



R. 4054

ANALISIS GENETICO DE LA CARIOGAMIA EN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología, por el licenciado

JULIO POLAINA MOLINA

Sevilla, Junio 1980

Director

Dr. Jaime Conde Zurita

Ponente

Prof. Enrique Cerdá Olmedo

T.D.29

TD
29



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi ~~Tesina de Licenciatura~~ _____

TESIS DOCTORAL

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios:
- Otros términos.

Firmado:

Valencia ~~Sevilla~~, a 29 de Marzo de 1995

FDO. JULIO POLAINA MOLINA
IATA - C.S.I.C.

VALENCIA

... I thought of my friends and
how much our companionship and
love meant to me and I felt very
rich in the actual treasures of
life...

Chick Corea

A mis amigos.

RESUMEN

Se han aislado y estudiado 23 estirpes mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* incapaces de llevar a cabo la fusión nuclear durante el ciclo sexual.

Se concluye que 12 de estas estirpes están afectadas en un gen denominado *KAR1* cuya existencia era conocida antes de la realización de este trabajo. Otras 5 están afectadas en otro gen, denominado *KAR2*, y una lo está en un tercer gen denominado *KAR3*. La existencia de los genes *KAR2* y *KAR3* se describe por vez primera.

No se ha demostrado cuál es el gen afectado en el caso de las restantes 5 estirpes mutantes, pero existen indicios de que dos son *kar3* y que otras dos están afectadas en un gen distinto de los anteriores.

Se sospecha que las mutaciones *kar* afectan a las placas de huso, que son las estructuras nucleares organizadoras de la mitosis y de la meiosis y el sitio por donde se unen los núcleos que se fusionan durante la conjugación sexual.

INDICE DE MATERIAS

INTRODUCCION	
EL CICLO DE VIDA DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ...	2
EL CICLO MITOTICO	5
CONJUGACION SEXUAL	8
HOMOTALISMO Y HETEROTALISMO	11
ESPORULACION	17
LA CARIOGAMIA	19
MATERIALES Y METODOS	
ESTIRPES	23
PRODUCTOS QUIMICOS	26
MEDIOS DE CULTIVO	26
CRECIMIENTO DE CULTIVOS	27
TRATAMIENTO MUTAGENICO	28
SELECCION DE MUTANTES	28
CRUZAMIENTOS	29
ESPORULACION	29
ANALISIS MEIOTICO	29
TINCION DE NUCLEOS	30
OBTENCION DE ESTIRPES DIPLOIDES CON CAPACIDAD CONJUGANTE	30
RESULTADOS	
MUTANTES AFECTADOS EN LA FUSION NUCLEAR	33
<i>Selección de mutantes</i>	33
<i>Identificación de mutantes</i>	34
<i>Comprobación genética del fenotipo mutante</i>	35
<i>Comprobación citológica del feno- tipo mutante</i>	38
<i>Mutantes atípicos</i>	38
ANALISIS MEIOTICO	40
<i>Segregación de cruzamientos $Kar^- \times Kar^+$</i> ...	41
<i>Relaciones de ligamiento entre las mu- taciones Kar</i>	49

<i>Autodiploidización en mutantes Kar⁻</i>	52
ESTUDIOS DE DOMINANCIA	55
ESTUDIOS DE COMPLEMENTACION	57
DISCUSION	
CARACTERIZACION GENETICA DE LOS MUTANTES	69
CONTROL GENETICO DE LA CARIOGAMIA	74
POSIBLES FUNCIONES AFECTADAS EN LOS MUTANTES	
Kar ⁻	75
UTILIDAD GENETICA DE LOS MUTANTES Kar ⁻	77
BIBLIOGRAFIA	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ...	3
Figura 2. Secuencia funcional de genes <i>CDC</i>	8
Figura 3. Recombinación entre el gen <i>MAT</i> y los genes portadores de información críptica para el sexo, según la hipótesis del "cassette"	14
Figura 4. Determinación de la frecuencia de fusión nuclear (%) para la estirpe Kar^+ 17-NI/CR4 y 23 mutantes Kar^-	36
Figura 5. Observación de núcleos en cigotos de <i>S. cerevisiae</i>	39
Figura 6. Estudios de dominancia	58
Figura 7. Estudios de complementación con <i>kar1</i>	63
Figura 8. Estudios de complementación con <i>kar2</i>	65

INDICE DE TABLAS

TABLA I.	Relación de estirpes utilizadas	24
TABLA II.	Cruzamientos estudiados	42
TABLA III.	Segregación meiótica del fenotipo Kar en cruzamientos $Kar^- \times Kar^+$	44
TABLA IV.	Análisis masal de esporas de los cruza- mientos XW1 y XW4	45
TABLA V.	Análisis masal de 100 esporas del cru- zamiento XW3/1	47
TABLA VI.	Segregación meiótica del cruzamiento XW3/2	47
TABLA VII.	Segregación meiótica del fenotipo Kar en cruzamientos $Kar^- \times kar1$	50
TABLA VIII.	Análisis masal de esporas de los cruza- mientos XK13 y XK14	51
TABLA IX.	Segregación meiótica del fenotipo Kar en cruzamientos $Kar^- \times kar2$	52
TABLA X.	Análisis masal de esporas de los cruza- mientos XK18 y XK19	53
TABLA XI.	Análisis meiótico del cruzamiento XK15/1.	54
TABLA XII.	Estirpes utilizadas en los estudios de dominancia	56
TABLA XIII.	Estirpes utilizadas en los estudios de complementación	61

INTRODUCCION

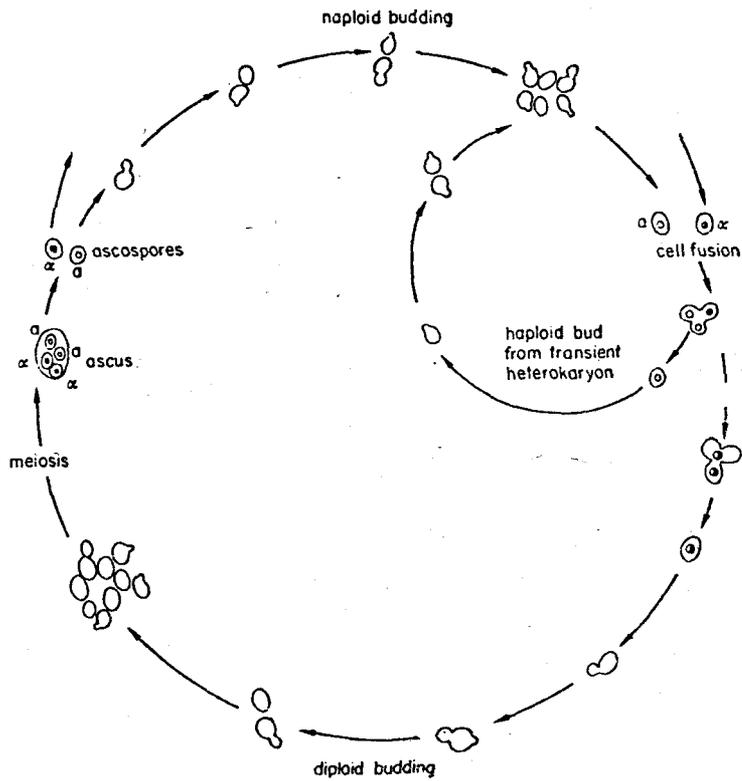
EL CICLO DE VIDA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Saccharomyces cerevisiae es una de las 349 especies de hongos designadas colectivamente como levaduras, cuya característica principal en común es que en su ciclo de vida el estado unicelular es exclusivo o al menos predominante (Lodder, 1970). Sus células pueden reproducirse vegetativamente de forma indefinida, tanto en estado haploide como diploide; en ambos casos la multiplicación celular tiene lugar por gemación. En la fase haploide existen dos sexos denominados a y α . Dos células haploides de distinto sexo, puestas en contacto, conjugan para dar un cigoto en el cual, normalmente, los dos núcleos haploides se fusionan en uno diploide. El cigoto produce por gemación células diploides, que no manifiestan capacidad sexual y que, en determinadas condiciones, esporulan dando lugar a una asca que contiene cuatro esporas haploides resultantes de una división meiótica.

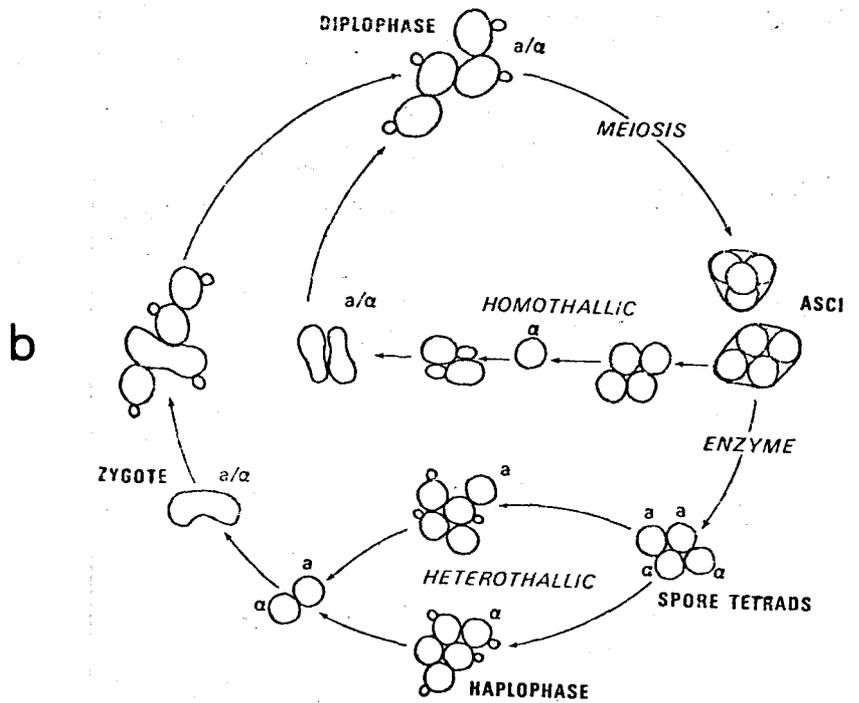
Este tipo de ciclo de vida, con una fase haploide estable, es denominado heterotálico. Algunas estirpes de *S. cerevisiae* son homotálicas, no presentan fase haploide estable; una vez los productos meióticos han sido liberados del asca, tras la primera o segunda división mitótica, opera un mecanismo de cambio de sexo que provoca la conjugación entre células hermanas para formar un cigoto diploide. Puede decirse que el ciclo de vida de las estirpes homotálicas representa un cortocircuito del ciclo heterotálico (Fig. 1).

Un amplio conjunto de características de *S. cerevisiae*: ser un eucarionte unicelular con rápido crecimiento vegetativo, la estabilidad de sus fases haploide y diploide, la facilidad con que pueden llevarse a cabo

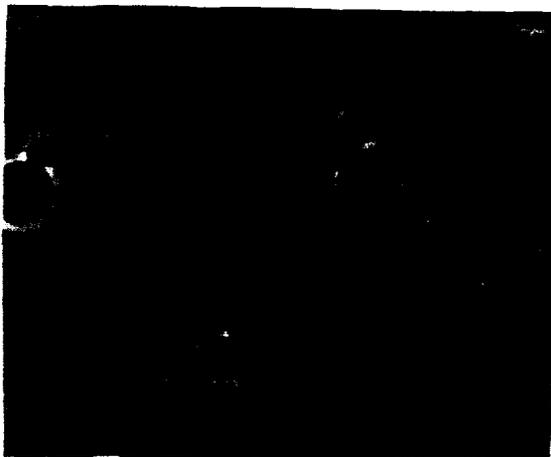
- Figura 1. Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*.
- (a) Ciclo heterotálico. Se representa la posibilidad de formación de una célula haploide a partir de un cigoto, por fallo en la fusión nuclear (Fincham et al., 1979).
- (b) Ciclos homotálico y heterotálico (Mortimer y Hawthorne, 1969).
- (c) Cigotos y ascas $\times 3.000$.



a



b



c

los cruzamientos y el análisis meiótico, etc., hacen de él uno de los organismos de mayor interés y, por tanto, de los mejor conocidos, desde el punto de vista genético. Se conocen en la actualidad varios cientos de genes nucleares, distribuidos en 17 cromosomas que componen un genomio haploide cuyo contenido en ADN es sólo unas tres veces superior al de *Escherichia coli*.

Los procesos morfogenéticos integrados en el ciclo de vida de *S. cerevisiae* implican profundas modificaciones estructurales y funcionales reguladas por la expresión diferencial de genes. Las ventajas genéticas de este organismo permiten que las investigaciones realizadas sobre su morfogénesis estén alcanzando importantes logros, los cuales probablemente serán de utilidad para abordar programas morfogenéticos mucho más complejos, como los que regulan el desarrollo de organismos superiores. La presente Tesis, cuyo objetivo es el estudio genético de la cariogamia, pretende profundizar en un aspecto del análisis morfogenético de la levadura.

EL CICLO MITOTICO

Dado que el ciclo mitótico es un proceso esencial para la supervivencia, es de esperar que la mayoría de las mutaciones que lo afecten sean letales. Por este motivo Hartwell y colaboradores comenzaron su estudio aislando una colección de mutantes condicionales, sensibles a la temperatura, capaces de reproducirse más o menos normalmente a temperatura permisiva (23°C), pero no a temperatura restrictiva (36°C).

Los mutantes del ciclo mitótico, denominados genéricamente *cdc*, se reconocen porque, incubados en condiciones restrictivas, no crecen y manifiestan un "fenotipo terminal" característico, relacionado con la etapa del ciclo mitótico en la que cada mutante ha quedado bloqueado (Hartwell, 1974).

Un análisis de complementación llevado a cabo con 148 de estos mutantes permitió agruparlos en 32 grupos de complementación, la mayoría de ellos representados por más de un alelo (Hartwell et al., 1973).

Se define el punto de ejecución de un mutante *cdc* como el último punto del ciclo en el que es necesaria la función codificada por el gen correspondiente (Hartwell, 1974). En términos experimentales, es el último momento de un ciclo de división determinado, en el que un cambio a condiciones restrictivas implica la detención del crecimiento en ese mismo ciclo. La determinación del punto de ejecución de los mutantes permite establecer una ruta funcional, que asigna las diferentes funciones génicas a las etapas del ciclo en las que son necesarias.

Se han utilizado varias aproximaciones experimentales para determinar los puntos de ejecución de mutantes *cdc*. Por ejemplo, los mutantes de síntesis de ADN, en condiciones restrictivas, son incapaces de incorporar precursores radioactivos a su ADN (Hartwell, 1971 y 1973).

Otra técnica se basa en el uso de mutantes dobles. Si las dos mutaciones utilizadas determinan fenotipos terminales distintos, el doble mutante presentará el

fenotipo terminal del mutante afectado en el gen más temprano (Hartwell, 1971; Hereford y Hartwell, 1974).

Especialmente útil ha sido el empleo de sustancias que interrumpen el ciclo, como la hidroxiaurea y el trenimón, que inhiben la síntesis de ADN y la feromona secretada por las células de sexo α , que inhibe la iniciación de la síntesis de ADN en células de sexo α (Hartwell et al., 1974). Estos inhibidores se han utilizado en experimentos en los que los mutantes en estudio se someten a dos tratamientos paralelos. En uno de ellos las células se incuban primero a temperatura restrictiva durante unas cuantas horas y luego se transfieren a temperatura permisiva en presencia del inhibidor. El otro tratamiento es a la inversa. Se observa si las células son capaces de completar el ciclo en la segunda parte de cada tratamiento. Hay tres resultados posibles. El ciclo puede haberse completado en los dos tratamientos, de donde se deduce que la función bloqueada por el inhibidor exógeno y la función alterada en el mutante *cde* son independientes. Una segunda posibilidad es que el ciclo no se complete en ninguno de los dos casos, de donde se deduce que las dos funciones son interdependientes. Finalmente, puede ocurrir que el ciclo se complete en una parte del experimento pero no en la otra, lo que implica que una de las dos funciones es necesaria para que la otra pueda ser llevada a cabo.

