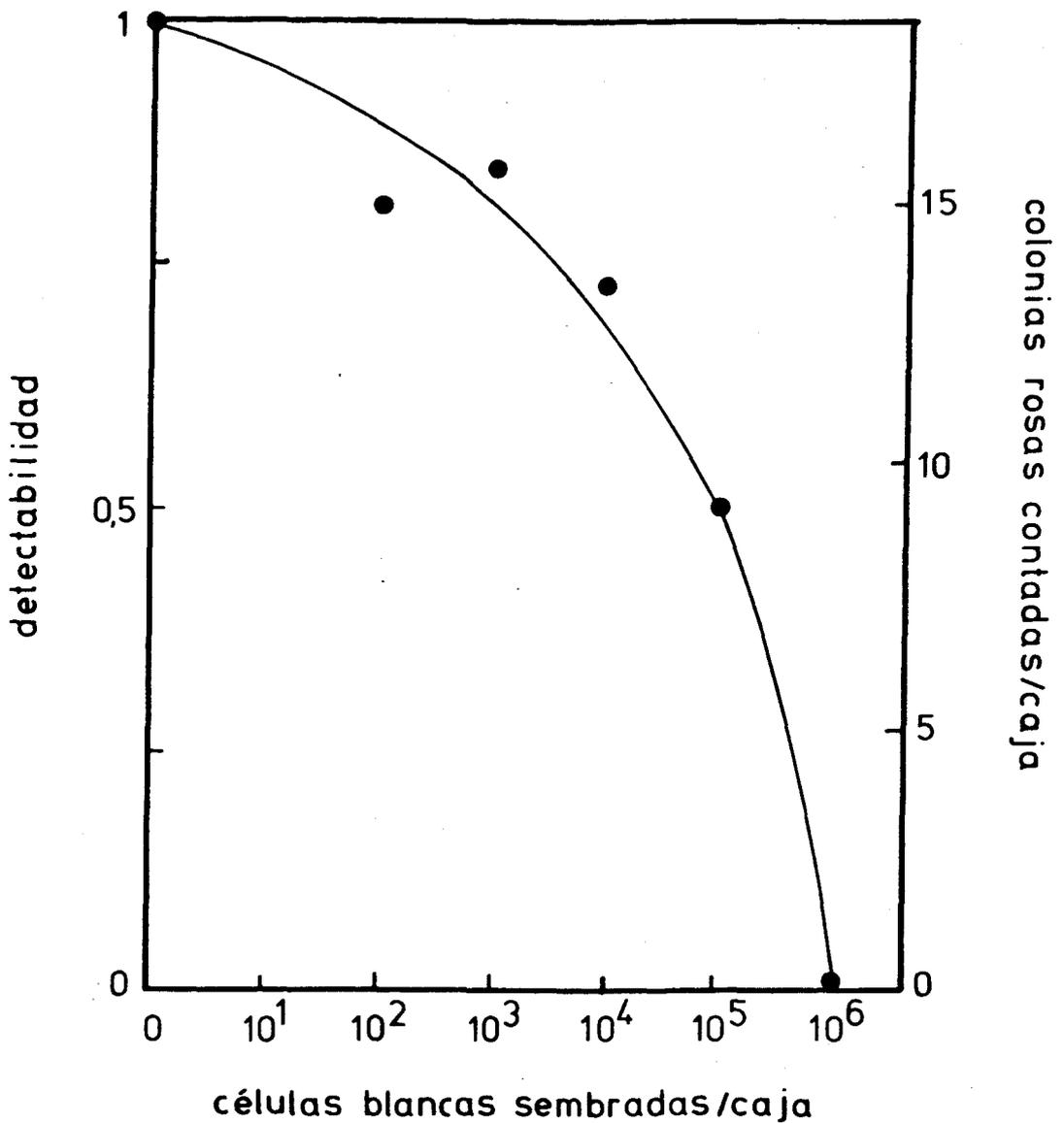


Figura 16. Detección de un pequeño número de colonias rosas entre muchas colonias blancas, sembradas en cajas de medio nutritivo. En la escala de la izquierda se da la detectabilidad de las colonias rosas, o sea, su probabilidad de detección según el número de colonias blancas presentes en la misma caja.

TABLA VIII. Supervivencia y frecuencia de mutantes rosas que aparecen entre los supervivientes y los revertientes Cdc15⁺, después de tratar la estirpe LC103 con nitrosoguanidina.

	Experimento		
	1	2	3
Supervivencia %	29.0	16.8	4.0
Entre los supervivientes:			
- mutantes rosas	-	102	157
- su frecuencia	-	1.45×10^{-3} *	2.09×10^{-3} *
Frecuencia revertientes Cdc ⁺	8.8×10^{-6}	4×10^{-5}	2.3×10^{-6}
Entre los revertientes Cdc ⁺ :			
- mutantes rosas	22	2	9
- su frecuencia	1.46×10^{-3}	1.06×10^{-3}	1.97×10^{-3}

* Frecuencias corregidas según la detectabilidad de los mutantes rosas (Fig.16).

Para determinar si las frecuencias de mutantes rosas entre los supervivientes y entre los revertientes Cdc^+ son distintas se realizó un test de diferencia de proporciones aplicando la transformación arco-seno (Sokal y Rohlf, 1969) mediante la fórmula:

$$t_s = \frac{\arcsen \sqrt{p_1} - \arcsen \sqrt{p_2}}{\sqrt{820.8 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

donde p_1 es la proporción muestral de rosas entre supervivientes, p_2 es la proporción muestral de rosas entre revertientes, n_1 es el tamaño muestral de los supervivientes y n_2 es el tamaño muestral de los revertientes.

Haciendo los cálculos, t_s resulta ser 0.82 que es muy inferior al valor crítico del 95%. Esto quiere decir que no hay diferencia significativa entre ambas muestras. Por tanto, no se observa comutación entre *cdc15* y *ade1*.

2.2.5. Inducción por nitrosoguanidina de mutantes rosas en la cepa S288C can^R

Los genes que, al ser mutados, dan lugar a fenotipo rosa son sólo dos: *ade1* y *ade2*. Podría parecer sorprendente la alta frecuencia (1/575, aproximadamente) de colonias rosas que aparecen después de tratar con nitrosoguanidina la cepa LC103. En consecuencia, se investigó la aparición de este tipo de mutantes en la cepa protótrofa S288C can^R , siguiendo el mismo protocolo que con la cepa LC103, excepto que todas las cajas se incubaron a 30°C. La supervi-

vencia fue del 15.8% y se obtuvo una frecuencia corregida de colonias rosas de 1/645. La frecuencia de inducción y detección de mutantes rosas no es afectada, por tanto, por la presencia de la mutación *cdc15*.

2.3. Localización en el genomio de mutaciones inducidas simultáneamente

Se cree que en casi todos los genes pueden ocurrir mutaciones que produzcan un fenotipo termosensible, es decir, mutaciones que hagan que las cepas que las lleven crezcan a temperatura baja (22°C) pero no a temperatura alta (37°C) (Edgar y Lielausis, 1964).

En los experimentos que se van a comentar a continuación se trataron células de *S. cerevisiae* con nitrosoguanidina, se aislaron dobles mutantes resistentes a la canavanina y termosensibles (Can^RTs) y se localizaron por recombinación mitótica y meiótica las mutaciones *tss*, responsables del fenotipo Ts. Si las mutaciones inducidas por nitrosoguanidina afectan a genes en replicación, se espera descubrir cuántos puntos de replicación simultáneos al que replica al gen *can1* existen en el genomio de *S. cerevisiae* y dónde se localizan.

2.3.1. Aislamiento de mutantes Can^RTs

Se trataron con nitrosoguanidina células de la cepa X30/3C, cultivadas en medio nutritivo, e inme-

diatamente se sembraron en cajas de medio mínimo que contenían canavanina que se incubaron a 22°C. Las colonias que aparecieron en estas cajas se trasplantaron a dos cajas de medio mínimo que se incubaron a 37°C y 22°C, respectivamente. De este modo, entre unas 1000 colonias probadas, se encontraron 91 mutantes termosensibles que se denominaron LC1 a LC91. Llamamos provisionalmente *tss1* a *tss91* a las mutaciones correspondientes.

Para asegurarse de que las mutaciones que confieren resistencia a la canavanina a las cepas LC1 a LC91 están en el gen *can1*, se cruzaron 20 de estas cepas por F11, portadora de la mutación *can1-1*. Los diploides se seleccionaron sembrando la mezcla conjugante en medio mínimo. Todos los diploides crecieron en medio con canavanina, por lo que se concluyó que las mutaciones Can^{R} obtenidas están en el gen *can1*.

2.3.2. Localización en el genoma de las mutaciones *tss*

Se cruzaron las cepas LC1 a LC91 por F4. Los diploides LC1/F4 a LC91/F4 se seleccionaron sembrando la mezcla conjugante en medio mínimo. Todos los diploides crecieron a 37°C en cajas de medio mínimo, por lo que se concluyó que todas las mutaciones *tss* son recesivas.

Entre estos diploides se seleccionaron recombinantes mitóticos *can1/can1* sembrándolos en cajas de medio mínimo con 180 µg canavanina/ml. La frecuencia espontánea de aparición de colonias Can^{R} fue de 5×10^{-4} .

Puesto que la frecuencia espontánea de mutantes Can^{R} es de 1×10^{-6} , se presume que sólo una de cada quinientas colonias Can^{R} así obtenidas es el resultado de homocigotización por mutación espontánea.

Algunas colonias *can1/can1* se trasplantaron a cajas de medio mínimo que se incubaron a 37°C para averiguar si también eran homocigóticas para *tss*. Si la mutación *tss* estuviera en el mismo brazo cromosómico que *can1*, la recombinación mitótica podría originar células homocigóticas para ambos genes a la vez.