Los resultados aportados por las aproximaciones experimentales descritas han permitido asignar 15 genes *CDC* a puntos del ciclo celular en los que se requiere específicamente su expresión (Hartwell, 1976). La figura 2 representa la secuencia funcional de estos genes.

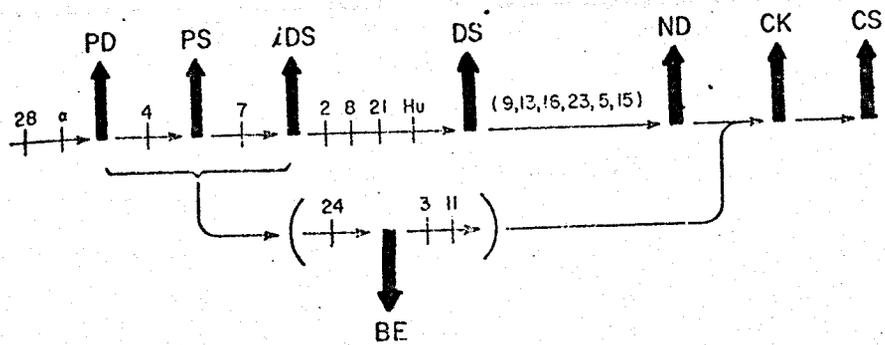


Figura 2. Secuencia funcional de genes *CDC*.

Los números representan distintos genes; α , factor α ; Hu, hidroxiaurea; PD, duplicación de placa nuclear; PS, separación de las placas nucleares hijas; iDS, iniciación de la síntesis de ADN; DS, replicación del ADN; ND, división del núcleo; CK, citocinesis; CS, separación de la pared celular de la yema hija; BE, aparición de la yema hija (Hartwell, 1976).

CONJUGACION SEXUAL

En *Saccharomyces* el sexo está determinado por dos alelos de un gen denominado *MAT*, localizado en el brazo derecho del cromosoma III a 20 cM del centrómero. Las células haploides manifiestan uno u otro sexo según el alelo *MAT α* o *MAT α* del que sean portadoras. Los diploides son, normalmente, heterocigotos *MAT α /MAT α* y no tienen capacidad conjugante. Cualquier célula, independientemente de su grado de ploidía (la existencia de estirpes aneuploides y poliploides es relativamente frecuente), manifiesta un sexo determinado sólo si es homocigótica para el alelo correspondiente (Mortimer y Hawthorne, 1969).

Para que tenga lugar la conjugación sexual es necesario que las células de ambos sexos alcancen un estado fisiológico competente que se consigue mediante una acción hormonal recíproca. Son dos las feromonas que intervienen en esta acción, el factor α y el factor α , secretadas por células α y α , respectivamente. Ambos actúan sobre células de sexo contrario, deteniendo su crecimiento en un punto del ciclo celular inmediatamente anterior a la síntesis de ADN e induciendo en ellas una serie de transformaciones fisiológicas y morfológicas (Duntze et al., 1970; Thron y Duntze, 1970; Bücking-Thon et al., 1973; Wilkinson y Pringle, 1974; Lipke et al., 1976).

El factor α es un péptido de 13 residuos cuya secuencia ha sido determinada (Slötzer et al., 1976). No se conoce con tanto detalle la naturaleza química del factor α ; se sabe que su actividad es sensible a proteasas y que está asociada a un peso molecular superior a 10^4 dáltones, aunque existen dudas sobre si este peso molecular corresponde a una proteína o a una asociación de péptidos de menor tamaño (Betz et al., 1977).

Mackay y Manney (1974a) han aislado y caracterizado una serie de mutantes estériles a partir de estirpes haploides de ambos sexos. Para obtener los mutantes utilizaron una estirpe que tenía varios requerimientos nutritivos y era resistente al antibiótico canavanina (carácter recesivo). Mezclaron células de esta estirpe, previamente irradiadas con luz ultravioleta, con una cantidad 1000 veces superior de células de otra estirpe que era de sexo opuesto a la anterior, tenía auxotrofías complementarias y era sensible a canavanina. Tras incubar la

mezcla de las dos estirpes en condiciones apropiadas para la conjugación, sembraron las células en medio mínimo suplementado con los requerimientos de la primera estirpe y con canavanina. Un porcentaje relativamente alto (1-20%) de las colonias capaces de crecer en este medio resultaban ser mutantes estériles.

Una fracción de los mutantes obtenidos, por ser rezumantes o por haber sido seleccionados como condicionales para la temperatura, pudieron ser sometidos a análisis meiótico. Los mutantes caracterizados podían clasificarse en cinco grupos independientes que probablemente corresponden a otros tantos genes. Uno de ellos, *ste1*, incluye mutaciones ligadas al gen *MAT*. Los grupos denominados *ste2* y *ste3* incluyen mutantes cuyo defecto sólo se manifiesta en células α en el primero y en células α en el segundo. Los otros dos grupos restantes, *ste4* y *ste5*, incluyen mutantes cuyo defecto se manifiesta en células de ambos sexos (MacKay y Manney, 1974b). Teniendo en cuenta el número de mutantes caracterizados por el análisis meiótico y las limitaciones del protocolo utilizado para su obtención, es de suponer que el número de genes implicados en la conjugación sea superior a los cinco descritos.

Las mutaciones ligadas a *MAT*, denominadas *ste1*, fueron obtenidas en estirpes que originalmente eran de sexo α . Estudios posteriores revelan que estas mutaciones son de dos tipos, ahora denominados *mata1* y *mata2*. Ambas mutaciones complementan entre sí y se diferencian porque la función codificada por *MAT α 2* es además necesaria para la esporulación. Se han descrito mutaciones ligadas a *MAT α* , denominadas *mata1* que afectan poco o nada a la capacidad conjugante y que, al igual que *mata2*, afectan a la esporulación (Strathern et al., 1979a). Estas mutaciones indican una alta complejidad funcional del locus *MAT*.

La mayoría de las mutaciones obtenidas por MacKay y Manney probablemente corresponden a genes estructurales implicados en la conjugación. La mutación *dmt* (Blamire, 1975; Blamire y Melnik, 1975), parece corresponder a un gen regulador. Esta mutación, no ligada al gen *MAT*, confiere a células α capacidad de conjugar con células de ambos sexos y no tiene efecto aparente sobre células de sexo α .

HOMOTALISMO Y HETEROTALISMO

La alta tasa de cambio de sexo, que caracteriza a las estirpes homotálicas de *Saccharomyces* y que es causa de la inestabilidad de su fase haploide, se hereda como un carácter mendeliano y monogénico. El alelo dominante, *HO*, de un gen no ligado al sexo es el determinante de homotalismo, mientras que su alelo recesivo, *ho*, determina heterotalismo (Hicks et al., 1977a).

Hicks et al. (1977b) han propuesto una hipótesis según la cual el cambio de sexo es el resultado de un mecanismo tipo transposición, análogo a los descritos en bacterias (Cohen, 1976). Los elementos de esta hipótesis, conocida como el modelo del "cassette", son el gen *MAT*, determinante del sexo; el gen *HO* y otros dos genes, *HML* y *HMR*, de los cuales se sabía que en determinadas combinaciones alélicas impedían el cambio de sexo en estirpes *HO* (Naumov y Tolstorukov, 1973; Harashima et al., 1974). Al igual que *MAT*, *HML* y *HMR* están localizados en el cromosoma III; el primero, en el brazo izquierdo, aproximadamente a 64 cM del centrómero y, el segundo, en el brazo derecho, aproximadamente a 65 cM del centrómero (Harashima y Oshima, 1976).

Según el modelo del "cassette", la información residente en el gen *MAT* es una secuencia polinucleotídica de quita y pon (comparable a la cinta grabadora de un aparato magnetofónico), que puede ser reemplazada por otra proveniente de *HML* o de *HMR*, los cuales contienen copias crípticas de *MAT*. Los tres genes presentan formas alélicas α y α . Para que el cambio de sexo tenga lugar es necesario que uno de los dos genes de reserva contenga información distinta a *MAT*. Es decir, una estirpe cuyo genotipo sea *HML* α *MAT* α *HMR* α no puede cambiar de sexo; es, por tanto, haploide estable aunque tenga el alelo *HO* determinante de homotalismo, cuya función es, precisamente, permitir el paso de información desde *HML* y *HMR* a *MAT*.

El apoyo experimental al modelo del "cassette", es muy firme.

Se ha demostrado que estirpes estériles, cuyo defecto está localizado en el gen *MAT*, pueden ser curadas. Por ejemplo, una estirpe estéril, originalmente α , puede convertirse en α y posteriormente cambiar a α funcional. Puesto que el alelo α original era defectuoso, debe de existir alguna otra fuente de información α silvestre (Hicks y Herskowitz, 1977; Strathern et al., 1979a).

Mediante determinadas técnicas se han conseguido estirpes mutantes en los genes *HML* y *HMR*. Se ha demostrado que estas estirpes reemplazan información funcional en el gen *MAT* por información mutante (Klar y Fogel, 1979; Kushner et al., 1979).

La mutación *cmt* se obtuvo en estirpes alteradas en la esporulación (Hopper y Hall, 1975b). Resultados aportados por Haber y George (1979) indican que esta mutación permite la expresión de información sexual contenida en *HML* y *HMR*. Otras dos mutaciones, *mar1* y *sir1* (Klar et al., 1979; Rine et al., 1979), causan el mismo efecto que *cmt*. Los genes *CMT*, *MAR1* y *SIR1* no están ligados entre sí; presumiblemente los tres están implicados en un mismo sistema de control negativo cuya función es impedir la expresión *in situ* de *HML* y *HMR*.

Si se cruzan dos estirpes heterotálicas del mismo sexo, con auxotrofías complementarias, se pueden seleccionar en medio mínimo diploides *MAT α /MAT α* cuya formación se debe a una mutación que ha cambiado el sexo de una de las estirpes parentales. En algunos casos el cambio de sexo resulta inseparable de una deleción en el cromosoma III. Según la hipótesis del "cassette" cabe esperar recombinación entre *MAT*, *HML* y *HMR* debido a la homología existente entre ellos; por tanto la deleción y el cambio de sexo pueden explicarse en base a una recombinación entre fragmentos homólogos adyacentes a *MAT* y a *HML* o a *HMR*. En estirpes diploides, portadoras de cambio de sexo asociado a deleción, el tamaño estimado para el fragmento perdido concuerda con las distancias entre *MAT* y *HMR* en un caso, y entre *MAT* y *HML* en otro. En una de estas estirpes se ha demostrado la existencia de un cromosoma III circular que era lo que cabía esperar si el cambio de sexo es consecuencia de una recombinación entre *MAT* y *HML* (Fig. 3).

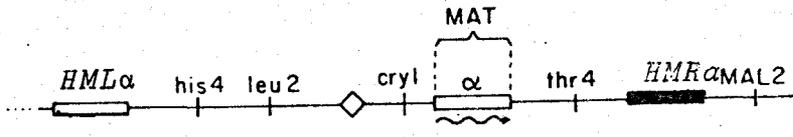
La mutación *rad52-1* confiere sensibilidad a rayos X y reduce la capacidad de esporular en los diploides (Game y Mortimer, 1974). Malone y Esposito (1980) han demostrado que esta mutación impide el cambio de sexo en es-

Figura 3. Recombinación entre el gen *MAT* y los genes portadores de información críptica para el sexo, según la hipótesis del "cassette" (Strathern et al., 1979b).

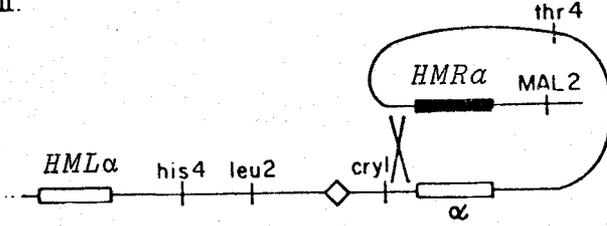
(a) Recombinación entre *MAT* y *HMR*

(b) Recombinación entre *MAT* y *HML*

I.

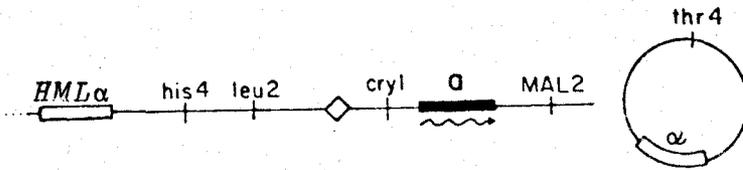


II.

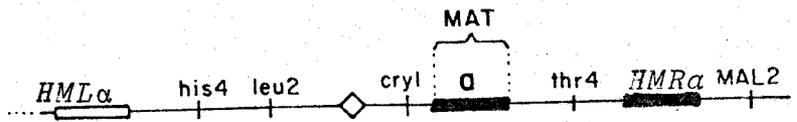


a

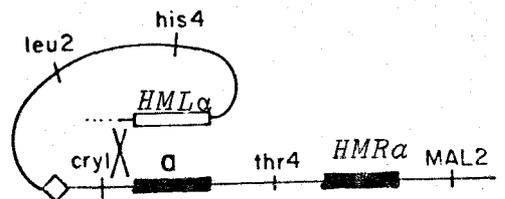
III.



I.

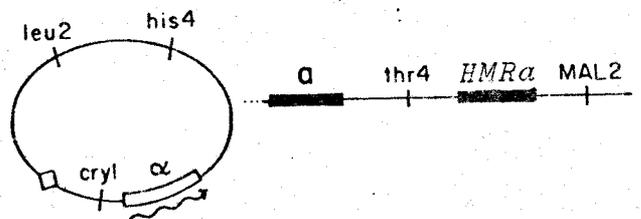


II.



b

III.



tirpes homotáticas; sus resultados sugieren que el cambio de sexo requiere, al menos, una función general de recombinación.

Se ha conseguido aislar y replicar un fragmento de ADN de *S. cerevisiae* que contiene el gen *HML*. Mediante experimentos de hibridación de ácidos nucleicos se ha podido demostrar que *MAT*, *HML* y *HMR* contienen secuencias homólogas a este fragmento (Hicks et al., 1979; Strathern et al., 1980).

Se ha descrito la existencia de mutaciones *cis*-dominantes, ligadas al gen *MAT*, que impiden el reemplazamiento del "cassette" en estirpes *HO*. Algunas de estas mutaciones están localizadas en la propia secuencia que debería ser reemplazada durante el cambio; estas mutaciones se denominan *MAT α -inc* o *MAT α -inc*, dependiendo de que afectan a uno u otro alelo (Takano et al., 1973; Takano y Arima, 1979; Strathern et al., 1979a). Otras mutaciones, *stk1* y *stk2*, tienen el mismo efecto que las anteriores, pero están localizadas fuera de la secuencia sustituible (Haber et al., 1980).

Como características importantes del sistema de homotalismo hay que señalar que el paso de información es unidireccional (se produce de *HML* y *HMR* a *MAT*, pero no a la inversa) y que la información contenida en los genes donadores se sigue manteniendo tras el cambio. Se ha apuntado la equivalencia funcional que existe entre este sistema y la conversión génica.

ESPORULACION

La capacidad de esporular está determinada en *Saccharomyces* por la heterocigosis del gen *MAT*; el proceso se induce en un medio pobre en nitrógeno y con acetato como fuente de carbono (Kassir y Simchem, 1976).

El estudio genético de un proceso que, como la esporulación, sólo tiene lugar en células con un grado de ploidía igual o mayor que dos, plantea problemas para la detección de mutaciones recesivas. M.S. Esposito y colaboradores superaron esta dificultad utilizando una estirpe homotálica. El método seguido para obtener mutantes afectados en el proceso consistió en irradiar con luz ultravioleta una suspensión de ascas, en condiciones tales que la mayor parte de las colonias supervivientes se hubiesen producido a partir de una única espóra. Debido al carácter homotálico de la estirpe utilizada, cualquier mutación inducida se obtendría en estado de homocigosis. Entre 869 colonias supervivientes se seleccionaron 75 mutantes cuya tasa de esporulación, al menos a una temperatura determinada, estaba 3 σ por debajo de los valores medios determinados para la estirpe parental a tres temperaturas diferentes (20, 30 y 34°C) (Esposito y Esposito, 1969).

Para determinar la dominancia o recesividad de las mutaciones obtenidas se cruzaron esporas de las estirpes mutantes con esporas de un diploide silvestre; las estirpes utilizadas en estos cruzamientos tenían auxotrofías complementarias, de forma que los diploides híbridos podían ser seleccionados como protótrofos en medio mínimo.

La mayoría de los mutantes caracterizados resultaron ser recesivos. Se cruzaron entre sí esporas de los diferentes mutantes recesivos, por el mismo procedimiento que en el caso anterior, para determinar su complementación. Como resultado se descubrieron 11 genes que se denominaron *SPO*. A partir de las frecuencias con que los mutantes caracterizados se distribuían en los 11 loci, se dedujo que debían de existir alrededor de 50 genes cuya mutación determinase fenotipo incapaz de esporular (Esposito et al., 1972).

Se ha demostrado que las mutaciones recesivas *spo7*, *8*, *9* y *11*, así como la dominante *SPO98*, bloquean la síntesis premeiótica de ADN (Esposito y Esposito, 1974a). Las funciones celulares afectadas en otros mutantes se han determinado más o menos precisamente combinando técnicas genéticas y citológicas (Moens et al., 1974; Esposito et al., 1974; Esposito et al., 1975).

Roth y Fogel han aislado mutantes afectados específicamente en etapas tempranas de la esporulación. Su sistema, que también permite el aislamiento de mutaciones recesivas, utiliza un haploide disómico para el cromosoma III, heterocigótico para el tipo sexual y auxótrofo para leucina por tener alelos mutantes distintos en cada una de las dos copias del gen *LEU2*, localizado en el cromosoma III. En esta estirpe la esporulación es abortiva, pero puede inducirse recombinación meiótica si se transfieren las células a medio de esporulación. Los mutantes se seleccionaron como colonias que en estas condiciones daban escasa cantidad de recombinantes protótrofos para leucina, pero que eran normales en recombinación mitótica (Roth y Fogel, 1971; Roth, 1976). Entre los mutantes obtenidos por este procedimiento se ha determinado

la existencia de tres mutaciones recesivas, *mei1*, *mei2*, y *mei3*, no ligadas entre sí, cuyo defecto bloquea la síntesis premeiótica de ADN (Roth, 1973). Otras tres mutaciones también recesivas e independientes, *con1*, *con2* y *con3*, permiten la síntesis premeiótica de ADN y, probablemente, afectan al mecanismo de conversión génica (Fogel y Roth, 1974).

Simchem y colaboradores han estudiado si las funciones requeridas en el ciclo mitótico, alteradas en los mutantes *cde*, son o no necesarias para la meiosis. Sus resultados revelan que la mayor parte de ellas lo son, a excepción de las que están implicadas en la citocinesis y alguna relacionada con la gemación. Estos resultados sugieren que la meiosis ha evolucionado como un ciclo mitótico, un tanto especial, por superposición de nuevas funciones, y que la divergencia entre ambos procesos no alcanza un grado tal como para que exista una duplicidad de genes (Simchem, 1974; Hirschberg y Simchem, 1977; Simchem y Hirschberg, 1977; Kasir y Simchem, 1978).

LA CARIOGAMIA

Durante el ciclo sexual de *Saccharomyces cerevisiae*, inmediatamente después de la conjugación de dos células de distinto sexo para formar un cigoto, tiene lugar la fusión de los núcleos.

Conde y Fink (1976) aislaron un mutante, *kar1-1*, que conjuga normalmente pero que es incapaz de llevar a cabo la fusión nuclear. Los cigotos formados por el cruzamiento de este mutante con una estirpe silvestre dan lugar en su descendencia a células que tienen el núcleo

haploide de uno de los dos parentales y citoplasma híbrido. Estas células se denominan heteroplasmontes. El mutante *kar1-1* se aisló seleccionando descendencia de estas características a partir de un cruzamiento en el que intervenían dos estirpes con marcadores nucleares y citoplásmicos complementarios. El protocolo para aislar mutantes alterados en la fusión nuclear se describe extensamente en la parte experimental de esta Tesis.

La mutación *kar1-1* es dominante internuclear y recesiva intranuclear. Lo primero significa que su presencia en uno de los dos núcleos de un cigoto recién formado determina no fusión. La recesividad intranuclear se deduce del comportamiento de diploides con capacidad conjugante, heterocigóticos para la mutación; por ejemplo, un diploide monosómico para el cromosoma III, de genotipo α *kar1-1/KAR1*⁺, es normal para fusión nuclear cuando se cruza con una estirpe silvestre de sexo opuesto (Fink y Conde, 1977).

Antes del aislamiento de *kar1-1* era conocido que en cruzamientos entre estirpes silvestres, con baja frecuencia, se producían fallos en la fusión nuclear que daban lugar a heteroplasmontes (Fig. 1a). Fowell (1951) observó la aparición de clones haploides formados a partir de cigotos aislados por micromanipulación.

Wright y Lederberg (1957) confirmaron los resultados de Fowell. Entre 530 colonias formadas a partir de cigotos aislados, encontraron 91 que presentaban los caracteres nucleares de una de las dos estirpes haploides parentales o eran mezcla de ambos. En cruzamientos

en los que uno de los parentales era "petite" citoplásmico (el fenotipo "petite" consiste en una incapacidad respiratoria motivada por la carencia de mitocondrias funcionales, cuyo origen es una mutación nuclear o mitocondrial), encontraron descendencia heteroplasmonte que presentaba el fenotipo nuclear de la estirpe "petite" y era normal en cuanto a capacidad respiratoria.

Resultados similares han sido aportados por Zahkarov et al. (1969), Vezinhet et al. (1975) y Aigle y Lacroute (1975).

Las investigaciones cuyos resultados se acaban de exponer fueron los antecedentes para la obtención del mutante *kar1-1*, en el cual el fallo en la fusión nuclear se produce no de forma ocasional, como ocurre en cruza- mientos entre estirpes silvestres (aproximadamente en 5% de los cigotos), sino con alta frecuencia (del orden de 95%).

kar1-1 no presenta otras alteraciones en su ciclo de vida, aparte de la descrita. Su existencia indica que la fusión nuclear es un proceso morfogenético autó- nomo, suceptible de ser analizado genéticamente.

MATERIALES Y METODOS

ESTIRPES

Las estirpes utilizadas en este estudio se relacionan en la Tabla I. La nomenclatura utilizada para la designación de genotipos es la propuesta por el Committee for Yeast Genetics (Plischke et al., 1976), a excepción del genotipo sexual que se designa mediante la denominación clásica (a ó α).

La estirpe JC1 es "petite" de origen citoplásmico, lo que se indica mediante la notación (ρ^-). Fue obtenida por tratamiento con bromuro de etidio de la estirpe 17A-NI/CR4. Ambas tienen el mismo genotipo nuclear. El bromuro de etidio induce la formación de "petites" por destrucción del genomio mitocondrial (Goldring et al., 1970).

Los mutantes para fusión nuclear obtenidos en este estudio se designan por tres letras y un número. Las dos primeras letras son JP, la tercera hace referencia al experimento en que fueron obtenidos. Los mutantes cuya designación coincide en las tres letras, por ejemplo JPB1, JPB2 y JPB3, fueron obtenidos en el mismo experimento.

XW2-2B, XW2-3B y XW2-20A, se obtuvieron en la descendencia meiótica del cruzamiento XW2; XW5-3B y XW5-3C en la del cruzamiento XW5 (Tabla II, ver Resultados).

Las notaciones *kar1*, *kar2* y *kar3* designan mutaciones en tres genes distintos, implicados en el proceso de fusión nuclear. La mutación *kar1* ha sido previamente

TABLA I. Relación de estirpes utilizadas

Estirpe	Genotipo	Procedencia
17A-NI/CR4	α <i>ade2 his4 can1 nys^R</i>	LCC
JC1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R (rho⁻)</i>	LCC
4836-8C	<i>a leu1 thr1</i>	LCC
XJ6-6B	<i>a his4 thr1 nys^R</i>	LCC
F5	α <i>ade2</i>	LCC
F6	<i>a ade2</i>	LCC
F7	α <i>trp1</i>	LCC
F8	<i>a trp1</i>	LCC
MC40	<i>a/a lys1/lys1</i>	LCC
X51-4C	<i>a his4 leu1 kar1-1</i>	LCC
K5-4B	α <i>ade2 leu1 can1 kar1-1</i>	LCC
JPA1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar⁻</i>	Este estudio
JPA2	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar⁻</i>	Este estudio
JPB1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1-2</i>	Este estudio
JPB2	α/α <i>ade2/ade2 his4/his4 can1/can1 nys^R/nys^R kar⁻</i>	Este estudio
JPB3	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
JPC1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
JPC2	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
JPD1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar2-1</i>	Este estudio
JPD2	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
JPE1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar2</i>	Este estudio
JPE2	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
JPE3	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar3-1</i>	Este estudio
JPF1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar2</i>	Este estudio
JPF2	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
JPG1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar2</i>	Este estudio

TABLA I. (Cont.)

Estirpe	Genotipo	Procedencia
JPH1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar⁻</i>	Este estudio
JPH2	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar2</i>	Este estudio
JPH3	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar⁻</i>	Este estudio
JPI1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
JPJ1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
JPK1	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
JPK2	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
JPK3	α <i>ade2 his4 can1 nys^R kar1</i>	Este estudio
XW2-2B	<i>a ade2 leu1 thr1 kar1-2</i>	Este estudio
XW2-3B	<i>a leu1 thr1 kar1-2</i>	Este estudio
XW2-20A	<i>a his4 leu1 can1 nys^R kar1-2</i>	Este estudio
XW5-3B	<i>a ade2 leu1 nys^R kar2-1</i>	Este estudio
XW5-3C	<i>a leu1 thr1 nys^R kar2-1</i>	Este estudio

LCC: Colección de estirpes de levadura de La Cruz del Campo, S.A., Sevilla.

descrita (Conde y Fink, 1976); los mutantes *kar2* y *kar3* se describen por vez primera en este estudio. Las estirpes designadas *kar⁻* son mutantes alterados en el proceso de fusión nuclear, para los que no se ha determinado cuál es el gen afectado.

PRODUCTOS QUIMICOS

Metanosulfonato de etilo, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.

Canavanina, (sulfato de L-canavanina), Sigma Chemical Co.

Nistatina, Sigma Chemical Co.

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

Mitramicina, Pfizer, Inc., Groton, Connecticut, U.S.A.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio mínimo (SD). Yeast nitrogen base w/o aminoacids (Difco) 0,67%; glucosa, 2%.

Medio completo (YEPD). Extracto de levadura, 1%; peptona, 2%; glucosa, 2%.

Medio selectivo. "Yeast nitrogen base w/o aminoacids" (Difco), 0.67%; glicerina, 3%; glucosa, 0.1%; histidina, 20 mg/l; sulfato de adenina, 20 mg/l. El medio se tampona con una solución 1 M de tampón citrato-fosfato pH 6.5, esterilizada por separado. Se añade el volumen necesario de solución tampón, para que su concentración final en el medio sea 0.1 M. Tras la esterilización, cuando el medio se ha enfriado hasta 50-60°C, se añade sulfato de canavanina y nistatina; la concentración de estos dos antibióticos en el medio es 60 mg/l y 2 mg/l, respectivamente.

Medio de preesporulación. Extracto de levadura, 0.8%; peptona, 0.3%; glucosa, 10%.

Medio de esporulación. Extracto de levadura, 0.1%; glucosa, 0.05%; acetato potásico, 1%.

Todos los medios se solidifican con agar a concentración 2%. En los casos necesarios, el medio mínimo se suplementa con aminoácidos y bases a las concentraciones indicadas por Sherman et al. (1977) y con canavanina y nistatina a la misma concentración que en el medio selectivo.

CRECIMIENTO DE CULTIVOS

Los cultivos en medio líquido se incubaron con aireación forzada. La densidad celular se estimó utilizando una cámara de Petroff-Hausser. El título de células vivas se determinó por dilución y siembra en cajas de medio completo.

Tanto en medio líquido como sólido la temperatura de incubación de los cultivos fue de 30°C.

TRATAMIENTO MUTAGENICO

Se utilizó metanosulfonato de etilo, según el protocolo descrito por Fink (1970). La supervivencia en diferentes experimentos, osciló entre 40% y 70%.

SELECCION DE MUTANTES

Los mutantes de fusión nuclear se obtuvieron a partir de la estirpe JC1. Un cultivo de esta estirpe, previamente tratado con metanosulfonato de etilo, se diluyó convenientemente para que tras un recrecimiento de 8-12 horas, en medio completo, llegara a fase estacionaria ($2-3 \times 10^8$ cel/ml). Se mezclaron 2-3 ml de este cultivo con un volumen apropiado de otro cultivo, crecido paralelamente en medio completo hasta fase estacionaria, de la estirpe 4836-8C. El volumen de cultivo de 4836-8C utilizado fue el necesario para que sus células estuviesen en la mezcla a una concentración 5 veces mayor que las de JC1.

La mezcla de las dos estirpes se concentró 10 veces y la espesa suspensión celular resultante se esparció en cajas de medio completo a razón de 0.2 ml por caja. Estas cajas se incubaron 18-20 horas para permitir la conjugación. La biomasa crecida al cabo de este tiempo se recogió añadiendo a cada caja 2 ml de agua estéril, se diluyó 100 veces y se sembró en cajas de medio selectivo.

CRUZAMIENTOS

Para permitir la conjugación entre dos estirpes, se mezclaron pequeñas cantidades de biomasa de cada una de ellas sobre la superficie de una caja de medio completo. Cuando la finalidad de los cruzamientos era el aislamiento de cigotos, las mezclas conjugantes se incubaron 3-5 horas. Cuando lo que se pretendía era la obtención de híbridos, se incubaron durante una noche.

Los híbridos resultantes de los diferentes cruzamientos realizados se aislaron por la técnica de selección de protótrofos de Pomper y Burkholder (1949). Las dos estirpes parentales utilizadas en cada cruzamiento tenían siempre auxotrofías complementarias, tuviesen o no otras en común; según el caso, los híbridos se seleccionaron en medio mínimo o en medio mínimo suplementado con el requerimiento común.

ESPORULACION

Colonias aisladas de los híbridos que se deseaba esporular se transfirieron a cajas de medio de preesporulación y se incubaron durante dos días. La biomasa crecida se transfirió a cajas de esporulación que se incubaron otros dos días.

ANALISIS MEIOTICO

En los casos en que fue posible, la segregación de los cruzamientos se estudió por análisis de tétra-

das. En algunos de los casos en que esta aproximación no fue posible, debido a la baja tasa de germinación de las esporas, se recurrió al análisis masal de esporas. Ambos procedimientos han sido descritos por Mortimer y Hawthorne (1969) y por Sherman y Lawrence (1974), entre otros. Para digerir las paredes de las ascas se empleó helicasa comercial, diluída 10 veces.

TINCION DE NUCLEOS

Para la observación de núcleos se prepararon mezclas conjugantes en cajas de medio completo. Tras 3-5 horas de incubación fueron teñidas con mitramicina según el protocolo de Slater (1976) y observadas al microscopio con iluminación de fluorescencia.

OBTENCION DE ESTIRPES DIPLOIDES CON CAPACIDAD CONJUGANTE

Para la construcción de cada uno de los diploides sexuales utilizados en los estudios de dominancia y complementación se siguió el siguiente protocolo.

Se construyó en primer lugar un diploide normal (heterocigótico para el sexo : a/α) por cruzamiento de dos estirpes haploides; una Kar^+ y otra Kar^- , o ambas Kar^- ; dependiendo de que el objetivo fuese estudiar dominancia o recesividad de una mutación, o complementación entre dos mutaciones. Las dos estirpes que intervenían en el cruzamiento se eligieron de forma que tuviesen en común una mutación determinante de auxotro-

fía, para que el híbrido fuese homocigótico para ella y por tanto auxótrofo. El híbrido diploide obtenido se incubó en medio completo líquido hasta fase estacionaria y se sembró en cajas de medio completo, a una densidad de aproximadamente 500 células por caja. Estas cajas se irradiaron con luz ultravioleta procedente de una lámpara germicida G15T8 de 15W, situada a 50 cm de distancia, durante 30 segundos. Tras la irradiación las cajas se incubaron 3 días. La supervivencia fue en todos los casos próxima a 100%.