De los 91 diploides LC1/F4 a LC91/F4, sólo 23 dieron lugar a colonias de fenotipo $\text{Can}^{\text{R}}\text{Ts}$, con las frecuencias presentadas en la Tabla IX y en la Figura 17. Los datos indican que las mutaciones *tss* se agrupan en dos bloques: las muy ligadas a *can1*, con más del 90% de Ts entre los Can^{R} , y otras más lejanas, con porcentajes de Ts entre los Can^{R} no significativamente distintos de 12%.

Con el fin de comprobar estos resultados, se hizo esporular a los 23 diploides cuyas mutaciones *can1* y *tss* pueden aparecer simultáneamente. Se seleccionaron las esporas en medio mínimo con canavanina, adenina, histidina y treonina y se estudiaron sólo colonias de color rosa ($\text{Ade}2^{-}$), para estar seguros de que eran haploides. La Tabla IX muestra la frecuencia de recombinación meiótica entre las mutaciones *tss* y *can1*. Aquí también se obtienen dos grupos de mutantes *tss*: los ligados y los independientes de *can1*.

TABLA IX. Ligamiento mitótico y recombinación meiótica entre las mutaciones *tss* y *can1* de las cepas LC1 a LC91. El ligamiento mitótico es la proporción de colonias diploides *Can^R* que son también *Ts*; sólo se indican las cepas en que el resultado fue distinto de cero. La recombinación meiótica es la proporción de ascosporas *Can^R* que no son *Ts*.

Cepa	Ligamiento mitótico		Recombinación	
	%	Límites confianza	%	Límites confianza
LC1	13.5	8.7 - 18.4	58	47.7 - 67.8
LC2	13.6	8.7 - 18.4	40	30.3 - 50.3
LC3	7	3.8 - 11.5	36	26.6 - 46.2
LC4	100	96.4 - 100	16	9.4 - 24.7
LC6	99	96.4 - 99.8	13	5.6 - 34.7
LC8	7	2.9 - 13.9	50	39.8 - 60.2
LC9	7.1	2.9 - 13.9	19	7.7 - 38.6
LC17	1.5	0.02- 8.9	48.5	37.9 - 58.2
LC19	13.0	2.5 - 31.3	42	28.2 - 56.8
LC20	18.5	6.8 - 40.7	41	31.5 - 76.9
LC25	8.6	2.8 - 20.5	44,	30.0 - 58.7
LC27	8.3	2.1 - 26.5	51	43.9 - 58.1
LC33	12.5	6.4 - 20.0	51	40.8 - 61.1
LC40	1	0.02- 5.5	38.5	22.7 - 59.4
LC48	94	83.4 - 98.7	10	3.3 - 21.8
LC56	6.4	2.3 - 12.6	46	31.8 - 60.7
LC59	12	4.5 - 24.3	-	
LC69	6	1.3 - 16.6	48	37.9 - 58.2
LC70	4	0.5 - 13.7	48	33.7 - 62.8
LC71	10	3.3 - 21.9	42	32.2 - 52.3
LC80	22	11.5 - 35.9	30	6.7 - 65.2
LC90	100	92.9 - 100	19	11.9 - 28.1
LC91	100	92.9 - 100	14	0.3 - 44.5

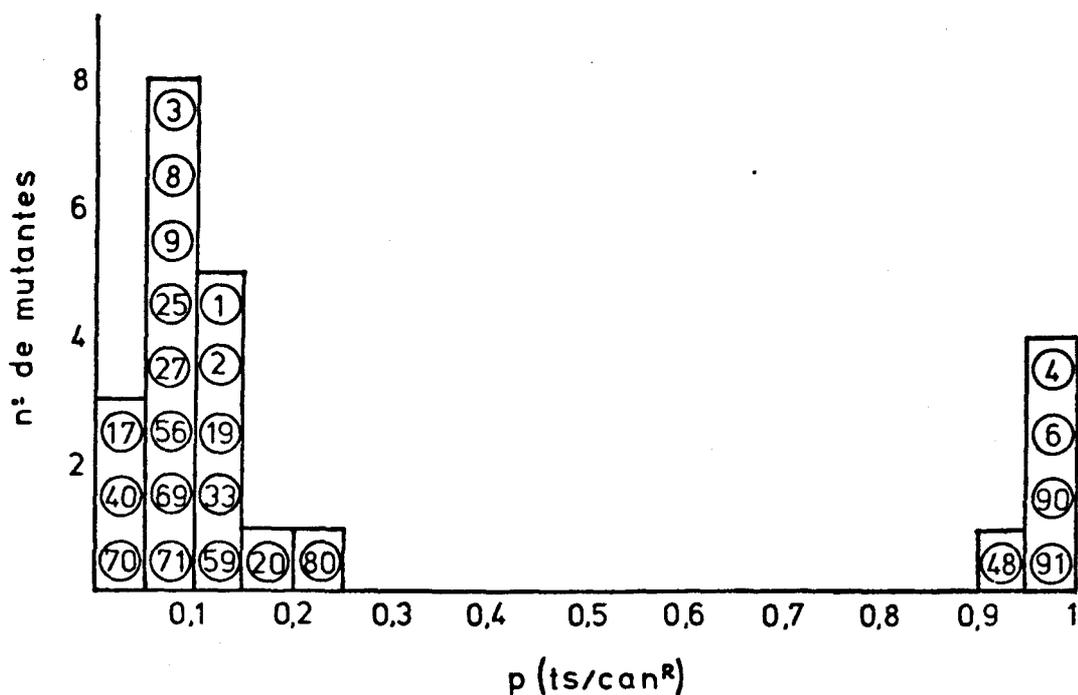


Figura 17. Distribución de los mutantes *tss* según la frecuencia de cohomocigotización de la mutación *tss* respectiva con *can1*. ① representa a *tss1*, ② a *tss2*, etc. No aparecen aquellos cuya frecuencia de cohomocigotización fué cero.

2.3.3. Complementación entre mutantes *tss*

Entre las esporas provenientes de los 23 diploides IL/F4 estudiados en el apartado anterior, se seleccionaron dos por cepa que tuvieran los fenotipos α Ade⁻ Thr⁻ y α Ade⁻ His⁻ Ts, respectivamente. La conjugación entre todos ellos se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, apartado 6.2.

3. ESTIMACION DEL NUMERO DE GENES DE *S. CEREVISIAE*

En *S. cerevisiae* se conocen bastante bien las rutas biosintéticas de aminoácidos y bases, las enzimas que intervienen y los genes que las determinan. Sin embargo se conocen muy pocos genes de los muchos que debe haber para determinar las proteínas indispensables de la célula.

Llamamos termosensibles auxótrofos a aquellos mutantes termosensibles en medio mínimo pero capaces de crecer a temperatura restrictiva en medio nutritivo. Termosensibles generales son, por el contrario, los que no crecen a temperatura restrictiva, sea cual sea el medio.

Esta parte del trabajo se propone estimar el número de genes de *S. cerevisiae* a partir de la proporción de mutantes termosensibles obtenidos tras tratamiento con nitrosoguanidina que son termosensibles auxótrofos.

Se aplicó también el mismo método a *Escherichia coli*, cuyo genomio es mucho más y mejor conocido.

3.1. *Aislamiento de termosensibles en S. cerevisiae y caracterización de los termosensibles auxótrofos*

Se cultivó la cepa S288C en medio nutritivo líquido a 37°C para evitar la aparición de termosensibles espontáneos; se lavaron y resuspendieron sus células en tampón tris-maleato (pH 7.5) y se añadió nitrosoguanidina a una concentración final de 100 µg/ml. Después de 30 minutos de tratamiento, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio nutritivo líquido. Se cultivaron a 22°C con aireación durante 4 horas, que corresponden a dos generaciones, y se sembraron en cajas de medio mínimo que se mantuvieron a 22°C durante tres días. Las colonias obtenidas fueron trasplantadas con palillos de dientes estériles a 2 cajas de medio mínimo que se incubaron a 37°C y a 22°C, respectivamente. Las colonias que no crecieron a 37°C se clasificaron como termosensibles. Para detectar los termosensibles auxótrofos, se trasplantaron los termosensibles a dos cajas de medio nutritivo, que se incubaron a 37 y a 22°C, respectivamente.

Este experimento se realizó tres veces en la forma descrita y dos veces sustituyendo el medio nutritivo líquido por medio mínimo líquido. En la primera versión sobrevivieron el 13.6% de las células tratadas y resultaron termosensibles el 1% de los sobrevivientes; en la segunda el 29% y el 0.5%, respectivamente. Los resultados globales de búsqueda de termosensibles y termosensibles auxótrofos aparecen en la Tabla X.

TABLA X. Resultados de la búsqueda y caracterización de mutantes termosensibles y termosensibles auxótrofos.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>
Supervivientes ensayados	13470	13500
Termosensibles	146	52
Termosensibles auxótrofos	17	14
Termosensibles auxótrofos caracterizados	3	8

Los termosensibles auxótrofos se caracterizan como se indica en el apartado 5.1. de Métodos, incubando las cajas a 37°C. De esta forma se identificó uno que requería aspartato, otro lisina y otro metionina. Los demás crecieron dudosamente o nada en las cajas con los suplementos.

3.2. Aislamiento de termosensibles en *E. coli* y caracterización de los termosensibles auxótrofos

La estirpe bacteriana usada fue *E. coli* B/5, protótrofa, derivada de *E. coli* B de L. Gorini.

Se inoculó medio mínimo líquido (tampón trisales y 2% de glucosa) con una colonia bacteriana y se incubó a 42°C con aireación hasta fase estacionaria. A continuación se diluyó 1:50 en medio nuevo y se dejó crecer hasta una concentración aproximada

de 10^8 bacterias/ml, tomando medidas de la densidad óptica a 450 nm con un espectrofotómetro Bausch & Lomb "Spectronic 20". Tras centrifugación, las células se resuspendieron en tampón tris-maleato, pH 7.5, al que añadió nitrosoguanidina a una concentración final de 100 μ g/ml. Se incubó durante 30 minutos a 37°C. Después de lavar un par de veces con tampón tris-sales, se resuspendieron en medio mínimo donde recrecieron durante 3 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo, las células se sembraron en cajas de medio mínimo que se incubaron a 30°C durante 2 días.

El aislamiento de termosensibles y termosensibles auxótrofos es en todo similar a los realizados en *S. cerevisiae* excepto que se consideró 30°C como temperatura permisiva y 42°C como restrictiva y se utilizó caldo de Luria (1% triptona (Difco), 0.5% extracto de levadura (Difco) y 1% cloruro sódico, ajustado todo a pH 7.2) como medio nutritivo.

El experimento se repitió 2 veces en las mismas condiciones, siendo la supervivencia media del 35%. Los resultados aparecen en la Tabla X.

Los termosensibles auxótrofos se caracterizaron como se indica en el apartado 5.2. de Métodos incubándolos a 42°C. Así se identificaron 3 Met⁻, 4 Arg⁻ y 1 Ile⁻ Val⁻. El resto no pudo ser identificado inequívocamente por dar crecimiento dudoso o nulo en las cajas con suplementos.

DISCUSION

La nitrosoguanidina ha sido utilizada como generador de mutantes en una gran variedad de organismos. Sin embargo, la gran mayoría de los estudios realizados para encontrar las condiciones óptimas de mutagénesis o para dilucidar su mecanismo de acción se han llevado a cabo en bacterias y, concretamente, en *E. coli*. Estos estudios se han tomado como términos de comparación para interpretar los resultados de esta Tesis, sobre todo cuando no había trabajos semejantes en eucariontes.

1. LETALIDAD Y MUTAGENICIDAD PRODUCIDAS POR NITROSO-GUANIDINA EN DISTINTAS CONDICIONES

De entre los resultados obtenidos en este apartado, sobresale por su interés la marcada diferencia entre las curvas de aparición de mutantes Can^{R} y mutantes blancos (o sea, petites, como se indicó en el apartado 1.0. de Resultados).

La naturaleza de los mutantes Can^{R} es, sin duda alguna, nuclear puesto que, como se ha dicho anteriormente, se localizan en el gen *can1*. Los mutantes petites, sin embargo, pueden ser de dos tipos: nucleares o citoplásmicos. Mayer y Legator (1970) encontraron que, a bajas dosis de nitrosoguanidina, que producían un 13% de petites como máximo, casi el 50% de ellos eran nucleares. Esto no es de extrañar teniendo en

cuenta que se han descrito más de 45 genes nucleares que dan lugar a fenotipo petite por mutación. Sin embargo, las altas frecuencias de petites observadas en prácticamente todos nuestros experimentos, inducen a pensar que la mayor parte son citoplásmicos.

A la vista de lo expuesto podría deducirse que la diferencia existente entre las curvas de aparición de mutantes Can^R y petites está en la distinta naturaleza de ambas. En contra de esta hipótesis estarían los resultados de Dawes y Carter (1974). Estos autores encontraron que la inducción por nitrosoguanidina de resistencias a eritromicina y oligomicina determinadas citoplásmicamente tiene un máximo en un cierto momento del ciclo celular, por lo que supusieron que el ADN mitocondrial se replica en un período discreto del ciclo. Posteriormente, Sena et al. (1975) demostraron que la síntesis de ADN mitocondrial se realiza continuamente durante el ciclo. Esta aparente contradicción puede resolverse suponiendo que la mutagénesis por nitrosoguanidina no coincide con la replicación general del ADN mitocondrial, sino con una síntesis de ADN asociada a replicación (Oliver, 1977).

Dawes y Carter (1974) encontraron también que la inducción de petites es constante en todos los estadios del ciclo y unas diez mil veces más frecuente que la de las resistencias mencionadas. Esto debe indicar que existe una diferencia fundamental entre la inducción de petites y el mecanismo de mutagénesis por nitrosoguanidina.

Se sabe que la nitrosoguanidina inhibe la síntesis de proteínas, al parecer por destrucción de los ribosomas y que provoca errores de lectura del ARN mensajero por los ribosomas aun activos (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967b; Süßmuth et al., 1969). En *Euglena gracilis*, la nitrosoguanidina provoca la pérdida de cloroplastos (McCalla, 1965). La estreptomicina, inhibidor de la síntesis de proteínas en procariontes y en las mitocondrias y cloroplastos de eucariontes, y causante de errores de lectura (Davies et al., 1964), también provoca la pérdida de cloroplastos en *Euglena* (Scher y Collinge, 1964). Se sabe que otros inhibidores de la síntesis de proteínas en procariontes, como la eritromicina, inducen la formación de petites en *S. cerevisiae* (Clark-Walker y Linnane, 1966). De la misma manera podrían inducirse petites en *S. cerevisiae* mediante nitrosoguanidina. Por otro lado, la nitrosoguanidina inactiva proteínas ya formadas (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1967b; Sugimura et al., 1968); si como sugirió Williamson (1970), la integridad de las mitocondrias está regulada por represión, la inducción de petites por nitrosoguanidina podría deberse a destrucción de las proteínas represoras.

Así pues, la diferencia encontrada en esta Tesis entre la inducción de mutantes Can^R y la de petites es consecuente con la hipótesis que supone distintos modos de acción de la nitrosoguanidina en uno y otro caso.

Ciñéndose ya a la inducción de mutantes nucleares (Can^R) se puede constatar una diferencia notable entre los resultados encontrados en *S. cerevisiae* y

los descritos para *E. coli*. En este último la proporción de mutantes entre supervivientes alcanza un máximo a los pocos minutos de tratamiento y se satura, aun cuando la letalidad siga aumentando (Cerdá Olmedo y Hanawalt, 1968; Kondo et al., 1970; Jiménez Sánchez y Cerdá Olmedo, 1975). En *S. cerevisiae*, y como ya fue descrito por Schwaier (1965) para la inducción de revertientes Ade6⁺, la curva de frecuencia de mutantes alcanza un máximo hacia el 30% de supervivencia y disminuye si continúa el tratamiento. Para explicar este hecho se propone la existencia, en el cultivo expuesto, de subpoblaciones celulares de distinta susceptibilidad a los efectos letales y mutagénicos de la nitrosoguanidina. Como ya se comentó en el apartado 1.2.2. de Resultados, a dosis bajas estaríamos observando la respuesta de las poblaciones más sensibles, en las que la nitrosoguanidina induce muchos mutantes. A dosis mayores se va exterminando a estas poblaciones más sensibles y, en consecuencia, la frecuencia de mutantes disminuye. Esta hipótesis no parece ser válida para los cultivos exponenciales puesto que, según muestra la Figura 12, la frecuencia de mutantes aparecidos es prácticamente la misma a todas las dosis.

La teoría de las subpoblaciones celulares se ve apoyada por el hecho de que la frecuencia de termosensibles entre mutantes Can^R seleccionados tras tratamiento con nitrosoguanidina de cultivos estacionarios (Resultados, apartado 2.3.1.), es diez veces mayor que la encontrada entre supervivientes generales al tratamiento (Figura X). Los Can^R representan la subpoblación sensible a la nitrosoguanidina; los supervivientes generales, a la población total.

Otra peculiaridad de los cultivos exponenciales es que las frecuencias de mutantes obtenidos sembrando inmediatamente después del tratamiento mutagénico son muy inferiores a las obtenidas con cultivos estacionarios. Esta observación es totalmente opuesta a lo conocido hasta ahora sobre mutagenicidad de la nitrosoguanidina para cultivos en distintas fases del crecimiento (Adelberg et al., 1965; Cerdá Olmedo et al., 1968; Hince y Neale, 1975; Munz y Leupold, 1970). La contradicción no existiría si la diferencia estuviera, no en la inducción de mutaciones, sino en su expresión, ya que la mutación *can1* es recesiva.

Como se ha visto en el apartado 1.3. de Resultados, la incubación en medio líquido posterior al tratamiento mutagénico y anterior a la selección de mutantes, conduce a una mayor frecuencia de éstos, al facilitar la expresión de la mutación. Este efecto de expresión retardada es mucho más acusado en cultivos exponenciales que en estacionarios, según se deduce de la Figura 14. Así pues parece ser que la inducción de mutaciones es mayor en los cultivos exponenciales, pero la expresión inmediata de estas mutaciones está favorecida en los estacionarios.

El envenenamiento de las células por canavanina debe ser tanto más rápido cuanto mayor sea la actividad permeasa de la arginina, cuanto menos arginina haya en la célula y cuanto más activa sea la síntesis de proteínas. Los cultivos estacionarios presentan deceleración de la síntesis de proteínas y, como consecuencia, acumulaciones internas de aminoácidos e inhibición de las permeasas de éstos (Grenson et al., 1968). Todos estos factores contribuirán a hacer más lento el envenenamiento por canavanina y, por tanto,

facilitarán la expresión de las mutaciones *can1* que se hayan inducido.

Por el contrario, las células exponenciales permearán y metabolizarán de forma muy activa la canavanina y, por tanto, se envenenarán rápidamente; los mutantes que hayan adquirido una mutación *can1* no dejarán de envenenarse hasta que las permeasas activas sean sustituidas por las nuevas, inactivas.