Las colonias crecidas se replicaron en cajas de medio completo, en las que también se replicó un césped de una estirpe haploide, auxótrofa para un requerimiento distinto al del diploide; como césped se empleó la estirpe F8. Las cajas en las que se habían replicado las colonias y el césped se incubaron durante una noche y, a continuación, se replicaron en otras de medio mínimo donde, al cabo de un día de incubación, podía observarse la aparición de manchas de crecimiento que presuntamente correspondían a triploides protótrofos, formados por conjugación entre un diploide con capacidad conjugante y la estirpe utilizada como césped.

Comparando las cajas de medio mínimo con las que contenían las colonias diploides se identificaron algunas con capacidad conjugante.

RESULTADOS

MUTANTES AFECTADOS EN LA FUSION NUCLEAR

Selección de mutantes

El medio empleado para la selección de mutantes Kar⁻ contiene glicerina como fuente de carbono y está suplementado con adenina e histidina y con los antibióticos canavanina y nistatina. Su composición está diseñada para impedir el crecimiento de las estirpes utilizadas como parentales y de los diploides normales formados por su cruzamiento. La estirpe JC1 no puede crecer a causa de su carácter "petite", que le impide utilizar una fuente de carbono no fermentable como la glicerina. La estirpe 4836-8C tampoco puede hacerlo porque es auxótrofa para leucina y treonina y el medio carece de estos aminoácidos, además esta estirpe es sensible a los antibióticos. Los diploides normales formados por conjugación de las dos estirpes anteriores no pueden crecer, porque tanto el carácter de resistencia a canavanina como el de resistencia a nistatina son recesivos.

El medio selectivo debe permitir el crecimiento de heteroplasmontes que tengan el núcleo de JC1 y mitocondrias funcionales de 4836-8C. La formación de heteroplasmontes requiere que se haya producido la conjugación de las estirpes parentales y que no se haya producido la fusión nuclear, lo cual se espera que ocurra con células mutantes afectadas en la fusión.

Entre las colonias crecidas en medio selectivo se seleccionaron los heteroplasmontes por el criterio de que fuesen auxótrofos para adenina e histidina. El resto de las colonias (alrededor del 40%) eran casi todas protótrofas, probablemente eran diploides capaces de crecer en medio selectivo por haber adquirido resistencia a los an-

tibióticos, como consecuencia de recombinación mitótica o pérdida de cromosomas.

Identificación de mutantes

Es de esperar que la mayor parte de los heteroplasmones obtenidos se hayan generado por un fallo accidental de la fusión nuclear, no debido a mutación, ya que esto ocurre con una frecuencia próxima a 5% en cruzamientos entre estirpes silvestres (Wright y Lederberg, 1957 y esta Tesis).

Los heteroplasmones mutantes pueden distinguirse de los "accidentales" en base a su eficacia para formar diploides en cruzamientos por una estirpe silvestre. Los mutantes han de dar lugar a una cantidad sensiblemente menor de diploides.

Para identificar los mutantes Kar^- entre el conjunto de heteroplasmones obtenidos, se dispusieron éstos en cajas de medio completo, sembrados en forma de trazos de aproximadamente 1 cm de longitud, a razón de 50 clones por caja. Estas cajas se incubaron hasta que los trazos crecieron suficientemente y entonces se replicaron en otras cajas de medio completo, en las que simultáneamente se replicó un césped de una estirpe que tenía auxotroffias complementarias a las de los heteroplasmones y era de sexo opuesto. Estas últimas cajas se incubaron durante 4 horas para permitir la conjugación entre los heteroplasmones y la estirpe utilizada como césped, y a continuación, se replicaron en otras de medio mínimo. Al cabo de un día, se aislaron como presuntos mutantes Kar^- aquellos clones cuya réplica en medio mínimo había

dado lugar a un crecimiento puntiforme, mientras que las réplicas de la mayor parte de los clones y de estirpes Kar⁺ utilizadas como patrones, crecieron de forma confluyente.

Comprobación genética del fenotipo mutante

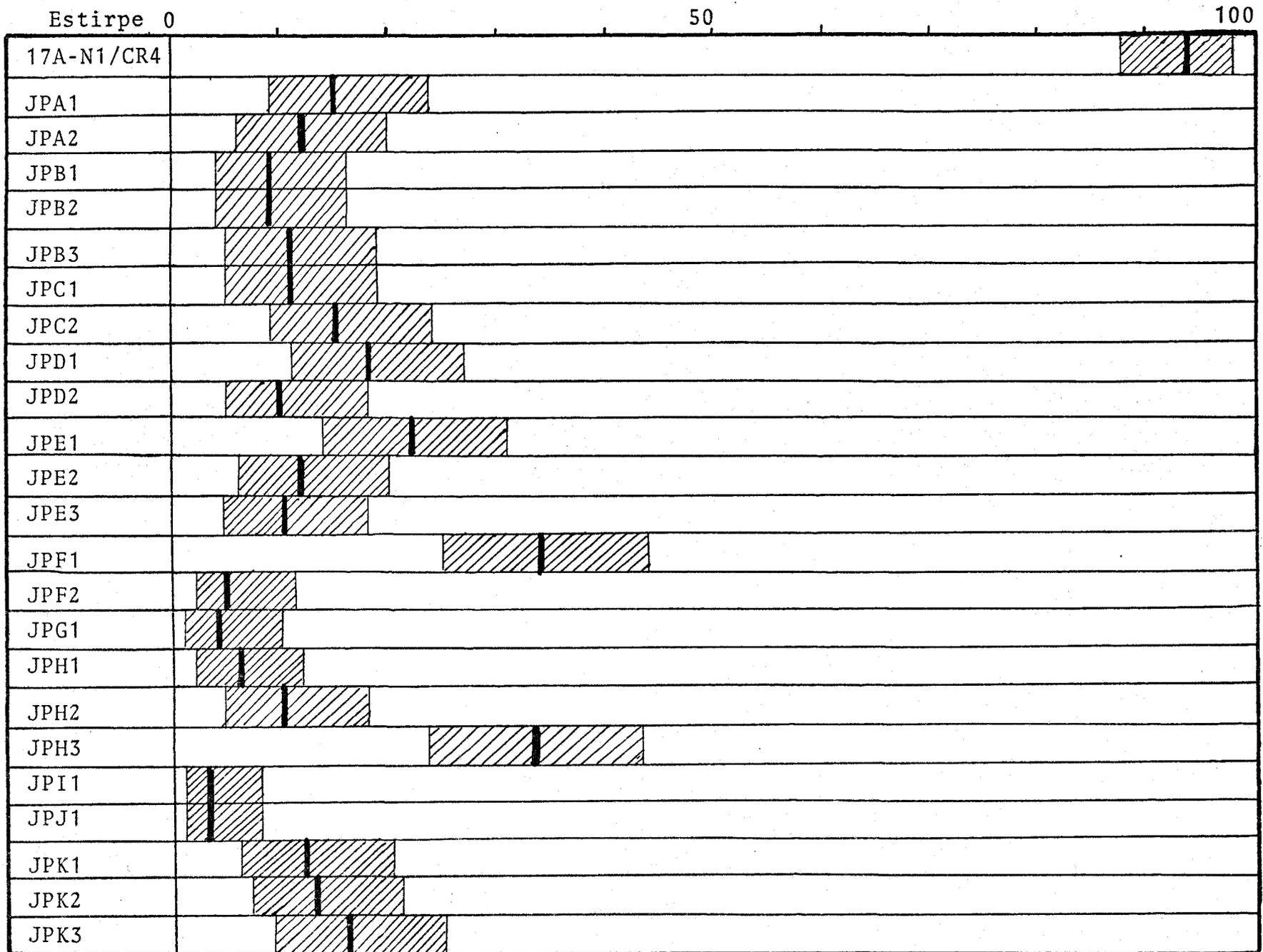
Los presuntos mutantes identificados en el experimento descrito, representaron menos del 5% del total de heteroplasmones. Para confirmar su carácter mutante, se aislaron por micromanipulación cigotos formados en sus cruzamientos por una estirpe silvestre. Los mutantes Kar⁻ se confirmaron como tales porque las colonias germinadas a partir de los cigotos manifestaron en un alto porcentaje el fenotipo de una de las dos estirpes parentales, lo que demostraba un fallo no accidental, sino genético, de la fusión nuclear.

En definitiva se han aislado 23 mutantes Kar⁻, obtenidos en 11 experimentos diferentes, lo que asegura que al menos una fracción importante de ellos es de origen independiente.

La Figura 4 representa la capacidad de fusión nuclear de la estirpe 17A-NI/CR4, utilizada como patrón Kar⁺, y de los distintos mutantes obtenidos. La capacidad de fusión nuclear se determinó analizando, en cada caso, 100 colonias formadas a partir de cigotos, aislados por micromanipulación, de cruzamientos entre las estirpes a caracterizar y la estirpe Kar⁺ 4836-8C. Se consideró que la fusión nuclear se había producido en los cigotos cuyo crecimiento dió lugar a una colonia diploide.

Figura 4. Determinación de la frecuencia de fusión nuclear (%) para la estirpe Kar^+ 17A-NI/CR4 y 23 mutantes Kar^- . Las barras verticales indican la frecuencia de fusión nuclear observada para cada estirpe. Las zonas rayadas corresponden a los intervalos de confianza para cada determinación.

Frecuencia de fusión nuclear (%)



El rendimiento final en la obtención de mutantes Kar⁻, referido al número de colonias crecidas en las cajas de medio selectivo es del orden de 1%. Debido a las características del protocolo de obtención de mutantes, es difícil evaluar con precisión la frecuencia de mutación inducida para el fenotipo Kar⁻, pero puede estimarse que es del orden de 10⁻⁶ en las condiciones experimentales utilizadas.

Comprobación citológica del fenotipo mutante

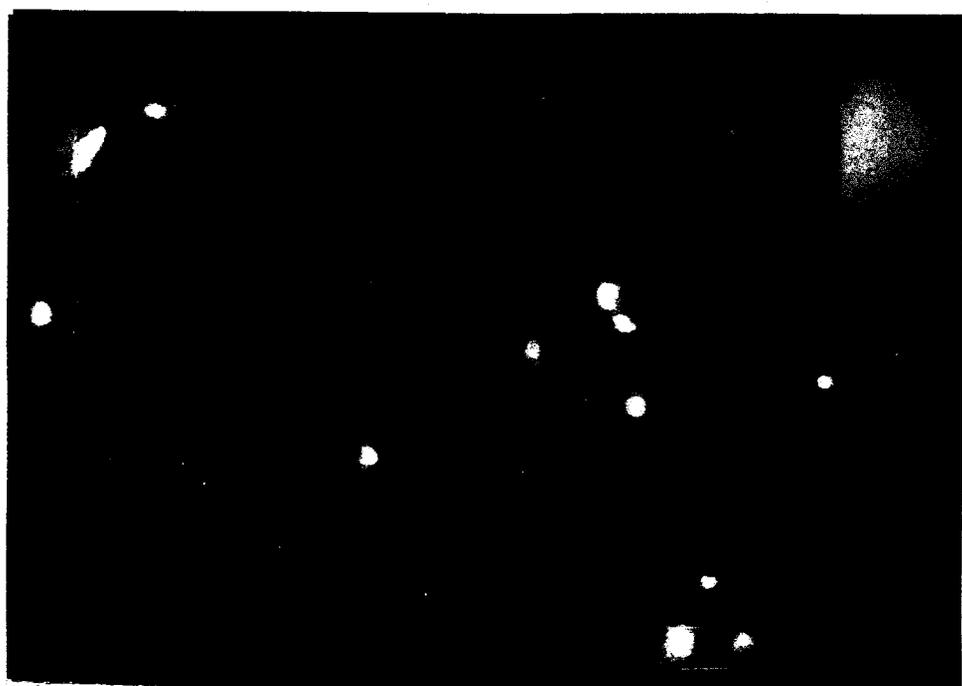
Un criterio adicional para la confirmación de los mutantes Kar⁻ fue la observación al microscopio de los núcleos presentes en cigotos formados en sus cruzamientos por estirpes silvestres. Cuando se examinan los cigotos formados por dos estirpes silvestres, sólo se observa un núcleo por cigoto, debido a que la fusión nuclear ocurre inmediatamente después de la fusión celular. En contraposición, los cigotos formados en un cruzamiento en que interviene una estirpe Kar⁻ son heterocariontes. La diferencia entre ambos tipos de cigotos aparece ilustrada en la Figura 5. Los núcleos de las células de *Saccharomyces* no son visibles directamente al microscopio; para su observación se tiñeron con mitramicina según se describe en el capítulo de Materiales y Métodos.

Mutantes atípicos

Algunos de los clones identificados como presuntos mutantes Kar⁻ resultaron ser estériles. Cuando se cruzaron estos clones por una estirpe silvestre, y se exami-



a



b

Figura 5. Observación de núcleos en cigotos de *S. cerevisiae* x 3.000.

- (a) Cigoto formado en un cruzamiento Kar^+ x Kar^+
(b) Cigoto formado en un cruzamiento Kar^- x Kar^+ .

naron las mezclas conjugantes al microscopio, no se observaron cigotos. No es fácil explicar la aparición de este tipo de mutantes en cajas de medio selectivo. Una posibilidad es que se trate de clones disómicos para el cromosoma III, que se hayan convertido en His⁻ por recombinación mitótica en dicho cromosoma. Para determinar si este era su origen, se cruzaron algunos de estos mutantes por estirpes de uno u otro sexo que tenían auxotrofías complementarias a las de ellos y se determinó la frecuencia de formación de complementantes protótrofos. Algunos de los mutantes mostraron escasa o nula formación de protótrofos frente a los dos sexos, lo cual apoya la hipótesis de que sean disómicos para el cromosoma III. Otros mostraron escasa, pero significativa, capacidad de formar protótrofos frente a una estirpe de sexo α y prácticamente ninguna frente a otra de sexo α , lo cual hace pensar que no son disómicos y que por alguna otra razón tienen disminuída su capacidad conjugante. Aunque no se dispone de más datos sobre estos mutantes, su existencia sugiere algún tipo de relación entre capacidad conjugante y capacidad de fusión nuclear.

ANALISIS MEIOTICO

Se ha analizado la segregación meiótica de cruza-
mientos de los mutantes obtenidos por estirpes silves-
tres y entre sí.

La segregación para el carácter Kar se determinó
por el procedimiento descrito anteriormente, en relación
con la distinción entre heteroplasmontes "accidentales"
y mutantes. Este procedimiento se basa en la diferente

respuesta de clones auxótrofos, Kar^- o Kar^+ , respecto a la formación de complementantes protótrofos, cuando son cruzados por una estirpe de sexo opuesto y auxotroffias complementarias. El fenotipo Kar se comprobó por el procedimiento de micromanipulación de cigotos para el 6% de las esporas analizadas; en la mayor parte de los casos la comprobación se hizo con las cuatro esporas de una misma tétrada; en otros casos, se hizo con esporas protótrofas, cuyo fenotipo Kar no puede ser determinado por el procedimiento general. En ningún caso los resultados obtenidos por micromanipulación de cigotos fueron discordantes con los obtenidos por el otro método.

Los cruzamientos cuya segregación meiótica ha sido analizada se relacionan en la Tabla 2. Salvo indicación expresa, la segregación para los marcadores genéticos, acompañantes al carácter Kar , que intervinieron en estos cruzamientos, fue la esperada.

Segregación de cruzamientos $Kar^- \times Kar^+$

La segregación meiótica de cruzamientos realizados entre 12 mutantes Kar^- y estirpes silvestres se determinó por análisis de tétradas. El fenotipo Kar^- segregó en todos estos casos como un carácter mendeliano y monogénico (Tabla 3).

En la descendencia de los cruzamientos realizados para caracterizar el mutante JPE3 (cruzamientos XW8/1 y XW8/2), la mutación kar^- cosegregó con un tamaño colonial ostensiblemente menor del normal.