La expresión fenotípica de la resistencia a canavanina, y por tanto, presumiblemente la adquisición de nuevas permeasas, requiere sólo el transcurso de una o dos generaciones (Gocke y Manney, 1979 ; Figura 9 de esta Tesis).

También merece comentario aparte el efecto del pH en la letalidad y la mutagenicidad producidas por nitrosoguanidina. Ya los primeros estudios revelaron que la nitrosoguanidina es muy inestable en solución (McKay, 1948) y que esta inestabilidad depende, entre otras cosas, del pH, siendo mínima a pH alrededor de 5 y máxima a pH extremos (Mandell y Greenberg, 1960). La descomposición depende no sólo del pH, sino también de la composición química del tampón y de la concentración del mismo (McCalla et al., 1968; La Polla et al., 1972).

Se piensa que los productos de descomposición de la nitrosoguanidina son los principales responsables de la letalidad y la mutagenicidad debido, precisamente, a que en algunos organismos las condiciones de descomposición correlacionan con las frecuencias de mutantes (McCalla et al., 1968; Cerdá Olmedo y

Hanawalt, 1968; Kimball et al., 1971; Neale, 1972). Sin embargo, en algunos casos no existe esta correlación (Kasahara, 1971; Hince y Neale, 1974) e incluso puede darse un proceso contrario como el descrito por Hyams y Davis (1971) en *Chlamydomonas reinhardii* y el encontrado en esta Tesis.

Los resultados presentados en esta Tesis no pretenden descubrir los motivos de la relación entre pH y mutagenicidad, sino optimizar las condiciones de mutagénesis en *S. cerevisiae*. Sin embargo, deberán tenerse en cuenta en la elaboración de teorías futuras sobre los mecanismos de letalidad y mutagénesis.

Los demás resultados obtenidos en el apartado 1 pueden resumirse en una serie de recomendaciones dedicadas a aquellos que deseen obtener un gran número de mutantes utilizando nitrosoguanidina. Estas recomendaciones serían:

Tratar suspensiones que contengan 10^8 células/ml en tampón tris-maleato, 50 mM, pH 7.8, con 20 μ g de nitrosoguanidina/ml durante 15 minutos a 37°C y con agitación esporádica. Se espera obtener frecuencias de mutación mayores si se tratan células en fase exponencial.

2. COMUTACION

La nitrosoguanidina, como se ha comentado con anterioridad, ejerce su acción mutagénica preferentemente en las zonas en replicación. Esto no quiere

decir que la replicación del ADN sea indispensable para la mutagénesis, ya que se obtienen mutantes tratando células en estado estacionario (Brusick, 1972; Resultados, apartado 1.4.2.), células hambrientas (Schwaier et al., 1966; Resultados, apartado 1.4.1.) e incluso células gonadales (Browning, 1968). No obstante, tanto en *S. cerevisiae* como en otros organismos eucarióticos, la mayoría de los mutantes se inducen en el período S del ciclo mitótico (Lee y Jones, 1973; Dawes y Carter, 1974; Kee y Haber, 1975; Burke y Fangman, 1975), lo que indica una clara relación entre la síntesis de ADN y la mutagénesis.

El paso siguiente sería investigar si se da comutación en este tipo de organismos. En esta Tesis se ha abordado el estudio de la comutación en *S. cerevisiae* desde dos puntos distintos: comutación entre genes ligados y comutación entre genes que correplican. Resumiendo los resultados, no se ha encontrado comutación entre genes próximos en ninguno de los casos explorados (*his4ABC* y *cdc15 adel*).

Al mismo tiempo que se realizaba esta tesis, Dawes et al., abordaron el estudio de la comutación en *his4*, publicando sus resultados en 1977. Estos autores tampoco encontraron comutación, pero sus resultados son inconcluyentes, porque la cepa utilizada no llevaba la mutación *hol1-1*, que permite la utilización del histidinol. Así, aún sembrando en medios con histidinol, sólo seleccionaban los revertientes His4C⁺ que además fueran protótrofos.

Como hemos dicho anteriormente *his4A*, *his4B* e *his4C* son transcritos a una misma molécula de ARN. Incluso parece ser (Keeseey et al., 1979) que este ARN es traducido a una sola cadena polipeptídica que tiene las tres actividades enzimáticas. Esto explicaría que una sola mutación de cambio de sentido pueda afectar simultáneamente a las tres actividades (Fink y Styles, 1974). Por otro lado, el no encontrar comutantes podría deberse a que las mutaciones en *his4A* o en *his4B* coinducidas con la reversión de *his4C*, impidan el buen funcionamiento de la deshidrogenasa del histidinol de modo que los comutantes serían incapaces de crecer en medio con histidinol. De hecho se han encontrado cepas mutantes *his4A* y/o *his4B* que contienen muy poca actividad deshidrogenasa del histidinol (Shaffer et al., 1969). Como conclusión de esta experiencia se saca que para este tipo de estudios no es conveniente elegir genes policistrónico.

En el caso del sistema *cdc15* y *ade1* obviamente no existe el mismo problema que en *his4ABC*. Se ha estimado una frecuencia de recombinación entre ambos de 1.1% a 6.4%. Basándose en que el mapa completo de *S. cerevisiae* tiene unos 3000 centiMorgan (Hawthorne y Mortimer, 1976) y que el genomio haploide contiene 1.9×10^7 pares de nucleótidos, puede estimarse que la distancia entre *cdc15* y *ade1* es de 7000 a 40000 pares de nucleótidos. En *E. coli* se da comutación entre genes separados un máximo de 1.5% del mapa, que equivalen a unos 60000 pares de nucleótidos (Bachman et al., 1976).

La distancia de comutación no tiene por qué ser la misma para todos los organismos. De hecho es mayor en *Streptomyces coelicolor* (Randazzo et al., 1976) y parece ser menor en *S. cerevisiae*, según se ha visto en esta Tesis. Es muy posible que la mayor complejidad de la cromatina eucariótica y la menor velocidad de replicación propia de los eucariontes (Hand, 1978) sean las responsables de esta diferencia entre *S. cerevisiae* y *E. coli*.

La distancia genética, en general, es proporcional a la física, pero no siempre es así. De este modo, podría ocurrir que la distancia de comutación en *S. cerevisiae* sea la misma que en *E. coli* pero que *cde15* y *adel* estén físicamente demasiado alejados para que se dé este fenómeno.

Más esperanzadores son los resultados de la localización de mutaciones termosensibles coinducidas con mutaciones *can1*. La discusión de estos resultados merece unas consideraciones previas:

Teniendo en cuenta la longitud total del ADN de *S. cerevisiae* y el tiempo que tarda en replicarse, se deduce que en su genomio deben haber muchos puntos de iniciación de la replicación. Esto ha sido confirmado por estudios genéticos (Kee y Haber, 1975) y de microscopía electrónica (Newlon et al., 1974). Se calcula que debe haber unos 8 replicones por cromosoma (Carter, 1975) pero no todos se replican a la vez puesto que al microscopio electrónico se ha visto un máximo de 3 burbujas por cromosoma (Newlon et al., 1974). La iniciación y terminación de la replicación no se realiza al azar, sino en un momento determinado

del período S que es el mismo para todas las células (Kee y Haber, 1975). Como consecuencia, cada gen se replica en un intervalo discreto del período S, como se ha comprobado experimentalmente mediante mutagénesis con nitrosoguanidina. Efectivamente, para cada gen existe un momento del período S en el cual la frecuencia de mutantes es máxima (Dawes y Carter, 1974; Burke y Fangman, 1975; Kee y Haber, 1975). Este máximo de mutantes desaparece si se inhibe la síntesis de ADN (Carter y Dawes, 1978). Como consecuencia de todo lo expuesto se esperaría que los genes que se repliquen simultáneamente, comuten.

En esta Tesis se ha abordado la comutación de genes que correplikan estudiando dobles mutantes $Can^R Ts$, según se describe en el apartado 2.3. de Resultados. Este tipo de abordaje se ha aplicado ya y con éxito a *Bacillus subtilis* (Siccardi et al., 1976).

Mediante recombinación mitótica y meiótica se estableció que de las 91 mutaciones estudiadas, 23 están en el mismo brazo cromosómico (VL) que *can1*. Esta proporción tan alta podría explicarse si, al igual que ocurre en las células de los mamíferos (Hand, 1975), en *S. cerevisiae* los puntos de iniciación de la replicación adyacentes se activan simultáneamente con una frecuencia mayor que la esperada por azar, permaneciendo activos durante el mismo tiempo. Además, ya que *can1* se replica muy al principio del período S (Burke y Fangman, 1975) es de esperar que en ese momento muchos de los puntos de replicación permanezcan aun inactivos.

Cuatro de las mutaciones estudiadas están muy cerca de *can1* o entre *can1* y el telómero del cromoso-

ma y diecinueve están aparentemente en el mismo brazo cromosómico, pero cerca del centrómero, según los resultados de recombinación mitótica. Cabría pensar que algunos de estos diecinueve podrían estar en el otro brazo (VR) del mismo cromosoma y haber cohomocigotizado con *can1*, no por recombinación mitótica, sino por no disyunción. Sin embargo, la no disyunción es muy poco frecuente, en comparación con la recombinación mitótica, unas 300 veces menos, en el caso de *cyc2* (Parry y Zimmermann, 1976). Si la situación de *can1* fuera semejante a la de *cyc2*, sólo el 0.3% de los homocigotos *can1* se habrían originado por no disyunción, lo que no afectaría notablemente a los resultados.

La complementación entre los mutantes Ts revela que todos, o al menos la inmensa mayoría, han afectado a genes distintos. Esto sugiere que la sincronía entre los puntos de replicación no es perfecta y que cuando un complejo replicador pasa por *can1*, los demás complejos replicadores no están exactamente siempre en el mismo gen, aunque sí dentro de una zona determinada.

Los resultados expuestos no contradicen los obtenidos por Dawes et al. en un trabajo realizado simultáneamente y publicado en 1977, en el que estudiaron la coinducción de mutaciones *tss* con reversiones de *Leu1⁻* a *Leu1⁺* y de *His4⁻* a *His4⁺*. No encontraron ninguna mutación *tss* ligada ni a *leu1* ni a *his4*, pero debe tenerse en cuenta el bajo número de termosensibles estudiados (38 y 16 respectivamente).

3. NUMERO DE GENES DE *S. CEREVISIAE*

El núcleo haploide de *S. cerevisiae* contiene 1.9×10^7 pares de nucleótidos. Si se considera que cada gen tenga, como promedio, 1500 pares de nucleótidos (Lewin, 1975) y que todo el genomio esté bien aprovechado, *S. cerevisiae* tiene ADN suficiente para unos 13000 genes. Por este mismo razonamiento, el genomio de *E. coli* podría tener cerca de cinco mil genes, es decir, unas tres veces menos que *S. cerevisiae*. Sin embargo hasta ahora sólo se han localizado unos 600 genes en cada uno de los mapas de estos dos organismos, y la mayoría de ellos relacionados con rutas metabólicas.

Watson (1975) estimaba que para el metabolismo básico de *E. coli* serían suficientes entre 600 y 800 proteínas. No hay motivos para pensar que estos números deban ser muy diferentes en *S. cerevisiae*. A esta cifra se deben sumar unos 200 genes implicados en funciones propias de la célula eucariótica, estudiados ya en *S. cerevisiae*, como los que dirigen los ciclos mitótico y meiótico. Así pues, las funciones conocidas justifican menos del 10% del ADN nuclear de *S. cerevisiae*.

Como aplicación práctica de la mutagénesis con nitrosoguanidina se pretendió estimar el número de genes de *S. cerevisiae* a partir de la proporción de termosensibles auxótrofos existente entre los termosensibles obtenidos tras tratamiento mutagénico. Este método se aplicó también a *E. coli* para comprobar su validez. Se supone que todos los genes pueden su-

frir mutaciones que den lugar a fenotipo termosensible y que la probabilidad de que esto ocurra es la misma para los genes implicados en las rutas metabólicas que para los demás.

Para la estimación sólo tendremos en cuenta los termosensibles auxótrofos que han podido ser caracterizados (3 en *S. cerevisiae* y 8 en *E. coli*), puesto que los demás sólo se sabe que no son termosensibles en medio nutritivo, lo que puede deberse, entre otras muchas causas, a que, sea cual sea su defecto, el medio nutritivo les ayuda a crecer mejor.

El número de genes se deduce de la siguiente relación: $N/n = A/a$, donde N es el número total de genes, A es el número de genes cuyas mutaciones dan lugar a auxotrofia para los requerimientos estudiados (ver listas en Métodos, Apartados 4.1 y 4.2), n es el número de termosensibles encontrados y a es el número de termosensibles auxótrofos caracterizados. Para *S. cerevisiae*; $A = 102$ (Hawthorne y Mortimer, 1976), $a = 3$, $n = 146$ (Resultados, apartado 3.1.) por lo que N puede estimarse en 4964. Para *E. coli*; $A = 70$ (Bachman et al., 1976), $a = 8$, $n = 52$ (Resultados, apartado 3.2.) y N puede estimarse en 455.

El cálculo subestima sin duda el número de genes de *E. coli*, lo que hace suponer que el número de genes de *S. cerevisiae* debe ser mayor de cinco mil. A pesar de que la muestra de termosensibles estudiada no es todo lo grande que sería deseable, la estimación está dentro de lo esperado. Es además congruente con la realizada por Hereford y Rosbash (1977). Estos autores encontraron que durante la vida vegetativa de *S. cerevisiae* se sintetizan unos 3000 ó 4000 ARN men-

sajeros distintos que hibridan con el 20% del ADN nuclear, lo que supone que sólo el 40% del genomio da lugar a proteínas. A este número deben sumarse los genes que no se expresan en las condiciones estudiadas como son los que dirigen la conjugación y el ciclo meiótico, los que permiten la utilización de azúcares distintos de la glucosa y que normalmente están reprimidos, etc.

En todo caso, la proporción de termosensibles auxótrofos entre los termosensibles es mayor en *E. coli* que en *S. cerevisiae* (Tabla X). Esto es congruente con la idea de que la célula eucariótica, por tener un funcionamiento más complejo, precisa de muchos más genes que *E. coli* para llevar a cabo sus funciones vitales.

APENDICE I. MATERIALES

1. CEPAS DE *S. CEREVISIAE*

1.1. *Nomenclatura genética*

Se siguieron las recomendaciones elaboradas en la "IV International Conference on Yeast Genetics" y recogidas en el Yeast Genetics Supplement, del nº 31 (1969) de Microbial Genetics Bulletin.

Los genes se designan mediante tres letras (que hacen referencia a la actividad fisiológica que determinan) y un número. Las mutaciones y los alelos se indican mediante el símbolo del gen afectado y otro número separado del primero por un guión. Los alelos cuyo fenotipo sea dominante se escriben con mayúsculas; los recesivos, con minúsculas. En este trabajo se utilizan las designaciones génicas siguientes:

his, ade, thr, ura, tyr, lys y *trp* designan genes de las rutas biosintéticas de los aminoácidos y bases a los que corresponde cada abreviatura. Las mutaciones en estos genes producen auxotrofia para ese aminoácido o base.

aro son genes comunes a las rutas biosintéticas de varios aminoácidos aromáticos. Una cepa portadora de una mutación en *aro2* requiere simultáneamente fenilalanina, triptófano, tirosina y p-aminobenzoato.

hol1 es un gen asociado a la correcta compartimentación del histidinol. Las cepas que poseen el alelo *HOL1-1* son capaces de utilizar el histidinol exógeno para fabricar histidina; la cepa silvestre, no.

mal, *gal* y *suc* son genes implicados en la fermentación de maltosa, galactosa y sacarosa, respectivamente. Los alelos silvestres respectivos no permiten la fermentación del azúcar correspondiente.

cde son genes relacionados con el ciclo celular. Los mutantes en estos genes son termosensibles por ser incapaces de proseguir su ciclo a 37°C.

can1 determina la estructura de la permeasa de la arginina. Los mutantes en *can1* son resistentes a canavanina, un análogo tóxico de la arginina.

cyh se caracteriza por mutaciones que producen resistencia a cicloheximida.

tss y *tsm* son genes cuyo producto no ha sido identificado; las mutaciones respectivas impiden a las cepas que las poseen crecer a 37°C, es decir, las hacen termosensibles.

lts son genes cuyo producto se desconoce y cuyas mutaciones hacen a la cepa criosensible, es decir, incapaz de crecer a 4°C.

cyc1 es el gen estructural del iso-1-citocromo *c*.

sup son genes implicados en la síntesis de proteínas en los que se producen mutaciones supresoras de terminaciones o de desfases.

a y α son alelos del gen *mat* que determina el sexo.

En esta tesis los fenotipos se designan con las mismas o parecidas letras que los genes responsables pero en caracteres redondos y con mayúscula inicial; se usan algunos signos adicionales: + para el alelo silvestre; - para los mutantes; los superíndices R y S indican resistencia y sensibilidad a un inhibidor, respectivamente.

1.2. *Cepas haploides no originales*

En la Tabla XI se relacionan las cepas utilizadas en esta Tesis provenientes de las colecciones de:

- La Cruz del Campo, S.A., Sevilla (LCC).
- Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (CSH).
- Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, California (YGSC).

1.3. *Cepas haploides originales*

En la misma Tabla XI se indican las cepas obtenidas durante la realización de esta Tesis. El origen de cada una se especifica dando la cepa de la que procede, el mutágeno utilizado (NG = tras mutagénesis con nitrosoguanidina) o el cruzamiento del que deriva. En este último caso constan las cepas parentales separadas por el signo \times para indicar cruzamiento, y si la selección de los haploides se hizo por micromanipulación de ascas ("microm.") o análisis de esporas en masa ("masa").

TABLA XI

Relación de estirpes utilizadas en esta Tesis

Nombre	Genotipo	Origen
4828-8C	α <i>his4C-290 HOL1-1</i>	LCC
4829-2B	α <i>his4C-280 HOL1-1</i>	"
4832-5D	α <i>his4C-564 HOL1-1</i>	"
S288C	α <i>mal gal2</i>	"
S288C can ^R	α <i>mal gal2 can1</i>	"
F16	α <i>his4-Δ15 ade2-1 can1</i>	"
F11	α <i>his1 adel can1-1</i>	"
F4	α <i>thr4 CAN1</i>	"
D286-2A	α <i>adel his1</i>	"
D273-11A	α <i>adel his1</i>	"
17 - 17	α <i>adel ural gal1 tyr1 his7 lys2 ade2 cdc15-1</i>	YGSC
XJ6/4B	α <i>thr1 can1</i>	J. Polaina
X30/3C	α <i>his4-Δ15 ade2-1</i>	F6×F16, microm.
LC103	α <i>cdc15-1 can1</i>	17-17×S288Ccan ^R , masa
LC1 a LC91	α <i>his4-Δ15 ade2-1 can1 tss1 a tss91</i>	de X30/3C, NG

2. PRODUCTOS QUIMICOS

Nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina), Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

Canavanina (sulfato de L-canavanina), Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U.S.A.

Helicasa ("Suc d'Helix pomatia"), L'Industrie Biologique Française, Clichy, Francia.