TABLA II. Cruzamientos estudiados

Cruzamiento	Parental α	Parental α
XW1	4836-8C	JPA1
XW2	4836-8C	JPB1
XW3/1	4836-8C	JPB2
XW3/2	MC40	JPB2
XW4	4836-8C	JPB3
XW5/1	4836-8C	JPD1
XW5/2	XJ6-6B	JPD1
XW6	XJ6-6B	JPE1
XW7	XJ6-6B	JPE2
XW8/1	XJ6-6B	JPE3
XW8/2	XW8/1-2D	F5
XW9	XJ6-6B	JPF1
XW10	XJ6-6B	JPF2
XW11	XJ6-6B	JPH1
XW12/1	4836-8C	JPH3
XW12/2	XJ6-6B	JPH3
XW12/3	F6	XW12/2-3D
XW13	XJ6-6B	JPI1
XW14	XJ6-6B	JPJ1
XW15	XJ6-6B	JPK1
XW16	XJ6-6B	JPK2
XW17	XJ6-6B	JPK3
XK1	X51-4C	JPB1
XK2	X51-4C	JPD1
XK3	X51-4C	JPE1
XK4	X51-4C	JPE2
XK5/1	XW2-2B	JPE3
XK6	X51-4C	JPF1
XK7	X51-4C	JPF2
XK8	X51-4C	JPI1
XK9	X51-4C	JPJ1
XK10	X51-4C	JPK1

TABLA II. (Cont.)

Cruzamiento	Parental α	Parental α
XK11	X51-4C	JPk2
XK12	X51-4C	JPk3
XK13	XW2-3B	JPA1
XK14	XW2-3B	JPB3
XK15/1	XW5-3B	JPE1
XK15/2	XW5-3C	JPE1
XK16/1	XW5-3B	JPE3
XK17	XW5-3B	JPF1
XK18	XW5-3C	JPA1
XK19	XW5-3C	JPB3

TABLA III. Segregación meiótica del fenotipo Kar en cruzamientos $Kar^- \times Kar^+$

Mutante por caracterizar	Cruzamiento	Tétradas analizadas	Segregación para Kar		
			2+:2-	3+:1-	3-:1+
JPB1	XW2	29	28	0	1
JPD1	XW5/1	9	9	0	0
JPD1	XW5/2	13	13	0	0
JPE1	XW6	23	22	1	0
JPE2	XW7	18	16	2	0
JPE3	XW8/2	18	18	0	0
JPF1	XW9	12	11	1	0
JPF2	XW10	16	15	1	0
JPI1	XW13	17	17	0	0
JPJ1	XW14	14	14	0	0
JPK1	XW15	19	18	1	0
JPK2	XW16	24	24	0	0
JPK3	XW17	15	13	1	1

La caracterización meiótica de los restantes mutantes se vió dificultada, principalmente, por la escasa viabilidad de las esporas derivadas de sus cruzamientos. En la mayor parte de los casos no fue posible, tras haber micromanipulado varias decenas de tétradas, encontrar siquiera una sola en la que hubiesen germinado las cuatro esporas.

Entre las tétradas micromanipuladas, procedentes del cruzamiento XW11, en el que intervenía el mutante JPH1, hubo un caso en el que germinaron las cuatro esporas. En esta tétrada el fenotipo Kar⁻ cosegregó con un tamaño colonial pequeño, igual que ocurría en los cruzamientos realizados con el mutante JPE3. En otras tétradas derivadas de este mismo cruzamiento, en las que habían germinado tres esporas, también se observó cosegregación de Kar⁻ y tamaño colonial pequeño.

En algunos de los casos en los que no fue posible obtener datos a partir de tétradas completas se recurrió al análisis masal de esporas. Así se estudió la segregación de los cruzamientos XW1 y XW4. Los resultados obtenidos para ambos indican segregación mendeliana y monogénica para el carácter Kar⁻ (Tabla IV).

TABLA IV. Análisis masal de esporas de los cruzamientos XW1 y XW4

Mutante por caracterizar	Cruzamiento	Esporas analizadas	Fenotipo de la descendencia			
			α Kar ⁺	α Kar ⁻	α Kar ⁺	α Kar ⁻
JPA1	XW1	194	53	42	56	43
JPB3	XW4	100	20	37	19	24

En los cruzamientos del mutante JPB2 por estirpes haploides Kar^+ , la viabilidad de las esporas era particularmente baja. Se estudió, por análisis masal de esporas, el cruzamiento XW3/1. La segregación obtenida para el sexo y otros marcadores se ajusta a la que cabría esperar en el caso de que JPB2 fuese diploide, homocigótico para todos sus marcadores incluido el sexo (Tabla V). Conviene recordar que este mutante fue seleccionado como heteroplasmonte por poseer los mismos marcadores nucleares que la estirpe JC1. Para confirmar el supuesto carácter diploide de JPB2, dicho mutante se cruzó por la estirpe MC40, diploide y homocigótica α/α *lys2/lys2* (cruzamiento XW3/2); la germinación de las esporas fue buena en este caso, en contraposición a la de los cruzamientos por una estirpe haploide. La segregación obtenida, determinada por análisis de tétradas, se ajusta a la esperada para un tetraploide (Tabla VI).

La causa de la diploidía de JPB2 pudo ser endomitosis o fusión de núcleos hermanos, habiendo podido tener lugar esta última en el cigoto heterocariótico del cual procede este mutante o en una célula formada a partir de dicho cigoto.

El carácter diploide de JPB2 justifica la escasa viabilidad de las esporas procedentes de sus cruzamientos con estirpes haploides. Esta explicación no sirve para otros casos como los de los mutantes JPA1 y JPB3, para los cuales los resultados sugieren una constitución haploide (Tabla IV). En estos casos el problema de baja viabilidad de esporas puede atribuirse a alguna de las dos causas siguientes: 1) mutaciones adicionales generadas en el tratamiento con metanosulfonato de etilo y 2)

TABLA V. Análisis masal de 100 esporas del cruzamiento XW3/1

Marcador	Segregación	
Sexo	14 α : 41 α : 45	no conjugantes
His	59 His ⁺	: 41 His ⁻
Leu	88 Leu ⁺	: 12 Leu ⁻
Thr	90 Thr ⁺	: 10 Thr ⁻

TABLA VI. Segregación meiótica del cruzamiento XW3/2

Ade ⁻ :Ade ⁺	Nº té- tradas	His ⁻ :His ⁺	Nº té- tradas	Lys ⁻ :Lys ⁺	Nº té- tradas	Sexo*	Nº té- tradas
2:2	1	2:2	1	2:2	0	4:0	1
1:3	5	1:3	2	1:3	3	2:2	3
0:4	4	0:4	7	0:4	7	0:4	6

* La segregación expresada indica la relación conjugantes: no conjugantes. La mayor parte de los clones no conjugantes fueron capaces de esporular.

efecto pleiotrópico de la propia mutación determinante del fenotipo Kar^- . En el caso de que la primera hipótesis fuese la correcta, los dos efectos podrían ser separados en la descendencia, a no ser que se diese la poco probable circunstancia de que el defecto en la germinación de las esporas se deba a mutaciones ligadas al gen responsable del fenotipo Kar^- . Si la segunda hipótesis fuese correcta, los dos efectos serían inseparables. Aunque no se dispone de resultados concluyentes para discernir entre las dos alternativas, el hecho de que las esporas derivadas de cruzamientos entre un silvestre y 3 clones Kar^- descendientes de JPA1, germinen mal, mientras que las derivadas de cruzamientos entre silvestre y otros 5 clones Kar^+ , también descendientes de JPA1, germinen bien, parece apoyar la segunda hipótesis.

Con la finalidad de caracterizar la mutación responsable del carácter Kar^- del mutante JPH3 se estudiaron los cruzamientos XW12/1, XW12/2 y XW12/3. Aunque la viabilidad de las esporas procedentes de estos cruzamientos no era buena, aproximadamente en el 10% de los casos germinaban las cuatro esporas de una misma tétrada. Estas tétradas mostraron segregación atípica para el sexo. En 15 casos la segregación fue $2\alpha:1\alpha:1n$ (n = no conjugante); en 3 casos fue $2\alpha:2n$ y en 1 caso $2\alpha:2\alpha$. La segregación para los restantes marcadores fue normal. Estos resultados pueden interpretarse suponiendo la existencia en la estirpe JPH3 de una mutación que causa la esterilidad de células de sexo α , pero no la de células de sexo α , por lo que no se manifiesta en el aislamiento original. Según esta hipótesis, los tres tipos de tétradas citados corresponderían, cuando se considera la segregación de esterilidad, frente a sexo, a tetratipos, ditipos recombinantes y ditipos parentales, respectiva-

mente. En los casos analizados, el carácter Kar^- segregó independientemente del sexo y de la supuesta mutación de esterilidad y cosegregó con un tamaño colonial pequeño, exactamente igual que ocurría en cruza- mientos en los que intervenían los mutantes JPE3 y JPH1 mencionados anteriormente.

Relaciones de ligamiento entre las mutaciones kar

A) Ligamiento a *KAR1*

Se estudió en primer lugar la existencia o no de ligamiento entre las mutaciones responsables del fenotipo Kar^- de los mutantes obtenidos en este trabajo y el gen *KAR1*. Para ello se analizó la segregación de cruzamientos llevados a cabo entre distintos mutantes y estirpes *kar1*.

La Tabla VII muestra los resultados de los cruza- mientos cuya segregación pudo ser determinada por aná- lisis de tétradas. De estos resultados se deduce que las mutaciones *kar* de 8 estirpes están ligadas a *KAR1*, por lo que, probablemente, afectan a dicho gen. En el caso de otros 4 mutantes no existe ligamiento, de donde se deduce que el gen mutado no es *KAR1*. Se designó como *KAR2* al gen cuya mutación es responsable del fenotipo Kar^- de la estirpe JPD1.

El cruzamiento del mutante JPE3 por una estirpe *kar1*, al igual que los realizados entre dicho mutante y estirpes silvestres, mostró una segregación 2:2 para el tamaño colonial, si bien, como era de esperar en es- te caso, el tamaño colonial pequeño no cosegregaba con

todas las esporas Kar^- , sino sólo con dos de cada tétrada. Los resultados de la Tabla VII demuestran que este mutante no es *kar1*.

TABLA VII. Segregación meiótica del fenotipo *Kar* en cru-
zamientos $Kar^- \times kar1$

Mutante por caracterizar	Cruza- miento	Tétradas analizadas	Segregación para <i>Kar</i>		
			0+:4-	1+:3-	2+:2-
JPB1	XK1	13	13	0	0
JPD1	XK2	31	5	20	6
JPE1	XK3	17	3	13	1
JPE2	XK4	15	15	0	0
JPE3	XK5/1	4	1	2	1
JPF1	XK6	12	3	7	2
JPF2	XK7	13	13	0	0
JPI1	XK8	13	13	0	0
JPJ1	XK9	15	15	0	0
JKP1	XK10	10	10	0	0
JKP2	XK11	13	13	0	0
JKP3	XK12	9	9	0	0

Para caracterizar alguno de los mutantes cuyos cru-
zamientos daban lugar a esporas poco viables, se recu-
rrió de nuevo al análisis masal de esporas. Así se es-
tudió la segregación de los cruzamientos XK13 y XK14. Los
resultados obtenidos indican que el mutante JPA1 no está
afectado en el gen *KAR1* y que el mutante JPB3 sí lo está
(Tabla VIII).

TABLA VIII. Análisis masal de esporas de los cruzamientos XK13 y XK14

Mutante por caracterizar	Cruzamiento	Esporas analizadas	Fenotipo de la descendencia			
			α Kar ⁺	α Kar ⁻	α Kar ⁺	α Kar ⁻
JPA1	XK13	173	27	65	26	55
JPB3	XK14	100	0	44	0	56

Al igual que ocurrió en los cruzamientos del mutante JPH3 por estirpes silvestres, en la descendencia de un cruzamiento realizado entre este mutante y una estirpe *kar1*, aparecieron clones no conjugantes a los que hubiese correspondido ser de sexo α en una segregación normal para el sexo. Se analizaron las esporas conjugantes de 8 tétradas. Seis de estas esporas, cada una de ellas perteneciente a una tétrada distinta, eran Kar⁺, lo que demuestra que JPH3 no está afectado en el gen *KAR1*.

B) Ligamiento a *KAR2*

Los mutantes que a la vista de los resultados expuestos en la Tabla VII demostraron no ser *kar1*, fueron cruzados con estirpes *kar2-1* derivadas de JPD1. La Tabla IX muestra los resultados del análisis de tétradas de dichos cruzamientos. Se deduce que las mutaciones *kar* de las estirpes JPE1 y JPF1 están ligadas a *KAR2*, por lo que, probablemente, se trata de mutantes en dicho

gen. JPE3 no es *kar2*; al igual que ocurría en otros cruzamientos en los que intervino esta estirpe, en la descendencia del cruzamiento XK16/1 se observó segregación 2:2 para el tamaño colonial. El gen cuya mutación es responsable del fenotipo Kar^- del mutante JPE3 se designó *KAR3*.

TABLA IX. Segregación meiótica del fenotipo *Kar* en cruzamientos $Kar^- \times kar2$

Mutante por caracterizar	Cruzamiento	Tétradas analizadas	Segregación para <i>Kar</i>		
			0+:4-	1+:3-	2+:2-
JPE1	XK15/2	10	10	0	0
JPE3	XK16/1	4	0	4	0
JPF1	XK17	8	8	0	0

Los resultados del análisis masal de esporas de cruzamientos de los mutantes JPA1 y JPB3 por una estirpe *kar2* se muestran en la Tabla X. Se deduce que ninguno de estos mutantes está afectado en el gen *KAR2*, lo cual era de suponer para el caso de JPB3, según los datos de la Tabla VIII.

Autodiploidización en mutantes Kar^-

En el apartado dedicado a la segregación de cruzamientos $Kar^- \times Kar^+$ se expuso el caso del mutante JPB2, que resultó ser diploide homocigótico para todos sus marcadores. No es el único caso de este tipo que se ha observado.

TABLA X. Análisis masal de esporas de los cruzamientos XK18 y XK19

Mutante por caracterizar	Cruzamiento	Esporas analizadas	Fenotipo de la descendencia			
			α Kar ⁺	α Kar ⁻	α Kar ⁺	α Kar ⁻
JPA1	XK18	168	35	53	21	59
JPB3	XK19	48	8	11	8	21

El cruzamiento XK15/1 se llevó a cabo para estudiar si existía ligamiento entre la mutación responsable del fenotipo Kar⁻ del mutante JPE1 y el gen *KAR2* (resultados adicionales demostraron que JPE1 es *kar2*). Cuando se micromanipularon tétradas procedentes de la esporulación de un clon híbrido, seleccionado como complementante a partir de este cruzamiento y supuestamente diploide, se obtuvieron resultados que se ajustan a la segregación esperada para un tetraploide (Tabla XI). Hay que hacer notar que las dos estirpes que intervinieron en el cruzamiento XK15/1 son haploides.

Un caso análogo ocurrió con el cruzamiento XK2 (*kar1* × *kar2*). Un híbrido seleccionado a partir de este cruzamiento también mostró segregación atípica, si bien en este caso la germinación de las esporas no fue buena, por lo que no fue posible determinar si la segregación correspondía a la meiosis de un tetraploide, pero en cualquier caso, puede afirmarse que correspondía a un clon

TABLA XI. Análisis meiótico del cruzamiento XK15/1

His ⁻ :His ⁺	Nº té- tradas	Leu ⁻ :Leu ⁺	Nº té- tradas	Can ^R :Can ^S	Nº té- tradas	Sexo*	Nº té- tradas
2:2	1	2:2	5	2:2	3	4:0	0
1:3	3	1:3	1	1:3	5	2:2	5
0:4	6	0:4	4	0:4	2	0:4	5

*La segregación expresada indica la relación conjugantes: no conjugantes. La mayor parte de los clones no conjugantes fueron capaces de esporular.

de ploidía mayor que dos. Otro clon híbrido, obtenido de este mismo cruzamiento, mostró la segregación esperada para la meiosis de un diploide; los resultados obtenidos para este último figuran en la Tabla VII.