3. TAMPONES

3.1. *Tampón tris-maleato*

Preparado según Gomori (1955). Una solución 0.2 M de tris-maleato (solución A) se diluyó hasta 0.05 M, mediante adición de una solución de OHNa 0.02 M y de agua destilada en las proporciones adecuadas para cada pH. De esta forma se prepararon tampones a pH entre 5.5 y 8.5.

Solución A: Tris(hidroximetil)aminometano, 24.2 g; ácido maleico, 23.2 g; agua destilada, 1000 ml.

Se esterilizó por filtración a través de un filtro Millipore HA de 0.47 μ m de diámetro de poro, succionando con una bomba de vacío Millipore.

3.2. *Tampón acetato*

Preparado según Gomori (1955), mezclando en las proporciones adecuadas soluciones 0.1 M de ácido acético (solución A) y acetato sódico (solución B). De esta forma se prepararon tampones a pH entre 4 y 5.5.

Solución A: ácido acético, 11.55 ml; agua destilada, 1000 ml.

Solución B: acetato sódico, 16.4 g; agua destilada, 1000 ml.

Se esterilizó por filtración como anteriormente.

3.3. *Tampón citrato-tris-maleato*

Se preparó una solución que contenía ácido cítrico, 2.65 g; citrato sódico, 3.67 g; tris(hidroximetil)amino-metano, 1.512 g; ácido maleico, 1.45 g, en 200 ml de agua destilada. Los distintos pHs se obtuvieron diluyendo 20 ml de esta solución hasta 0.005 M mediante adición de agua destilada y una solución 1 M de OHNa ó de HCl en las proporciones adecuadas. De esta forma se prepararon tampones a pH entre 4 y 8.5.

Se esterilizó por filtración como en los casos anteriores.

3.4. *Tampón tris-sales*

Formado por un 9% de solución A, 90% de agua destilada y 1% solución B, mezcladas en este orden, ajustado a pH 7.4 y esterilizado en autoclave.

Solución A: Tris(hidroximetil)aminometano, 120 g; agua destilada, 500 ml; disolver; ClH 37%, 75 ml; ClK, 20 g; PO_4HNa_2 , 6.6 g; SO_4Na_2 , 3.5 g; agua destilada, 400 ml; ClNH_4 , 20 g.

Solución B: $\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g; agua destilada, 100 ml.

4. MEDIOS LIQUIDOS

4.1. Medio mínimo usual (SD)

Se utilizó un medio sintético formulado por Wickerham (1946) que contiene vitaminas, microelementos, sales y una fuente de nitrógeno y comercializado con el nombre de "Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos" (Difco).

El medio mínimo lo constituye una solución 0.67% de Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos y 2% de glucosa en agua destilada. En cada caso se le añadieron los suplementos requeridos por cada estirpe a las concentraciones indicadas en Sherman y Lawrence (1974). El histidinol se utilizó a una concentración 2 mM.

El medio se esterilizó en autoclave; los suplementos, por filtración.

4.2. Medio mínimo sin fuente de nitrógeno

Constituido por una solución 1.2% en agua destilada de un medio sintético comercializado como "Yeast

Carbon Base" (Difco) que contiene vitaminas, microelementos, sales y una fuente de carbono. Se suplementó y esterilizó como en el apartado anterior.

4.3. Medio nutritivo (YPD)

Constituído por extracto de levadura (Difco), 1%; peptona (Difco), 2% y glucosa, 2%. La glucosa se esterilizó por separado.

5. MEDIOS SOLIDOS

Preparados añadiendo 2% de agar a los medios líquidos. Después de esterilizar en autoclave, cuando la temperatura era de 45°C, se añadían los requerimientos necesarios y se vertían aproximadamente 25 ml en cada caja de Petri.

5.1. Medios con canavanina

Los mutantes can^R se seleccionaron en medio mínimo con canavanina (60 µg/ml) y los requerimientos de la estirpe de que se tratara. Los recombinantes mitóticos can^R se seleccionaron en medio mínimo con 180 µg de canavanina por ml.

5.2. Medio de preesporulación

Se trata de un medio muy rico que contiene 0.8% de extracto de levadura, 0.3% de peptona y 10% de glucosa. La glucosa se esteriliza por separado.

5.3. *Medio de esporulación*

Se trata de un medio muy pobre que contiene 0.1% de extracto de levadura, 0.05% de glucosa y 1% de acetato potásico (McClary et al., 1959).

5.4. *Medio para fermentación (YPG)*

Contiene glicerol como fuente de carbono no fermentable a una concentración de 3% v/v. Lleva además 1% de extracto de levadura y 2% de peptona. En este medio crecen las células capaces de respirar ("grandes"), pero no las "petites", exclusivamente fermentadoras.

APENDICE II. METODOS

1. CRECIMIENTO

Los medios líquidos se inocularon con una colonia de la cepa que se deseaba cultivar y se incubaron con aireación forzada. El título de células se estimó al microscopio con ayuda de una cámara de Petroff-Hausser (C.A. Hausser & Son, Philadelphia, U.S.A).

La temperatura normal de incubación para cultivos sólidos y líquidos fue de 30°C. Para las cepas termosensibles se tomó como temperatura permisiva 22°C y como temperatura restrictiva 37°C.

2. ENUMERACION DE CELULAS VIVAS

Después de efectuar las diluciones adecuadas en agua estéril, se tomaron muestras que se esperaba contuvieran 100-200 células vivas, se extendieron en cajas de medio nutritivo, y se incubaron durante 1-4 días. Para cada determinación se sembraron dos cajas y se hizo el promedio de ambas. Se definen como células vivas las que dan lugar a colonias en medio sólido.

3. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA

La nitrosoguanidina se disolvió en agua destilada (1.0 mg/ml) y se prepararon tubitos con alícuotas de

1 ml. Se guardaron congelados en la oscuridad hasta el momento de ser usados y en ningún caso se volvieron a congelar.

Se emplearon dos métodos distintos de mutagénesis.

3.1. *En medio sólido*

Se preparó un cultivo en medio líquido y se incubó hasta alcanzar unas 3×10^7 células/ml. Entonces se centrifugó y se resuspendió en agua estéril. Se hicieron las diluciones oportunas y el contenido del último tubo de dilución se dividió en cuatro partes iguales a las que se añadió nitrosoguanidina hasta una concentración final de 1000, 100, 10 y 0 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Alícuotas de 0.1 ml de estas soluciones se sembraron en cajas con distintos medios.

3.2. *En tampón*

Células que habían estado creciendo en medio nutritivo líquido se centrifugaron y se resuspendieron en tampón tris-maleato de pH 7.8. Se añadió nitrosoguanidina a una concentración final de 20 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó a 37°C con agitación esporádica pero sin aireación. En algunos experimentos se utilizaron tampones y concentraciones de nitrosoguanidina distintos de los aquí especificados, lo que se indicará oportunamente. Al final del tratamiento deseado se tomaron alícuotas de la suspensión de células, se diluyeron en 10 ml de agua estéril, se centrifugaron y se lavaron dos veces con agua estéril.

4. CARACTERIZACION DE AUXOTROFOS

Se utilizaron cajas de medio mínimo suplementadas con distintas mezclas de aminoácidos y bases. Estas mezclas fueron:

4.1. Para mutantes auxótrofos de *S. cerevisiae*

		Cajas				
		nº 1	nº 2	nº 3	nº 4	nº 5
Cajas	nº 6	A	G	cys	met	U
	nº 7	his	leu	ile	val	lys
	nº 8	phe	tyr	trp	thr	pro
	nº 9	glu	ser	ala	asp	arg

4.2. Para mutantes auxótrofos de *E. coli*

		Cajas			
		nº 1	nº 2	nº 3	nº 4
Cajas	nº 5	tyr	trp	phe	
	nº 6	his	ile	val	leu
	nº 7	asp	glu	arg	
	nº 8	lys	met	cys	thr

Cada caja lleva los aminoácidos y bases que están en su fila o columna a la concentración especificada en Sherman y Lawrence (1974) para *S. cerevisiae*; para *E. coli* se añadieron 20 µg/ml de cada aminoácido y 10 µg/ml de cada base.

Una cepa que requiera un solo suplemento crece en una de las cajas numeradas de 1 a 5 y en otra de

las numeradas del 6 al 9. Si sólo crece en una caja es porque requiere una combinación de nutrientes para vivir.

5. CONJUGACION

Se utilizaron tres métodos diferentes. La elección de uno u otro dependió del número de cepas a conjuguar.

5.1. *Conjugación de pocas (una a tres) cepas de un sexo por pocas (una a tres) cepas del otro sexo*

Se tomaron con sendos palillos de dientes cantidades equivalentes de biomasa de colonias de cada sexo cultivadas en medio sólido y se mezclaron sobre una caja de medio nutritivo extendiéndolas sobre una superficie de un cm² aproximadamente. Se incubaron durante 5-8 horas (termosensibles). Se comprobó que el proceso había tenido lugar normalmente observando los cigotos al microscopio.

5.2. *Conjugación de muchas (más de tres) cepas de un sexo por muchas (más de tres) cepas del otro sexo*

Sobre agar nutritivo se sembraron las cepas a conjuguar en trazos paralelos espaciados un cm. Cada caja contenía cepas del mismo sexo. Se incubaron durante un día. Transcurrido este tiempo se presionó la caja que contenía las estirpes de sexo *a* sobre un terciopelo.

La caja que contenía las de sexo α se presionó sobre el mismo terciopelo, con los trazos girados 90° respecto de los primeros. Se obtiene así una red en cuyos nudos tienen lugar los cruzamientos. Seguidamente se presionó sobre el terciopelo una caja de agar nutritivo que se incubó durante un día.

5.3. *Conjugación de muchas cepas de un sexo por una del otro sexo*

Se trasplantaron con palillos de dientes una colonia de cada cepa de uno de los sexos a una caja de agar nutritivo. En otra caja de agar nutritivo se sembraron unas 10^6 células de la única estirpe del otro sexo. Ambas cajas se incubaron durante 24 horas, se transfirieron al mismo terciopelo y de éste a una caja de agar nutritivo que se incubó durante un día.

6. SELECCION DE DIPLOIDES

Se utilizaron dos métodos distintos. El uso de uno u otro dependió del genotipo de los conjugantes.

6.1. *Por siembra de la mezcla conjugante en medio selectivo para el diploide*

Utilizado cuando las estirpes conjugantes poseían auxotrofías complementarias. Con un asa se tomó parte de la mezcla conjugante y se sembró en una caja carente de los suplementos exclusivos de cada estirpe conjugante, de modo que sólo podían crecer los diploides.

6.2. *Por micromanipulación de cigotos*

Utilizado cuando los diploides no eran seleccionables por el método anterior. Mediante un micromanipulador (Lawrence Precision Machine, California) fijado a un microscopio invertido Nikon (modelo MS) y dotado de una microaguja de cristal, se separaron algunos cigotos de la mezcla conjugante cuando estaban emitiendo su primera yema. Estos cigotos tienen una morfología inconfundible (llamada en "flor de lis").

7. ESPORULACION

Una colonia del diploide que se deseaba que esporulara, se transfirió con un palillo de dientes estéril a una caja de medio de preesporulación extendiéndola sobre una superficie de aproximadamente un cm² y se incubó durante dos días. La biomasa obtenida se transfirió a una caja de medio de esporulación que se incubó durante 2-3 días. El proceso se consideraba satisfactoriamente concluido cuando al menos el 50% de las células se habían transformado en ascas visibles al microscopio.

8. SELECCION DE LAS ASCOSPORAS

Se utilizaron dos métodos distintos. La utilización de uno u otro se justifica en cada caso.

8.1. *Análisis de esporas en masa*

Las ascas se rompieron por tratamiento con helicasa (Johnston y Mortimer, 1959). Para ello se tomó biomasa satisfactoriamente esporulada y se suspendió en 0.2 ml de una solución 1:4 de helicasa en agua estéril. Se incubó a 30°C durante 1 h 30 min agitando la esporádicamente. La suspensión se diluyó entonces añadiéndole 3 ml de agua estéril y se sometió a ultrasonidos mediante un sonicador Sonifier B-12 (Branson Sonic Power, C.O.) durante 1 minuto a una intensidad de 50-60W. La rotura de las ascas y la separación de las ascosporas se comprobaron al microscopio.

La selección de las ascosporas que interesaban se hizo sembrando diluciones apropiadas en medio mínimo suplementado con los requerimientos que se especifican en cada caso.

8.2. *Análisis de tétradas por micromanipulación*

Se suspendió una pequeña cantidad de biomasa esporulada en 0.2 ml de una solución 1:4 de helicasa en agua estéril y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Esta suspensión debe ser tratada con cuidado para que las ascosporas provenientes de una misma asca no se separen. Las cuatro esporas de cada asca se separaron mediante el micromanipulador descrito en el apartado 6.2. y se sembraron en agar nutritivo.

APENDICE III. BIBLIOGRAFIA

- ADELBERG, E.A., MANDEL, M. y CHEIN-CHING-CHEN, G. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18, 788-795.
- AHMED, A. (1968) *Molec. gen. Genet.*, 103, 185-193.
- BACHMANN, B.J., LOW, K.B. y TAYLOR, A.L. (1976) *Bacteriol. Rev.*, 40, 116-167.
- BECK, J.C., MATTOON, J.R., HAWTHORNE, D.C. y SHERMAN, F. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60, 186-193.
- BECK, J.C., PARKER, J.H., BALCAVAGE, W.X. y MATTOON, J.R. (1970) En "Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts" ed. N.K. Boardman, A.W. Linnae y R.M. Smibe, pp. 194-204, North Holland, Amsterdam.
- BRITTEN, R.J. y KOHNE, D.E. (1968) *Science*, 161, 529-540.
- BROWNING, L.S. (1968) *Genetics*, 60, p. 165.
- BRUSICK, D.J. (1972) *J. Bacteriol.*, 109, 1134-1138.
- BURKE, W. y FANGMAN, W.L. (1975) *Cell*, 5, 263-269.
- BYERS, B. y GOETSCH, L. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 5056-5060.
- CARTER, B.L.A. (1975) *Cell*, 6, 259-268.

CARTER, B.L.A. y DAWES, I.W. (1978) Mutat. Res., 51, 289-292.

CERDA OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. (1967a) Mutat. Res., 4, 369-371.

CERDA OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. (1967b) Biochim. Biophys. Acta, 142, 450-464.

CERDA OLMEDO, E. y HANAWALT, P.C. (1968) Molec. gen. Genet., 101, 191-202.

CHRISTIANSEN, C., LETH BAK, A., STENDERUP, A. y CHRISTIANSEN, G. (1971) Nature New Biol., 231, 176-177.

CIFERRI, O., SORA, S. y TIBONI, O. (1969) Genetics, 61, 567-576.

CLARK-WALKER, G.D. y LINNANE, A.W. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 8-13.

COHN, W. y CRAWFORD, I.P. (1976) J. Bacteriol., 127, 367-379.

CULOTTI, J. y HARTWELL, L.H. (1971) Exp. Cell Res., 67, 389-401.

DAVIES, J., GILBERT, W. y GORINI, L. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 51, 883-889.

DAWES, I.W. y CARTER, B.L.A. (1974) Nature, 250, 709-712.

DAWES, I.W., MACKINNON, D.A., BALL, D.E., HARDIE, I.D., SWEET, D.M., ROSS, F.M. y MACDONALD, F. (1977) Molec. gen. Genet., 152, 53-57.

DUGLE, D.L., CAMPBELL, C.E., MEEKER, B.E. y GILLESPIE, C.J. (1973) *Mutat. Res.*, 18, 237-245.

EDGAR, R.S. y LIELAUSIS, I. (1964) *Genetics*, 49, 649-662.

EDLUND, T., GUSTAFSSON, P. y WOLF-WATZ, H. (1976) *J. Mol. Biol.*, 108, 295-303.

FAYE, G., FUKUHARA, H., GRANDCHAMP, C., LAZOWSKA, J., MICHEL, F., CASEY, J., GETZ, G.S., COEN, D., DEUTSCH, J., DUJON, B., NETTER, P. y SLONIMSKI, P.P. (1973) *Biochimie*, 55, 779-792.

FINK, G.R. (1966) *Genetics*, 53, 445-459.

FINK, G.R. (1970) En "Methods in Enzymology" vol. 17A, pp. 59-78 (Tabor, H. y Tabor, C.W. eds.), Academic Press, New York.

FINK, G.R. y STYLES, C.A. (1974) *Genetics*, 77, 231-244.

GOCKE, E. y MANNEY, T.R. (1979) *Genetics*, 91, 53-66.

GOLDRING, E.S., GROSSMAN, L.I., KRUPNICK, D., CRYER, D.R. y MARMUR, J. (1970) *J. Mol. Biol.*, 52, 323-335.

GOMORI, G. (1955) En "Methods in Enzymology" vol. I, pp. 138-146 (S.P. Colowick y N.D. Kaplan, eds.) Academic Press, New York.

GRENSON, M., CRABEEL, M., WIAME, J.M., BECHET, J. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30, 414-419.

- GRENSON, M., MOUSSET, M., WIAME, J.M. y BECHET, J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 127, 325-338.
- GUEROLA, N., INGRAHAM, J.L. y CERDA OLMEDO, E. (1971) *Nature*, 230, 122-125.
- HAND, R. (1975) *J. Cell Biol.*, 64, 89-97.
- HAND, R. (1978) *Cell*, 15, 317-325.
- HARTWELL, L.H. (1967) *J. Bacteriol.*, 93, 1662-1670.
- HARTWELL, L.H. (1970) *Ann. Rev. Genet.*, 4, 373-395.
- HARTWELL, L.H. (1974) *Bacteriol. Rev.*, 78, 164-198.
- HARTWELL, L.H., CULOTTI, J. y REID, B. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 66, 353-359.
- HAWTHORNE, D.C. y MORTIMER, R.K. (1976) En "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology" pp. 765-832 (G.D. Fasman, ed.), CRC Press, Florida.
- HEREFORD, L.M. y ROSBASH, M. (1977) *Cell*, 10, 453-462.
- HILLMAN, J.D. y FRAENKEL, D.G. (1975) *J. Bacteriol.*, 122, 1175-1179.
- HINCE, T.A. y NEALE, S. (1974) *Mutat. Res.*, 24, 383-387.
- HINCE, T.A. y NEALE, S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2, p. 53.

- HYAMS, J. y DAVIS, D.R. (1971) *Mutat. Res.*, 14, 381-389.
- ISHII, Y. y KONDO, S. (1975) *Mutat. Res.*, 27, 27-44.
- JIMENEZ SANCHEZ, A. y CERDA OLMEDO, E. (1975) *Mutat. Res.*, 28, 337-345.
- JOHNSTON, J.R. y MORTIMER, R.K. (1959) *J. Bacteriol.*, 78, p. 292.
- KASAHARA, H., UDAKA, S. e IKEDA, Y. (1971) *Agr. Biol. Chem.*, 35, 226-232.
- KAUDEWITZ, V.F. (1955) *Z. Naturforsch.*, 10, 562-572.
- KEE, S.G. y HABER, J.E. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1179-1183.
- KEESEY, J.K., Jr., BIGELIS, R. y FINK, G.R. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 7426-7433.
- KONDO, S., ICHIKAWA, H., IWO, K. y KATO, T. (1970) *Genetics*, 66, 187-217.
- KIMBALL, R.F., LIU, M. y SETLOW, J.K. (1971) *Mutat. Res.*, 13, 289-295.
- KOVÁČ, L., LACHOWICZ, T.M. y SLONIMSKI, P.P. (1967) *Science*, 158, 1564-1567.
- LEE, R.W. y JONES, R.F. (1973) *Molec. gen. Genet.*, 121, 99-108.