Observaciones adicionales indican que la autodiploidización debe ser frecuente en cruzamientos en los que intervienen mutantes *kar2*.

El caso de JPB2 parece ser independiente. El análisis de esporas procedentes de cruzamientos de este mutante por estirpes haploides *kar1* y *kar2* mostró la existencia de recombinantes Kar^+ en ambos casos, lo que indica que JPB2 no es *kar1* ni *kar2*.

ESTUDIOS DE DOMINANCIA

Las pruebas para determinar si una mutación es dominante o recesiva son habitualmente sencillas en *S. cerevisiae*. Basta cruzar la estirpe haploide portadora de la mutación con una estirpe silvestre de sexo opuesto y comprobar si el híbrido diploide manifiesta o no el fenotipo mutante. La situación se complica cuando se trata de estudiar mutantes Kar^- , ya que los diploides que se construyan con este fin serán no conjugantes y, por tanto, no se podrá determinar si son fenotípicamente Kar^+ o Kar^- . Para salvar esta dificultad se construyeron diploides sexuales, derivados de diploides normales, a su vez obtenidos en cruzamientos de los distintos mutantes y una estirpe Kar^+ (según el procedimiento descrito en el capítulo de Materiales y Métodos). La Tabla XII pre-

TABLA XII. Estudios de dominancia. Relación de diploides sexuales, heterocigóticos *kar/KAR*⁺

Diploide sexual*	Parental α	Parental α
DD1	XJ6-6B	JPA1
DD2	XJ6-6B	JPA2
DD3	XJ6-6B	JPB1
DD4	XJ6-6B	JPB3
DD5	XJ6-6B	JPC1
DD6	XJ6-6B	JPC2
DD7	XJ6-6B	JPD1
DD8	XJ6-6B	JPD2
DD9	XJ6-6B	JPE1
DD10	XJ6-6B	JPE2
DD11	XJ6-6B	JPE3
DD12	XJ6-6B	JPF1
DD13	XJ6-6B	JPF2
DD14	XJ6-6B	JPG1
DD15	XJ6-6B	JPH1
DD16	XJ6-6B	JPH2
DD17	XJ6-6B	JPH3
DD18	XJ6-6B	JPI1
DD19	XJ6-6B	JPJ1
DD20	XJ6-6B	JPK1
DD21	XJ6-6B	JPK2
DD22	XJ6-6B	JPK3

* Todos son de sexo α .

senta la relación de los diploides sexuales que fueron construídos y posteriormente analizados. El fenotipo Kar de cada uno de estos diploides sexuales se determinó por micromanipulación de los cigotos formados en sus cruza- mientos por la estirpe Kar⁺, F8.

La Figura 6 muestra los resultados de los estudios de dominancia. Puede observarse que la mayoría de los diploides sexuales son capaces de fundir núcleos con frecuencias próximas a las de estirpes silvestres; en estos casos se deduce que las mutaciones correspondientes son recesivas. Son casos aparte los diploides DD11, DD15 y DD17, que funden núcleos con frecuencia sensiblemente inferior; en estos casos puede decirse que las mutaciones son dominantes, o más propiamente, semidominantes, ya que el fallo en la fusión no se produce con frecuencia tan alta como en los casos de sus parentales mutantes. Precisamente, DD11, DD15 y DD17 proceden, respectivamente, de las estirpes JPE3, JPH1 y JPH3. Estas tres estirpes son las que mostraron segregación 2:2 para tamaño colonial, en el análisis meiótico de sus cruzamientos. La mutación responsable del fenotipo Kar⁻ de la estirpe JPE3 fue designada *kar3-1*, a la vista de los resultados del análisis meiótico; de momento no se ha demostrado que JPH1 y JPH3 también sean *kar3* pero el parecido fenotípico de estos tres mutantes deja lugar a pocas dudas.

ESTUDIOS DE COMPLEMENTACION

Al igual que se hizo para los estudios de dominancia, se construyeron y analizaron diploides sexuales, en

Figura 6. Estudios de dominancia. Determinación de la frecuencia de fusión nuclear (%) para diploides sexuales, heterocigóticos kar^-/KAR^+ . Las barras verticales indican la frecuencia de fusión nuclear observada para cada diploide sexual. Las zonas rayadas corresponden a los intervalos de confianza para cada determinación.

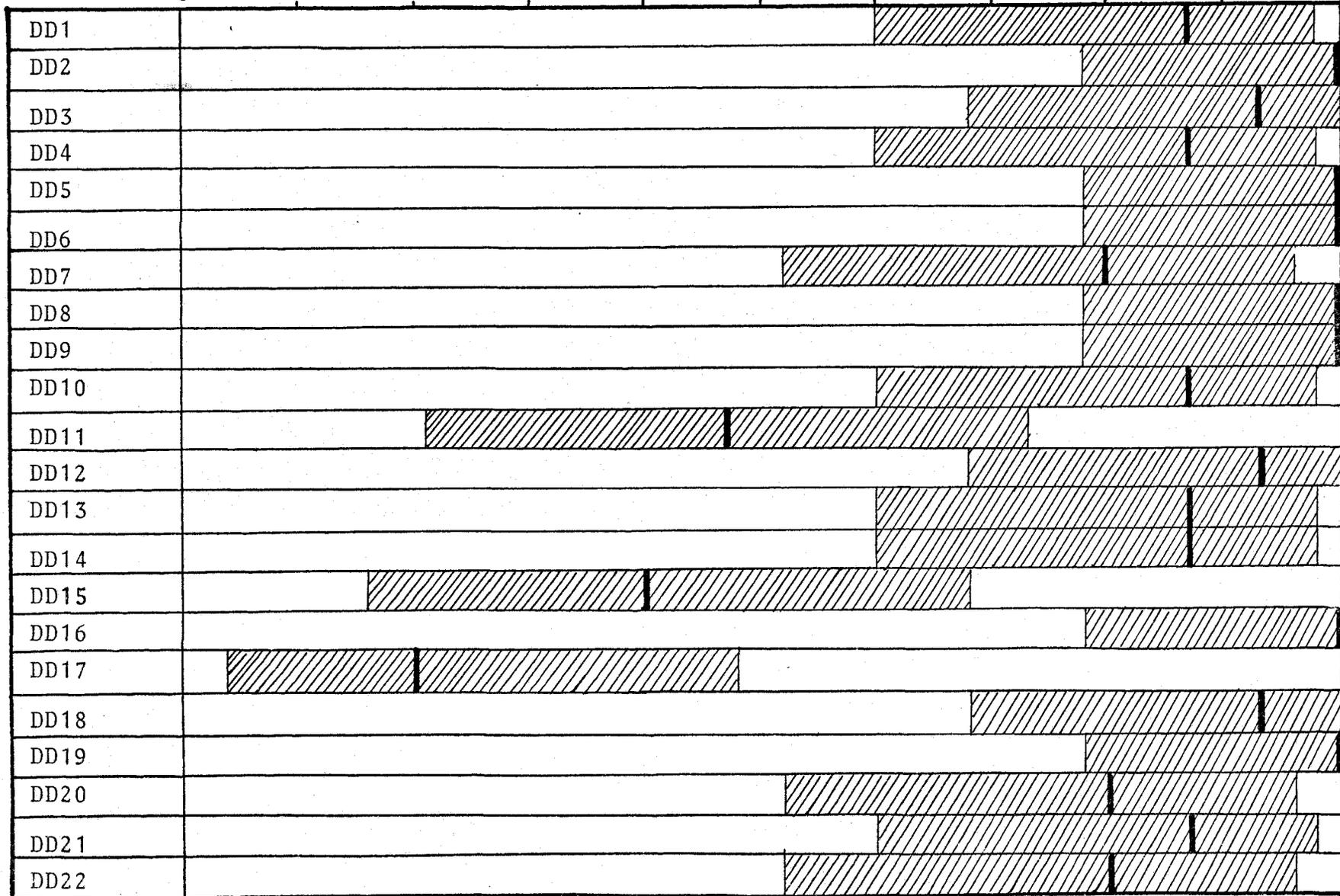
Diploide
sexuado

Frecuencia de fusión nuclear (%)

0

50

100



este caso formados a partir de cruzamientos entre estirpes Kar⁻. La Tabla XIII presenta la relación de estos diploides. Se excluyeron de los estudios de complementación las estirpes cuyas mutaciones resultaron semidominantes.

La Figura 7 presenta los resultados de la complementación de distintos mutantes con *kar1*. La primera prueba se hizo con el diploide sexuado DC1, formado entre un derivado meiótico de la estirpe JPB1 (concretamente XW2-20A) y una estirpe *kar1-1*. El resultado fue de no complementación, por lo que se puede asegurar que la mutación responsable del fenotipo Kar⁻ del mutante JPB1 es alélica a *kar1-1*. En las restantes pruebas de complementación se utilizó como patrón *kar1* la estirpe XW2-2B, derivado meiótico de JPB1.

A partir del fenotipo Kar de los correspondientes diploides sexuados puede deducirse que 11 mutantes no complementan con *kar1* y, por tanto, sus mutaciones son alélicas a ésta. Otros 7 mutantes complementan con *kar1*, de donde se deduce que estos mutantes no están afectados en ese gen. Un caso dudoso es el del diploide sexuado DC4, cuya frecuencia de fusión nuclear es próxima a los valores para los que la complementación se considera positiva, si bien, los resultados del análisis meiótico indican que JPB3 (mutante a partir del cual se construyó la estirpe DC4), es *kar1*.

La Figura 8 presenta los resultados de las pruebas de complementación con *kar2*. La estirpe utilizada como patrón *kar2* fue XW5-3B, derivado meiótico de JPD1. Esta figura demuestra la existencia de 5 mutantes *kar2*, para los cuales la complementación resultó negativa. Complementaron con *kar2* todas las estirpes *kar1* y otras dos estirpes que no lo son, se trata de JPA1 y JPA2.

TABLA XIII. Estudios de complementación. Relación de diploides sexuales, formados a partir de cruzamientos entre estirpes Kar⁻

Diploide sexual*	Parental α	Parental α
DC1	XW2-20A	K5-4B
DC2	XW2-2B	JPA1
DC3	XW2-2B	JPA2
DC4	XW2-2B	JPB3
DC5	XW2-2B	JPC1
DC6	XW2-2B	JPC2
DC7	XW2-2B	JPD1
DC8	XW2-2B	JPD2
DC9	XW2-2B	JPE1
DC10	XW2-2B	JPE2
DC11	XW2-2B	JPF1
DC12	XW2-2B	JPF2
DC13	XW2-2B	JPG1
DC14	XW2-2B	JPH2
DC15	XW2-2B	JPI1
DC16	XW2-2B	JPJ1
DC17	XW2-2B	JPK1
DC18	XW2-2B	JPK2
DC19	XW2-2B	JPK3
DC20	XW5-3B	JPA1
DC21	XW5-3B	JPA2
DC22	XW5-3B	JPC1
DC23	XW5-3B	JPC2
DC24	XW5-3B	JPD1
DC25	XW5-3B	JPD2
DC26	XW5-3B	JPE1
DC27	XW5-3B	JPE2
DC28	XW5-3B	JPF1

TABLA XIII. (Cont.)

Diploide sexuado*	Parental α	Parental α
DC29	XW5-3B	JPF2
DC30	XW5-3B	JPG1
DC31	XW5-3B	JPH2
DC32	XW5-3B	JPI1
DC33	XW5-3B	JPJ1
DC34	XW5-3B	JPK1
DC35	XW5-3B	JPK2
DC36	XW5-3B	JPK3

* Todos son de sexo α .

Figura 7. Estudios de complementación con *kar1*. Determinación de la frecuencia de fusión nuclear (%) para diploides sexuales $kar^-/kar1$. Las barras verticales indican la frecuencia de fusión nuclear observada para cada diploide sexual. Las zonas rayadas corresponden a los intervalos de confianza para cada determinación.

Diploide
sexuado 0

Frecuencia de fusión nuclear (%)