LA POLLA, J.P., HARRIS, C.M. y VARY, J.C. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 49, 133-138.

LEWIN, B. (1975) Cell, 4

LLOVERES, C.P. y CERDA OLMEDO, E. (1973) J. Bacteriol.,
116, 527-530.

MANDELL, J.D. y GREENBERG, J. (1960) Biochem. Biophys.
Res. Commun., 3, 575-577.

MATILE, P.H., MOOR, H. y ROBINOW, C.F. (1974) En "The
Yeast", I, pp. 219-302 (A.H. Rose, J.S. Harrison, eds.)
Academic Press, New York.

MAYER, V.W. y LEGATOR, M.S. (1970) Mutat. Res., 9,
193-198.

McCALLA, D.R. (1965) Science, 148, p. 497.

McCALLA, D.R., REUVERS, A. y KITAI, R. (1968) Can. J.
Biochem. Physiol., 46, 807-811.

McCLARY, D.O., NULTY, W.L. y MILLER, G.R. (1959) J.
Bacteriol., 78, 362-368.

McKAY, A.F. (1948) J. Am. Chem. Soc., 70, 1974-1975.

McKAY, A.F. y WRIGHT, G.F. (1947) J. Am. Chem. Soc.,
69, 3028-3030.

MORTIMER, R.K. y HAWTHORNE, D.C. (1973) Genetics, 74,
33-54.

- MORTIMER, R.K. y HAWTHORNE, D.C. (1975) En "Methods in Cell Biology", XI, pp. 221-233, Academic Press, New York.
- MOUNOLOU, J.C., JAKOB, H. y SLONIMSKI, P.P. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 218-224.
- MUNZ, P. y LEUPOLD, U. (1970) Mutat. Res., 9, 199-212.
- NAGAI, S., YANGAGISHIMA, N. y NAGAI, H. (1961) Bacteriol. Rev., 25, 404-426.
- NEALE, S. (1972) Mutat. Res., 14, 155-164.
- NEALE, S. (1976) Mutat. Res., 32, 229-266.
- NELSON, D.A., BELTZ, W.R. y RILL, R.L. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1343-1347.
- NEWLON, C.S., PETES, T.D., HEREFORD, L.M. y FANGMAN, W.L. (1974) Nature, 247, 32-35.
- NORDSTRÖM, K. (1967) J. Gen. Microbiol., 48, 277-281.
- OESCHEGER, M.P. y BERLYN, M.K.B. (1974) Molec. gen. Genet., 134, 77-83.
- OLIVER, S.G. (1977) J. Theor. Biol., 67, 195-201.
- PARRY, J.M. y ZIMMERMANN, F.K. (1976) Mutat. Res., 36, 49-66.

PRESCOTT, D.M. (ed.) (1975) "Methods in Cell Biology" XI, Yeast Cells, Academic Press, New York.

PRESCOTT, D.M. (ed.) (1975) "Methods in Cell Biology, XII, Yeast Cells, Academic Press, New York.

RANDAZZO, R., SCIANDRELLO, G., CARERE, A., BIGNAMI, M., VELCICH, A. y SERMONTI, G. (1976) *Mutat. Res.*, 36, 291-302.

RANDAZZO, R., SCIANDRELLO, G. y BIGNAMI, M. (1977) *Microbial Genet. Bull.*, 42, 12-13.

ROHLF, F.J. y SOKAL, R.R. (1969) "Statistical Tables" W.H. Freeman and Co., San Francisco.

ROSE, A.H. y HARRISON, J.S. (eds.) (1969) "The Yeasts" 1, Biology of Yeasts, Academic Press, New York.

ROSE, A.H. y HARRISON, J.S. (eds.) (1971) "The Yeasts" 2, Physiology and Biochemistry of Yeasts, Academic Press, New York.

ROSE, A.H. y HARRISON, J.S. (eds.) (1970) "The Yeasts" 3, Yeast Technology, Academic Press, New York.

RUIZ VAZQUEZ, R. (1979) Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.

RUIZ VAZQUEZ, R., PUEYO, C. y CERDA OLMEDO, E. (1978) *Mutat. Res.*, 54, 121-129.

SCHENDEL, P.F., DEFAIS, M., JEGGO, P., SAMSON, L. y CAIRNS, J. (1978) *J. Bacteriol.*, 135, 466-475.

SCHER, S. y COLLINGE, J.C. (1964) Plant Physiol. Suppl., 39, p. 34.

SCHWAIER, R. (1965) Z. Vererbungsl., 97, 55-67.

SCHWAIER, R., ZIMMERMANN, F.K. y PREUSSMANN, R. (1966) Z. Vererbungsl., 98, 309-319.

SENA, E.P., WELCH, J.W., HALVORSON, H.O. y FOGEL, S. (1975) J. Bacteriol., 123, 497-504.

SHAFFER, B., RYTKA, J. y FINK, G. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 1198-1205.

SHERMAN, F. y LAWRENCE, C.W. (1974) en "Handbook of Genetics", 1, pp. 359-393, R.C. King (ed.), Plenum Press, New York.

SHERMAN, F., FINK, G.R. y LAWRENCE, C.W. (1977) "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor, New York.

SICCARDI, A.G., FERRARI, F.A., MAZZA, G. y GALIZZI, A. (1976) J. Bacteriol., 125, 755-761.

SLONIMSKI, P.P., PERRODIN, G. y CROFT, J.H. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun., 30, 232-239.

SMIRNOV, M.N., SMIRNOV, V.N., BUDOWSKY, E.I., INGEVECHTOMOV, S.G. y SEREBRIAKOV, N.G. (1967) Molec. Biologia, 1, 639-647.

SMITH, D.G., MARCHANT, R., MAROUDAS, N.G. y WILKIE, D. (1969) J. gen. Microbiol., 56, 47-54.

- SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. (1969) "Biometría" H. Blume Ediciones, Barcelona p. 663.
- SPIEGEL, M.R. (1969) "Estadística", McGraw Hill, México.
- SRB, A.M. (1954) Acad. Sci. Paris Compt. Rend., 239, 447-448.
- SRB, A.M. (1955) Compt. Rend. Lab. Carlesberg, Ser. Physiol., 23, p. 363.
- SUGIMURA, T., FUJIMURA, S., NAGAO, M., YOKOSHIMA, T. y HASEGAWA, M. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 170, 427-429.
- SÜSSMUTH, R., CHANDRA, P., WACKER, A. y LINGENS, F. (1969) Z. Naturforschg., 24b, 707-712.
- VELEMINSKY, J. y GICHNER, T. (1970) Mutat. Res., 10, 43-52.
- VOLCANI, B.E. y SNELL, E.E. (1948) J. Biol. Chem., 174, 893-901.
- WATSON, J.D. (1975) "Molecular Biology of the Gene", W.A. Benjamin, Inc., New York.
- WHELAN, W.L., GOCKE, E. y MANNEY, T.R. (1979) Genetics, 91, 35-51.
- WICKERHAM, L.J. (1946) J. Bacteriol., 52, 293-301.
- WILKIE, D. (1963) J. Mol. Biol., 7, 527-533.

WILLIAMSON, D.H. (1970) En "Control of Organelle Development" (P.L. Miller, ed.) pp. 247-276, Cambridge University Press.

YOSHIDA, Y. y YUKI, S. (1968) Japan J. Genet., 43, 173-179.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D. Enrique Cerdá Olmedo por haber sabido despertar en mí el interés por la Genética, por su estímulo constante y su dedicación a esta Tesis.

Al Dr. Jaime Conde Zurita por sus valiosas sugerencias y por iniciarme en el manejo de las levaduras.

A mis compañeros del Departamento, a los que son y a los que fueron, por su colaboración y apoyo moral en todo momento. Especialmente a Paco Castillo por sus valiosas críticas y su inestimable colaboración en la parte matemática de esta Tesis; a Paco Murillo, a Isabel y a Reyes que me animaron en los malos momentos y se alegraron conmigo en los buenos. Muy especialmente a Asun y a Maribel que colaboraron con eficiencia y talento en la elaboración y confección de esta Tesis; a ambas por su amistad.

A mis compañeros de Facultad, a los que son y a los que fueron, por su amistad y ayuda a lo largo de todos estos años. Especialmente a Yazán.

A la Fundación Juan March y a la Comisión Asesora para el Estudio Científico y Tecnológico por la ayuda financiera.

A Pedro, sin el cual todo hubiera sido muy difícil.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. José López Calderín
sobre "Mutación y comutación inducidas por
nitrosoguanidina en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*"
y otorgarle la calificación de Sobresaliente
"Cum Laude"

Sevilla, de Febrero 1980

El Vocal,

Milont

Presidente.

[Signature]

El Vocal,

R. Verdá Olmedo

El Secretario,

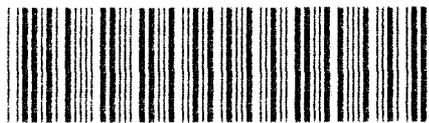
[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Doctorado

José López Calderín



500292062

FBI E TD-020

292062