50

100

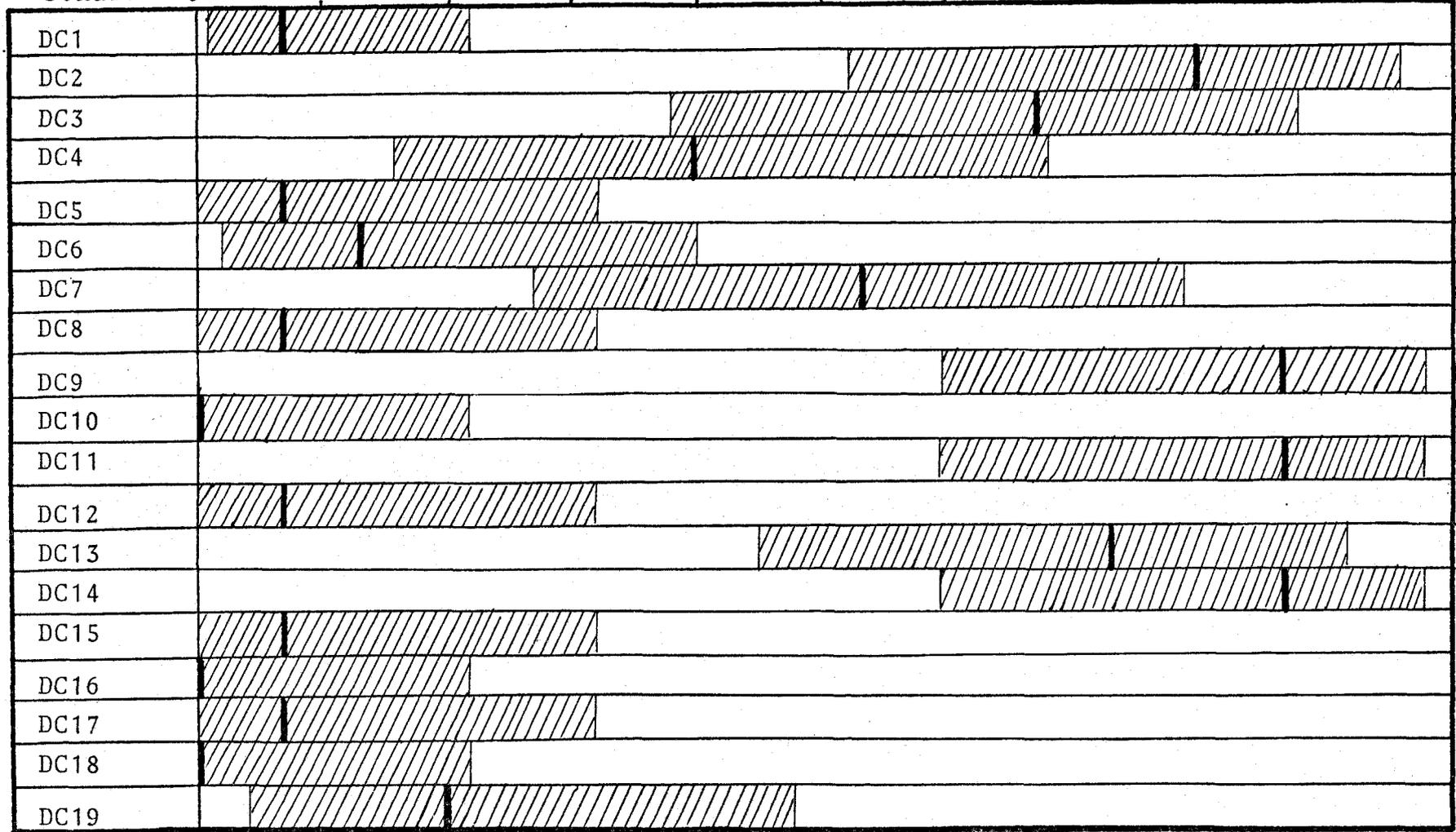


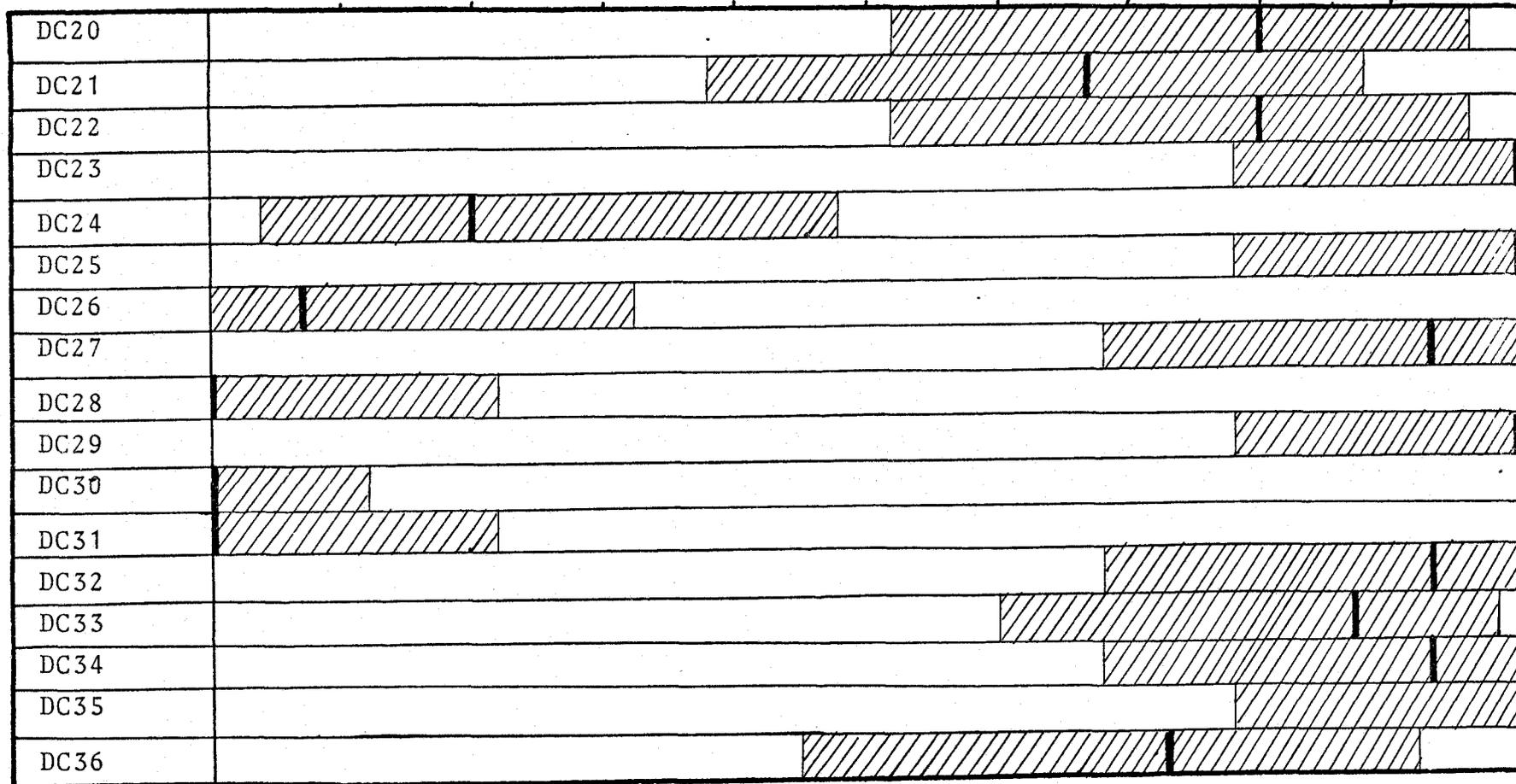
Figura 8. Estudios de complementación con *kar2*. Determinación de la frecuencia de fusión nuclear (%) para diploides sexuales $kar^-/kar2$. Las barras verticales indican la frecuencia de fusión nuclear observada para cada diploide sexual. Las zonas rayadas corresponden a los intervalos de confianza para cada determinación.

Diploide
sexuado 0

Frecuencia de fusión nuclear (%)

50

100



Los resultados de los estudios de complementación concuerdan con los obtenidos a partir del análisis meiótico.

DISCUSSION

CARACTERIZACION GENETICA DE LOS MUTANTES

La caracterización genética de los mutantes comprendió el análisis meiótico de sus cruzamientos y los estudios de dominancia y complementación.

En estudios como el que se expone en esta Tesis, máxime si el número de mutantes con que se trabaja es alto, o relativamente alto, las pruebas de dominancia y complementación suelen ser el primer criterio que se aplica para la clasificación de los mutantes, lo cual ahorra trabajo, pues los estudios subsiguientes pueden limitarse a un caso representativo de cada uno de los grupos obtenidos en la clasificación previa. Esta es, por ejemplo, la estrategia seguida por Hartwell y colaboradores para el estudio de los mutantes *cdc*, que se describe en la Introducción de esta Tesis.

En este trabajo se ha realizado primero el análisis meiótico, principalmente por dos razones. En primer lugar, las pruebas de dominancia y complementación para este estudio resultan más complicadas de lo que lo son habitualmente, por las causas expuestas en el capítulo de Resultados al tratar sobre este tema. En segundo lugar, el origen heteroplasmonte de los mutantes puede alterar su grado de ploidía, lo cual podría dar lugar a interpretaciones erróneas de los resultados obtenidos.

Los resultados de los análisis meióticos son poco ambíguos. De ellos los más consistentes son los obtenidos por el análisis de tétradas. Cuando se es-

tudió por este método la segregación de cruzamientos $Kar^- \times Kar^+$, el fenotipo mutante mostró segregación 2:2 en todos los casos; esporádicamente se obtuvieron tétradas en las que la segregación fue 3:1 ó 1:3, con una frecuencia del orden de la esperada para la conversión génica (alrededor del 5%). La existencia o no de ligamiento entre mutaciones *kar* quedó demostrada, sin aparentes problemas de interpretación, por la segregación de cruzamientos realizados entre mutantes Kar^- .

Los estudios de dominancia y complementación requieren un tratamiento más detallado, que ha de empezar por la clarificación del significado de los términos dominancia y complementación, en el caso concreto de este trabajo.

En el apartado dedicado a la cariogamia, en la Introducción de esta Tesis, se dice que la mutación *kar1-1* es dominante internuclear y recesiva intranuclear. La dominancia internuclear se refiere al hecho de que un núcleo *kar1-1*, presente en un cigoto recién formado, no se funde con el otro núcleo, aunque éste sea $KAR1^+$. Esta circunstancia no es contradictoria con que la misma mutación *kar1-1* sea recesiva intranuclear, lo que significa que un núcleo heterocariótico, *kar1-1/KAR1^+* es fenotípicamente Kar^+ . Este doble comportamiento de *kar1-1*, que se manifiesta también en los mutantes obtenidos en este trabajo (incluso, en cierta medida en los semidominantes), sugiere que las mutaciones Kar^- causan un defecto en la estructura nuclear.

Respecto a la complementación, la situación es análoga. Puede considerarse que las mutaciones que afectan a genes distintos no complementan internuclearmente y sí lo hacen intranuclearmente.

Anteriormente hemos empleado, y en lo sucesivo continuaremos empleando, los términos dominancia, recesividad y complementación, sin más calificativos, para referirnos a la situación intranuclear.

Los estudios de dominancia y complementación se basan en la obtención y posterior análisis de diploides sexuales, derivados de diploides normales, a su vez obtenidos en cruzamientos $Kar^- \times Kar^+$ o $Kar^- \times Kar^-$. Probablemente estas estirpes se han generado por uno de los dos mecanismos siguientes: 1) Recombinación mitótica entre el centrómero del cromosoma III y el gen *MAT*. 2) Pérdida de una de las copias del cromosoma III. Debido al alto número de diploides sexuales que ha sido necesario estudiar, hubiese resultado ímprobo distinguir entre ambas posibilidades para cada caso. Cualquiera de los dos mecanismos anteriores podría afectar al genotipo *Kar* de estas estirpes, si alguno de los genes en cuestión estuviese localizado en el cromosoma III. La coherencia interna de los resultados obtenidos en los estudios de dominancia y complementación y la concordancia de estos resultados con los del análisis meiótico, hacen pensar que los diploides sexuales no han sufrido ninguna alteración de su genotipo *Kar*, motivada por ésta ni por otra causa.

Se han obtenido y estudiado 23 estirpes mutantes, incapaces de llevar a cabo normalmente la fusión nuclear. De ellas, 12 son portadoras de mutaciones alélicas a la mutación *kar1-1*, descrita por Conde y Fink (1976). Otras 5 lo son para otro gen, denominado *KAR2* y 1 mutante lo es para un tercer gen, *KAR3*. La existencia de los genes *KAR2* y *KAR3* se ha descubierto en este estudio.

No se ha demostrado cuál es el gen afectado en el caso de las restantes 5 estirpes mutantes. Dos de estas estirpes, JPH1 y JPH3, probablemente son *kar3* porque manifiestan un notable parecido fenotípico con la estirpe JPE3 (*kar3-1*). Tanto en los cruzamientos de JPE3 como en los de JPH1 y JPH3, por estirpes silvestres, la mutación *kar* cosegrega con un tamaño colonial pequeño. Por otra parte, las mutaciones de estas tres estirpes son semidominantes, mientras que las de todos los demás mutantes son recesivas. JPH3, además de la mutación responsable de su fenotipo *Kar-*, tiene una mutación adicional que provoca la esterilidad en esporas de sexo α descendientes de sus cruzamientos.

Otros dos de los mutantes no caracterizados, JPA1 y JPA2, que fueron obtenidos en el mismo experimento y tienen características fenotípicas similares, probablemente están afectados en un gen distinto a los anteriores, lo cual de ser cierto, significaría la existencia de *KAR4*. Estas dos estirpes no son *kar1* ni *kar2*, puesto que sus mutaciones complementan con las de estirpes afectadas en estos genes. Es poco probable que sean *kar3*, porque sus mutaciones ni son semi-

dominantes, ni cosegregan con un tamaño colonial pequeño, circunstancias ambas que parecen ser características de mutantes *kar3*. Probablemente no resultaría difícil demostrar la existencia del gen *KAR4*.

El mutante JPB2 resultó ser autodiploide; se desconoce cuál es el gen afectado en este mutante, aunque se sabe que no es *KAR1* ni *KAR2*. La obtención de JPB2 y otros resultados descritos en el apartado dedicado a análisis meiótico, indican que la autodiploidización es relativamente frecuente en mutantes *Kar⁻* y particularmente frecuente en el caso de mutantes *kar2*. Se ha observado que este fenómeno ocurre durante la conjugación, no se sabe si también durante el crecimiento vegetativo.

Las causas de la autodiploidización pueden ser endomitosis o fusión de núcleos hermanos, posibilidades que no son excluyentes entre sí. Concretamente para explicar el origen de JPB2, la endomitosis parece más probable que la fusión de dos núcleos hermanos, ambos mutantes para la fusión nuclear.

La endomitosis puede ocurrir por inhibición de la división nuclear en un punto intermedio entre la duplicación del material cromosómico y su reparto. Esta situación es fácilmente concebible en un cigoto heterocariótico, generado por un fallo en la fusión nuclear, en el cuál la asincronía en la división de los núcleos puede originar señales regulatorias contradictorias.

CONTROL GENETICO DE LA CARIOGAMIA

Considerando el número de mutantes caracterizados y su distribución en genes, parece poco probable que existan muchos más genes cuya mutación afecte a la fusión nuclear y cuyo fenotipo sea seleccionable por el método utilizado en este trabajo.

Las limitaciones del método de selección no permitirían la obtención de mutaciones, que de existir afectarían a la cariogamia, si sus características fuesen las siguientes:

1) Mutaciones en genes implicados en la fusión nuclear y en procesos esenciales para la supervivencia de la célula. Estas mutaciones podrían obtenerse como condicionales, modificando adecuadamente el protocolo de selección. Es interesante apuntar que una mutación de ciclo mitótico, obtenida como sensible a la temperatura, confiere fenotipo Kar^- a temperatura permisiva (Hartwell, resultados no publicados).

2) Mutaciones recesivas internucleares. Suponiendo que la fusión nuclear estuviese regulada por alguna señal difusible, podrían existir mutantes incapaces de emitir dicha señal. Estos mutantes serían Kar^- , pero no podrían obtenerse como heteroplasmones a partir de cigotos formados en sus cruzamientos con una estirpe Kar^+ , si el núcleo de esta segunda estirpe fuese capaz de suplir el defecto de la primera, por ejemplo emitiendo la misma señal.

3) Mutaciones que afecten el ensamblaje del núcleo diploide. Es de suponer que un núcleo diploide sea algo más que la unión de los materiales existentes en los núcleos haploides que se fusionan para construirlo. De alguna manera, la fusión debe implicar la organización del núcleo resultante. Las mutaciones que afecten a esta organización, posiblemente no den lugar a heteroplasmas.

POSIBLES FUNCIONES AFECTADAS EN LOS MUTANTES Kar^-

La doble característica de dominancia internuclear y recisividad intranuclear de las mutaciones *kar* hace sospechar que estas mutaciones afectan a estructuras nucleares.

Las placas nucleares, también denominadas placas de huso y cuerpos polares de huso, son en los hongos las estructuras equivalentes a los centriolos de las células animales y a los casquetes polares de células vegetales. La ultraestructura de las placas nucleares y su comportamiento durante diversas etapas del ciclo de vida de *S. cerevisiae* han sido estudiados por Byers y Goetsch (1973 y 1975). Los resultados de estos autores demuestran que las placas nucleares, además de ser los organizadores de la mitosis, son los puntos por donde se unen los núcleos que van a fusionarse durante la conjugación sexual. Sus resultados también revelan que la morfología de las placas nucleares durante la conjugación es algo distinta a la que presentan durante el ciclo mitótico y que algunos mutantes *cdc* presentan un fenotipo terminal en el cual el aspecto de estas estructuras se parece al propio de la

conjugación. Cuando dos núcleos se funden, también lo hacen sus placas nucleares. Como es de suponer, estas estructuras también son organizadores de la meiosis (Moens y Raport, 1971; Esposito y Esposito, 1974b).

Se sospecha, en concreto, que las mutaciones *kar* afectan a las placas nucleares.

Aproximadamente la mitad de los mutantes Kar^- dan lugar en sus cruzamientos a diploides cuya meiosis es anormal. Entre los mutantes que manifiestan este tipo de anomalía los hay *kar1*, *kar2*, supuestos *kar3* y supuestos *kar4*. La otra mitad de los mutantes es más o menos normal en este aspecto. Si los productos de los genes *KAR* son elementos constituyentes de las placas nucleares y su misión es llevar a cabo la fusión nuclear, sería lógico que algunas de sus mutaciones sólo afectasen a su función en la cariogamia, mientras que otras afectarían simultáneamente a esta función y a su acoplamiento en la placa nuclear, lo que podría resultar deletéreo para esta estructura y manifestarse en la meiosis.

La asociación de la mutación *kar3* con un tamaño colonial pequeño hace pensar que en este caso el defecto en la cariogamia también afecta a la mitosis.

Una característica interesante de las mutaciones *kar* es su rezumancia. Ninguna de las mutaciones obtenidas hace que la frecuencia de fusión nuclear sea inferior al 1%. Resultados no expuestos en esta Tesis demuestran que esta frecuencia es considerablemente más baja en el caso de dobles mutantes *kar1 kar2*.

UTILIDAD GENETICA DE LOS MUTANTES Kar⁻

La producción de clones heteroplasmones y eventualmente de clones heterocariontes, por parte de estirpes Kar⁻, amplía el ciclo de vida de *Saccharomyces* y proporciona una nueva herramienta para su análisis genético.

Las características de los mutantes Kar⁻ sugieren de inmediato su utilidad para estudios de herencia citoplásmica. Fink y Conde (1979) utilizaron una estirpe *kar1-1* como un nuevo sistema para mostrar la transmisión citoplásmica de los caracteres "killer" y (PSI⁺). Las estirpes *kar1-1* también han sido utilizadas para estudiar la herencia de un plásmido conocido como círculo de 2 μ , frecuente en células de *Saccharomyces* (Livingston, 1977) y la transmisión de marcadores mitocondriales (Lancashire y Mattoon, 1979).

Klar y Fogel (1979) han utilizado la mutación *kar1-1* en un sistema mediante el cual consiguen la esporulación de diploides homocigóticos para el tipo sexual. Este sistema consiste en transferir a condiciones de esporulación, cigotos formados por el diploide sexuado y una estirpe *kar1-1*. La meiosis del núcleo diploide se induce porque en el cigoto heterocarionte se expresan funciones MAT α y MAT α , aportadas por uno y otro núcleo.

BIBLIOGRAFIA

AIGLE, M. y F. LACROUTE "Genetical aspects of (URE3) a non-mitochondrial cytoplasmically inherited mutation in yeast". *Molec. Gen. Genet.*, 136, 327-335 (1975).

BETZ, R., V.L. MacKAY y W. DUNTZE " α -Factor from *Saccharomyces cerevisiae*: partial characterization of a mating hormone produced by cells of mating type α ". *J. Bacteriol.*, 132, 462-472 (1977).

BLAMIRE, J. "The mating reaction in yeast. II. Spontaneous occurrence of omnimating types". *Molec. Gen. Genet.*, 141, 185-188 (1975).

BLAMIRE, J. y L.M. MELNICK "The mating reaction in yeast. I. A new mutation involved in the determination of mating type". *Molec. Gen. Genet.*, 140, 243-252 (1975).

BUCKING-THOM, E., W. DUNTZE, L.H. HARTWELL y T.R. MANNEY "Reversible arrest of haploid yeast cells at the initiation of DNA synthesis by a diffusible sex factor". *Expl. Cell. Res.*, 76, 99-110 (1973).

BYERS, B. y L. GOETSCH "Duplication of spindle plagues and integration of the yeast cell cycle". *Sym. Quant. Biol.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 38, 123-131 (1973).

BYERS, B. y L. GOETSCH "Behavior of spindles and spindle plagues in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.*, 124, 511-523 (1975).

COHEN, S.N. "Transposable genetic elements and plasmid evolution". *Nature, Lond.*, 263, 731-733 (1976).

CONDE, J. y G.R. FINK "A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 3651-3655 (1976).

DUNTZE, W., V.L. MacKAY y T.R. MANNEY "*Saccharomyces cerevisiae*: a diffusible sex factor". Science, 168, 1472-1473 (1970).

ESPOSITO, M.S. y R.E. ESPOSITO "The genetic control of sporulation in *Saccharomyces*. I. The isolation of temperature-sensitive sporulation deficient mutants". Genetics, 61, 79-89 (1969).

ESPOSITO, R.E., N. FRINK, P. BERNSTEIN y M.S. ESPOSITO "The genetic control of sporulation in *Saccharomyces*. II. Dominance and complementation of mutants of meiosis and spore formation". Molec. Gen. Genet., 114, 241-248 (1972).

ESPOSITO, M.S. y R.E. ESPOSITO "Genes controlling meiosis and spore formation in yeast". Genetics 78, 215-225 (1974a).

ESPOSITO, R.E. y M.S. ESPOSITO "Genetic recombination and commitment to meiosis in *Saccharomyces*". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3172-3176 (1974b).

ESPOSITO, M.S., R.E. ESPOSITO y P.B. MOENS "Genetic analysis of two spored asci produced by the *spo3* mutant of *Saccharomyces*". Molec. Gen. Genet., 135, 91-95 (1974).

ESPOSITO, M.S., M. BOLOTIN-FUKUHARA y R.E. ESPOSITO "Antimutator activity during mitosis by a meiotic mutant of yeast". Molec. Gen. Genet., 139, 9-18 (1975).

FINCHAM, J.R.S., P.R. DAY y A. RADFORD "Fungal Genetics" Blackwell Scientific Publications, fourth edition, vol. 4 (1979).

FINK, G.R. "The biochemical genetics of yeast". In: "Methods in Enzymology", (Tabor, H. y Tabor, C.W., eds.) Academic Press, New York and London, vol. XVIIIA: 59-78 (1970).

FINK, G.R. y J. CONDE "Studies on *kar1*, a gene required for nuclear fusion in yeast". In: International Cell Biology, (B.R. Brinkley and K.R. Porter, eds.) Rockefeller Univ. Press, 414-419, 1976-77.

FOGEL, S. y R. ROTH "Mutations affecting meiotic gene conversion in yeast". Molec. Gen. Genet., 130, 189-201 (1974).

FOWELL, R.R. "Hybridization of yeasts by Lindregen's technique". J. Inst. Brewing., 57, 180-195 (1951).

GAME, J.C. y R.K. MORTIMER "A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast". Mutat. Res., 24, 281-292 (1974).

GOLDRING, E.S., L.J. GROSSMAN, D. KRUPNICK, D.R. CRYER y J. MARMUR "The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxy ribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide". J. Mol. Biol., 52, 323-335 (1970).

HABER, J.E. y J. GEORGE "A mutation that permits the expression of normally silent copies of mating-type information in *Saccharomyces cerevisiae*". Genetics, 93, 13-35 (1979).

HABER, J.E., W.T. SAVAGE, S.M. RAPOSA, B. WEIFFENBACH y L.B. ROWE "Mutations preventing transpositions of yeast mating type alleles". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77, 2824-2828 (1980).

HARASHIMA, S., Y. NOGI e Y. OSHIMA "The genetic system controlling homothallism in *Saccharomyces* yeasts". Genetics, 77, 639-650 (1974).

HARASHIMA, S. e Y. OSHIMA "Mapping of the homothallic genes HMa and HMa in *Saccharomyces* yeasts". Genetics, 84, 437-451 (1976).

HARTWELL, L.H. "Genetic control of the cell division cycle in yeast. II. Genes controlling DNA replication and its initiation". J. Mol. Biol., 59, 183-194 (1971).

HARTWELL, L.H. "Three additional genes required for DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol., 115, 966-974 (1973).

HARTWELL, L.H., R.K. MORTIMER, J. CULOTTI y M. CULOTTI "Genetic control of the cell division cycle in yeast. V. Genetic analysis of *cde* mutants". Genetics, 74, 267-286 (1973).

HARTWELL, L.H. "*Saccharomyces cerevisiae* cell cycle". Bacteriol. Rev., 38, 164-198 (1974).

HARTWELL, L.H., J. CULOTTI, J.P. PRINGLE y B.J. REID "Genetic control of the cell division cycle in yeast: a model". Science, 183, 46-51 (1974).

HARTWELL, L.H. "Sequential function of gene products relative to DNA synthesis in the yeast cell cycle". J. Mol. Biol., 104, 803-817 (1976).

HEREFORD, L.M. y L.H. HARTWELL "Sequential gene function in the initiation of *Saccharomyces cerevisiae* DNA synthesis". J. Mol. Biol., 84, 445-461 (1974).

HICKS, J.B. e I. HERSKOWITZ "Interconversion of yeast mating types. II. Restoration of mating type ability to sterile mutants in homothallic and heterothallic strains". Genetics, 85, 373-393 (1977).

HICKS, J.B., J.N. STRATHERN e I. HERSKOWITZ "Interconversion of yeast mating types. III. Action of the homothallism (HO) gene in cells homozygous for the mating type locus". Genetics, 85, 395-405 (1977a).

HICKS, J.B., J.N. STRATHERN, e I. HERSKOWITZ "The cassette model of mating-type interconversion". In: DNA insertion elements, plasmids and episomes, (A.I. Bukhari, J.A. Shapiro y S.L. Adhya, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, p. 457-469 (1977).

HICKS, J., J.N. STRATHERN y A.J.S. KLAR "Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae*". Nature, 282, 478-483 (1979).

HIRSCHBERG, J. y G. SINCHEN "Commitment to the mitotic cell cycle in yeast in relation to meiosis". Expl. cell Res., 105, 245-252 (1977).

HOPPER, A.K. y B.D. HALL "Mutation of a heterothallic strain to homothallism". Genetics, 80, 77-85 (1975b).

HOPPER, A.K., J. KIRSCH y B.D. HALL "Mating type and sporulation in yeast. II. Meiosis recombination, and radiation sensitivity in an α diploid with altered sporulation control". *Genetics*, 80, 61-76 (1975).

HOPPER, A.K. y B.D. HALL "Mating type and sporulation in yeast. I. Mutations which alter mating-type control over sporulation". *Genetics*, 80, 41-59 (1975a).

KASSIR, Y. y G. SIMCHEM "Regulation of mating and meiosis in yeast by the mating-type region". *Genetics*, 82, 187-206 (1976).

KASSIR, Y. y G. SIMCHEM "Meiotic recombination and DNA synthesis in a new cell cycle mutant of *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics*, 90, 49-68 (1978).

KLAR, A.J.S. y S. FOGEL "Activation of mating type genes by transposition in *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 4539-4543 (1979).

KLAR, A.J.S., S. FOGEL y K. MACLEOD "*MAR1*- A regulator of the HMa and HM α loci in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics*, 93, 37-50 (1979).

KUSHNER, P.T., L.C. BLAIR e I. HERSKOWITZ "Control of yeast cell types by mobile genes: A test". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, 5264-5268 (1979).

LANCASHIRE, W.E. y J.R. MATTON "Cytoduction: a tool for mitochondrial genetic studies in yeast". *Molec. Gen. Genet.*, 170, 333-344 (1979).

LIPKE, P.N., A. TAYLOR y C.E. BALLON "Morphogenic effects of α -factor in *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol., 127, 610-618 (1976).

LIVINGSTON, D.M. "Inheritance of the 2 μ m DNA plasmid from *Saccharomyces*". Genetics, 86, 73-84 (1977).

LODDER, J. "The yeasts, a taxonomic study", North-Holland Publ., Amsterdam, (1970).

MacKAY, V.L. y T.R. MANNEY "Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Isolation and phenotypic characterization of non-mating mutants". Genetics, 76, 255-271 (1974a).

MacKAY, V.L. y T.R. MANNEY "Mutations affecting sexual conjugation and related processes in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic analysis of non-mating mutants". Genetics, 76, 273-288 (1974b).

MALONE, R.E. y R.E. ESPOSITO "The *RAD52* gene is required for homothallic interconversion of mating types and spontaneous mitotic recombination in yeast". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 77, 503-507 (1980).

MOENS, P.B. y E. RAPPORT "Spindles, spindle plaques, and meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen)". J. Cell Biol., 50, 344-361 (1971).

MOENS, P.B., y R.E. ESPOSITO y M.S. ESPOSITO "Aberrant nuclear behavior at meiosis and anucleate spore formation by sporulation-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*". Exptl. Cell Res., 83, 166-174 (1974).

MORTIMER, R.K. y D.C. HAWTHORNE "Yeast genetics" In: The yeasts (Rose, A.H. y Harrison, J., eds.) Academic Press, New York, vol. 1, 385-460 (1969).

NAUMOV, G.I. e I.I. TOLSTORNOV "Comparative genetics of yeast. X. Reidentification of mutators of mating types in *Saccharomyces*". Genetika, 9, 82-91 (1973).

PIÑON, R. "Effects of ammonium ions on sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*". Expl. Cell. Res., 105, 367-378 (1977).

PLISCHKE, M.E., R.C. VON BORSTEL, R.K. MORTIMER y W.E. COHN "Genetic markers and associated gene products in *Saccharomyces cerevisiae*". In: Handbook of Biochemistry and Molecular Biology Nucleic Acid, vol. II, tercera edición (G.D. Fasman, ed.) Chemical Rubber Co. Press, Akron, Ohio, p. 767-832 (1976).

POMPER, S. y P.R. BURKHOLDER "Studies on the biochemical genetics of yeast". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 35, 456-464 (1949).

RINE, J., J.N. STRATHERN, J.B. HICKS, e I. HERSKOWITZ "A supressor of mating-type locus mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for and identification of cryptic mating-type loci". Genetics, 93, 877-901 (1979).

ROTH, R. "Temperature-sensitive yeast mutants defective in meiotic recombination and replication". Genetics, 83, 675-685 (1976).

ROTH, R. y S. FOGEL "A system selective for yeast mutants deficient in meiotic recombination". Molec. Gen. Genet., 112, 295-305 (1971).

ROTH, R. "Chromosome replication during meiosis: identification of gene functions required for premeiotic DNA synthesis". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 3087-3091 (1973).

SHERMAN, F. y C.W. LAWRENCE "*Saccharomyces*". In: Handbook of Genetics (R.C. King, ed.) Plenum Press, New York and London, vol. 1, 359-393 (1974).

SHERMAN, F., G.R. FINK y C.W. LAWRENCE "Methods in yeast genetics". In a "Laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory for quantitative Biology, New York (1977).

SIMCHEM, G "Are mitotic functions required in meiosis?". Genetics, 76, 745-753 (1974).

SIMCHEM, G. y J. HIRSCHBERG "Effect of the mitotic cell-cycle mutation *cdc4* on yeast meiosis". Genetics, 86, 1-15 (1977).

SLATER, M.L. "A rapid nuclear staining method for *Saccharomyces cerevisiae*". J. Bacteriol., 126, 1339-1341 (1976).

SLOTZER, D., H.H. KILTZ y W. DUNTZE "Primary structure of α -factor peptides from *Saccharomyces cerevisiae*". Eur. J. Biochem., 69, 397-400 (1976).

STRATHERN, J.N., L.C. BLAIR e I. HERSKOWITZ "Heating of *mat* mutations and control of mating type inter-conversion by the mating type locus in *Saccharomyces cerevisiae*". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 3425-3429 (1979a).

STRATHERN, J.N., C.S. NEWLON, I. HERSKOWITZ y J.B. HICKD "Isolation of a circular derivative of yeast chromosome III: implications for the mechanism of mating type interconversion". *Cell*, 18, 309-319 (1979b).

STRATHERN, J.N., E. SPATOLA, C. MCGILL y J.B. HICKS "Structure and organization of transposable mating type cassettes in *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77, 2839-2843 (1980).

TAKANO, I., T. KUSUMI e Y. OSHIMA "An α -mating-type insensitive to the mutagenic action of the homothallic gene system in *Saccharomyces diastaticus*". *Molec. Gen. Genet.*, 126, 19-28 (1973).

TAKANO, I. y K. ARIMA "Evidence of the insensitivity of de α -*inc* allele to the function of the homothallic genes in *Saccharomyces yeast*". *Genetics*, 91, 245-254 (1979).

THROM, E. y W. DUNTZE "Mating-type-dependent inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.*, 104, 1388-1390 (1970).

VEZINHET, F., M. PELLECUER, P. GALZY y J. PASERO "Study of some anomalies of copultation in *Saccharomyces cerevisiae* Hansen". *Heredity*, 35, 109-114 (1975).

WILKINSON, L.E. y J.R. PRINGLE "Transient G1 arrest of *S. cerevisiae* cells of mating type α by a factor produced by cells of mating type a ". *Expl. Cell Res.*, 89, 175-187 (1974).

WRIGHT, R.E. y J. LEDERBERG "Extranuclear transmission in yeast heterokaryons". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 43, 919-923 (1957).

ZAKHAROV, Y.A., L.V. YURTHENKO, y B.P. YAROVY "Cyto-duction: autonomous transfer of cytoplasmic heredity factors in the course of mating in yeast". Genetika, 5, 136-141 (1969).

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han hecho posible esta Tesis.

De forma especial al Dr. Jaime Conde Zurita por su dirección. Al profesor Cerdá Olmedo por su ayuda durante estos años. A todos mis compañeros del Departamento de Genética, en especial a Paco Murillo y a Paco Castillo. A Rafalito y Lourdes por su ayuda con las fotos. A Asun por su ayuda técnica.

Sin la ayuda de Reyes y Maribel, hubiese perdido la carrera contra el reloj.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
a la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Julio Polama Molina
titulada "Auditoria Genética de la cariogamia
en Saccharomyces cerevisiae"

acorda otorgarle la calificación de Sobresaliente
"Cum Laude"

Sevilla, _____ de _____

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Elmundo

[Signature]

J. Lerdá Olmedo

El Presidente,
El Presidente,

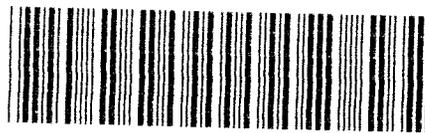
El Secretario,
El Secretario,

El Secretario,

[Signature]

[Signature]
B.

[Signature]



500292230

FBI E TO-029

292230